



**"OBTENCION DE LINEAS CELULARES PRODUCTORAS  
DE LAS ISOFORMAS DE 20 Y 22 KD DE  
LA HORMONA DEL CRESIMIENTO HUMANO**

**TESIS**

**QUE CON OPCION AL TITULO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR  
E INGENIERIA GENETICA**

**PRESENTA:**

**Q.F.B. ROCIO ORTIZ LOPEZ**

**MONTERREY, N.L., NOVIEMBRE DE 1992**



TM

Z6658

FM

1992

07

TM

Z6658

FM

1992

07



1020071209



OBTENCION DE LINEAS CELULARES PRODUCTORAS DE LAS  
ISOFORMAS DE 20 Y 22kDa DE LA HORMONA  
DEL CRECIMIENTO HUMANO

T E S I S

QUE CON OPCION AL TITULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR

E INGENIERIA GENETICA

PRESENTA

ROCIO ORTIZ LOPEZ

Monterrey, N.L., Noviembre de 1992

TL1  
2-28  
F01  
1992  
C7



**FONDO TESIS**

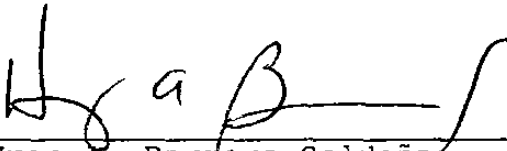
24061


"OBTENCION DE LINEAS CELULARES PRODUCTORAS DE LAS  
ISOFORMAS DE 20 Y 22kDa DE LA HORMONA  
DEL CRECIMIENTO HUMANO"

Por:

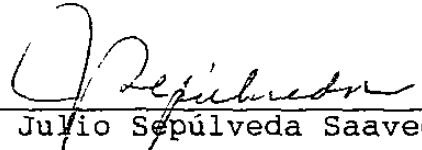
ROCIO ORTIZ LOPEZ

El comité de tesis:

  
Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

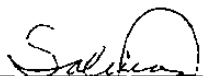
  
Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez.

  
Dra. Martha Guerrero de Viader.

  
Dr. Julio Sepúlveda Saavedra.

  
Dr. Jesús Zacarías Villarreal Pérez.

Aprobó:

  
Dr. Mario César Salinas Carmona  
Secretario de las Ciencias Básicas  
Sub-dirección de Investigación y Estudios de Postgrado  
Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

Este trabajo de tesis se realizó en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña y con la co-asesoría de la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez.

## DEDICATORIA

*A la memoria de mi padre  
Al gran amor y comprensión de mi madre  
A mi hermano, por su cariño y apoyo incondicional  
A Augusto el de la Cordillera de los Andes  
A mis familiares, a mis amigos y a todos aquéllos que  
creemos en la ciencia y nos enajenamos por ella*



## AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. H. Barrera, mi director de tesis, quien con su caracter me enseñó a discernir por mi misma y a templarme el espíritu en este mundo de la ciencia donde además del conocimiento, la paciencia y la entrega son necesarios para continuar la búsqueda infinita.

A Hugo, la otra parte del Dr. Barrera, por su amistad y apoyo en muchos de los tiempos difíciles. Gracias.

A la Dra. Herminia Martínez Rodriguez, por su asesoría en este trabajo y sobre todo por el interés que muestra para sus alumnos.

A mi comisión de tesis, por sus valiosas sugerencias.

A la Dra. Martha Guerrero, además de su interés, sus sugerencias y su tiempo, gracias por su comprensión.

Al Dr. Guillermo Elizondo, director del Centro Internacional de Biología Molecular y Celular, A.C. por su apoyo económico y moral otorgado.

Al Dr. Juan Pablo Martínez Soriano, por su amistad y ayuda.

Al Laboratorio de Endocrinología del Hospital Universitario "José Eleuterio González", por su colaboración en las pruebas de radioinmunoensayo.

Al Dr. Antonio Luna por su gran disposición y excelente trabajo fotográfico.

Al Dr. Mario César Salinas, al Dr. Jesús Zacarias Villarreal y al Lic. Armando Nájera, por su valiosa ayuda en los trámites para la presentación de mi exámen.

A mis primeros compañeros de laboratorio: Diego, Alfredo, Jaime, Paty, Manuel, Kiwi, Rosy y especialmente Vitorio, de quienes guardo un especial recuerdo.

A los de aquí (que estan o que pasaron por aquí): Augusto por supuesto (mi cachaco preferido), Ata (el gran ser), Jorge (el buen George), Eddy, Norma, Carmen, Lolita, Zavala (el compañero), Déctor (el príncipe Jaroch), Mario (el pollo), Chapis (mi estimada), a Ruy, Catty, Roberto, Jorge, Victor, Leslie, Laura, Angela y Ana, porque finalmente uno termina queriéndolos mucho.

A Diana y a Claudio, por todas las batallas sostenidas (a favor o en contra nuestra?), por los apoyos morales, por las travesuras (muchas, incluyendo la última), por los pleititos, por aquéllos días de seminario, por las alegrías, en fin, por todas las cosas que hacen a los amigos.

A todas las maestras y maestros del departamento de Bioquímica.

A las secretarias: Mirthala, Leonor, Chelita, Gladys y Rosy, por su buena disposición y ayuda.

A Raúl y a Lalo, al Sr. Aroon, Dn. Ponchito y a Dn Pedro, mi ~~car~~carino.

# INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA FIGURAS Y TABLAS.....	ii
RESUMEN.....	1
<b>INTRODUCCION</b>	
1. LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO.	
1.1. Actividad biológica de HGH.....	3
1.2. Síntesis y regulación fisiológica.....	5
1.3. Estructura y aspectos bioquímicos.....	6
1.4. Aspectos moleculares.....	7
1.5. Potencial farmacológico de HGH 20kDa y perspectivas para su producción.....	14
2. El MODELO CHO/MTX/DHFR	
2.1. Elementos del modelo CHO/DHFR/MTX.....	17
2.2. Características de la amplificación.....	19
3. ANTECEDENTES PARTICULARES.....	22
OBJETIVOS E HIPOTESIS.....	24
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	
1. ESTRATEGIA GENERAL DEL TRABAJO.....	25
2. ORIGEN DEL MATERIAL Y LOS REACTIVOS.....	28
3. ORIGEN DEL MATERIAL BIOLOGICO.....	29
4. METODOS.....	30
4.1. PRIMERA FASE: Clonación de los ADNcs de HGH 20 y 22kDa en el plásmido pNUT.....	30
4.2. SEGUNDA FASE: Transfección, selección y amplificación.	
4.2.1. Cultivo de células.....	32
4.2.2. Ensayos de la enzima cloranfenicol-acetil- transferasa.....	32
4.2.3. Determinación de los niveles de toxicidad de MTX en la línea celular CHODG44.....	33
4.2.4. Transfección y selección de células CHO/DHFR(+). .....	33
4.2.5. Estrategia de amplificación con dosis crecientes de MTX.....	34
4.2.6. Estrategia alternativa de amplificación...	35

4.2.7. Detección de HGH.....	35
4.2.8. Estandarización del Western Blot.....	36
4.3. TERCERA FASE: Análisis de la expresión e integración de los ADNcs de HGH20 y 22kDa mediante la RCP.....	37
4.3.1. Estandarización de la RCP.....	38
4.3.2. Análisis de la expresión de los ADNcs de HGH20 y 22kDa.....	40
4.3.3. Análisis de la integración y estable- cimiento del número de copias por genoma, de los minigenes de 20 y 22kDa en las células CHODG44.....	41

## RESULTADOS Y DISCUSION

1. Los plásmidos pNUTHGH20kD y pNUTHGH22kD.....	44
2. Ensayo de CAT en la línea celular CHODG44.....	49
3. Ensayos de toxicidad del MTX en la línea celular CHODG44.....	51
4. Expresión de HGH detectada por RIA.....	51
5. Expresión de HGH detectada por Western blot.....	56
6. Estandarización de la RCP.....	57
7. Análisis por RCP de la expresión de los ADNcs trans- fectados.....	58
8. Análisis de la integración de los ADNcs.....	60
9. Determinación del número de copias.....	60

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	66
----------------------------------	----

BIBLIOGRAFIA.....	71
-------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN.....	Acido desoxirribonucleico
ADNc.....	ADN complementario al ARN mensajero
ARN.....	Acido ribonucleico
ARNm.....	ARN mensajero
CAT.....	Cloranfenicol acetil transferasa
CHODG44..	Línea celular de Ovario de <u>Hamster</u> Chino, deficiente de la DHFR
BGH.....	Hormona del crecimiento bovino
DHFR.....	Enzima dihidrofolato reductasa
dhfr.....	Gen para DHFR
DMEM.....	Medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
GH.....	Hormona del crecimiento
GHRH.....	Hormona liberadora de la GH
h.....	Hora (s)
hCMV.....	Citomegalovirus humano
HGH.....	Hormona del crecimiento humano
h-HGH....	HGH obtenida de hipófisis
hGH <sub>N</sub> .....	Gen normal para HGH
HPL.....	Hormona lactogénica placentaria
kDa.....	Kilodaltones
kpb.....	Kilopares de bases
M.....	Concentración molar
met-HGH..	Forma metionil-HGH
mg.....	Miligramos
min.....	Minuto (s)
ml.....	Mililitros
MTX.....	Metotrexato
µg.....	Microgramos
µl.....	Microlitros
nM.....	Nanomolar
pb.....	Pares de bases
PGH.....	GH porcina
pH.....	Logaritmo negativo de la concentración de iones H <sup>+</sup>
pMT.....	Promotor del gen metalotioneína
Prl.....	Prolactina
RCP.....	Reacción en cadena de la polimerasa
RIA.....	Radioinmunoensayo
SDS.....	Dodecil sulfato de sodio
SBF.....	Suero bovino fetal
Sm.....	Somatomedina
SMC.....	Sitio múltiple de clonación
St.....	Somatostatina
SV40.....	Virus 40 del simio



## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1:	Regulación de la secreción de HGH.....	5
Figura 2:	Secuencia de aminoácidos de HGH22kDa y modelo tridimensional general para las GHs	8
Figura 3:	Complejo multigénico hGH-hPL.....	10
Figura 4:	Ciclo del dihidrofolato (FH <sub>2</sub> ).....	18
Figura 5:	Estructura del minigen HGH.....	21
Figura 6:	Estrategia general del trabajo experimental.....	27
Figura 7:	Estrategia de clonación utilizada para el ensamblaje de los minigenes HGH 20 y 22kDa en el vector pNUT.....	31
Figura 8:	Estrategias utilizadas para la cuantificación del número de copias génicas.....	40
Figura 9:	Mapas de restricción y organización de los plásmidos: pNUTHGH20kD, pNUTHGH22kD y pNUT(-).....	46
Figura 10:	Patrones electroforéticos de los plásmidos pNUTHGH20kD, pNUTHGH22kD y pNUT cortados con las enzimas de restricción <u>PvuII</u> , <u>BamH1+RsaI</u> y <u>BamH1+EcoRI</u> .....	47
Figura 11:	Patrones electroforéticos de los plásmidos pNUTHGH20kD, pNUTHGH22kD y pNUT cortados con las enzimas de restricción <u>PstI</u> , <u>BglII</u> y <u>SmaI</u> .....	48
Figura 12:	Resultados del ensayo CAT.....	50
Figura 13:	Ensayo de toxicidad con MTX en la línea celular CHODG44.....	51
Figura 14:	Expresión de HGH en células CHODG44 transfectadas.....	52
Figura 15:	Expresión de HGH en cultivos sometidos a dosis iniciales bajas de MTX seguida de dosis crecientes de la droga (Estrategia A).....	53

Figura 16:	Niveles de expresión de HGH en cultivos sometidos a dosis crecientes de MTX, iniciando con dosis altas de la droga (Estrategia B).....	54
Figura 17:	Comparación de la expresión de HGH en cultivos sometidos a ambas estrategias de amplificación.....	55
Figura 18:	Expresión de HGH 20 y 22kDa determinada por "Western blot".....	56
Figura 19:	Análisis de productos amplificados a partir de los híbridos ARN-ADnc.....	59
Figura 20:	Cuantificación del número de copias en la línea celular productora de HGH20kDa, resistente a 50 nM de MTX.....	62
Figura 21:	Cuantificación del número de copias en la línea celular productora de HGH22kDa, resistente a 50 nM de MTX.....	63
Figura 22:	Cuantificación del número de copias en la línea celular productora de HGH20kDa, resistente a 10 $\mu$ M de MTX.....	64
Figura 23:	Cuantificación del número de copias en la línea celular productora de HGH20kDa, resistente a 50 nM de MTX, utilizando la estrategia I.....	65
Tabla 1:	Efectos principales de HGH.....	4
Tabla 2:	Isoformas de las hormonas de crecimiento..	11
Tabla 3:	Resultados de la purificación de los plásmidos en gradiente de cloruro de cesio.....	49
Tabla 4:	Parámetros para la reacción de amplificación (RCP).....	58

## RESUMEN

La hormona del crecimiento humano (HGH) de 20 kilodaltones (20kDa) es una variante o isoforma (producto del mismo gen) de HGH de 22kDa que se encuentra en hipófisis humanas y sangre periférica constituyendo aproximadamente del 5 al 10% del total de HGH. Las dificultades para la purificación de esta variante han limitado su estudio y el esclarecimiento de su papel fisiológico. En nuestro laboratorio recientemente se lograron clonar, a partir de hipófisis humanas, los ADN complementarios (ADNcs) a los ARNs mensajeros (ARNms) correspondientes a HGHs de 20 y 22kDa. Con la finalidad de mejorar la disponibilidad de la variante de 20kDa y así poder estudiar diferencias en sus propiedades biológicas, se decidió expresar dicho ADNc en un sistema que permitiera su expresión estable y la sobreproducción de la hormona recombinante.

En este trabajo logré la obtención de tres líneas celulares, dos productoras de HGH20kDa y una productora de HGH22kDa, empleando el sistema CHO/DHFR/MTX que utiliza células de ovario de hámster chino (CHO) deficientes en el gen para la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). Este sistema permite la selección de células portadoras de un plásmido que incluya una copia del gen de interés (gen hGH) y otra del gen para la DHFR (gen dhfr) y posteriormente, utilizando metotrexato (MTX), un inhibidor de la DHFR, se induce la amplificación conjunta de dichos genes.

Probando variaciones en el esquema de inducción de la amplificación, encontré las condiciones que favorecen el establecimiento de cultivos estables con fenotipo normal y productores de la forma recombinante de la variante hormonal.

Confirmé la presencia de las isoformas de 20 y 22 kDa por "Western blot" y las células, actualmente resistentes a 100 nM de MTX, tienen niveles de producción de las hormonas recombinantes que rebasan  $1 \mu\text{g}/10^6$  células/día, las cuáles continúan siendo sometidas al proceso de amplificación. El análisis del ADN genómico de estas células mostró que el ADNc de HGH20kDa está amplificado en más de 100 copias e integrado al genoma celular.

# **INTRODUCCION**



# 1. LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO

## 1.1. Actividad biológica de HGH

HGH es esencial para el crecimiento postnatal y para el metabolismo normal de carbohidratos, lípidos y proteínas (1). Las propiedades inductoras del crecimiento de HGH se determinan mediante la prueba de ganancia de peso (valoración del incremento de peso en animales hipofisectomizados) y la prueba de alargamiento de la tibia (medición del crecimiento de las epífisis de las tibias después de inyecciones diarias de HGH en animales hipofisectomizados) (1,2).

Aunque con estas pruebas los efectos de HGH pueden ser fácilmente reconocidos, el sitio y el mecanismo celular de los efectos de la hormona no son claros. Uno de los mayores obstáculos en la exploración de los mecanismos de acción de HGH es la discrepancia de los efectos in vivo con los efectos observados in vitro. La administración de HGH in vivo produce una marcada estimulación de la condrogénesis y un subsecuente crecimiento somático acelerado. Sin embargo, cuando se adiciona la hormona a explantes de cartílago y a preparaciones de músculo, los efectos son casi nulos (2).

Esta discrepancia de efectos y la identificación de algunas proteínas en plasma, dependientes de GH, sugirieron que HGH estimula el crecimiento somático de manera indirecta, mediante factores de crecimiento llamadas somatomedinas (Sm), que funcionan como segundos mensajeros de GH (3). Las Sm, también llamados factores de crecimiento insulino-agonistas I y II (IGF I y II), son altamente dependientes de los niveles circulantes de HGH. Se ha probado que las preparaciones de IGFs libres de HGH, insulina, testosterona ó tiroxina y tienen el mismo potencial de HGH para

promover el crecimiento somático y el del cartílago. La regulación de la secreción de IGF-I es un proceso complejo influido por HGH, lactógeno placentario (HPL), prolactina (HPrl), hormonas esteroides (incluyendo glucocorticoides, estrógenos y andrógenos), hormonas tiroideas e insulina, así como el estado nutricional (2,3).

Recientemente, gracias a la disponibilidad de su forma recombinante (producida en bacterias), se ha demostrado que los efectos de HGH sobre el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas pueden dividirse dos: efectos semejantes a los de la insulina (insulino-agonistas) y efectos diabetogénicos (insulino-antagonistas) que se correlacionan respectivamente con los efectos agudos y crónicos (Tabla 1).

---



---

**TABLA 1. EFECTOS PRINCIPALES DE HGH\***

---



---

**I. EFECTOS INDIRECTOS:**

- Estimula crecimiento corporal.

**II. EFECTOS DIRECTOS:**

**A) Insulino-agonistas (efectos agudos)**

- Incrementa la captación intracelular de aminoácidos.
- Induce hipoglicemia y aumento de la oxidación de ácidos grasos.
- Estimula adipogénesis.

**B) Insulino-antagonistas (efectos crónicos)**

- Incrementa la resistencia a la insulina.
- Induce hiperglicemia (efecto diabetogénico).

---



---

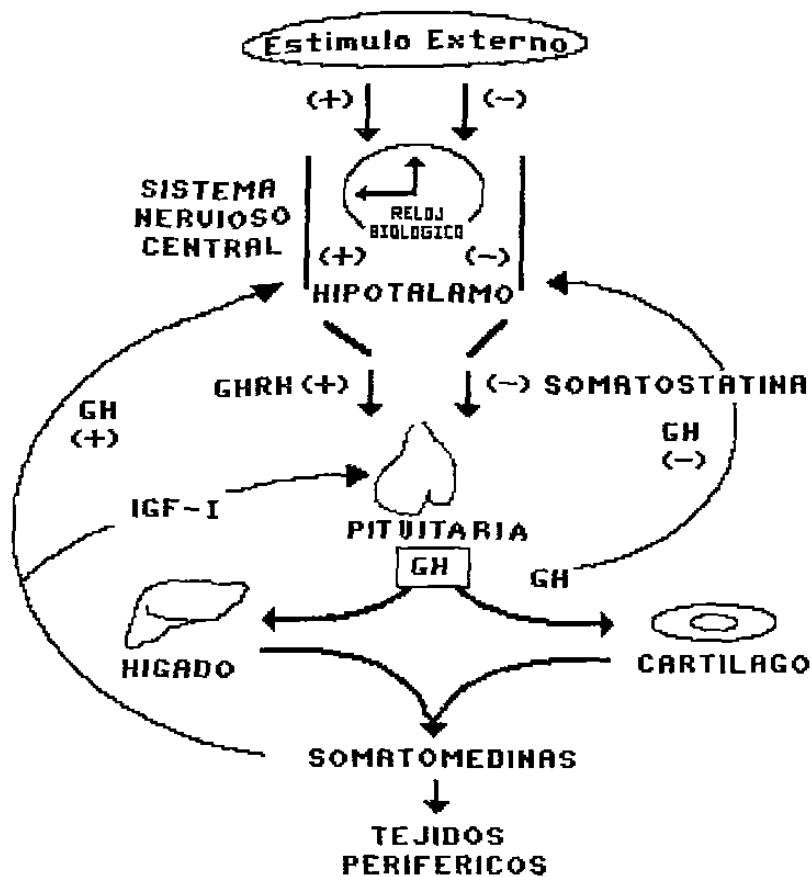
\*Información recabada de las referencias 2 y 3.

Estos efectos parecen ser intrínsecos a la molécula de HGH y estar mediados, en forma directa, por receptores en diversos tejidos (4).

## 1.2. Síntesis y regulación fisiológica

HGH es sintetizada por las células somatotrofas de la adenohipófisis. Tiene una vida media de aproximadamente 25 min y se secreta al torrente circulatorio a una tasa de aproximadamente 1 g/día (2,5). La secreción al torrente circulatorio es controlada por dos factores hipotalámicos: La hormona liberadora de GH (GHRH) que es el regulador positivo y la somatostatina (St) que es el regulador negativo. Tanto la GHRH como la St son modulados por el efecto de factores biológicos y ambientales como el estrés, el sueño, la hipoglicemia, algunos fármacos (L-dopa y clorpromazina) y las hormonas (andrógenos, estrógenos, vasopresina y la misma HGH) que actúan en el sistema nervioso central y particularmente sobre el hipotálamo (2, 7).

