

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTUDIO COMPARATIVO DE PROMOTORES DE  
GENES DEL COMPLEJO hGH-hPL QUE SE EXPRESAN  
EN PLACENTA**

**POR**

**MARTIN CANIZALES ESPINOSA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS CON  
ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR  
E INGENIERIA GENETICA**

**NOVIEMBRE DE 1996.**

FM

OH450

C3

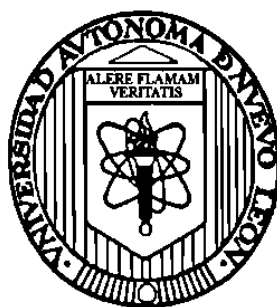
C.1



1080071210

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**Estudio Comparativo de Promotores de Genes del Complejo  
hGH-hPL que se Expresan en Placenta**

**Por**

**MARTIN CANIZALES ESPINOSA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRIA EN CIENCIAS con  
Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

**Noviembre 1996**

TM  
QH450  
C3

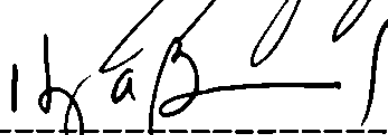


**ESTUDIO COMPARATIVO DE PROMOTORES  
DE GENES DEL COMPLEJO hGH-hPL  
QUE SE EXPRESAN EN PLACENTA**

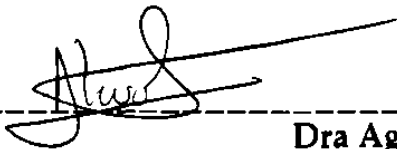
**Aprobación de Tesis:**



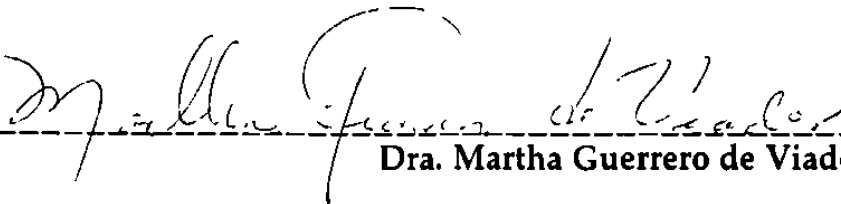
-----  
**Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez Asesor de Tesis.**



-----  
**Dr. Hugo A. Barrera Saldaña Coasesor.**



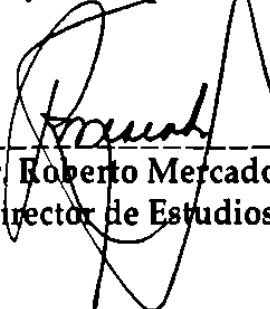
-----  
**Dra Agnes Revol de Mendoza.**



-----  
**Dra. Martha Guerrero de Viader.**



-----  
**Dr. Julio Sepúlveda Saavedra.**



-----  
**Dr. Roberto Mercado Longoria.  
Subdirector de Estudios de Posgrado.**

***El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica, bajo la asesoría de la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez y la Coasesoría del Dr Hugo A. Barrera Saldaña.***

***En la lucha eterna entre el río y la roca,  
siempre vence el río,  
no tanto por su fuerza  
sino por su perseverancia...***

***Jasson Brown***

## DEDICATORIA

*Por sobre muchas penalidades y situaciones a mis padres, Liborio Canizales e Irene Espinosa; Gracias... por la libertad que me han otorgado y porque me enseñaron que el resultado de un esfuerzo no se da por uno solo.....*

*A mis hermanos y hermanas, por la familia que hemos logrado formar...*

*A mis cuñadas y cuñado, por soportar a mis hermanos y por la dicha que brindan en colaborar con la segunda generación....*

*A mis sobrinos, fuente de alegrías familiares...*

*A Miguel Villasana "Don Mike", por mostrarme la intensidad de vivir en el ocaso de la vida.....*

*A la gente ULIEG ...a los de ayer y los de hoy .....y a todo lo que representa la ULIEG, que me otorgó una nueva visión ante la vida....*

*Al grupo de amigos "Los hijos de Mine", con quienes me tocó vivir esta etapa ...*

*Muy especialmente a Alma, quién ha compartido mucho de mi andar, mi pensar y de mis nuevas ilusiones.....Gracias.....por todo lo que me aportas y por la esperanza de un futuro recombinante.*