Recientemente se ha demostrado que la regulación positiva de GHRH se ejerce directamente a nivel del gen ( $hGH_{\alpha}$ ), induciendo la liberación de factores activadores de la transcripción, mientras que la somatostatina regula negativamente la secreción de HGH inhibiendo la movilización de calcio (al estabilizar reservas intracelulares de este ion) requerido para mediar la unión de HGH a su receptor (7).



**Figura 1.** Regulación de la secreción de HGH. Se representa la interacción de algunos órganos, tejidos y hormonas que determinan la regulación positiva o negativa de HGH. GHRH: Hormona liberadora de HGH, IGF-I: Factor de crecimiento insulinoagonista, Sm: Somatomedina y St: Somatostatina.

### 1.3. Estructura y aspectos bioquímicos

La isoforma de HGH mejor conocida es una proteína formada por una sola cadena polipeptídica de 191 aminoácidos, con los extremos amino y carboxi-terminales libres y dos enlaces disulfuro internos que la constriñen y dan origen a dos asas, una mayor y otra menor (Figura 2,A). Esta proteína es una globulina con un peso molecular aproximado de 22kDa. Se sintetiza como una pre-hormona de 217 aminoácidos con un péptido señal de 26 residuos hidrofóbicos en el extremo amino terminal de la proteína madura (5).

Recientemente Abdel-Meguid y cols. (6), gracias al desarrollo y mejoramiento de los métodos de purificación de proteínas y al análisis cristalográfico por difracción de rayos X, determinaron la estructura tridimensional de la hormona del crecimiento porcino (PGH). La alta similitud en secuencia aminoacídica que presentan las HGHs de diferentes especies sugiere que la estructura encontrada puede proponerse como un modelo tridimensional general para todas las GHs (Figura 2, B).

#### 1.4. Aspectos moleculares

El gen  $hGH_N$  se encuentra constituyendo el complejo multigénico  $hGH-hPL$  localizado en las bandas q22-q24 del cromosoma 17. Este complejo multigénico contiene dos genes para HGH y tres para HPL, todos con la misma orientación transcripcional y separados uno de otro por regiones intergénicas de 6 a 13 kilopares de bases (kpb).

La disposición de estos genes en el genoma humano es la siguiente:  $5'*-hGH_N$  (normal)- $hPL_1$ - $hPL_4$ - $hGH_V$  (variante)- $hPL_3*-3'$  (Figura 3A). La alta similitud entre los genes  $hGH$  y  $hPL$ , tanto en la secuencia (aproximadamente del 95%) como en la función de sus productos, sugiere que éstos se generaron por duplicación y divergencia a partir de un gen ancestral común (8, 9).

Los miembros de esta familia multigénica  $hGH-hPL$  se expresan en diferentes tejidos y bajo distintos mecanismos de control. El gen  $hGH_N$  es el único que se expresa en la hipófisis, mientras que el resto lo hace en placenta (10).



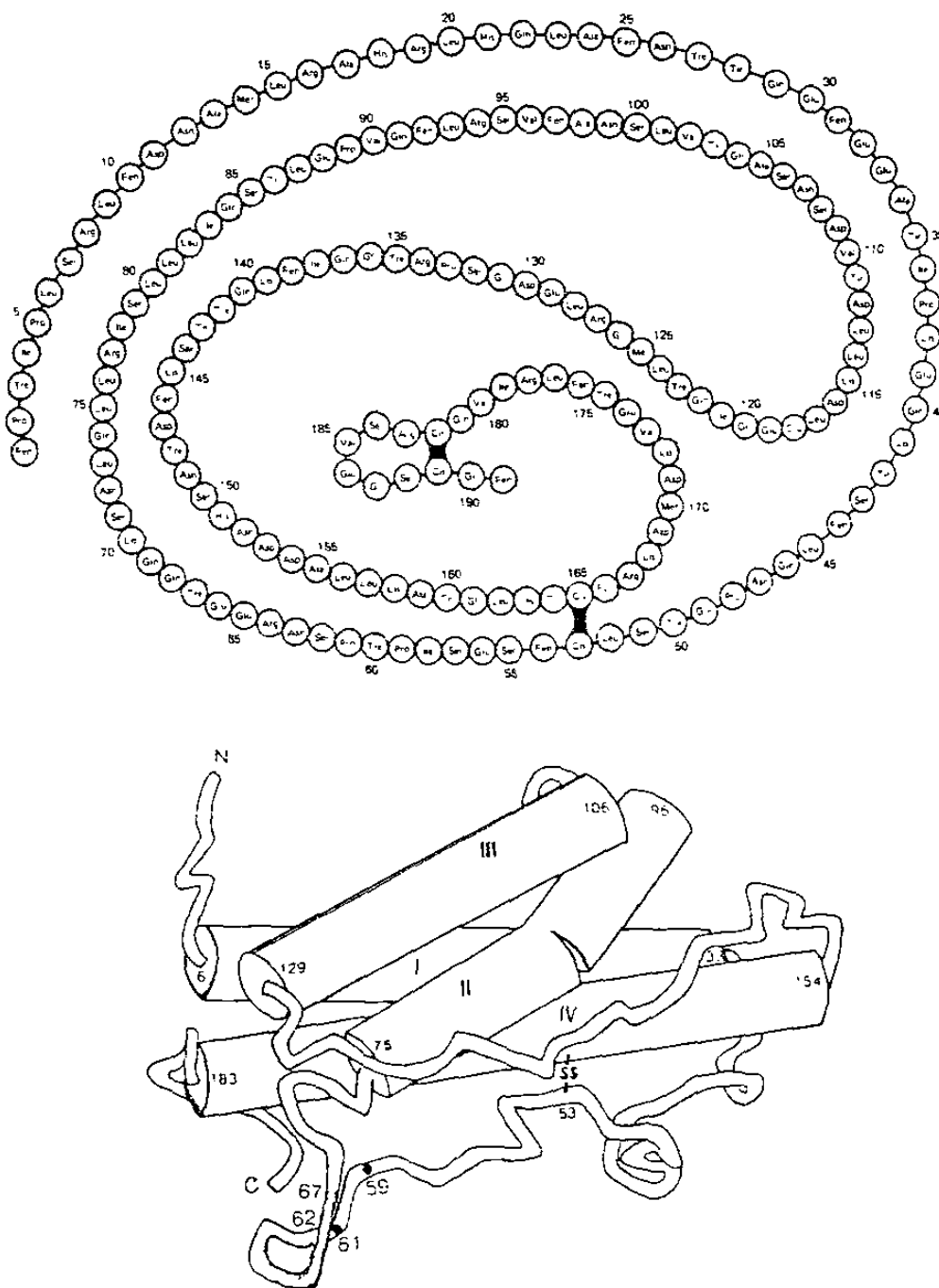
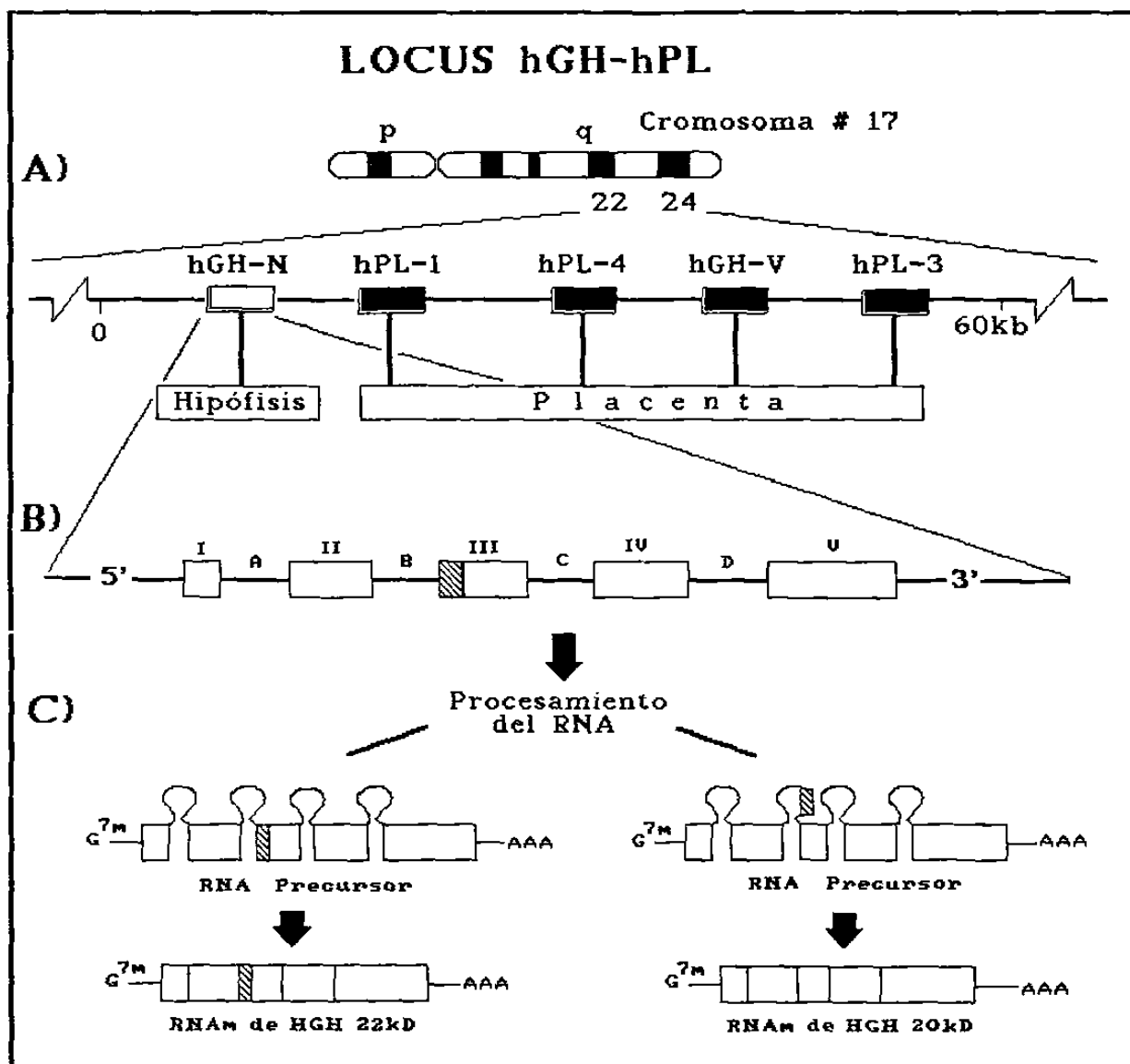


Figura 2. Secuencia de aminoácidos de HGH22kDa y modelo tridimensional general para las GHs. En (A) se muestran los 191 aminoácidos que constituyen a la proteína madura de HGH de 22kDa y la posición de sus enlaces disulfuro internos. El modelo tridimensional representado en (B) está basado en la estructura de PGH. Los cilindros representan la estructura  $\alpha$ -hélice y la numeración de los residuos aminoacídicos está hecha con base a la secuencia de HGH mostrada en (A).

Los cinco genes son muy similares en organización, cada uno presenta cinco exones interrumpidos en las mismas posiciones por cuatro intrones pequeños. Estos genes incluyen regiones simétricas invertidas, repetidas y palindrómicas que posiblemente unen proteínas importantes en la regulación de la expresión génica (10).

Numerosos estudios han revelado que tanto en la hipófisis como en la circulación periférica, el efecto de HGH está determinado por una colección de polipéptidos similares pero con estructura, motilidad electroforética y actividad biológica variable (11, 12). Propiamente, algunas de éstas corresponden a isoformas (productos de un mismo gen, generados por vías alternas de la maduración del ARNm), mientras que otras corresponden a agregados, formas inmaduras, etc.



**Figura 3. Complejo multigénico hGH-hPL.** A) Se representa la localización cromosómica, el tejido en el que se expresan, la disposición y la orientación de los cinco genes que constituyen este complejo. B) También, se muestra la anatomía molecular del gen hGH<sub>N</sub> con cinco exones (I a V) y cuatro intrones (A a D), la cuál es similar para los otros genes. C) Se ejemplifica el procesamiento alternativo del transcrito primario que da origen a los ARNm para las HGH de 20 y 22kDa.

Entre las isoformas de HGH, el componente fisiológico más abundante es HGH 22kDa, que corresponde aproximadamente al 85-90% de HGH, contenida en la hipófisis; el resto corresponde a las otras variantes identificadas (12).

Las variantes de GHs se han aislado y caracterizado a partir de la hipófisis, del plasma ó de bancos de ADNc. En la tabla 2 se resumen algunas de las características de las variantes hasta ahora identificadas (11, 12).

**Tabla 2. ISOFORMAS DE LAS HORMONAS DEL CRECIMIENTO HUMANO\***

ISOFORMA	C A R A C T E R I S T I C A
HGH 80kDa	HGH 22kDa unida a una proteína de transporte.
HGH 45kDa	Dímero de HGH 22kDa.
HGH 22kDa	La más abundante y mejor estudiada.
HGH 20kDa	Delección interna de los residuos 32 al 46 del Exon III, por procesamiento alternativo del transcrito del gen hGH <sub>N</sub> .
HGH 24kDa	Pre-hormona conservando los 26 aminoácidos del péptido señal.
HGH 24kDa	Rompimiento proteolítico entre los residuos 139 y 140 de HGH 22kDa, cambiando la conformación tridimensional y el comportamiento electroforético.
HGH 17.5kDa	Delección de todo el exón III (120 residuos), producto del procesamiento alternativo del transcrito del gen hGH <sub>N</sub> .

\* Tomado de las referencias 2, 3, 12.

Entre las isoformas de HGH, una que ha despertado mucho interés es la de 20kDa (HGH20kDa), que se ha encontrado en todas las muestras de hipófisis humanas y en sangre periférica constituyendo del 5 al 10% del total del contenido de HGH, lo que la convierte en la segunda más abundante (12).

Los estudios moleculares han demostrado que HGH 20kDa no es el resultado del rompimiento proteolítico de alguna de las porciones terminales de la cadena de HGH 22kDa y tampoco se ha encontrado un gen adicional que codifique para ésta y que pueda explicar su existencia (13, 14). La diferencia de aproximadamente 2kDa es producida por una delección de 15 residuos internos entre las posiciones aminoacídicas 32 y 46 de la cadena polipeptídica (15).

Wallis (14) sugirió un mecanismo para explicar la delección de los 15 residuos de la porción interna de la molécula polipeptídica. Teniendo en cuenta que el intrón B del gen de hGH<sub>N</sub> empieza después del codón que codifica para el residuo 31, el cuál es el punto de inicio de la delección, propuso que HGH 20kDa se formaba cuando un fragmento de la secuencia traducible del gen HGH (residuos 32 al 46) era incluido como parte del intrón B y se removía durante el procesamiento del ARN heterogéneo nuclear precursor (Figura 3).

DeNoto y cols. (15) y otros (16, 17), analizaron la secuencia y expresión del gen hGH<sub>N</sub> y del ADNC de HGH 22kDa, encontrando evidencias directas de que las HGHs de 20 y 22kDa eran producidas en la hipófisis durante el procesamiento alternativo del transcrito primario a partir del mismo gen hGH<sub>N</sub> (Figura 3).

En estudios hechos con ratas hipofisectomizadas se ha encontrado que las dos formas de HGH (20 y 22kDa) tienen potencia similar para promover el crecimiento y generar somatomedinas (18, 19). Pero se les han encontrado efectos diferentes sobre el metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos libres, tanto "in vitro" como "in vivo" (19, 20 y 21).

En contraste con HGH 22kDa, HGH 20kDa no acelera la utilización de glucosa y tiene actividad marcadamente disminuida, aunque no ausente, en sus efectos lipogénico e hiperglicemiante. Stevenson y cols. (2) mostraron que la capacidad de HGH para aumentar la secreción de insulina y el consecuente aumento en la captación de glucosa por las células, reside principalmente en los aminoácidos 32 a 38, lo que puede explicar la disminución de este efecto en HGH 20kDa.

Se ha determinado que la secuencia Tyr-Ile-Pro presente en la región removida en la variante, está presente en la insulina y se piensa que ésta podría ser la responsable de este efecto. Sin embargo, aun no está claro si GH tiene este efecto insulino-agonista per se o si tiene un efecto potenciador sobre la insulina (7).

El glutamato, normalmente presente en la posición 33 de HGH 22kDa es el principal residuo responsable de la unión de esta hormona con algunos receptores hepáticos, en un proceso mediado por calcio. La ausencia de este residuo en la HGH 20kDa altera la alta dependencia del ión calcio en la unión de HGH 20kDa con dichos receptores y estos hallazgos son consistentes con el bajo efecto insulino-agonista de HGH 20kDa (7).

En un modelo que utiliza la conversión de fibroblastos preadipocíticos a adipocitos, Morikawa y cols. (22) encontraron que HGH 20kDa es capaz de inducir el fenómeno de diferenciación adipocítica, adjudicándosele a esta variante una actividad adipogénica.

Algunas interrogantes se han resuelto parcialmente por la reciente introducción de sistemas in vitro y por el uso de nuevas tecnologías para la identificación y purificación de receptores. No se ha comprobado si cada uno de los diversos efectos de HGH

son mediados por receptores de diferentes categorías que especifican cada función o si son inducidos por un mismo receptor que pueda mediar diversas funciones (35 - 39).

El estudio comparativo entre HGH 22kDa y HGH 20kDa, que posee solo algunas de las propiedades fisiológicas, podrá ayudar a entender algunos de los mecanismos de las acciones de las GHs en general.

#### **1.5. Potencial farmacológico de HGH 20kDa y perspectivas para su producción**

En el campo farmacológico, GH ha demostrado ser útil para el tratamiento de niños con enanismo hipofisiario (7). Actualmente ha aumentado el interés en ella por la versatilidad terapéutica que parece ofrecer. Remueve ácidos grasos en el tratamiento de obesos y mejora la vascularización en ancianos. En pacientes con quemaduras de piel, úlceras y fracturas óseas, acelera el metabolismo y la regeneración tisular y su actividad hiperglicemiante se ha aprovechado en personas que sufren hipoglicemia (23). La GH ha resultado ser una de las clásicas hormonas anabólicas, la evidencia más simple de ello es que los niños con deficiencia de GH presentan aumento en la masa muscular después de la administración de GH como tratamiento. Actualmente HGH ha despertado interés entre los atletas por su potencial como anabólico (24).

Se ha reportado que los tratamientos prolongados con HGH 22kDa pueden desencadenar diabetes mellitus, hipertensión arterial y/o aterosclerosis como consecuencia de la actividad diabetogénica y lipogénica de esta hormona, por lo que se ha contemplado utilizar a la variante de 20kDa como alternativa para el tratamiento, con la finalidad de disminuir los efectos secundarios mencionados, ya que algunos autores manifiestan la

carencia del efecto diabetogénico en esta variante (25, 26). Sin embargo los trabajos con HGH 20kDa a este nivel son prácticamente inexistentes.

Las limitaciones que se han presentado para el estudio de esta variante radican en su obtención y en su purificación, pues existe una alta tendencia a la formación de dímeros entre moléculas de 20 y 22kDa, además de que las preparaciones de la hormona derivadas de hipófisis y/o suero no proporcionan un producto homogéneo, sino más bien una mezcla de múltiples variantes (27, 28). Más aun, debido a que HGH 20kDa representa solo el 5-10% de la hormona en la hipófisis y el 5% en el suero, las cantidades obtenidas en las purificaciones de ésta, han sido insuficientes para realizar estudios in extenso.

Una alternativa para superar estos problemas fue la producción de esta variante mediante la tecnología del ADN recombinante para evitar la heterogeneidad e incrementar las cantidades disponibles. Para ello Adelman y cols. (29) y posteriormente otros grupos (30, 31) obtuvieron biosintéticamente en bacterias la forma recombinante metionil-HGH 20kDa (met-HGHR 20kDa) y han continuado el estudio de esta hormona utilizando la forma recombinante en lugar de la natural obtenida de la hipófisis.

Ohmae y cols. (32) utilizaron las formas recombinantes de HGH (met-HGHs de 20 y 22kDa) para probar la actividad promotora del crecimiento, encontrando solamente el 10.7% y 93.5% de actividad para HGH 20 y 22kDa respectivamente, comparadas con la hormona derivada de la hipófisis (h-HGH). Tinsley y cols. (30) y Ader y cols. (31), en un intento de probar el efecto insulino-agonista, también utilizaron las formas metionil de las dos hormonas de 20 y 22kDa, sin encontrar diferencias en las respuestas.