## **AGRADECIMIENTOS.**

**A la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez, mi asesora y después amiga; por todas las enseñanzas que definitivamente recordaré que son para la vida, GRACIAS POR TODO.**

**Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, GRACIAS por la segunda oportunidad en la vida y por aquello de : "Espero que algún día llegues a superarme, lo dudo mucho, pero puedes intentarlo".**

**A la Dra Agnes Revol por la asesoría experimental y sus aportaciones al enriquecimiento de este manuscrito.**

**A la Dra. Martha Guerrero y Dr. Julio Sepúlveda por el interés mostrado en el mejoramiento de este escrito.**

**Al Dr. José Ma. Viader por todos sus comentarios y sugerencias que han contribuido a mi formación.**

**De manera muy especial al personal administrativo, intendencia y de mantenimiento por la ayuda brindada en momentos "de crisis"; logrando que este trabajo saliera adelante.**

**Extiendo mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de la beca y que me permitió concluir con mis estudios de maestría.**

## **Lista de Tablas.**

	<b>Página</b>
<b>Tabla I</b>	<b>Digestión preparativa del vector pAVE-hGHN.....17</b>
<b>Tabla II</b>	<b>Digestión de los vectores pBS-hPL-4.....21</b>
<b>Tabla III</b>	<b>Ligación del vector y el promotor del gen hPL-4.....22</b>
<b>Tabla IV</b>	<b>Digestión preparativa de pBS-hPL-3 y pBS-hGHV.....24</b>
<b>Tabla V</b>	<b>Ligación del vector y promotores de los genes hPL-3 y hGH-V.....27</b>
<b>Tabla VI</b>	<b>Calidad y rendimiento en las preparaciones de plásmidos.....48</b>
<b>Tabla VII</b>	<b>Concentración media de HGH para cada recombinante.....55</b>
<b>Tabla VIII</b>	<b>Análisis densitométrico del amplicón digerido con <i>Rsa</i> I.....56</b>
<b>Tabla IX</b>	<b>ANOVA de la concentración media de HGH .....58</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. <b>Estrategia General.....</b>	<b>15</b>
2. <b>Mapa de restricción de pAVE-hGHN.....</b>	<b>17</b>
3. <b>Mapa de restricción de pBS-hPL4.....</b>	<b>21</b>
4. <b>Mapa de restricción de pBS-hPL-3 y pBS-hGHV.....</b>	<b>24</b>
5. <b>Estrategia general de construcción de plásmidos recombinantes.....</b>	<b>26</b>
6. <b>Estrategia general de purificación y transfección de recombinantes.....</b>	<b>29</b>
7. <b>Fundamento del ensayo de CAT.....</b>	<b>32</b>
8. <b>Eliminación del promotor en pAVE-hGHN.....</b>	<b>41</b>
9. <b>Mapa de restricción y caracterización del vector pBS-hPL-4.....</b>	<b>42</b>
10. <b>Mapa de restricción y caracterización del vector pBS-hPL-3.....</b>	<b>43</b>
11. <b>Mapa de restricción y caracterización del recombinante phPL4-hGHN... </b>	<b>45</b>
12. <b>Mapa de restricción y caracterización del recombinante phPL3-hGHN... </b>	<b>46</b>
13. <b>Mapa de restricción y caracterización del recombinante phGHV-hGHN. </b>	<b>47</b>
14. <b>Influencia de la concentración del DNA y volumen de lipofectamina en células JAR.....</b>	<b>49</b>
15. <b>Estandarización de la transfección en células JAR.....</b>	<b>50</b>
16. <b>Optimación de la transfección en células JEG-3.....</b>	<b>50</b>
17. <b>Eficiencia de cotransfección en células JEG-3 con el recombinante phPL4-hGHN.....</b>	<b>51</b>
18. <b>Eficiencia de cotransfección en células JEG-3 con el recombinante phPL3-hGHN.....</b>	<b>52</b>
19. <b>Eficiencia de cotransfección en células JEG-3 con el recombinante phGHV-hGHN.....</b>	<b>52</b>
20. <b>Perfil electroforético de RNA total extraído de células transfectadas.....</b>	<b>53</b>