La producción de met-HGhr 20kDa fue una alternativa muy útil para evitar los problemas de contaminación y escasez antes mencionados, sin embargo, la molécula producida en bacterias tiene un residuo metionil extra en el extremo amino y existen varios informes en la literatura que indican que aparentemente este residuo puede eventualmente ocasionar problemas en el uso prolongado de la hormona (30, 32) y finalmente los resultados obtenidos a la fecha después de los ensayos biológico que se han realizado, tampoco han sido concluyentes.

Hasta ahora no se ha reportado la producción de HGH 20kDa en un sistema eucariótico. Los resultados aún no concluyentes y las diferencias en los efectos hallados entre h-HGH 20kDa y met-HGH 20kDa sugieren la necesidad de producir esta variante en un sistema eucariote en el que pueda obtenerse HGH 20kDa idéntica a la natural y libre de los contaminantes más comunes de la fuente natural. Además, la producción de HGhr en eucariotes permite su síntesis en forma activa por lo que se evitan los problemas de desnaturalización y renaturalización, comunes en la sobreproducción de proteínas eucarióticas en bacterias.

Por todas estas razones se decidió generar en nuestro laboratorio, una nueva línea celular de mamífero capaz de producir la variante de HGH20kDa. Con ella buscamos aportar una fuente superior para la purificación de la hormona en cantidades suficientes para realizar estudios fisiológicos y farmacológicos que contribuyan al conocimiento de su función.

Para llevar a cabo este trabajo elegimos el modelo CHO/DHFR/MTX (33) ya que tiene la ventaja de ser un sistema que permite la amplificación (aumento del número de copias) del gen de interés y ha sido previamente utilizado para la producción exitosa de proteínas y vacunas recombinantes.

## 2. EL MODELO CHO/MTX/DHFR

### 2.1. Elementos del modelo CHO/DHFR/MTX

Entre los modelos conocidos para inducir amplificación génica, este es el mas ampliamente utilizado, el cuál involucra el gen de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) con dosis crecientes de la droga metotrexato (MTX) (33, 34, 35).

La DHFR es la enzima responsable de generar tetrahydrofolato ( $FH_4$ ) a partir de dihydrofolato ( $FH_2$ ) intracelular. Este es uno de los pasos intermediarios de la ruta metabólica para la síntesis de timidilato, el cuál es requerido para la biosíntesis de glicina, timidina monofolato y de las purinas, convirtiéndolo en un precursor directo en la síntesis de ADN (Figura 4). El papel central de la DHFR en la síntesis de precursores de ADN junto con su alta sensibilidad a los análogos del tetrahydrofolato han hecho de esta enzima un blanco muy común para el uso de agentes quimioterapéuticos.

El MTX es un análogo del folato, que compite con la misma afinidad que el  $FH_2$  por el sitio activo de la enzima DHFR agotando la cantidad de enzima libre necesaria para la formación de  $FH_4$ . Esto conduce a la inhibición de la síntesis de nucleótidos y consecuentemente a la muerte celular por inhibición de la síntesis de ADN de células en contacto con la droga.

En algunos pacientes cancerosos que habían sido sometidos a tratamientos prolongados con MTX, se observó que sus células cancerosas se volvían refractarias a la droga y no inhibían la síntesis del ADN. Los estudios realizados mostraron que la resistencia al MTX es el resultado de por lo menos tres mecanismos diferentes, los cuales, pueden ocurrir en forma simultánea:

- a) Transporte disminuído del MTX, en el que el MTX casi no penetra a la célula.
- b) Afinidad reducida de la enzima, en donde generalmente se encuentran mutantes de la enzima DHFR con poca ó nula actividad para el MTX.
- c) Sobreproducción de la DHFR (que es el más común de los casos de resistencia), debida a un incremento del número de copias del gen dhfr.

En este último caso, los incrementos en el número de copias son proporcionales a las dosis crecientes de MTX adicionados. Estudios posteriores con análisis más finos mostraron que la amplificación del gen dhfr se efectúa conjuntamente con la amplificación de regiones de ADN vecinas al gen (35).

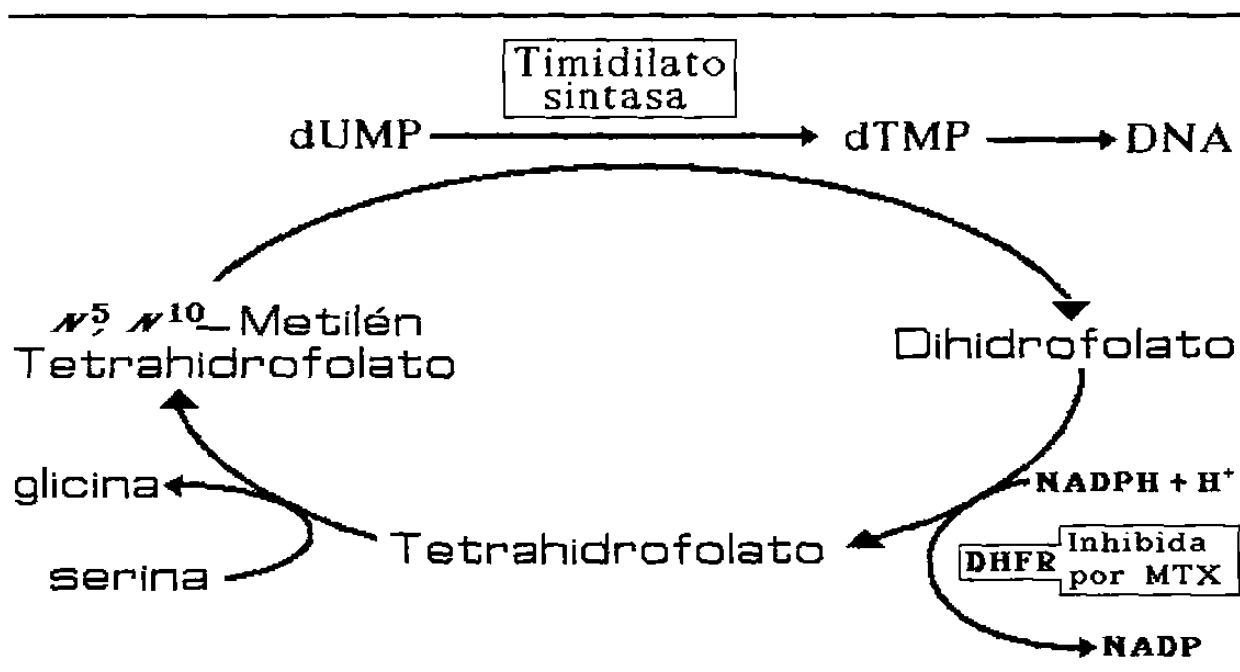


Figura 4. Ciclo del dihidrofolato (FH<sub>2</sub>). El MTX compite con el FH<sub>2</sub> por el sitio activo de la enzima DHFR, la cual interviene en la síntesis del FH<sub>4</sub>, produciendo un bloqueo en la vía de la síntesis de novo de las purinas.

Actualmente existen líneas celulares mutantes, deficientes en la enzima DHFR que no pueden sintetizar  $FH_4$  y por lo tanto no pueden utilizar la síntesis de novo de las purinas y solo pueden mantenerse en cultivo si se les adiciona constantemente medio suplementado con purinas, timidina y glicina. La línea celular más utilizada para éste propósito es una mutante de CHO mutante, carente del gen dhfr (33, 36). La transfección de estas células DHFR(-) con vectores que portan una copia del gen dhfr, resulta en la generación de células que pueden crecer en medio de cultivo sin suplemento de purinas y con estas condiciones se seleccionan únicamente aquéllas células que incorporan el plásmido y se convierten en DHFR(+) (35).

Las células que carecen de la actividad de DHFR pueden ser transfectadas con plásmidos recombinantes que contengan a la vez el gen de interés y el gen dhfr ó alternativamente, el ADN de interés puede ser transfectado en paralelo (cotransfección) junto con otro plásmido que contenga el gen dhfr. De cualquiera de las dos formas, los ADNs tienden a expresarse cuando las células se someten a una selección con medio no suplementado con nucleótidos. Además, si se induce la amplificación del gen dhfr mediante dosis crecientes de MTX ambos genes pueden coamplificarse e inducir la sobre-expresión de la proteína de interés. De este modo, el mismo sistema DHFR que permite la selección de clones DHFR(+) nos otorga la ventaja de convertirse en un sistema amplificable (33, 36).

## 2.2. Características de la amplificación

La estructura física del elemento extracromosómico amplificable se desconoce y el tamaño de la región amplificada, así como el tamaño de la unidad adyacente al gen son altamente variables tanto de una célula a otra como entre líneas celulares diferentes y en algunos casos el ADN amplificado resulta de

duplicaciones invertidas en tandem (34, 35)..

Después de varios meses de cultivo en concentraciones crecientes de MTX, se puede obtener una línea celular que porta más de mil copias del gen dhfr. Generalmente, el tamaño de las unidades amplificadas mediante este sistema, estimada por análisis citogenéticos, es altamente variable pero puede estar entre una a 100 ó hasta 500 kpb.

Durante la propagación de células en cultivo, el ADN amplificado puede sufrir cambios que comprenden: 1) Círculos de ADN extracromosómicos de tamaños variables, dependiendo de las duplicaciones en tandem, 2) cambios en las posiciones de los sitios de recombinación y/o 3) aumento en el índice de mutaciones de la unidad amplificada, comparada con la copia única del gen original.

Los intermediarios extracromosómicos pueden aumentar de tamaño, formando estructuras múltiples de sí mismos y estas secuencias son las que eventualmente se integran para formar regiones homogéneamente teñidas (HSRs) en los cromosomas.

Los genes amplificados en líneas celulares recientemente resistentes, son inestables. Más aún, cuando las células se propagan en ausencia del agente selectivo, el gen amplificado frecuentemente se pierde. El grado de estabilidad de los genes amplificados en ausencia de la droga de selección puede correlacionarse con la localización de los genes amplificados y la complejidad de los rearrreglos cromosómicos.

En las líneas amplificadas de forma inestable, los genes dhfr se encuentran en regiones extracromosómicas, como elementos de replicación autónoma denominados minidiplocromosomas (DMs), los cuáles no contienen centrómeros y se pierden rápidamente

cuando las células se reproducen en ausencia de un agente selectivo.

En contraste, en las líneas celulares en las que los genes amplificados son estables, las secuencias que han sido integradas en el cromosoma se asocian a HSRs que se mantendrán y se heredarán a las células hijas. En ésta última circunstancia, los genes amplificados pueden mantenerse aún sin el agente selectivo durante tiempo indefinido.

### 3. ANTECEDENTES PARTICULARES

Para iniciar este trabajo partí de los siguientes antecedentes (37):

1) En nuestro laboratorio se logró aislar y clonar, a partir de hipófisis humanas, los ADNcs de las HGH de 20 y 22kDa. Estos están constituidos por un fragmento de aproximadamente 600 pb, delimitado por los sitios de restricción Aat II y Xma I y comprenden la casi totalidad de la región codificante del ADNc para cada hormona.

2) Con la finalidad de inducir la expresión de los ADNcs en cultivo, éstos se fusionaron por la parte 5' en el sitio Aat II con una secuencia que codifica para el péptido señal y el codón de iniciación de la transcripción del gen hPL. Por la parte 3' en el sitio Xma I, se ligaron a una secuencia que codifica para señales de poliadenilación y terminación de la transcripción del gen hGH<sub>N</sub>. Esta fusión dió como resultado final un "minigen" para cada ADNc (Figura 5), éstos fueron incorporados, en forma independiente, en el vector de expresión eucariótico pAVE2 dando origen a dos plásmidos susceptibles de expresarse eficientemente y en forma transitoria, en células en cultivo.

Basándome en estos logros, emprendí entonces la tarea de obtener la expresión estable del minigen para HGH 20kDa en un sistema que involucra la amplificación del minigen, según el modelo CHO/DHFR/MTX anteriormente descrito. Utilicé la línea celular CHODG44 DHFR(-) (36) y la transfecté con un plásmido que portaba tanto el minigen de HGH20kDa como el ADNc que codifica para la enzima DHFR. Induje el proceso de amplificación y selección de la información genética introducida a las células con la droga MTX, para convertir así a la línea celular

resultante en una productora estable y continua de la forma recombinante de la variante. A la par de todos los experimentos para HGH20kDa, llevé a cabo los mismos ensayos para HGH22kDa que me sirvieron de testigo positivo a lo largo de éste trabajo, de manera que finalmente logré la obtención de líneas celulares productoras de HGH20kDa y HGH22kDa.

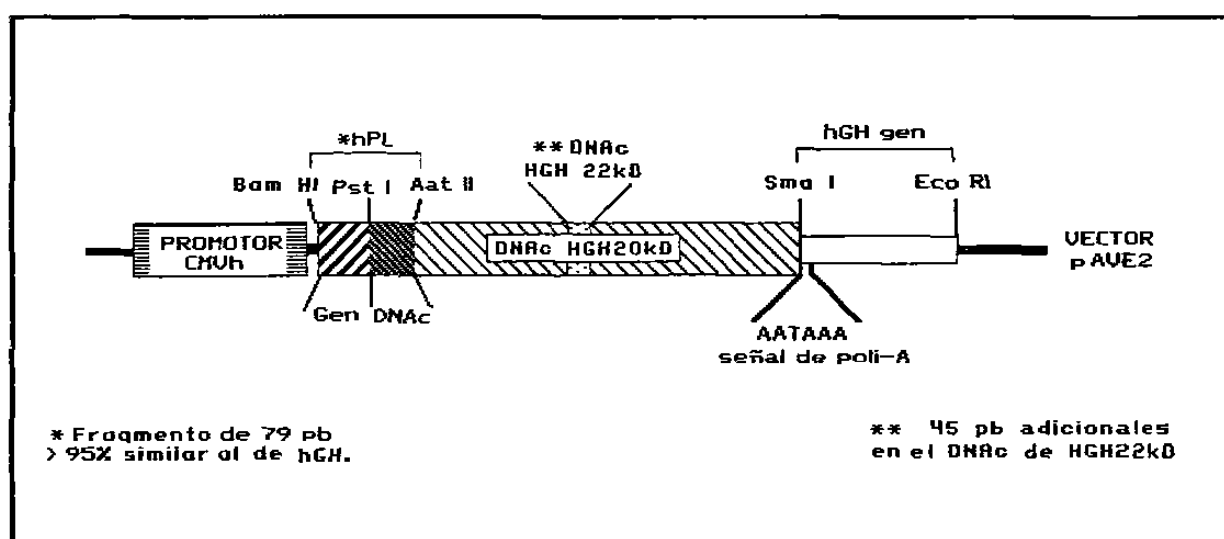


Figura 5. Estructura del minigen HGH. Se representa la estructura del "minigen" que contiene el fragmento AatII-SmaI del ADNc que codifica para HGH20kDa y (\*\*) la forma alternativa para el de HGH22kDa. Este minigen se reconstruyó utilizando para el extremo 5': un fragmento de 79 pb (\*) correspondiente también a las regiones 5' del gen (fragmento BamHI-PstI) y del ADNc (fragmento PstI-AatII) de hPL-3; para el extremo 3' se utilizó el fragmento SmaI-EcoRI que comprende la región para la señal de poliadenilación (poli A) del gen hGH<sub>N</sub>. Los sitios BamHI y EcoRI son sitios únicos que flanquean de la región codificadora en ambos minigenes. Estos sitios los utilicé para llevar a cabo la construcción de los plásmidos recombinantes pNUTHGH20kD y pNUTHGH22kD (ver más adelante en materiales y métodos).



# OBJETIVOS E HIPOTESIS

## OBJETIVOS

Los objetivos fijados para llevar a cabo el presente trabajo fueron:

1. Construir plásmidos recombinantes que expresaran en cultivo celular, los minigenes HGH20kDa y 22kDa y que a la vez permitieran la selección de clonas que los portaran.
2. Introducir dichos plásmidos por transfección, a células en cultivo y seleccionar las clonas productoras de las isoformas de HGH.
3. Derivar líneas sobreproductoras de las isoformas induciéndoles amplificación de los minigenes.

## HIPOTESIS

La hipótesis de trabajo fué la siguiente:

"Si se explotan las ventajas del modelo CHO/DHFR/MTX para introducir por separado, en cultivo celular, los minigenes de HGH20kDa y HGH22kDa e inducir su amplificación por exposición y selección con MTX, se pueden obtener líneas celulares sobreproductoras de estas isoformas".

## MATERIAL Y METODOS

## 1. ESTRATEGIA GENERAL DEL TRABAJO

Para lograr dichos objetivos, dividí el trabajo experimental en tres fases que se esquematizan en la figura 6 y describo a continuación:

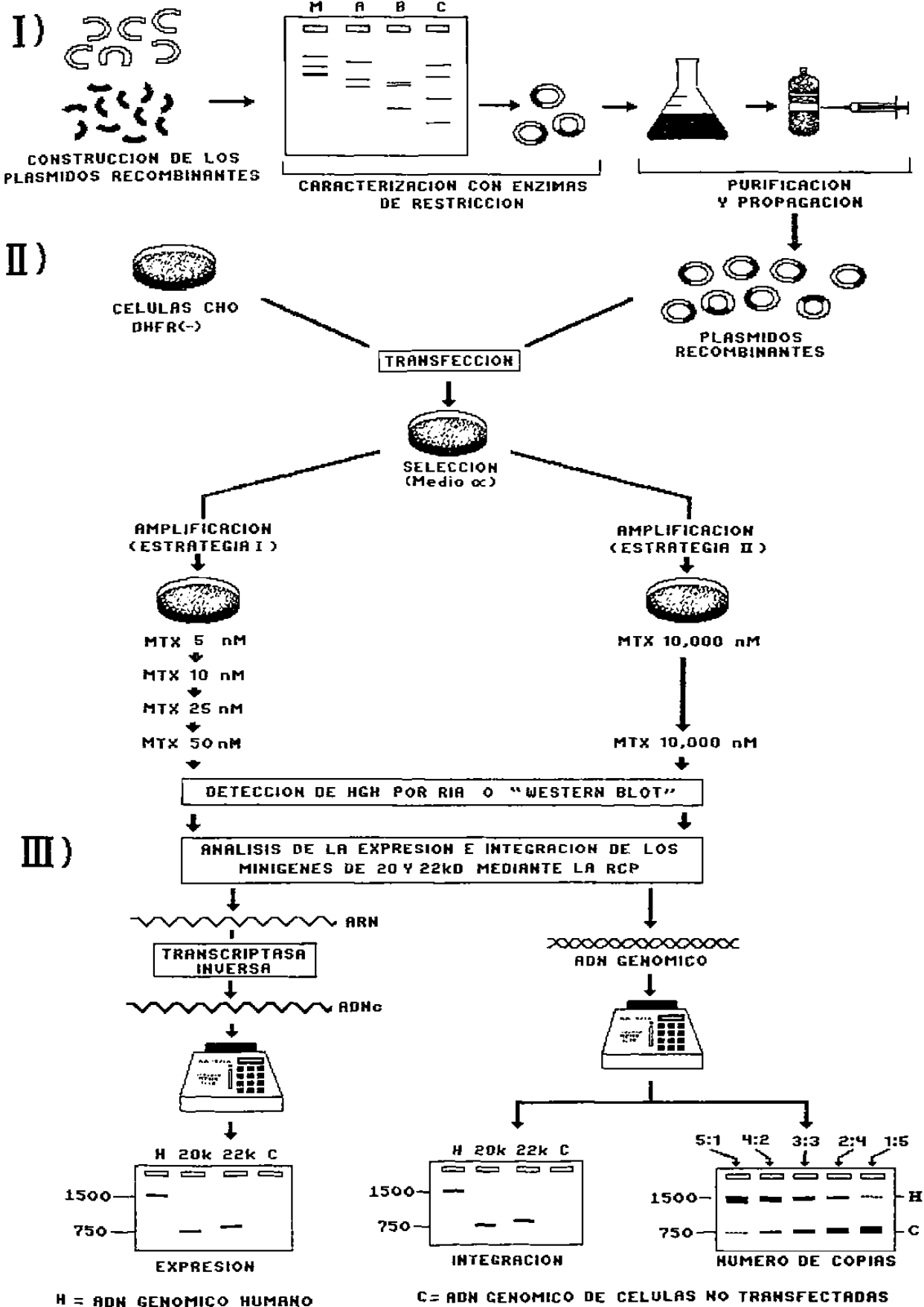
I) En la primera fase obtuve los plásmidos recombinantes pNUTHGH20kD y pNUTHGH22kD que tienen la característica de poseer, además del minigen de interés, el ADNc de la enzima DHFR, el cual sirve como gen de selección en células DHFR(-) transfectadas con ellos. Caractericé estos plásmidos con enzimas de restricción diagnósticas y confirmada su identidad, obtuve sus ADNs en grandes cantidades y en forma pura para realizar los siguientes ensayos de transfección (Figura 6, I). A lo largo de todos los experimentos de expresión utilicé, como testigo negativo al plásmido pNUT(-), que carece de secuencias codificantes para HGH (38).