<b>21.</b>	<b>Curva de calibración corregida para detección de HGH.....</b>	<b>54</b>
<b>22.</b>	<b>Simulación de PCR en el programa Amplify 1.2.....</b>	<b>56</b>
<b>23.</b>	<b>Perfil electroforetico de productos amplificados.....</b>	<b>56</b>
<b>24.</b>	<b>Perfil electroforetico de la digestión del producto amplificado.....</b>	<b>57</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ANOVA</b>	<b>Análisis de varianza</b>
<b>°C</b>	<b>Grados Celsius</b>
<b>CAT</b>	<b>Cloranfenicol-acetil-transferasa</b>
<b>pCMV</b>	<b>Promotor inmediato temprano del Citomegalovirus humano</b>
<b>DNA</b>	<b>Acido desoxiribonucleico</b>
<b>cDNA</b>	<b>Acido desoxiribonucleico complementario</b>
<b>dNTP's</b>	<b>Desoxiribonucleótidos</b>
<b>DPEC</b>	<b>Dietilpirocarbonato</b>
<b>D.S.</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>EDTA</b>	<b>Acido etilendiaminotetra-acético</b>
<b>ELISA</b>	<b>Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima</b>
<b>GHF-1</b>	<b>Factor de hormona de crecimiento 1</b>
<b>h</b>	<b>Horas</b>
<b>hGH-N</b>	<b>Gen normal de Hormona del crecimiento humano</b>
<b>hGH-V</b>	<b>Gen variante de Hormona del crecimiento humano</b>
<b>HGH</b>	<b>Hormona del crecimiento humano (proteína)</b>
<b>HGH-V</b>	<b>Hormona variante del crecimiento humano (proteína)</b>
<b>HPL</b>	<b>Lactógeno Placentario (proteína)</b>
<b>hPL-1</b>	<b>Gen del Lactógeno Placentario 1</b>
<b>hPL-3</b>	<b>Gen del Lactógeno Placentario 3</b>
<b>hPL-4</b>	<b>Gen del Lactógeno Placentario 4</b>
<b>Kb</b>	<b>Kilobases</b>
<b>kDa</b>	<b>Kilodaltones</b>
<b>l</b>	<b>Litros</b>

<b>LB</b>	<b>Medio Luria-Bertani</b>
<b>mg</b>	<b>Miligramos</b>
<b>min</b>	<b>Minutos</b>
<b>ml</b>	<b>Mililitros</b>
<b>µg</b>	<b>Microgramos</b>
<b>µl</b>	<b>Microlitros</b>
<b>µM</b>	<b>Micromolar</b>
<b>RT M-MLV</b>	<b>Transcriptasa reversa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney</b>
<b>mM</b>	<b>Milimolar</b>
<b>MOPS</b>	<b>Acido (3-[N-Morfolino] propan-sulfónico)</b>
<b>ng</b>	<b>Nanogramos</b>
<b>OPD</b>	<b>Ortho-Fenil-Diamina</b>
<b>PAGE</b>	<b>Electroforesis en gel de poliacrilamida</b>
<b>pb</b>	<b>Pares de bases</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa</b>
<b>pH</b>	<b>-Log [H<sup>+</sup>]</b>
<b>PM</b>	<b>Peso molecular</b>
<b>pSV-40</b>	<b>Promotor del Virus de Simio 40</b>
<b>rGH</b>	<b>Hormona de crecimiento de rata</b>
<b>RNA<sub>m</sub></b>	<b>Acido Ribonucleico mensajero</b>
<b>RNA<sub>tot</sub></b>	<b>Acido Ribonucleico total</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>RT</b>	<b>Transcripción reversa</b>
<b>S</b>	<b>Unidades Svedverg</b>
<b>s</b>	<b>Segundos</b>
<b>SDS</b>	<b>Dodecil Sulfato de Sodio</b>

<b>SEVAG</b>	<b>Cloroforma : Alcohol isoamílico (24:1)</b>
<b>SMC</b>	<b>Sitio múltiple de clonación</b>
<b>TBE</b>	<b>Amortiguador Tris-Boratos-EDTA</b>
<b>TE</b>	<b>Amortiguador Tris-EDTA</b>
<b>u</b>	<b>Unidades</b>
<b>UV</b>	<b>Ultravioleta</b>
<b>V</b>	<b>Volts</b>
<b>Vol</b>	<b>Volumen</b>

## Resumen

Martín Canizales Espinosa  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Noviembre de 1996

Título del Estudio: ESTUDIO COMPARATIVO DE PROMOTORES DE GENES DEL  
COMPLEJO hGH-hPL QUE SE EXPRESAN EN PLACENTA

Número de páginas: 69

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con  
especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

**Propósito y Método del Estudio:** Las hormonas del crecimiento humano (HGH y HGH-V) y el lactógeno placentario (HPL), son polipéptidos de 191 aminoácidos con un peso molecular de 22 kDa. Están codificadas por cinco genes que integran el complejo hGH-hPL, de los cuales tres se expresan en placenta, originando las respectivas hormonas que se postulan involucradas en el embarazo y desarrollo fetal.