II) La segunda fase del trabajo experimental consistió en la introducción, por separado, de los plásmidos recombinantes en células CHO DHFR(-). Las células portadoras de los plásmidos las seleccioné utilizando medio  $\alpha$  sin nucleótidos y posteriormente, empleando dos estrategias para amplificar el número de copias de los minigenes incorporados a las células. Una consistió en iniciar el esquema de amplificación con dosis bajas de MTX y aumentarlas en forma paulatina (Figura 6, Estrategia I) y la otra en utilizar una dosis muy alta de MTX para iniciar la inducción de la amplificación (Figura 6, Estrategia II). Mantuve los cultivos así hasta su completa recuperación en los cuales determiné la expresión de HGH por RIA (39) y por "Western Blot" (40).

III) En la tercera y última fase del trabajo, con la finalidad de corroborar la identidad e integración de los minigenes en el genoma de las células CHO, llevé a cabo análisis cualitativos y cuantitativos del ARN y del ADN obtenidos de las células que expresaban HGH20 ó 22kDa, mediante la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (41). Analicé varios cultivos productores de HGH y después de que confirmé la integración de los ADNcs en el genoma de las células, calculé el número aproximado de copias del material genético amplificado.

La ejecución experimental de estas tres fases requirió de los materiales y métodos descritos a continuación.

**Figura 6. ESTRATEGIA GENERAL DEL TRABAJO EXPERIMENTAL**



## 2. ORIGEN DEL MATERIAL Y DE LOS REACTIVOS

El material requerido para el cultivo de células (pipetas, botellas, tubos, cajas, filtros, unidades de filtración, etc.) lo obtuve de Falcon (Lincoln Park, NJ, EUA), In vitro (Ventura CA, EUA), Promega (Madison, WI, EUA), Corning (New York, NY, EUA) y Costar (Cambridge, MA, EUA).

Los reactivos necesarios para la preparación de soluciones y medios de cultivos, así como los suplementos para éstos [precursores de nucleótidos, aminoácidos, suero bovino fetal (SBF), etc.] los adquirí de Sigma Chemical Co. (Missouri, MI, EUA) y Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA). El MTX lo compré de Sigma.

Las enzimas de restricción las obtuve de varias casas comerciales, como Bethesda Research Laboratories (BRL), New England Biolabs (NEB; Beverly, MA, EUA), Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN, EUA) y Pharmacia (Piscataway, NJ, EUA) y las utilicé de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El estuche enzimático para la síntesis de los ADNcs y la enzima ADN polimerasa Taq (Taq pol), los obtuve de BRL.

Los reactivos empleados en la elaboración de soluciones y amortiguadores, así como los utilizados para la preparación, el desarrollo y la tinción de los geles, provenían también de varias casas comerciales como Sigma, Merck (Darmstadt Germany), Aldrich (Milwaukee, WI, EUA), IBI (Lakewood, NJ, EUA), BRL y Casa Rocas, S.A. (Monterrey, N.L. México).

Los oligonucleótidos que utilicé en las reacciones de amplificación por RCP fueron diseñados en nuestro laboratorio y adquiridos de Synthetic Genetics, Inc. (San Diego, CA, EUA).

### 3. ORIGEN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

El plásmido pNUT (42) fué obsequiado a nuestro laboratorio por el Dr. Richard Palmiter de la Universidad de Washington en Seattle, E.U.A. Los plásmidos (pAVE2HGH20kD, pAVE2HGH22kD, pNUT(-) y pCMVcat) y las bacterias (Escherichia coli de la cepa RR1) provinieron de la colección existente en nuestra Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG), en cuyo laboratorio del Genoma realicé el presente trabajo.

La línea celular CHO/DG44 (36) la donó el Dr. Lawrence Chasin de la Universidad de Columbia (New York, NY, EUA).

Los marcadores de peso molecular: Lambda+HindIII+EcoRI y pUC+Alu los preparó en el laboratorio Eddy Luz Cab Barrera.

Para la cuantificación de HGH por RIA, utilicé un estuche comercial de Diagnostic Products Co. (Los Angeles, CA, EUA) y para ello recibí el invaluable apoyo del personal del Servicio de Endocrinología de nuestro Hospital Universitario "Dr. José E. González".

La proteína HGH purificada de hipófisis (h-HGH) y los anticuerpos (primero y segundo anticuerpos) que emplee para la inmunodetección por "Western blot" son generosos donativos de la Dra. Angélica Salas, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El anticuerpo de cabra anti-Ig total de conejo conjugado con fosfatasa alcalina lo obtuve de Sigma.



## 4. METODOS

### 4.1. PRIMERA FASE: Clonación de los ADNcs de HGH de 20 y 22kDa en el plásmido pNUT.

Mediante técnicas estándares de Biología Molecular (43), llevé a cabo la construcción de los plásmidos pNUTHGH20kD y pNUTHGH22kD, siguiendo la estrategia de clonación descrita en la figura 7, a partir de los plásmidos pAVE2HGH20kD, pAVE2HGH22kD y pNUT. De los dos primeros plásmidos, recuperé los minigenes HGH20kDa y HGH22kDa (1298 y 1343 pb respectivamente) mediante digestión con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, los purifiqué por la técnica de electroelución (44) y finalmente los transferí por subclonación al vector de expresión seleccionado.

Como vector de expresión elegí al plásmido pNUT (Figura 7), que originalmente portaba el gen hGH<sub>n</sub> bajo el control del promotor del gen de la metalotioneína (pMT-I). pNUT también contiene el ADNc de la enzima DHFR bajo el control del promotor-potenciador (enhancer) del virus 40 del Simio (SV40). Aprovechando que en pNUT el gen hGH está flanqueado por los sitios BamHI y EcoRI, utilicé estas enzimas de restricción para remover el gen y obtener el vector (abierto BamHI - EcoRI), en el que inserté el minigen HGH20kDa ó el de HGH22kDa, mediante reacciones de ligación para así construir los plásmidos pNUTHGH20kD y pNUTHGH22kD.

pNUT(-) había sido previamente preparado en nuestro laboratorio, eliminando la región codificadora de hGH en pNUT mediante digestión con SmaI y volviendo a cerrar el vector en una reacción de ligación (38).

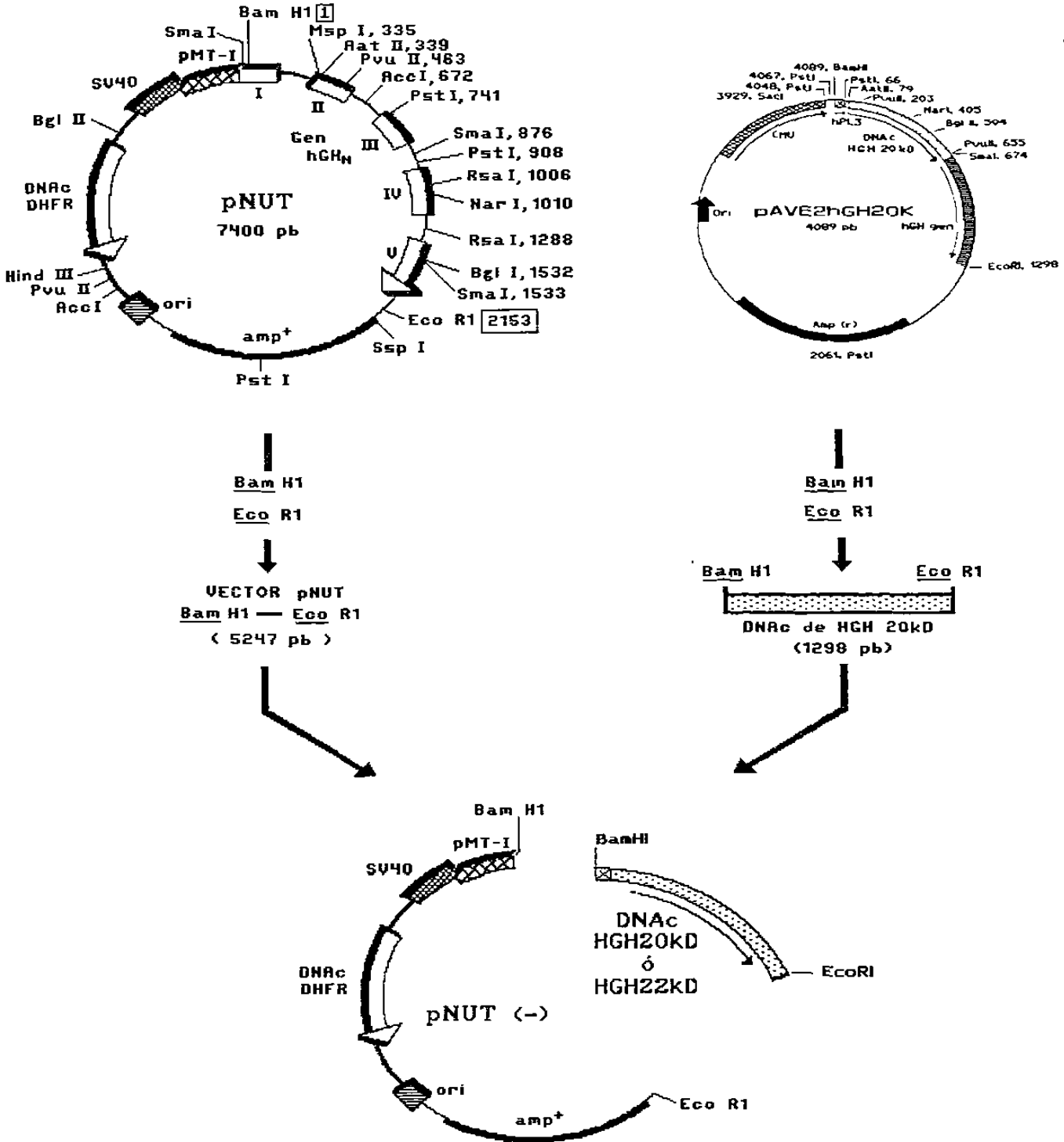


Figura 7: Estrategia de clonación utilizada para el ensamblaje de los minigenes HGH 20 y 22kDa, en el vector pNUT. Utilizando los sitios de restricción BamH1 y EcoR1, aislé el fragmento de 1298 pb que porta la región codificante para HGH 20kDa y la fusioné con el vector pNUT (5247 pb) abierto en los mismos sitios para generar el plásmido: pNUTHGH20kD. Utilicé la misma estrategia para la clonación de pNUTHGH22kD solo que partiendo del plásmido pAVE2HGH22kD.

Los productos de las ligaciones los utilicé para transformar bacterias (cepa RR1 de E.coli) calcio-competentes (45). De las colonias resultantes, elegí nueve correspondientes a cada construcción (n = 18) y las propagué para recuperar los plásmidos por la técnica de minipreparación por lisis alcalina (46). Para demostrar la identidad e integridad de los plásmidos obtenidos, los caractericé con enzimas de restricción diagnósticas y electroforesis en geles de agarosa.

Elegí aquéllas clonas que presentaron el patrón de restricción esperado para pNUTHGH20kD y pNUTHGH22kD. Junto con los plásmidos pNUT(-) y pCMVcat (obtenidos de la genoteca de la ULIEG), los cultivé a gran escala y purifiqué mediante ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio. La pureza y concentración de los plásmidos las determiné por espectrofotometría y las corroboré por electroforesis en gel de agarosa (43).

#### **4.2. SEGUNDA FASE: Transfección, selección y amplificación**

**4.2.1. Cultivo de células.** Utilicé la línea celular CHO/DG44 DHFR(-) ya descrita (36) que cultivé en medio DMEM suplementado con SBF al 5%, aminoácidos no esenciales, precursores de nucleótidos (timidina, desoxiadenosina e hipoxantina, 10 mM de cada uno), sulfato de estreptomycin (100 µg/ml) y penicilina (100 U/ml) e incubé a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

**4.2.1. Ensayos de la enzima cloranfenicol-acetil-transferasa.** Analicé la eficiencia de transfección de los plásmidos en la línea celular CHO/DG44, mediante un ensayo indirecto en el que determiné la actividad de la enzima cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT). Para esto, realicé la co-transfección de cada uno de los tres plásmidos (7.5

$\mu\text{g}$ ) junto con el plásmido pCMVcat (7.5  $\mu\text{g}$ ), mediante la técnica de co-precipitación del ADN con fosfato de calcio (47). A las 48 h de la transfección, deseché los sobrenadantes de los cultivos y recuperé las células levantando directamente la monocapa con un raspador de teflon. Lavé las células con solución salina fisiológica (0.85%), las centrifugué 5 min a 9,000 rpm y el botón celular lo utilicé para la preparación de los extractos, los cuales obtuve mediante tres ciclos continuos de congelación (-170 °C) y descongelación (37 °C). Resuspendí los extractos celulares en Tris HCl 250 mM, pH 7.4, en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ . La actividad de la enzima CAT la determiné por el método descrito por Neumann y cols. (48), utilizando 20  $\mu\text{l}$  de cada uno de los extractos celulares previamente preparados.

**4.2.3. Determinación de los niveles de toxicidad de MTX en la línea celular CHODG44.** Resembré las células en cajas con pozos múltiples (cajas con 24 pozos de 2  $\text{cm}^2$  cada uno) a una densidad aproximada de  $1 \times 10^4$  células/pozo. Las mantuve en medio completo durante 48 h, que cambié posteriormente por medio  $\alpha$  adicionado con las diferentes dosis de MTX a probar (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 y 100 nM). Utilicé cuatro pozos por cada concentración de MTX y ocho pozos con medio completo sin MTX. Realicé el ensayo por triplicado y los cultivos los mantuve durante 10 días bajo estas condiciones, con cambios de medio fresco cada 4 ó 5 días. Para determinar el porcentaje de viabilidad celular, utilicé la prueba de azul de tripano (49). Finalmente, elegí la concentración mínima de MTX a la cuál observé 90 a 100% de muerte celular.

**4.2.4. Transfección y selección de células CHO/DHFR(+).** Una vez establecidas las condiciones del cultivo, inicié los

experimentos de transfección estable (34). Preparé cultivos nuevos de las células CHODG44 y los mantuve con medio DMEM completo hasta que alcanzaron un 50% de confluencia. Realicé la transfección mediante la técnica de co-precipitación del ADN con fosfato de calcio, empleando 15  $\mu\text{g}$  de cada uno de los plásmidos por caja de 100 mm.

Después de 48 h reemplacé el medio de cultivo por medio  $\alpha$  [sin nucleótidos, suplementado con 5% de SBF dializado (SBFd, para eliminarle los nucleótidos y sus precursores), aminoácidos no esenciales (sin glicina), sulfato de estroptomina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y penicilina (100 U/ml)] para inducir la selección de las células portadoras del plásmido. Mantuve las células en medio  $\alpha$  durante 18 días, hasta lograr la recuperación de los cultivos y la selección de las células CHO/DHFR(+).

**4.2.5. Estrategia de amplificación con dosis crecientes de MTX (33).** Esta la llevé a cabo a partir de las células CHO/DHFR(+) seleccionadas en el paso anterior. Para iniciar el primer ciclo de amplificación, reemplacé el medio por el mismo medio  $\alpha$  pero adicionado con MTX a una concentración de 5 nM. Mantuve los cultivos a esta dosis, con cambios de medio fresco cada 4 ó 5 días hasta la completa recuperación de las células (por su apariencia al microscopio: fenotipo normal, refringentes, no vacuoladas y con crecimiento vigoroso hasta alcanzar confluencia). Posteriormente, expandí los cultivos para obtener una población suficiente para dividirla en 4 alícuotas, de las que utilicé una para preservación por congelación, otra para aislamiento de ADN, otra para aislamiento de ARN y la última para someterla al siguiente ciclo de amplificación. El sobrenadante de los cultivos lo utilicé para el monitoreo de la expresión de HGH por RIA. Llevé a cabo los ciclos de amplificación con dosis

de 5, 10, 25 y 50 nM de MTX hasta que logré detectar la expresión de HGH por "Western-blot".

**4.2.6. Estrategia alternativa de amplificación (50).** Para esta estrategia realicé la transfección de las células en forma similar a la anteriormente descrita, utilizando el mismo lote de plásmidos y la misma cantidad de ADN (15  $\mu$ g). Solamente que después de la selección de las células CHODHFR(+), el medio de cultivo lo cambié por medio  $\alpha$  sin nucleótidos y adicionado con MTX a una concentración de 10,000 nM (10  $\mu$ M). Mantuve las células en esta concentración de MTX, con cambios de medio fresco cada 4 ó 5 días, hasta constatar la completa recuperación de los cultivos. El sobrenadante de los cultivos también lo recuperé para la cuantificación de HGH por RIA.

**4.2.7. Detección de HGH.** Analicé la expresión de las HGHs en los cultivos utilizando sistemas de detección para HGH22kDa, debido a que no existe ninguno específico para HGH20kDa. Inicié el seguimiento de la expresión de las HGHs mediante un RIA comercial para HGH22kDa y lo continué con "Western blot", utilizando también para éste, antisuero anti-HGH22kDa.

La cuantificación de HGH por RIA la hice directamente en los sobrenadantes de los cultivos (200  $\mu$ l) o haciendo diluciones de éstos, con medio de cultivo  $\alpha$  sin suero, cuando los valores obtenidos eran mayores de 30 ng/ml y estaban fuera de la curva de referencia del ensayo.

Después de varios tamizajes por RIA, elegí los cultivos más vigorosos y con mayor producción de proteína para expansión y congelación. Finalmente, cuando la producción de HGH fué suficiente, los tamaños moleculares de las

proteínas producidas en cultivo los confirmé por "Western blot". Por comparaciones entre los resultados obtenidos por RIA, Western Blott y previos estudios autorradiográficos (38) deduje que el RIA para HGH22kDa detecta a la variante de 20kDa con una eficiencia de alrededor del 10%. Una vez que los cultivos alcanzaron niveles de expresión mayores de 100 ng/ml, por RIA, en los cultivos de HGH22kDa, continué el tamizaje de los sobrenadantes mediante "Western blot". Para esto, fue necesaria la estandarización de las condiciones del inmunoensayo y la determinación de la máxima sensibilidad de esta técnica bajo las condiciones que yo manipulaba en el laboratorio, utilizando las metodologías descritas por Laemmli (51) y Towbin y cols (40).

**4.2.8. Estandarización del Western blot.** Las pruebas iniciales las hice utilizando 5  $\mu$ g de h-HGH y probando diluciones (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10,000) de los antisueros en solución salina de fosfatos con 0.2% del detergente Tween 20 (PBST). La sensibilidad la determiné utilizando diluciones seriadas de: 0, 1, 5, 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 ng de h-HGH, cuantificada por el método de Bradford (52) y confirmada por RIA. Para tamizar las muestras, utilicé de 0.5 a 1 ml de los sobrenadantes de los cultivos seleccionados, mantenidos previamente por 24 h en medio  $\alpha$  sin suero, esto último con dos finalidades; la primera, la de eliminar toda la GH exógena, presente en el suero adicionado al medio de cultivo, que tiene reactividad cruzada con los anticuerpos anti-HGH y la segunda la de evitar las proteínas presentes en el suero (albúmina, globulinas, etc.) que saturan la capacidad de resolución del gel de poliacrilamida.

Para la electroforesis, precipité los sobrenadantes en frío con tres volúmenes de acetona y los resuspendí en 50  $\mu$ l

de medio  $\alpha$  sin suero. Desnaturalicé las proteínas por ebullición durante 3 min, en presencia de SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol (51) y enseguida las sometí a electroforesis en geles desnaturalizantes discontinuos de poliacrilamida-SDS al 5% y 15%. Después de la electroforesis realicé la electrotransferencia a filtros de nitrocelulosa (40). Para bloquear las áreas libres de proteína en el filtro, éste lo incubé durante 1 h a temperatura ambiente en "blotto" (una solución que contiene leche en polvo descremada al 5%, Tween-20 al 0.2% y albúmina sérica bovina al 2 %, en PBS).

Para la reacción antígeno-anticuerpo utilicé tres tipos de anticuerpos policlonales: a) un anticuerpo de cobayo anti-HGH22kDa, con reactividad cruzada parcial para HGH20kDa (primer anticuerpo), b) un anticuerpo de conejo anti-Ig total de cobayo (segundo anticuerpo) y c) un anticuerpo de cabra anti-Ig total de conejo, conjugado con fosfatasa alcalina (tercer anticuerpo). Incubé el filtro de nitrocelulosa, previamente transferido y bloqueado, durante 1 h a 37 °C en soluciones de PBST conteniendo cada uno de los anticuerpos y haciendo tres lavados, de 30 min cada uno, después de la incubación con cada anticuerpos. Para el revelado de la reacción utilicé 10 ml de la mezcla de sustratos cromogénicos que contenía: 66  $\mu$ l de nitroazul de tetrazolio (NBT) al 50% y 33  $\mu$ l de 5-bromo, 4-cloro, 3-indolil fosfato (BCIP) al 50%, en solución de PBST; estos dos últimos preparados en dimetilformamida.

#### **4.3. TERCERA FASE: Análisis de la expresión e integración de los ADNcs de HGH 20 y 22kDa mediante la RCP**

Estos ensayos los realicé mediante la RCP, que en forma general, consiste en la amplificación enzimática selectiva, in vitro, de un fragmento de ADN que se quiere analizar y que



generalmente está presente en una mezcla muy compleja, donde es difícilmente distinguible.

Las pruebas las hice a partir de ARN y ADN, aislados de las células CHO que expresaron niveles de HGH 20 ó 22kDa, detectados por "Western blot" y que tenían más de 6 meses en cultivo bajo cualquiera de los dos esquemas de amplificación con MTX. Para esto, seleccioné los cultivos de mayor expresión de HGH y los más vigorosos, expuestos a 50 nM ó 10  $\mu$ M de MTX.

A partir de los cultivos previamente seleccionados (aproximadamente de 8 a  $10 \times 10^6$  células por cultivo), aislé el ARN total por el método de isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (53). La cantidad y calidad de los ARNs aislados la determiné mediante espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa-urea-ácido (54), respectivamente.

El ADN genómico lo aislé mediante la técnica de CTAB/DTAB (55), de células CHO transfectadas productoras de HGH y no transfectadas (aproximadamente de  $10 \times 10^6$  células por lote a probar) y de leucocitos humanos (a partir de 300  $\mu$ l de sangre periférica). La cantidad y la calidad de los ADNs obtenidos las determiné también por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa (43).

La figura 6 (III) esquematiza la estrategia general seguida para estos ensayos, pero antes de iniciarlos, fué necesario estandarizar las condiciones de la RCP (56).

**4.3.1. Estandarización de la RCP.** Probé los siguientes parámetros: el ADN blanco (0.25, 0.5 y 1.0  $\mu$ g), los oligonucleótidos (10, 25, 50, 100 y 200 pmoles), la enzima Taq pol (1.25, 2.5 y 5 U) y el número de ciclos de

amplificación (18, 22, 26 y 30 ciclos) en una reacción que además contenía desoxirribonucleótidos (dNTPs, 200  $\mu$ M), cloruro de magnesio (3 mM) y amortiguador RCP (Tris HCl 50 mM pH 9.0, NaCl 50 mM y  $MgCl_2$  10 mM), todo esto en un volumen final de 50  $\mu$ l y adicionando a la mezcla una capa de aceite mineral. La RCP la realicé en un termociclador programable PTC 100 (MJ Research, Watertown, MA. EUA). Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados en base a un análisis computacional de las secuencias de los genes del complejo hGH-hPL, utilizando el programa "Genealign: Multiple Sequences Alignment", versión 5.4 (Intelligenetics-ICGEB, Trieste, Italia). Explotando la alta similitud que existe entre estos genes, se buscaron las secuencias compartidas flanqueantes a cada gen para así encontrar las regiones consenso que nos permitieran la amplificación simultánea de los cinco genes del complejo. De manera que los oligonucleótidos resultantes tienen una complementaridad perfecta a los extremos de los ADNcs de hGH de 20 y 22kDa y también a los extremos de los cinco genes del complejo multigénico hGH-hPL. La secuencia de dichos oligonucleótidos es: 5'-GGGGATCCTGTGGACAGCTCACCTA-3' para uno, y 5'-CCGAATTCAGGAGAGGCACTGGGG-3' para el otro, e incluyen en sus extremos 5' sitios de restricción únicos para las enzimas BamH1 y EcoR1, respectivamente. La temperatura media de fusión ( $T_m$ ) de estos oligonucleótidos la calculé con la fórmula:  $T_m = 4^\circ C$  para cada citosina ó guanina + 2  $^\circ C$  para cada adenina o timina, obteniendo una  $T_m$  de 80 $^\circ C$  o mayor.

El ADN que utilicé para estas pruebas de estandarización provenía de los plásmidos pNUTHGH 20 y 22kDa ó de ADN humano genómico. Esperaba que el producto amplificado por la RCP a partir de los plásmidos generara una banda de aproximadamente 750 pb, correspondiente al

tamaño de los ADNc de las HGHs, los cuales pueden diferenciarse entre ambos con las enzimas de restricción PstI y AvaII. Por otra parte, de la RCP del ADN genómico humano esperaba una banda de 1500 pb correspondiente al tamaño y a la amplificación simultánea de todos los genes de la familia hGH-hPL.

Los resultados satisfactorios en estas pruebas preliminares establecieron la utilidad del método para identificar los tamaños de los ADNcs y de los genes eucarióticos intactos y sirvieron como testigos positivos ó bandas de referencia en todos los análisis de cuantificación génica.

Una vez establecidas las condiciones de la RCP, procedí a hacer el análisis de la expresión e integración de los ADNcs transfectados.

**4.3.2. Análisis de la expresión de los ADNcs de HGH 20 y 22kDa.** Los ARNs previamente obtenidos de las tres líneas los utilicé para la síntesis de la primera cadena de ADN complementaria mediante la enzima transcriptasa inversa o reversa del virus murino de Moloney (TR-VMM). Inicialmente, las reacciones de transcripción reversa (TR) las estandarice en el laboratorio, siguiendo el protocolo del fabricante. Determiné como ideales para la reacción de TR las condiciones siguientes: 5 µg de cada ARN en cada reacción que contenía amortiguador de la enzima (Tris-HCl 0.5 M, pH 8.3, KCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 7mM, DTT 1mM, BSA 0.1 mg/ml), 2.5 µM de hexámeros al azar, 0.2 mM de DTT, 0.5 mM de dNTP's y 200 U de la enzima TR-VMM (40 U/µg de ARN) en un volumen final de 50µl. Incubé las reacciones durante 1 h a 37°C y las almacené a -20°C ó las utilicé directamente para los siguientes ensayos.

Tomé 5  $\mu$ l (1/10 del volumen) de cada una de las reacciones de TR que contenía los híbridos ARN-ADNc y los sometí directamente a la amplificación por RCP, utilizando las condiciones previamente establecidas. El éxito de la amplificación la verifiqué utilizando 3  $\mu$ l del producto de RCP, mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y la identidad de estos productos la confirmé mediante digestiones con las enzimas de restricción AvaII y PstI.

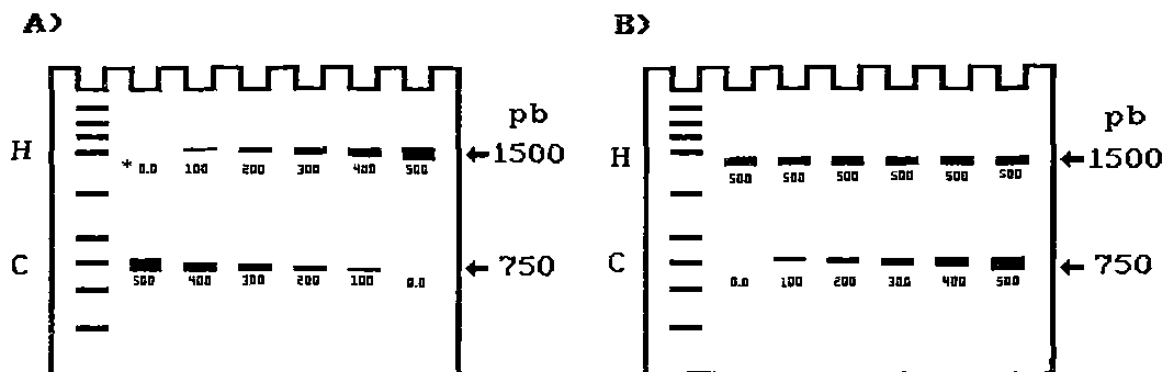
Para la caracterización del producto amplificado emplee un décimo del volumen (5  $\mu$ l) de la reacción de RCP y lo digerí con 5 U de cada una de las enzimas a probar. Las reacciones de digestión las incubé a 37°C durante 3 h y el análisis de los productos digeridos lo hice directamente, mediante electroforesis en geles de agarosa.

**4.3.3. Análisis de la integración y establecimiento del número de copias por genoma, de los minigenes de 20 y 22kDa, en las células CHODG44.** Para determinar si las células habían incorporado a su genoma los ADNcs transfectados, llevé a cabo la reacción de RCP a partir del ADN genómico de éstas, para así confirmar si los ADNcs formaban parte de dicho genoma. Utilicé 500 ng de cada uno de los ADNs genómicos aislados a partir de las células transfectadas y de las no transfectadas y los sometí a amplificación por RCP. La presencia de una banda de 750 pb indicaría la integración de los ADNcs en los genomas.

Los ensayos de cuantificación los realicé utilizando mezclas del ADN genómico humano (estandar interno = H) y ADN genómico de las células a analizar (problemas = 1, 2 ó 3) y probé dos alternativas de cuantificación por comparación de las intensidades de las bandas problema con respecto a las bandas del estandar interno (Figura 8) (57, 58).

La primera (Estrategia A) consistió en mezclar cantidades crecientes de ADN genómico humano (0 a 500 ng) con cantidades decrecientes de ADN genómico de células en cultivo (500 a 0 ng), manteniendo constante la cantidad total de ADN (500 ng) (Figura 8, A). La segunda (Estrategia B) consistió en la preparación de mezclas de cantidades crecientes de ADN genómico de células (0 a 500 ng) y cantidades constantes de ADN genómico humano (500 ng) (Figura 8, B). Las mezclas de ADNs las sometí a amplificación por RCP de acuerdo a las condiciones establecidas previamente. En el primer caso esperaba proporciones inversas de amplificación, mientras que en el segundo caso esperaba encontrar un aumento de masa e intensidad en la banda correspondiente al ADNc (750 pb) y bandas de grosor e intensidad constante correspondientes al ADN genómico humano (1500 pb).

Como todos los resultados correspondieron a lo esperado, permitieron establecer una metodología para la cuantificación del producto amplificado, al resolver éste en gel de agarosa y detectar las bandas en cuestión, tiñéndolo con bromuro de etidio e irradiándolo con luz ultravioleta. Como testigo negativo de la amplificación génica con MTX, utilicé al ADN genómico de células CHODG44 DHFR(-) no transfectadas, y como testigo negativo de la RCP, utilicé una mezcla con todos los componentes de la reacción, exceptuando al ADN.



H: DNA genómico humano

C: DNA genómico de células transfectadas con pNUTHGH 20 ó 22 kD

\*: Concentraciones de DNA utilizadas para la mezcla de reacción

Figura 8. Estrategias utilizadas para la cuantificación del número de copias génicas. Se muestran los patrones de bandas esperados para los productos de RCP, utilizando mezclas de ADN con: A) cantidades crecientes ó B) cantidades constantes de un estándar interno (H) y A) cantidades decrecientes ó B) cantidades crecientes de los ADNs problemas a cuantificar.

## RESULTADOS Y DISCUSION

## 1. Los plásmidos pNUTHGH20kD y pNUTHGH22kD

pNUTHGH20kD y pNUTHGH22kD son el producto de la ligación del vector pNUT (5247 pb) con alguno de los fragmentos BamH1-EcoR1 correspondientes al minigen HGH de 20kDa (1298 pb) ó al de 22kDa (1343 pb). Las clonas obtenidas a partir de la transformación de las bacterias calcio-competentes, con los productos de estas ligaciones, las seleccioné y analicé con enzimas de restricción para confirmar su identidad.

La caracterización la hice con las enzimas PstI, SmaI, BglII, PvuII, BamH1 + RsaI y confirmé la presencia de los fragmentos insertados utilizando cortes simultáneos con las enzimas BamH1 + EcoR1, donde se observan los fragmentos de 5247 y 1298 ó 1343 esperados (Figura 10).

Como no se cuenta con la secuencia completa del plásmido pNUT, para la interpretación de los resultados de las digestiones, me basé en los patrones de restricción generados por los dos minigenes y utilicé como testigo a pNUT(-) que no contiene secuencias codificantes para HGH. La figura 9 muestra los mapas de restricción correspondientes a los plásmidos pNUTHGH20kD y pNUTHGH22kD resultantes, así como el de pNUT(-), debido a que fué incluido en las caracterizaciones. Los patrones electroforéticos obtenidos para estos plásmidos, después de digerirlos con las enzimas de restricción mencionadas (figuras 10 y 11), confirmaron las identidades de cada uno. Por ejemplo, uno de los sitios PstI se pierde junto con el fragmento que se remueve en el ARNm de la 20kDa, de manera que, como muestro en la figura 10, la presencia del fragmento de 206 pb en pNUTHGH22kD (carril C+PstI) y su ausencia en pNUTHGH20kD (carril B+PstI), determinan la identidad de ambos plásmidos. En la figura 10, carril A+PstI observé únicamente una banda de aproximadamente 5400 pb, que corresponde a la linearización de pNUT(-) con dicha



enzima, debido a un sitio original que porta el vector. El resto de las interpretaciones de las digestiones con las otras enzimas lo hice de la misma manera.

Para la digestión con la enzima SmaI, obtuve la linearización del plásmido pNUT(-) y la liberación de los fragmentos esperados de 679 pb (carril B+SmaI) y de 724 pb (carril C+SmaI) de pNUTHGH20kD y pNUTHGH22kD, respectivamente (Figura 11). En todos los patrones electroforéticos obtenidos después de las digestiones, observé claramente la diferencia de tamaño entre las bandas diagnósticas, correspondientes a HGH20kDa ó HGH22kDa, debida a los 45 nucleótidos de diferencia.

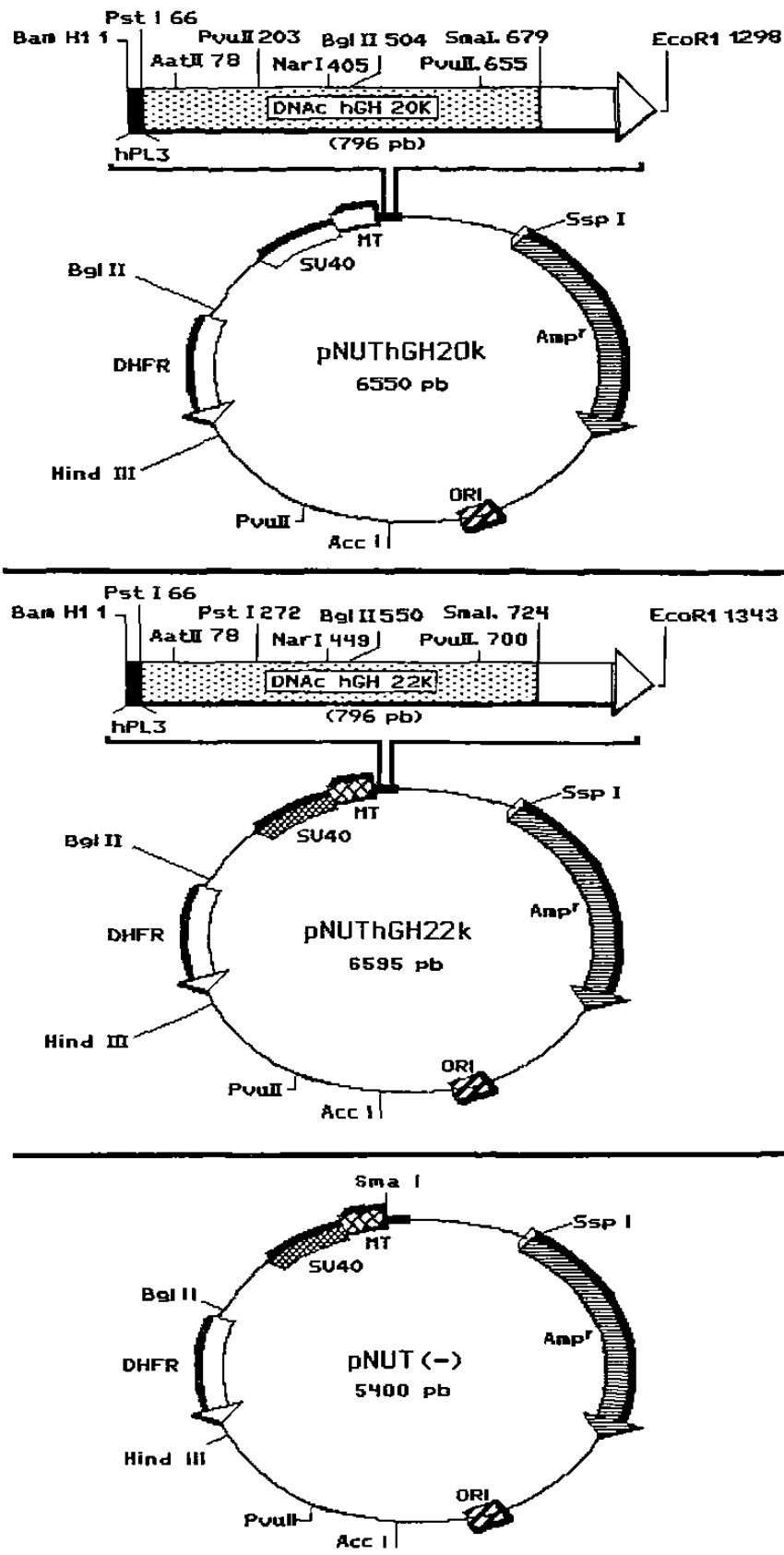
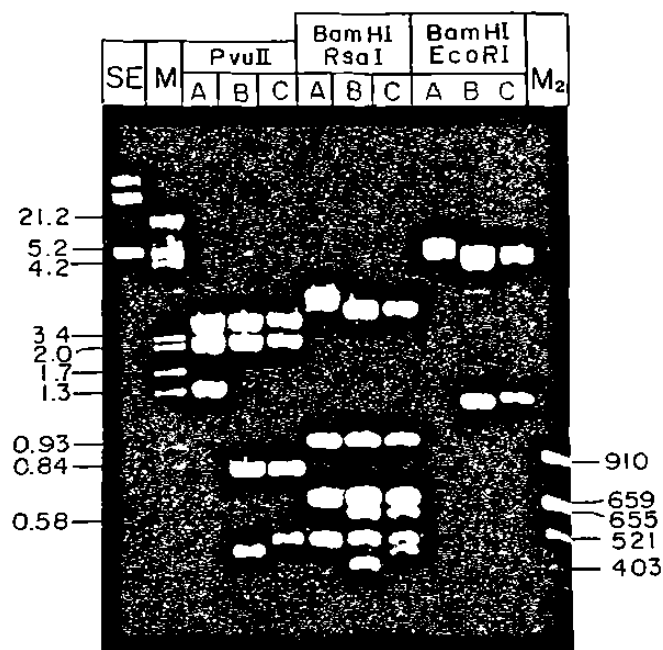


Figura 9. Mapas de restricción y organización de los plásmidos pNUTHGH20kD, pNUTHGH22kD y pNUT(-). Aquí muestro los mapas de restricción de los plásmidos pNUTHGH20kD, pNUTHGH22kD construidos a partir de los minigenes para HGH20kDa y HGH22kDa, así como el mapa de restricción de pNUT(-), obtenido de la genoteca de la ULIEG y previamente reportado.



**Figura 10.** Patrones electroforéticos de los plásmidos pNUT(-) (carril A), pNUTHGH20kD (carril B) y pNUTHGH22kD (carril C) obtenidos después de cortes con las enzimas de restricción PvuII, Bam HI+RsaI y BamHI+EcoRI. Carril M1 y M2: marcadores de peso molecular. SE: ADN plasmídico (super-enrollado) sin digerir. En la digestión con PvuII esperaba los fragmentos de 452 y 497 pb, así como para BamHI+EcoRI los de 1298 y 1343 pb, para pNUTHGH20kD y pNUTHGH22kD, respectivamente; mismos que obtuve y muestro en esta figura.