Ha sido de gran interés la notable diferencia en los niveles de expresión observados para los genes placentarios, lo cual contrasta con su co-localización cromosómica, su muy alta similitud de secuencia nucleotídica e idéntica organización.

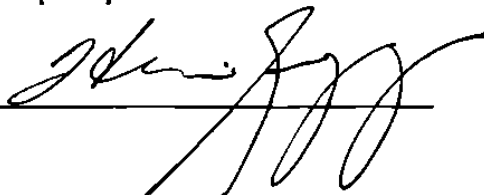
Se han estudiado tanto las unidades transcripcionales como las regiones 5' y 3' flanqueantes de estos genes, lográndose localizar secuencias relacionadas con la expresión tejido-específica, así como secuencias involucradas en la activación o bien inhibición de su expresión.

Los estudios de la región reguladora denominada promotor proximal, se han circunscrito a un fragmento de 500 pb antes del inicio de la transcripción y generalmente a un gen a la vez. En el presente trabajo se logró la subclonación molecular de regiones mayores (de aproximadamente 2.5 a 3.0 Kb), correspondientes a las regiones reguladoras 5' (promotor proximal y distal) de los genes hPL-3, hPL-4 (que se expresan a altos niveles) y hGH-V (de expresión baja) en el vector de expresión para células eucariotes pAVE-hGHN.

Los recombinantes se lipofectaron en una línea celular derivada de placenta (JEG-3). La expresión del gen reportero hGH-N, bajo la influencia de cada una de las regiones reguladoras mencionadas, se evaluó detectando la proteína HGH por ELISA y alternativamente se detectó el nivel de transcritos usando RT-PCR.

**Contribuciones y Conclusiones:** Los resultados obtenidos indican que en los recombinantes construidos en este trabajo, la fuerza del promotor del gen hGH-V iguala la fuerza del promotor del gen hPL-4 y éstos fueron 1.8 veces más fuertes que el promotor del gen hPL-3. Se evaluó la síntesis del producto del gen reportero en cultivo celular (HGH secretada al medio extracelular) y se encontró un patrón que no coincide al encontrado a nivel placentario. Estos resultados fueron confirmados de manera semicuantitativa con ensayos de RT-PCR, detectando transcritos específicos del gen reportero hGH-N a niveles diferentes para cada uno de los recombinantes. Este trabajo demuestra la influencia de la región 5' proximal y distal en la regulación de estos genes y al detectar comparativamente que el promotor hGH-V tiene mayor fuerza que la reportada en estudios previos, sugiere que hay mecanismos que reprimen su función en su estado natural.

FIRMA DEL ASESOR





## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
<b>I INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
1.1 El Complejo Multigénico hGH-hPL.....	1
1.2 Regulación Diferencial.....	3
1.3 Expresión Tejido-Específica.....	5
1.3.1 Niveles de regulación génica.....	7
1.4 Justificación.....	8
<b>II HIPOTESIS .....</b>	<b>9</b>
<b>III OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
<b>IV. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>11</b>
4.1 Origen de los reactivos.....	11
4.2 Origen del material biológico.....	12
4.3 Equipo.....	13
4.4 Métodos.....	14
4.4.1 Subclonación de los promotores en pAVE-hGHN.....	15
4.4.1.1 Selección del vector de clonación.....	15
4.4.1.2 Estrategia de eliminación del promotor heterólogo.....	16
4.4.1.3 Digestión preparativa del vector de clonación.....	17
4.4.1.4 Purificación del vector.....	18
4.4.1.5 Digestión y ligación de las secuencias promotoras de hPL-4.....	20
4.4.1.6 Construcción del recombinante phPL-4-hGHN.....	22
4.4.1.7 Estrategia de clonación del promotor de hPL-3 y hGH-V.....	23
4.4.1.8 Purificación, ligación y transformación de secuencias promotoras.....	26
4.4.2 Crecimiento a gran escala de recombinantes y testigos.....	27
4.4.3 Análisis en cultivo de células.....	30
4.4.3.1 Condiciones del cultivo celular .....	30