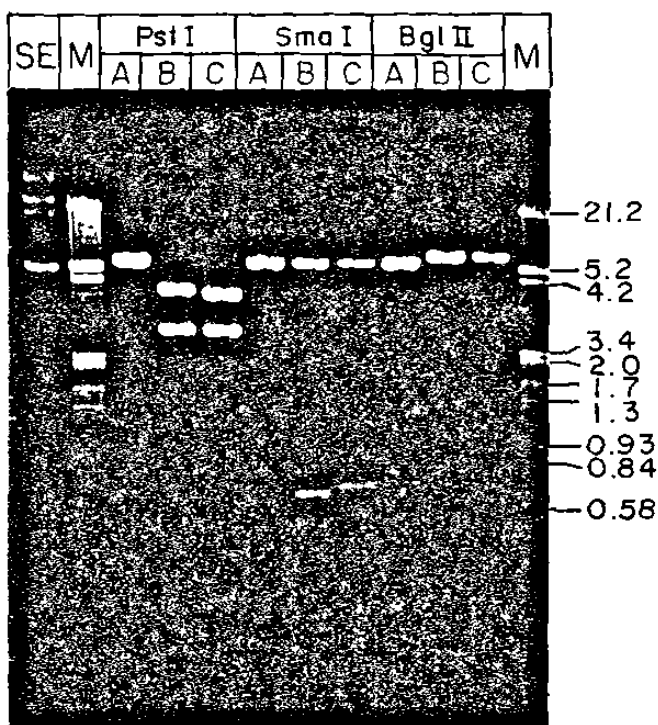


Figura 11. Patrones electroforéticos de los plásmidos pNUT(-) (carril A), pNUTHGH20kD (carril B) y pNUTHGH22kD (carril C) obtenidos después de cortes con las enzimas de restricción PstI, SmaI y BglII. Carriles M: marcadores de peso molecular. SE: ADN plasmídico (superenrollado) sin digerir. SE puede observar la linearización de pNUT(-) con SmaI y la liberación de los fragmentos de 679 pb (carril B+SmaI) y de 724 pb (carril C+SmaI) de pNUTHGH20kD y pNUTHGH22kD, respectivamente.

Confirmada la identidad de los plásmidos, estos fueron purificados junto con el plásmido pCMVcat a partir de un litro de cultivo bacteriano mediante ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio, para así obtener ADN en la cantidad y pureza requeridas para los ensayos de transfección. Los resultados obtenidos los enlisto en la tabla 3, concluyendo que con excepción del rendimiento para pCMVcat, obtuve buenos resultados, tanto en la pureza (Abs: 260/280) como en el rendimiento ( $x = 500 \mu\text{g/ml}$ ).

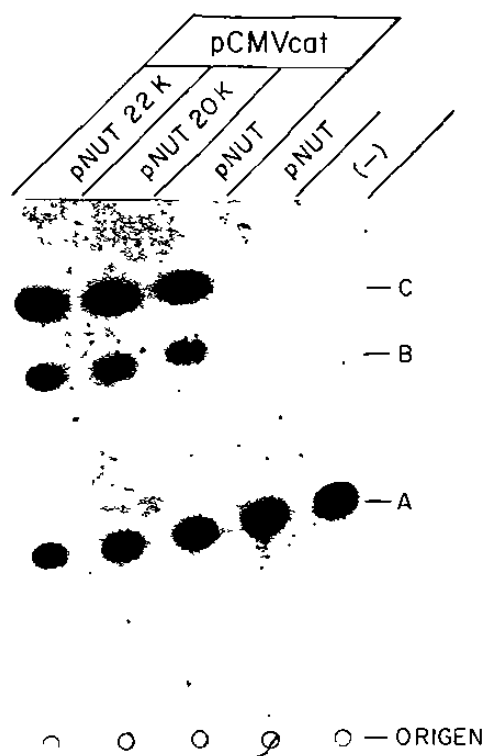
**Tabla 3. Resultados de la purificación de plásmidos en gradiente de cloruro de cesio.**

Plásmido	Pureza Abs. 260/280	Rendimiento ( $\mu\text{g}$ )
pNUT(-)	2.0	1725
pNUTHGH20kD	1.9	1350
pNUTHGH22kD	1.8	800
pCMVcat	1.8	138

## 2. Ensayos de CAT en la línea celular CHODG44

Los resultados de la prueba de CAT, realizados para probar la eficiencia de transfección de los plásmidos contruídos, los muestro en la figura 12. El autorradiograma de la cromatografía en capa fina del ensayo de la actividad de la enzima CAT mostró que el plásmido pCMVcat transfectado había entrado a las células con eficiencias equiparables, ya que las intensidades de las manchas correspondientes a las formas acetiladas del cloranfenicol, resultaron homogéneas entre los diferentes experimentos. Como el plásmido pCMVcat lo introduje junto con cada uno de los plásmidos de interés, inferí que éstos plásmidos

también se habían introducido a las células con eficiencias similares y que éstos a su vez podían ser ya utilizados en los ensayos siguientes de transfección. Las letras A, B y C en la figura 10 corresponden, respectivamente, al cloranfenicol marcado radiactivamente, a la forma 1-acetil-cloranfenicol y a la forma 1,3-diacetil-cloranfenicol. Como testigo negativo del ensayo de transfección utilicé pNUT(-) sin co-transfectarlo con pCMVcat, por lo tanto, no se observa la actividad de la enzima CAT.



**Figura 12. Resultados del ensayo de CAT.** La autorradiografía de la cromatografía en capa fina muestra las formas: 1-acetil y 1,3-diacetil cloranfenicol (B y C respectivamente), productos de la actividad de la enzima CAT, codificada por el plásmido pCMVcat y expresada por las células CHO. Como testigo negativo de la transfección utilicé el plásmido pNUT sin co-transfectar y como testigo del ensayo de CAT utilicé [ $^{14}\text{C}$ ]Cloranfenicol (A).

### 3. Ensayos de toxicidad del MTX en la línea celular CHODG44

En estos ensayos encontré que una concentración de 5 nM o mayor produce una muerte celular al 90% (Figura 13) y con base en estos resultados, elegí a ésta concentración como la dosis mínima de MTX para iniciar el esquema de amplificación.

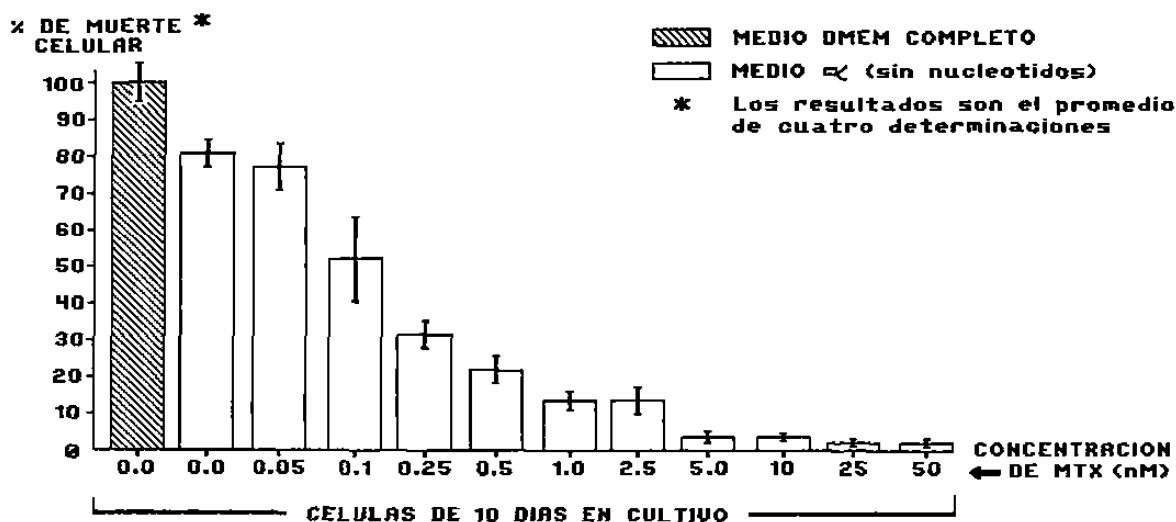


Figura 13. Ensayo de toxicidad del MTX en la línea celular CHODG44. Se muestran los porcentajes de muerte celular obtenidos al probar diferentes concentraciones de MTX en cultivo. Cada uno de los datos obtenidos son el promedio de cuatro determinaciones.

### 4. Expresión de HGH detectada por RIA

Transfecté los plásmidos pNUT(-), pNUT HGH20kDa y pNUTHGH22kDa en las células CHODG44 y los sobrenadantes de los cultivos los recolecté 48 h después para determinar los niveles iniciales de expresión de HGH obtenidos por RIA, obteniendo 0.2 ng/ml para pNUT(-), 5.7 ng/ml para HGH20kDa y 63.0 ng/ml para HGH22kDa (estos valores fueron el resultado de tres

transfecciones independientes) (Figura 14). El medio de cultivo lo sustituí por medio  $\alpha$  sin nucleótidos para iniciar la selección de células CHODHFR(+).

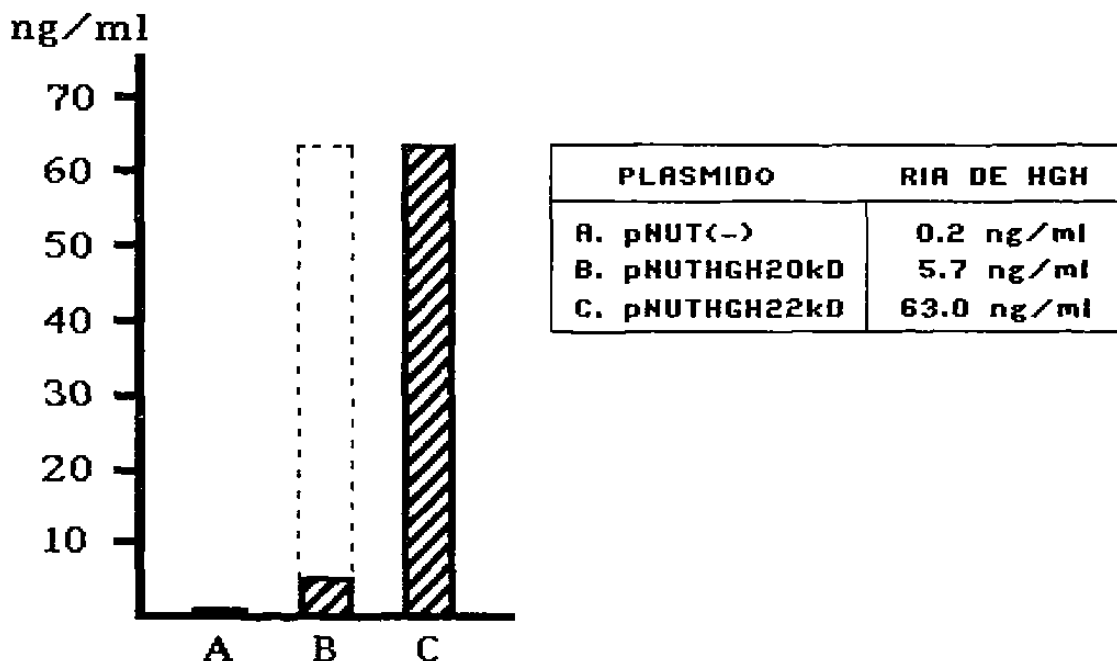


Figura 14. Expresión de HGH en células CHODG44 transfectadas. Muestra los niveles de expresión de HGH, determinados por RIA, en células CHODG44, 48 h después de haberlas transfectado con los plásmidos pNUT(-) (A), pNUTHGH20kD (B) y pNUTHGH22kD (C). La línea punteada representa los niveles de expresión de la isoforma de 20kDa, considerando que el RIA reconoce a esta isoforma aproximadamente diez veces menos eficientemente que la isoforma de 22kDa (ver texto).

Posteriormente, inicié el esquema de amplificación con una dosis de MTX de 5nM y continué con dosis de 10, 25 y 50nM. Como muestro en la figura 15, cada paso de amplificación tomó de 8 a 10 semanas en completarse y a los 9 meses de haberse iniciado el experimento, los valores de RIA de HGH 20kDa, considerando que la eficiencia del RIA diseñado para HGH22kDa para detectar a esta



variante es del 10% (Rincón Limas, et al), eran aproximada y aparentemente de 8.0 ng/ml, mientras que los de HGH22kDa eran de 80 ng/ml; sin embargo, las hormonas aún no eran detectables por "Western-blot" (Figura 13)

Alternativamente a estos procedimientos, determiné la sensibilidad del "Western blot" bajo nuestras condiciones de laboratorio. Utilizando diluciones de h-HGH22kDa, encontré que la sensibilidad de esta prueba en los diferentes ensayos fué de 100 ng, lo que explicaba el porqué la expresión de HGH aún no era detectable por "Western blot".

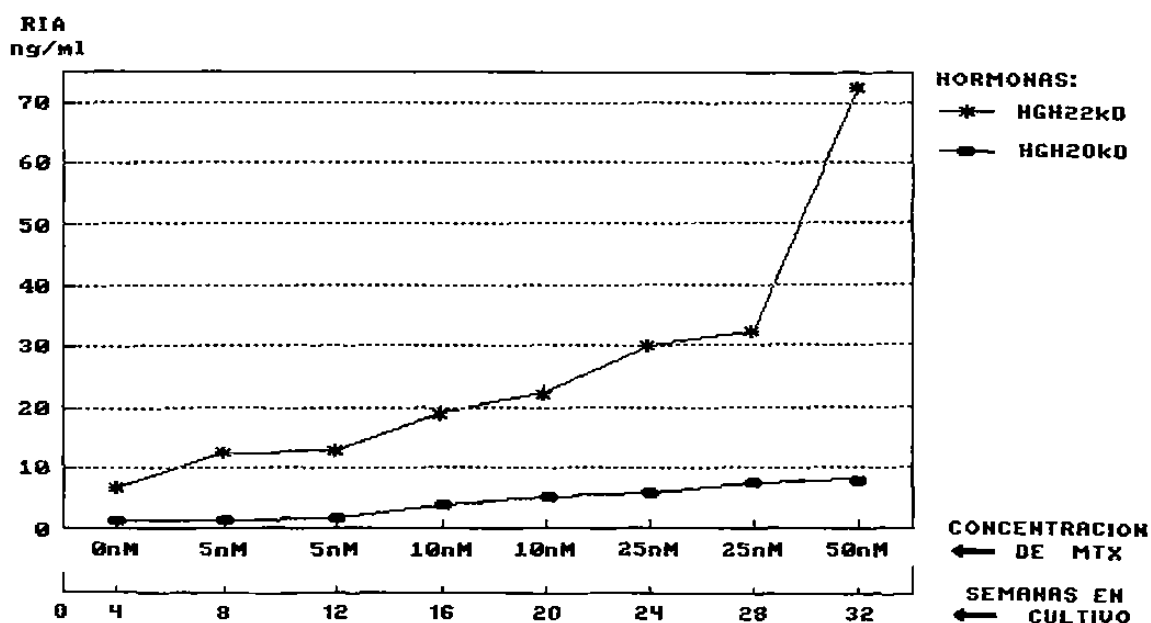


Figura 15. Expresión de HGH20 y 22kDa en cultivos sometidos inicialmente a dosis bajas de MTX y continuando con dosis crecientes de la droga (Estrategia A). Después de la transfección, las células las sometí a selección con medio  $\alpha$  y posteriormente a amplificación con dosis crecientes de 5, 10, 25 y 50 nM de MTX. En la gráfica mostro los niveles de HGH 20 y 22kDa, determinados por RIA, expresados en dichos cultivos a lo largo de los esquemas de amplificación. Cada cambio de dosis la realicé aproximadamente cada 8 semanas.

Con estos resultados decidí iniciar una estrategia alternativa de amplificación que nos condujera a una selección ya no gradual, sino más bien de choque, por lo que emplee dosis muy altas de MTX. Esto con la finalidad de inducir una amplificación génica, que aunque riesgosa, fuera a la vez más rápida. Realicé la transfección utilizando las mismas condiciones de la estrategia gradual y cuantifiqué por RIA la expresión de HGH, 48 h después de la transfección (0.0 ng/ml para pNUT(-), 4.6 ng/ml para pNUTHGH20kD y 48.9 ng/ml para pNUTHGH22kD (Figura 16). Estos resultados fueron semejantes a los obtenidos en las transfecciones iniciales y la relación de 10 a 1 entre los valores de HGH22kDa con respecto a HGH20kDa, seguía manteniéndose.

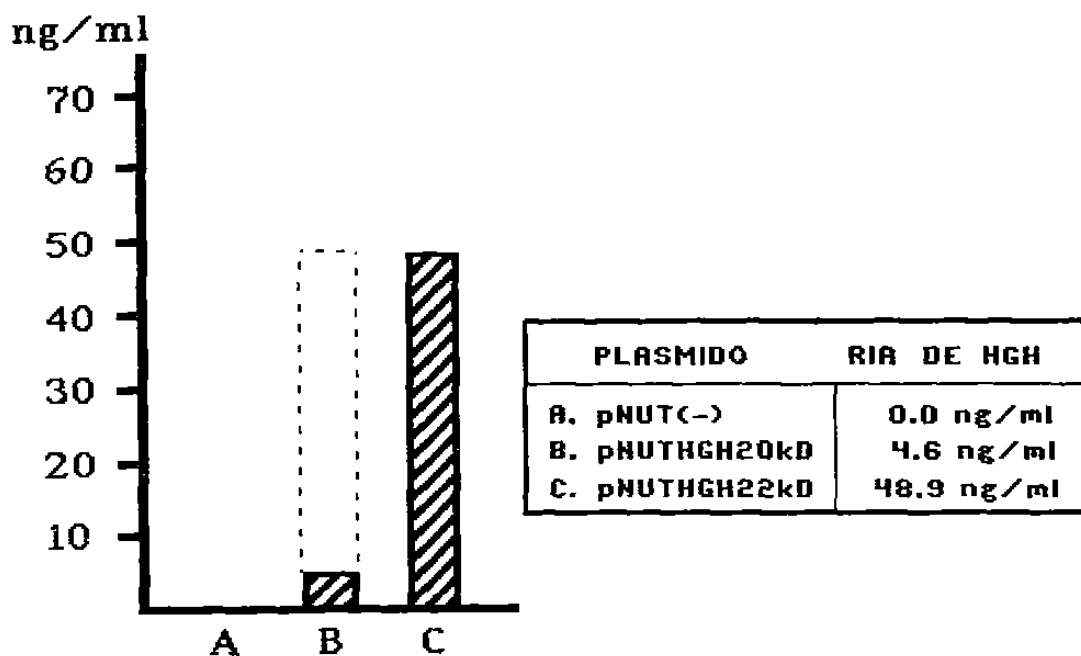


Figura 16. Niveles de expresión de HGH, 48 h después de la transfección, en cultivos previos a inducir la amplificación génica con dosis iniciales altas de la droga (Estrategia B). La transfección la realicé en las mismas condiciones que para la estrategia I y la descripción de la figura es igual a la de la figura 14.

Posteriormente, adicioné MTX a una concentración de  $10 \mu\text{M}$  a las células y continué simultáneamente con ambas estrategias. Igualmente, el seguimiento de la expresión de HGH lo realicé en los sobrenadantes de los cultivos.

A los 30 días de mantener estos nuevos cultivos, observé diferencias significativas en la expresión de HGH entre éstos y los cultivos de la estrategia gradual: las células cultivadas a dosis altas ( $10 \mu\text{M}$ ) de MTX expresaban casi tres veces más hormona ( $25 \text{ ng/ml}$  de HGH $_{20\text{kDa}}$ ) que las que tenían ya 10 meses de haber iniciado con la amplificación gradual y apenas estaban a dosis de  $50 \text{ nM}$  de MTX ( $8 \text{ ng/ml}$  para HGH $_{20\text{kDa}}$ ) (Figura 17).