4.4.3.2 Estandarización de la transfección.....	31
4.4.3.3 Ensayos de CAT (Cloranfenicol-acetil-transferasa).....	32
4.4.4 Extracción de RNA total.....	34
4.4.5 Ensayos de ELISA.....	35
4.4.6 Transcripción reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) .....	36
4.4.6.1 Síntesis de la cadena de cDNA.....	36
4.4.6.2 Reacción de PCR.....	37
4.4.6.3 Digestión del producto amplificado.....	39
4.4.7 Densitometría de geles.....	40
4.4.8 Método estadístico.....	40
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
5.1 Caracterización del vector pAVE-hGHN y eliminación del promotor de hCMV.....	41
5.2 Obtención de las secuencias promotoras de hPL-4 y hPL-3.....	42
5.2.1 Promotor del gen hPL-4.....	42
5.2.2 Promotor del gen hPL-3.....	43
5.2.3 Promotor del gen hGH-V.....	43
5.3 Construcción de los recombinantes.....	44
5.3.1 Recombinante phPL4-hGHN.....	44
5.3.2 Recombinante phPL3-hGHN.....	45
5.3.3 Recombinante phGHV-hGHN.....	46
5.4 Cuantificación y calidad de los recombinantes .....	47
5.5 Transfección.....	48
5.5.1 Eficiencia de transfección con los recombinantes.....	51
5.5.1.1 Eficiencia de transfección con phPL4-hGHN.....	51
5.5.1.2 Eficiencia de transfección con phPL3-hGHN.....	51

5.5.1.3	Eficiencia de transfección con phGHV-hGHN.....	52
5.6	Análisis de Expresión.....	53
5.6.1	Recuperación del RNA total.....	53
5.6.2	Inmunodetección de HGH.....	53
5.6.3	Amplificación del cDNA de hGH-N por PCR.....	55
5.6.4	Digestión del producto amplificado.....	56
5.6.5	Análisis de niveles de expresión de los genes híbridos por densitometría de geles.....	57
5.6.6	Análisis estadístico.....	58
<b>VI</b>	<b>DISCUSION.....</b>	<b>59</b>
<b>VII</b>	<b>CONCLUSIONES. ....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>63</b>

# **CAPITULO I**

## **INTRODUCCION.**

El interés por las hormonas polipeptídicas ha llevado en la mayoría de los casos a la clonación molecular y secuenciación de los genes y cDNAs que las codifican, más no a la de sus secuencias reguladoras. Es posible que el conocimiento de los mecanismos de regulación nos permita en un futuro tener una mejor idea de como controlar e incluso manipular la expresión de genes. Una forma de lograr esto, es sin duda alguna, aportar conocimientos que nos permitan localizar, identificar y caracterizar las secuencias génicas involucradas en la regulación; el propósito de este trabajo es precisamente contribuir al estudio de este interesante campo de investigación.

### **1.1 El Complejo Multigénico hGH-hPL .**

Existen grupos de genes muy similares entre sí a los cuales se les ha denominado familias. Una de ellas esta constituida por los genes de la hormona del crecimiento (hGH), de la prolactina (hPrL) y del lactógeno placentario (hPL)<sup>1</sup>.

En el humano, el complejo multigénico hGH-hPL codifica para las hormonas del crecimiento (hGH y hGH-V) y el lactógeno placentario (hPL), está constituido de 5 genes que se encuentran localizados en el cromosoma 17 entre las bandas q22 y q24 <sup>2</sup>.

Partiendo del extremo 5', estos genes se encuentran ordenados de la siguiente manera: 5'-hGH-N (normal), hPL-1, hPL-4, hGH-V (variante), hPL-3 - 3' <sup>3</sup>; los productos de expresión mejor caracterizados de esta familia son los polipéptidos de 191 aminoácidos de HGH y HPL. Aunque sus genes presentan una muy alta similitud de secuencia nucleotídica (92 al 95%) <sup>4</sup> y codifican para hormonas muy parecidas (85%) estructural y funcionalmente, se expresan en tejidos diferentes <sup>5</sup>. El análisis mediante el empleo de técnicas de DNA recombinante ha revelado una paradoja en el potencial de codificación de estos genes, ya que mientras unos genes del complejo (hGH-N y hGH-V) por remoción alternativa de sus intrones son capaces de generar RNAs que codifican para más de una proteína <sup>6</sup>; otros como los genes hPL-3 y hPL-4 contribuyen a la síntesis de una misma proteína madura <sup>7,8</sup>.