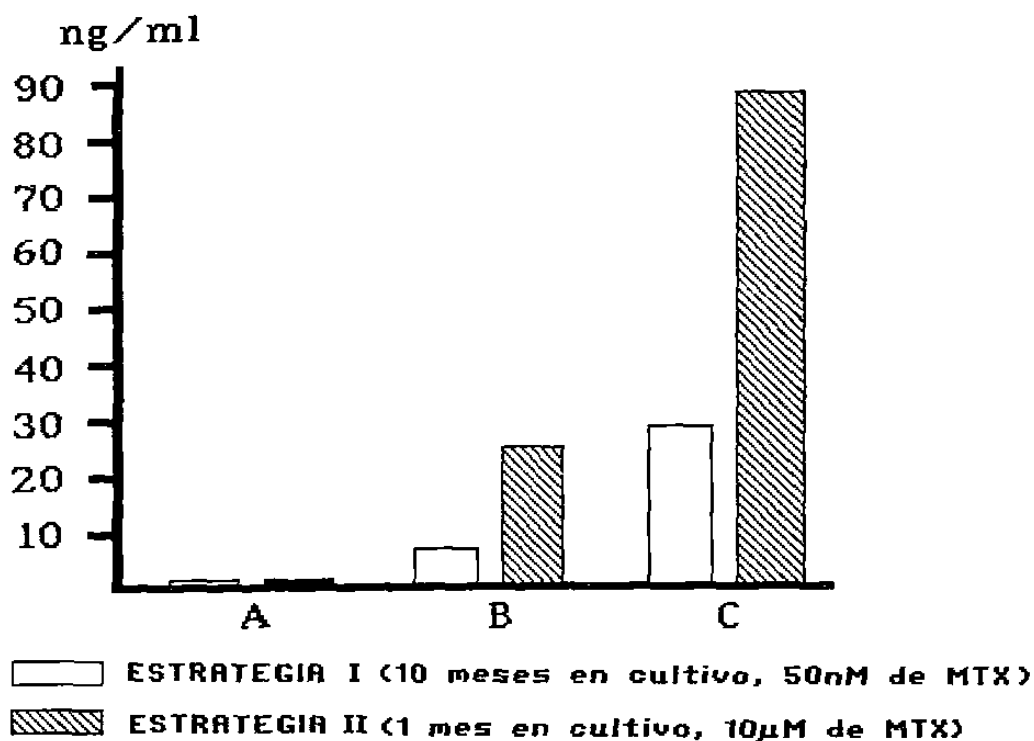
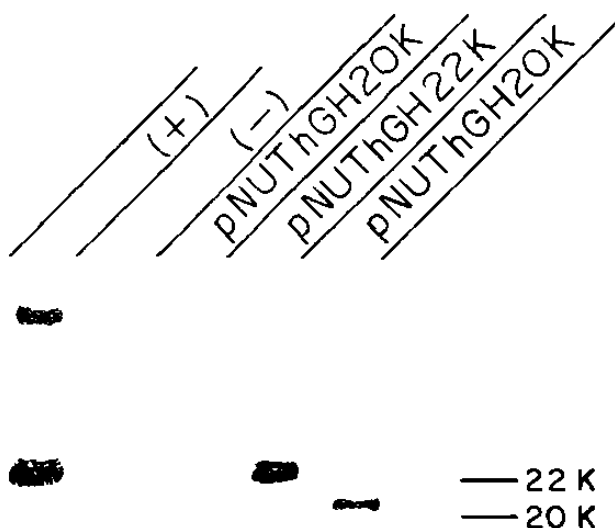


Figura 17. Comparación de la expresión de HGH en cultivos sometidos a ambas estrategias de amplificación. En esta tabla se observa la notable diferencia en los niveles de expresión de HGH a 30 días de mantener cultivos simultáneos con diferentes estrategias de amplificación. Las barras blancas corresponden a los niveles obtenidos mediante amplificación con dosis crecientes de MTX y las barras negras corresponden a las generadas por la estrategia alternativa. La cuantificación de la hormona presente en los sobrenadantes de los cultivos la hice por RIA.

## 5. Expresión de HGH detectada por Western blot

Cuatro meses después de continuar con ambos protocolos, logré la detección de HGH20 y 22kDa por "Western blot" en algunos de los cultivos que estaban con 50 nM de MTX (estrategia I ó gradual) y en uno solo de los que estaban con 10 $\mu$ M de MTX (estrategia II ó de choque) (Figura 18). De estos cultivos seleccioné los más vigorosos y de mayor producción de HGH: un cultivo productor de HGH 20kDa seleccionado a 50 nM de MTX, uno de HGH22kDa seleccionado a 50 nM de MTX y uno de HGH 20kDa seleccionado a 10  $\mu$ M de MTX, y los sometí al análisis de la expresión e integración de los ADNcs. El resto de las células las conservo en congelación a -170°C (nitrógeno líquido).



**Figura 18. Expresión de HGH 20 y 22kDa determinada por Western blot.** Se muestran los resultados del análisis por Western blot realizado a partir de los sobrenadantes de los cultivos más vigorosos que presentaron niveles de mayor expresión de HGH, previamente cuantificados por RIA. Logré demostrar la presencia de HGH20kDa (carriles 1 y 3 indicados con pNUTHGH20kD) en cultivos con dosis de 50 nM y 10  $\mu$ M de MTX y la presencia de HGH22kDa (carril 2, indicado con pNUTHGH22kD) en cultivos con dosis de 50 nM de MTX. Como testigo positivo (carril +) utilicé h-HGH22kDa purificada a partir de hipófisis y como testigo negativo (carril -) utilicé medio alfa sin suero.

Debo notar que observé cambios en el fenotipo de las células cultivadas con  $10\mu\text{M}$  de MTX. Los cultivos no lograron la recuperación total aún después de un tiempo prolongado de cultivo en presencia de MTX. La mayoría de las células estaban redondeadas y no adquirieron su fenotipo fibroblastoide, aún en cultivos frescos sembrados a muy baja densidad; la capacidad de unión a las superficies disminuyó también y la producción de HGH se mantuvo sin aumentos significativos.

Estos resultados contrastaban con los que obtuve en los cultivos de la estrategia I gradual, en los que, la recuperación de las células tomaba de 8 a 10 semanas, pero finalmente lograba obtener cultivos vigorosos, fenotípicamente normales; tomando en cuenta que la expresión de HGH, aunque a niveles bajos, siempre se mantuvo en aumento. De tal manera que con estas diferencias, finalmente llegaron a igualarse los niveles de expresión de ambas estrategias, aún después de que estaban desfasadas en el tiempo y en la producción inicial.

## 6. Estandarización de la RCP

Después de probar cada uno de los elementos necesarios para la RCP, establecí los parámetros ideales de la reacción (Tabla 4) para obtener la amplificación óptima y de mayor especificidad para los ADNcs o los genes del complejo hGH-hPL.

Los parámetros indicados los determiné después de probar diferentes concentraciones de cada uno de los elementos de la reacción de RCP y diferentes temperaturas en cada paso. En todas las reacciones que fui realizando a lo largo del trabajo utilicé los parámetros para la RCP descritos en la tabla siguiente.

**Tabla 4. Parámetros para la reacción de amplificación (RCP)**

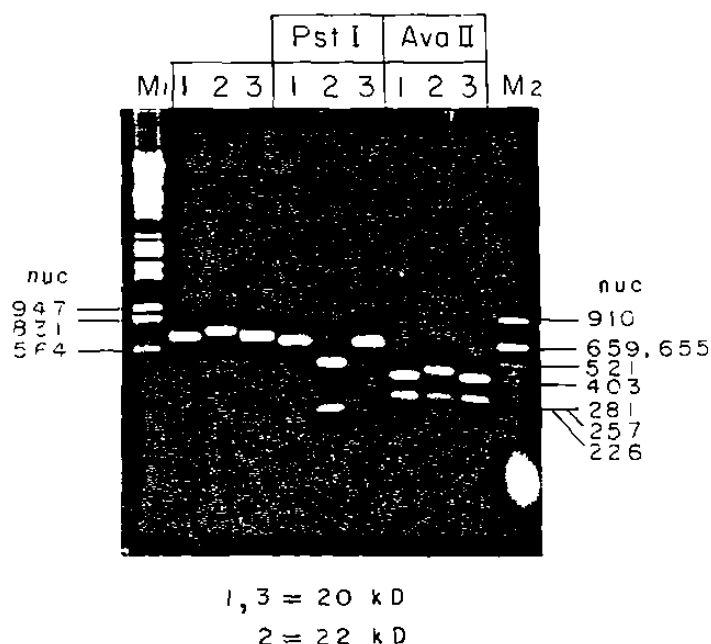
PARAMETRO	VALOR
<u>de la reacción</u>	
* ADN genómico ó plasmídico	500 ó 5 ng, respectivamente.
* Oligonucleótidos	50 pMoles de cada uno
* dNTPs	200 $\mu$ M
* Cloruro de Magnesio	3 mM
<u>de los ciclos</u>	
* Número de ciclos	25 ciclos
* Temperatura de desnaturalización	94 °C/ 1.5 min.
* Temperatura de alineamiento	60 °C/ 1.0 min.
* Temperatura de polimerización	72 °C/ 1.5 min.
* Extensión prolongada	72 °C/ 5.0 min.

#### 7. Análisis por RCP de la expresión de los ADNcs transfectados

La figura 19 muestra los resultados obtenidos en la detección de transcritos derivados de los minigenes. En el análisis directo del producto amplificado a partir de los híbridos ARN-ADNc, obtuve las bandas de tamaño esperado (de aproximadamente 750 pb) correspondientes a los ADNcs de HGH 20 ó 22kDa y además se observaba claramente la ligera diferencia de tamaño de las bandas para HGH20kDa, debida a los 45 nucleótidos ausentes en esta variante (figura 19).

Adicionalmente, los productos amplificados los digerí con las enzimas de restricción AvaII y PstI. Los patrones de la digestión de dichos productos muestran los perfiles electroforéticos característicos esperados para los ADNcs de HGH 20 y 22kDa.

Como se observa en la figura 19, el resultado de la digestión con PstI, de los productos amplificados a partir de híbridos ARN-ADNc de las células que expresaban HGH20kDa, fué satisfactorio ya que se obtuvieron las bandas esperadas de 690 pb. Por otro lado, también se observan las bandas de 485 y 241 pb correspondientes a los híbridos ARN-ADNc de las células que expresaban HGH22kDa. Los tamaños y los patrones de las bandas obtenidos en este ensayo confirmaron la identidad de los minigenes de HGH20 y 22kDa en los cultivos respectivos, así como que la expresión de HGH se está llevando a cabo a partir de los ADNcs que introduje a las células.



**Figura 19. Análisis del producto amplificado a partir de los híbridos ARN-ADNc.** En el análisis directo se observan las bandas de tamaño esperado (de aproximadamente 750 pb) correspondientes a los ADNcs de HGH20kDa (carriles 1 y 3) ó HGH22kDa (carril 2) y además claramente se aprecia la ligera diferencia de tamaño de las bandas para HGH20kDa, debida a los 45 nucleótidos ausentes en la variante. Se muestran también, los productos de éstos, después de digerirlos con las enzimas PstI y AvaII. Carriles M1 y M2: marcadores de peso molecular.

## 8. Análisis de la integración de los ADNcs

Ya que para estos ensayos utilicé ADN genómico de alto peso molecular de las células que expresaban HGH de 20 ó 22kDa, con la presencia de las bandas de 750 pb correspondientes al tamaño de los ADNcs de las HGHs, puedo inferir que había logrado la integración de los ADNcs correspondientes a HGH 20 ó 22k en el genoma celular. La ausencia de bandas en el producto amplificado a partir del ADN genómico de células no transfectadas confirmaba los resultados.

## 9. Determinación del número de copias

Las estrategias utilizadas para la cuantificación del número de copias de los minigenes por genoma celular, las validé al utilizar en una prueba de RCP: ADN genómico de humano, ADN genómico de las células transfectadas ó mezclas de ambos; logré obtener bandas muy nítidas de 1550 pb y 750 pb respectivamente y de ambos tamaños en el último caso.

Para determinar el número de copias de los minigenes de HGH en el genoma de las células, hice lo siguiente: localicé en el gel las bandas correspondientes al producto amplificado a partir de las células (750 pb) y las correspondientes al producto amplificado a partir del ADN humano (1500 pb). Posteriormente elegí las bandas (una de 750 pb y otra de 1500 pb) que fueran semejantes en intensidad y grosor. Finalmente, calculé el número de copias con la siguiente ecuación que desarrollé:

$$\# \text{ de copias} = (H/P) \times A \times 2, \quad \text{en donde:}$$

H = Concentración del ADN de humano con la que inicié la RCP, de la banda seleccionada de 1500 pb.

P = Concentración del ADN a cuantificar con la que inicié la RCP (banda de 750 pb seleccionada).

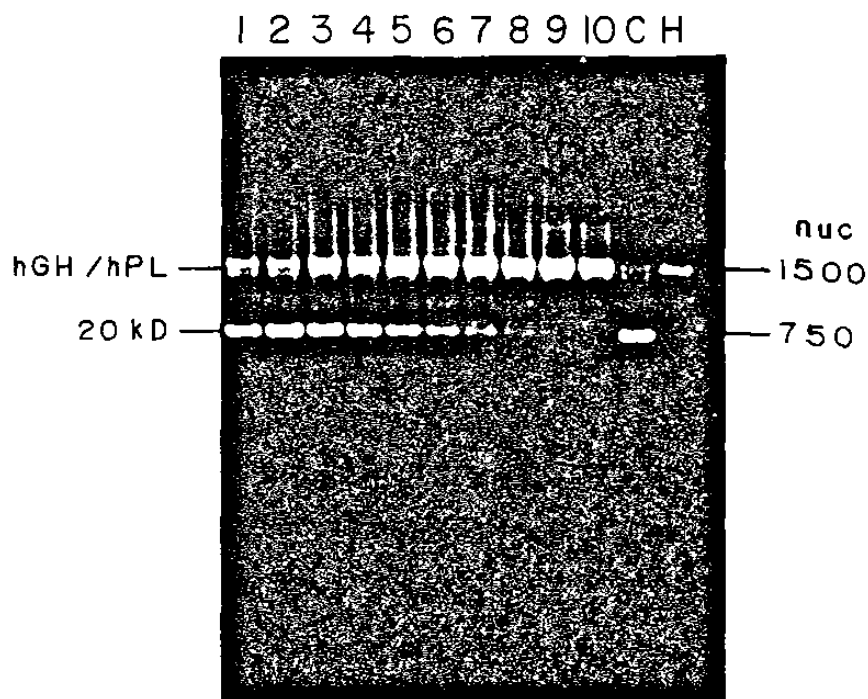
A = Número de copias del gen o fragmento génico del ADN blanco que dió origen a la banda de 1500 pb (cinco en el caso de la familia multigénica hGH-hPL).



2 = Factor de corrección debido a que la cantidad de ADN en una banda de 750 pb debe ser el doble para que pueda observarla de la misma intensidad que una de 1500 pb

Aplicando esta fórmula, calculé el número de copias amplificadas para cada uno de los cultivos elegidos y encontré que, para el cultivo que expresaba HGH20kDa mantenido a 50 nM de MTX, tenía un promedio de 130 copias por genoma. Este dato lo obtuve promediando los resultados obtenidos mediante las dos estrategias de cuantificación: 120 y 150 copias según la estrategia A y B, respectivamente. Para los cultivos que expresaban HGH22kDa, mantenidos a 50 nM de MTX, tenía aproximadamente 15 copias por genoma celular y para los cultivos de HGH22kDa mantenidos a 10  $\mu$ M tenía 30 copias amplificadas, por genoma celular.

Las figuras 20, 21, 22 y 23 muestran los resultados obtenidos en estos ensayos. Como podemos ver, el mayor número de copias obtenido para la amplificación del mínigen para la HGH20kDa en la estrategia de dosis crecientes de MTX, señala que a la larga ésta fue la estrategia más adecuada para inducir sobreproducción de proteínas en cultivo.



50 nM MTX

DNA humano = 300 ng

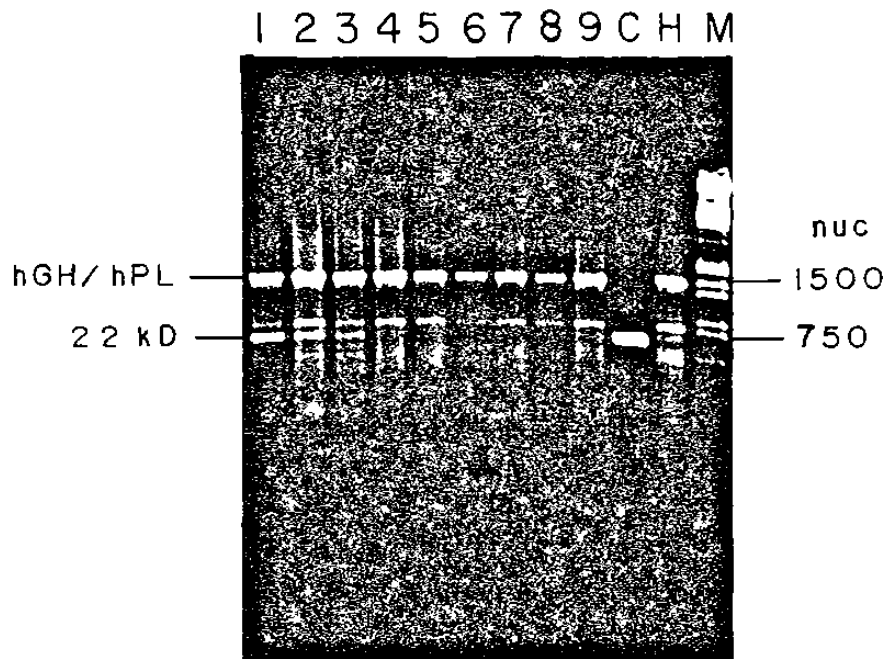
DNA CHO = 200 → 0.7 ng

(4 = 300:25 ng)

Figura 20. Cuantificación del número de copias en la línea celular productora de HGH20kDa, resistente a 50 nM de MTX. En este caso utilicé la estrategia "B" de dosis constantes del estándar interno (hGH/hPL) y decrecientes del ADN problema. Elegí las bandas del carril 4 como las semejantes en intensidad. Para la banda de 1500 pb la concentración inicial de ADN blanco fué de 300 ng y para la banda de 750 pb la concentración inicial fué de 25 ng.

Empleando la fórmula: # de copias = (H/P) x A x 2, obtuve:

# de copias = (300/25) X 5 X 2 = 120 copias por genoma para esta línea celular.



50 nM MTX

DNA humano = 300 ng

DNA CHO = 200 → 0.7 ng

(1 = 300 : 200 ng)

Figura 21. Cuantificación del número de copias en la línea celular productora de HGH22kDa, resistente a 50 nM de MTX. En este caso utilicé la estrategia "B" de dosis constantes del estándar interno (hGH/hPL) y decrecientes del ADN problema. Elegí las bandas del carril 1 como las semejantes en intensidad. Para la banda de 1500 pb la concentración inicial de ADN blanco fué de 300 ng y para la banda de 750 pb la concentración inicial fué de 200 ng.

Empleando la fórmula: # de copias = (H/P) x A x 2, obtuve:

# de copias = (300/200) X 5 X 2 = 15 copias por genoma para esta línea celular.

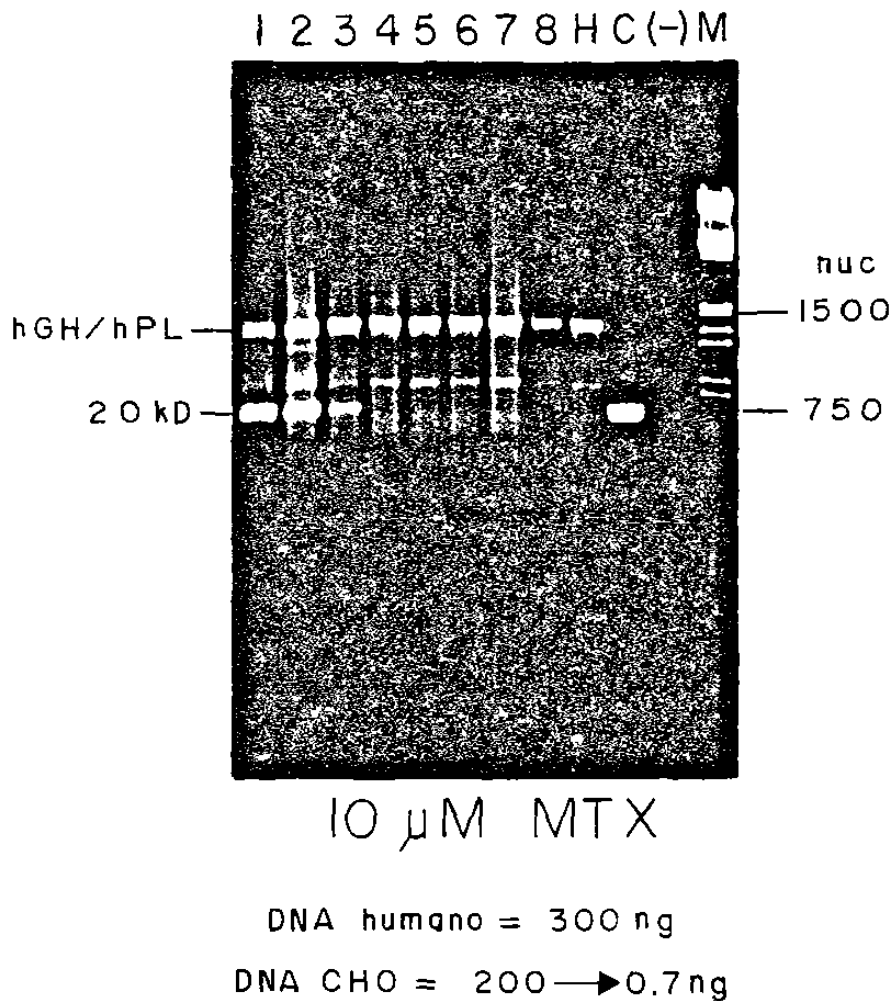
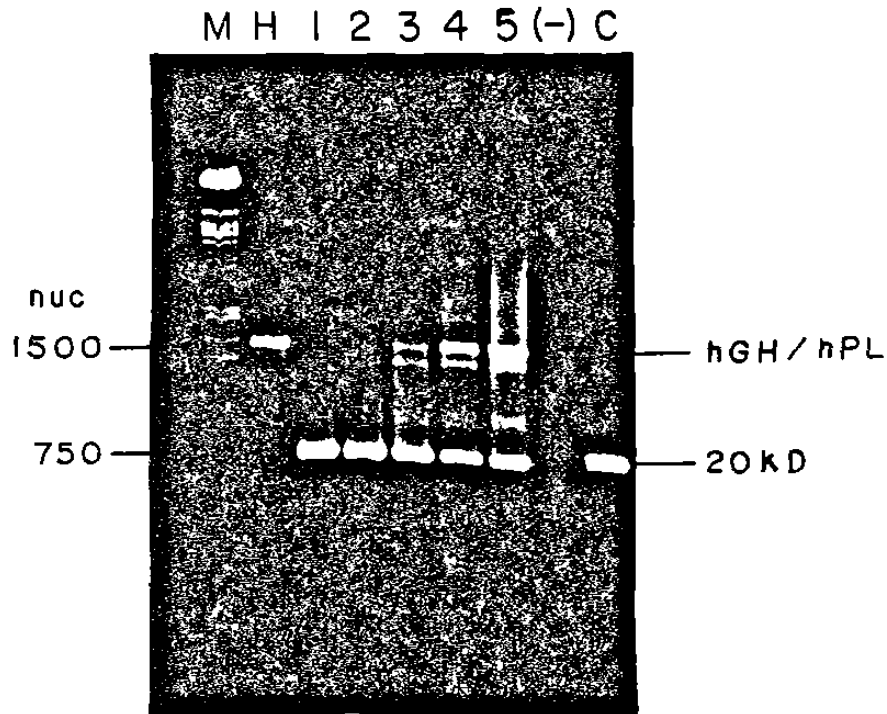


Figura 22. Cuantificación del número de copias en la línea celular productora de HGH20kDa, resistentes a 10  $\mu$ M de MTX. Utilicé la estrategia "B" de dosis constantes del estándar interno (hGH/hPL) y decrecientes del ADN problema. Elegí las bandas del carril 2 como las semejantes en intensidad. Para la banda de 1500 pb la concentración inicial de ADN blanco fué de 300 ng y para la banda de 750 pb la concentración inicial fué de 100 ng.

Empleando la fórmula: # de copias = (H/P) x A x 2, obtuve:

$$\# \text{ de copias} = (300/100) \times 5 \times 2 = 30 \text{ copias por genoma para esta línea celular.}$$



50 nM MTX

DNA humano = 100 → 1000 ng

DNA CHO = 100 ng

( 5 = 1000 : 100 ng )

Figura 23. Cuantificación del número de copias de la línea celular productora de HGH20kDa, expuesta a 50 nM de MTX. En este caso utilicé la estrategia "A" de dosis decrecientes del estándar interno (hGH/hPL) pero con dosis constantes del ADN problema. Elegí las bandas del carril 5 como las semejantes en intensidad. Para la banda de 1500 pb la concentración inicial de ADN blanco fué de 1000 ng y para la banda de 750 pb la concentración inicial fué de 100 ng.

Empleando la fórmula: # de copias = (H/P) x A x 2, obtuve:

# de copias = (1500/100) X 5 X 2 = 150 copias por genoma  
para esta línea celular.

# **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

## DISCUSION Y PERSPECTIVAS

En este trabajo logré: 1) la obtención de líneas celulares que producen en forma estable HGH20 kDa, así como la isoforma de 22kDa (que nos sirvió de referencia); 2) la amplificación génica de los ADNcs de HGH20 y 22kDa dentro del genoma de las células CHODG44, mediante dos estrategias alternativas de amplificación; 3) la demostración de su integración al genoma de las células CHO; 4) la determinación del número de copias por genoma de los minigenes de 20 y 22 kDa y 5) la identificación de las proteínas recombinantes de HGH de 20 y 22 kDa.

El éxito de este trabajo se basó en la selección del modelo experimental utilizado (El Modelo CHO/DHFR/MTX, página 18). Con respecto a la obtención de las líneas celulares, es importante enfatizar que esta es la primera vez que se obtiene una línea celular eucariótica productora de HGH20kDa y que en un futuro cercano nos permitirá tener las cantidades adecuadas de hormona pura e idéntica a la natural para cumplir con los futuros objetivos propuesto. Un logro adicional fué la obtención de la línea productora de HGH22kDa, ya que ésta no estaba contemplada en el diseño inicial de este trabajo. Esta se originó debido a que no se cuenta con una técnica sensible de detección de HGH20kDa y esta hormona dá una reacción cruzada muy pobre con los anticuerpos que reconocen a la de 22kDa para la cual ya se tienen sistemas de RIA muy precisos y sensibles. Así, desde los primeros experimentos para la HGH20kDa realicé experimentos en paralelo para la HGH22kDa y de esta manera logré una cuantificación aproximada de los niveles de expresión de HGH20kDa, al extrapolarle los niveles obtenidos para HGH22kDa. Además de lo anterior, fué importante generar líneas

sobreproductoras de HGH de 22kDa, puesto que esta isoforma es de gran interés biotecnológico y siempre será el punto de referencia para cualquier estudio que deseemos emprender sobre la isoforma de 20 kDa.

Con respecto a las dos estrategias de amplificación que empleé, ambas han sido utilizadas para la producción estable de varias proteínas recombinantes con resultados satisfactorios (59). Sin embargo, hasta ahora no se había reportado un análisis comparativo que estableciera cual de las dos era más eficiente y confiable.

En este caso, en los primeros 30 días observé diferencias significativas de expresión entre una y otra estrategia. Sin embargo, los siguientes resultados fueron sorprendentes: Las células cultivadas directamente a 10  $\mu\text{M}$  de MTX no lograron la recuperación completa después del desafío con la droga, perdieron el fenotipo original y los niveles de expresión de HGH decayeron. La estrategia de las dosis crecientes fue la más favorable en estos experimentos probablemente porque le permite a las células seleccionadas el tiempo suficiente para reponerse a la agresión farmacológica y utilizar principalmente el mecanismo de duplicación génica para generar la resistencia al MTX. En el caso del desafío tipo choque con una dosis alta de MTX, es probable que las células seleccionadas hayan utilizado también alguna de las otras alternativas de resistencia, pues los números de copias de los genes hGH no eran tan grandes como los de las células de la alternativa gradual.

Los resultados exitosos con la estrategia de dosis altas de MTX obtenidas por otros grupos, pueden explicarse si se consideran factores como las condiciones de cultivo, las características del plásmido transfectado, la línea celular elegida, las características de las proteínas recombinantes a



expresar y las alternativas de los mecanismos de resistencia celular de MTX antes mencionados. Actualmente, tenemos niveles de expresión de 1.0 a 2.0  $\mu\text{g}$  de proteína/ $10^6$  células/día en cultivos expuestos a 250nM de MTX por la técnica gradual, mientras que los cultivos en 10  $\mu\text{M}$  se mantienen en niveles de producción de aproximadamente 0.5  $\mu\text{g}/10^6$  células/día de la hormona.

Antes del advenimiento de la RCP, la cuantificación del número de copias de un gen en un genoma celular se realizaba principalmente por Southern blot, la metodología más accesible en la mayoría de laboratorios de biología molecular. Sin embargo, esta técnica requiere del uso de grandes cantidades de ADN (mínimo 10  $\mu\text{g}$ ), isótopos radioactivos, 4 a 5 días de trabajo y personal eficientemente entrenado para ello. En este trabajo, confirmé la integración de los minigenes de HGH en el genoma de las células mediante la técnica de RCP, la cuál resultó ser muy ventajosa al comparar los parámetros mencionados del métodos tradicional de Southern-blot. Determiné el número aproximado de copias de ambos ADNcs que se lograron amplificar en cada una de las dos alternativas de amplificación con MTX. Hasta ahora no se tiene explicación de porqué el minigen HGH20kDa amplificó más que el de HGH22kDa. Posiblemente se deba a la forma en que estos ADNcs se hayan integrado al genoma de la célula (el cromosoma, el sitio, la orientación, etc.), sin embargo, estos resultados fueron muy satisfactorios para nosotros.

La detección inicial de los niveles de expresión de HGH la realicé únicamente por RIA, dado a la gran sensibilidad y especificidad de esta metodología al utilizar anticuerpos específicos marcados con  $^{125}\text{I}$  (detecta niveles de 1 a 30 ng/ml), siendo más sensible que el Western blot (con niveles mínimos de detección de 100 ng totales). La diferencia tan marcada en los niveles de expresión entre HGH22kDa y HGH20kDa observada por RIA

es realmente un artificio, que se explica porque el estuche comercial para detección de HGH por RIA utiliza anticuerpos policlonales altamente específicos para HGH22kDa que reconocen pobremente la variante de 20kDa. Estos resultados fueron apoyados por observaciones anteriores realizadas en nuestro laboratorio (37) y por los hallazgos de otros grupos de investigadores (32). Además es notable que siempre se mantuvo una relación aproximada de 10 a 1 para los niveles de HGH22kDa con respecto a los de HGH20kDa en todas las determinaciones. Consecuentemente, decidí que los alentadores resultados de la expresión de HGH22kDa eran justificadamente extrapolables a HGH de 20kDa.

Podemos decir que la identidad de nuestra proteína de interés fué parcialmente probada al utilizar para el Western-blot, los anticuerpos policlonales específicos anti-HGH22kDa, pero el tamaño (20kDa) obtenido para nuestra proteína finalmente nos confirmaba su presencia. No obstante hemos verificado ya la actividad funcional de las HGHs recombinantes producidas in vitro, en el modelo de diferenciación de fibroblastos preadipocíticos de la línea celular 3T3-F442A hacia adipocitos. Nuestros estudios demuestran que ambas isoformas de HGH secretadas por los cultivos son capaces de inducir la conversión adipocítica de los fibroblastos preadipocíticos, aunque con diferencias en sus potencias (37).

Finalmente, en forma resumida podemos decir que las perspectivas de trabajo que se generaron con los resultados de esta tesis son las siguientes: 1) Desarrollar un sistema de inmunodetección específico de HGH20kDa, 2) Llevar a cabo estudios bioquímicos que permitan distinguir entre la actividad de HGH 22 y de 20kDa, 3) Contribuir a delinear el papel biológico y el probable papel farmacológico de esta variante y 4) valorar su posible potencial biotecnológico. Actualmente algunos de las perspectivas anteriormente mencionadas ya están siendo abordados.

## **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

1. Paladini, A.C., Peña, C. y Poskus, E. 1983. Molecular biology of growth hormone. *Critical Reviews in Biochemistry* 15:25-56.
2. Press, M. 1988. Growth hormone and metabolism. In: *Diabetes/Metabolism Reviews*. John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y., U.S.A. 4:391-414.
3. Phillips III, J.A. 1989. Inherited defects in growth hormone synthesis and action. En: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. y Valle, D. (eds.) "The metabolic bases of inherited diseases". McGraw-Hill Co., New York, N.Y. pp. 1965-1983.
4. Isaksson, O.G., Edén, S. y Jansson, J.O. 1985. Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. *Ann. Rev. Physiol.* 47:483-499.
5. Granner, D.K. 1988. Hormonas de hipófisis e hipotálamo. En: *Bioquímica de Harper*. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. y Rodwell, V.W. El Manual Moderno S.A. México, D.F. pp. 480-493.
6. Abdel-Meguid, S.S. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84,6434
7. Phillips III, J.A. y Vnencak-Jones, C.L. 1989. Genetics of the growth hormone and its disorders. *Advances in human genetics.* 18:305-36.
8. Harper, M.E., Barrera-Saldaña, H.A. y Saunders G.F. 1982. Chromosomal localization of the human placental-growth hormone gene clomplex. *Am. J. Hum. Genet.* 34: 227-234
9. Barsh, G.S., Seeburg, P.H. y Gelinas, R.E. 1983. The human growth hormone gene family structure and evolution of the chromosomal locus. *Nucleic Acids Res.* 12:3939-3958.
10. Chen, E.Y., Liao, Y., Smith, D.H., Barrera-Saldaña, H.A., Gelinas, R.E. y Seeburg, P.H. 1989. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology and evolution. *Genomics.* 4:479-497.
11. Lewis, U.J., Dunn, J.T., Bonewald, L.F., Seavey, B.K. y VanderLaan, W.P. 1978. A naturally occurring structural variant of human growth hormone. *J. Biol. Chem.* 253:2679-2687.

12. Chawla, R.K., Parks, J.S. y Rudman, D. 1983. Structural variants of human growth hormone: biochemical, genetic and clinical aspects. *Ann. Rev. Med.* 34:519-547.
13. Kostyo, J.L., Skottner, A., Brostedt, P., Roos, P., Cameron, Ch.M., Forsman, A., Fryklund, L., Adamafio, N.A. y Skoog, B. 1987. Biological characterization of purified native 20kDa human growth hormone. *Biochemica et Biophysica Acta.* 925:314-324.
14. Wallis, M. 1980. Biological characterization of purified native 20kDa human growth hormone. *Nature.* 284:512
15. De Noto, F.S., Moore, D.D. y Goodman, H.M. 1981. Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic. Acids Res.* 9:3719-3730.
16. Lewis, U.J., Bonewald, L.F., Lewis, L.J. 1980. The 20,000-dalton variant of human growth hormone: Location of the amino acid deletions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92:511-516.
17. Masuda, N., Watahiki, M., Tanaka, M., Yamakawa, M., Shimizu, K., Nagai, J. y Nakashima, K. 1988. Molecular cloning of cDNA encoding 20kDa variant human growth hormone and the alternative splicing mechanism. *Biochem. Biophys. Acta.* 949:125-131
18. Chawla, R.K., Parks, J.S., Rudman, D., 1983. Structural variants of human growth hormone, Biochemical, Genetic and Clinical aspects. *Ann. Rev. Med.* 34:519-547.
19. Kostyo, J.L., Cameron, Ch.M., Olson, K.C., Jones, A.J. y Pai, R.C. 1985. Biosynthetic 20-kilodalton methionyl-human growth hormone has diabetogenic and insulin-like activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:4250-4253.
20. Culler, F.L., Kaufmann, S., Frigeri, L.G. y Jones, K.L. 1987. Comparison of the acute metabolic effects of 22,000-dalton and 20,000-dalton growth hormone in human subjects. *Horm. Metab. Res.* 20:107-109.
21. Campbell, R.M., Kostyo, J.L. y Scanes, C.G. 1990. Lipolytic and antilipolytic effects of human growth hormone, its 20-kilodalton variant, a reduced and carboximethylated derivated, and human placental lactogen on chicken adipose tissue in vitro. *Proc. Soc. Experim. Biol. Med.* 193:269-273.
22. Morikawa, M., Green, H. y Lewis, U.J. 1984. Activity of human growth hormone and related polypeptides on the adipose conversion of 3T3 Cells. *Mol. Cell. Biol.* 4:228-231.

23. Birnbaum R.S., Goodman, H.M. 1976. Studies on the mechanism of the antilipolytic effects of growth hormone. *Endocrinology* 99:1336-1345.
24. Takano, K. 1983. Short term study of biosynthetic HGH in man. *Endocrinol. Japon.* 30:79-84.
25. Culler, F.L., Kaufmann, S., Frigeri, L.G., Jones, K.L. 1987. Comparison of the acute metabolic effects of 22,000-dalton and 20,000-dalton growth hormone in human subjects. *Horm. Metab. Res.* 20:107-109.
26. Campbell, R.M., Kostyo, J.L. y Scanes, C.G. 1990. Lipolytic and antilipolytic effects of human growth hormone, its 20-kilodalton variant, a reduced and carboxymethylated derivated, and human placental lactogen on chicken adipose tissue in vitro. *Proc. Soc. Experim. Biol. Med.* 193:269-273.
27. Pecile, A. y Müller, E.E., 1980. Growth hormone and other biologically active peptides. *Proc. of the International Symposium en: Excerpta Médica.* Amsterdam, 125-143..
28. Chapman, G.E., Rogers, K.M., Brittain, T., Bradshaw, R.A., Bates, O.J., Turner Ch.T., Cary, P.D. y Crane-Robinson, C. 1981. The 20,000 molecular weight variant of human growth hormone. Preparation and some physical and chemical properties. *J. Biol. Chem.* 265: 2395-2401.
29. Adelman, J.P., Hayflick, J. S., Vasser, M., and Seeburg, P.H. 1983. Expression in *E. coli* of the HGH 20kDa obtained by site directed mutagenesis. *DNA.* 2, 183-193.
30. Tinsley, F.C., Grinnan, E.L., Baker, S.H., Powell, J.G., Bemis, K.G. y Shaar, C.J., 1986. The 20,000 dalton structural variant of recombinant DNA derived methionyl human growth hormone has early insulin-like effects in hypophysectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 138:342-348.
31. Ader, M., Agajanian, T., Finegood, D.T. y Bergman, R.N., 1987. Recombinant deoxyribonucleic acid derived 22K and 20K human growth hormone generate equivalent diabetogenic effects during chronic infusion in dogs. *Endocrinology* 120:725-731.
32. Ohmae, Y., Yano, H., Umezawa, S., Tanaka, T., Hibi, I., Miyamoto, C. y Furuichi, Y. 1989. Biological activities of synthesized 20K and 22K hGH in Nb<sub>2</sub> bioassay and IM-9 radioreceptor assay. *Endocrinol. (Japan)* 36:9-13.

33. Kaufman, R.J. y Sharp, P.A. 1982. Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene. *J. Mol. Biol.* 159:601-621.
34. Stark, G.R., Wahl, G.M. 1984. Gene amplification. *Ann. Rev. Biochem.* 53:447-91.
35. Goeddel, D.V. 1990. Gene expression technology en: *Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc. New York, N.Y. U.S.A 185:485-595.
36. Urlaub, G. y Chasin, L.A. 1980. Isolation of chinese Hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:4216-4220.
37. Rincon-Limas, D., Reséndez-Pérez D., Ortíz-López R., Alvidrez-Quiwi, L.E., Castro-Muñozledo, F., Kuri-Harcuch, W., Martínez-Rodríguez, M. y Barrera-Saldaña H.A. 1992. HGH isoforms: cDNA expression, adipogenic activity and production in cell culture. *B. B. Acta.* En prensa.
38. Reséndez-Pérez, D., Ramírez-Solís R., Varela-Echavarría A., Martínez-Rodríguez H. G. y Barrera-Saldaña H. A. 1990. Coding potential of transfected human placental lactogen genes. *Nucleic. Acids. Res.* 18:4665-4670.
39. Tanaka T., Shishiba, Y., Gout, P., Beer, C., Noble, R., Friesen, H.G. 1983. Radioimmunoassay and bioassay of human growth hormone and human prolactin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56:18-20.
40. Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354.
41. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, S., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
42. Palmiter, R.D., Behringer, R.R., Quaife, C.J., Maxwell, F., Maxwell, I.H. y Brinster, R.L. 1987. Cell lineage ablation in transgenic mice by cell specific expression of a Toxin gene. *Cell* 50:435-443.
43. Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* 2º Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.

44. Jacobs, E. y A. Clad. 1986. Electroelution of fixed and stained membrane proteins from preparative sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels into a membrane trap. *Anal. Biochem.* 156:585-589.
45. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
46. Birnboim, H.C. y Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid. Res.* 7:1513-1522
47. Gorman, C. 1985. High efficiency gene transfer into mammalian cells. En "DNA cloning". Ed. por Glover, D.M., Vol. 2, pp. 143-164.
48. Neumann, J.R., Morency, C.A. y Russian, C.O. 1987. A novel rapid assay for chloramphenicol acetyl transferase gene expression. *Biotechniques* 5:44-47.
49. Freshney, R.J. 1983. Culture of animal cells. Alan R. Ed. Liss, Inc. New York, N.Y. U.S.A.
50. Tabcharani, J.A., Chang, X.B., Riordan, J.R. y Hanrahan J.W. 1991. Phosphorylation-regulated Cl<sup>-</sup> channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* 352:628-631.
51. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
52. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
53. Chomczynski, P. y Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
54. Rosen, J.M., Woo, S.L.C., Holder, J.W., Means, A.R. y O'Malley, B.W. 1975. Preparation and preliminary characterization of purified ovalbumin messenger RNA from the hen oviduct. *Biochemistry* 14:69-78.
55. Del Sal, G., Manfioletti, G. y Schneider, C. 1989. The CTAB-DNA Precipitation Meth: A common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques* 7(5):514-19.



56. Innis, M.A., Gelfand, D.H y Sninsky, J.J,. 1990. PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, Inc. New York, N.Y., E.U.A.
57. Buck, K.J., Harris, R.A. y Sikela, J.M. 1991. A general method for quantitative PCR analysis of mRNA levels for members of gene families: Application to GABA receptor subunits. Biotechnology 11(5):636-641.
58. Wang, A., Doyle, Michael V., y Mark, David F. 1989. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:9717-972
59. Page, M.J. y Sydenham, M.A. 1991. High level expression of the humanized monoclonal antibody canpath-H in Chinese Hamster Ovary cells. Biotechnology 9:64-68