El producto de expresión del gen hGH-N es un polipéptido responsable del crecimiento de los huesos largos y de múltiples efectos sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos <sup>9</sup>. El transcrito primario de este gen se procesa mediante vías alternativas que dan como resultado la producción de dos isoformas polipeptídicas de diferente peso molecular: una de 22 kDa, que constituye del 85-90% del total de la HGH circulante en la sangre y la otra de 20 kDa, que comprende del 10-15% <sup>10</sup>.

El gen hGH-V se expresa durante el desarrollo placentario y produce también varios polipéptidos; uno de ellos es secretado, alcanzando la circulación materna e inclusive llega a sustituir casi por completo a la HGH normal producida por la adenohipófisis materna al final del embarazo <sup>11,12</sup>. Se produce también una isoforma de 26 kDa por retención del cuarto intrón, ella permanece anclada a la membrana del sinciotrofoblasto placentario y otras isoformas que aún no están bien estudiadas <sup>13</sup>.

La detección en suero materno del producto proteico derivado de la expresión conjunta por los genes hPL-3 y hPL-4, es factible a partir de la cuarta semana de gestación y alcanza niveles de producción de hasta 1 gramo diario hacia el final del embarazo <sup>14</sup>. A HPL se le ha considerado tradicionalmente como una hormona de crecimiento fetal, debido a los múltiples efectos de esta proteína en el metabolismo y movilización de aminoácidos, lípidos y carbohidratos en la madre, provocando que los nutrientes se encuentren más accesibles para su captación por el feto <sup>15</sup>. Sin embargo se han reportado casos en los que a pesar de que en el feto hubo delección de los genes que codifican para esta proteína, el embarazo y el producto a término de éste, resultaron normales <sup>16,17,18</sup>.

Del gen hPL-1 no ha podido detectarse una proteína derivada de su expresión y hasta muy recientemente se le consideraba transcripcionalmente inactivo, ya que presenta una mutación al inicio del segundo intrón, lo cual lo inhabilita para producir transcritos completamente procesados <sup>5,19,20</sup>. Cooke y cols. detectaron diversos transcritos producto del procesamiento alternativo de los RNAm inmaduros de este gen <sup>21</sup>. Sin embargo, la funcionalidad del promotor se ha verificado ya por ensayos de transcripción *in vitro* <sup>22</sup>. Recientemente se clonó un transcrito de este gen y en un ensayo de transcripción *in vitro* se determinó que tiene potencial de codificación para una proteína que puede ser secretada y su tamaño es muy similar al de HPL <sup>23</sup>.

## 1. 2 Regulación diferencial

Del total de los RNAm de los genes placentarios producidos en placenta a término, entre un 5 y un 10 % son de hPL, mientras que solo 0.05% lo son de hGH-V <sup>24</sup>, pero se desconoce por qué los genes hPL-3 y hPL-4 se expresan aproximadamente 100 veces más que hPL-1 y 1000 veces más que hGH-V.

La contribución de los genes hPL's activos (hPL-3 y hPL-4) a la producción de la proteína madura es diferente tanto a nivel de la placenta <sup>25</sup>, como en líneas de coriocarcinoma en cultivo celular y en neoplasias del trofoblasto (molas hidatidiformes) <sup>26</sup>.

Los niveles de expresión a nivel de RNAm de los genes hPL-3 y hPL-4 en placenta a término ha sido variadamente reportado como 6:4 (hPL4:hPL3) en estudios realizados por Barrera-Saldaña y cols. empleando tres enfoques de investigación diferentes y una sola placenta a término <sup>25</sup>, 3:1 por Chen y cols. en un banco de DNAc derivado de placenta <sup>3</sup>, 5:1 reportado por Cooke y cols. <sup>27</sup> y más recientemente por nuestro grupo desde 1:1 hasta 6:1, presentándose consistentemente el mismo patrón: los transcritos de hPL-4 más abundantes que los de hPL-3.

Nuestro grupo ha demostrado también que la transfección transitoria de células COS-7 con la región codificante de estos genes y bajo la regulación del mismo promotor heterólogo, conducen a niveles de transcripción de hasta 8:1 <sup>28</sup>, pero con un patrón invertido al observado en la placenta. Esto sugiere que pequeñas diferencias en la unidad transcripcional de estos dos genes pueden contribuir de forma importante en los niveles de expresión observados en tejido placentario.

Estudios realizados con recombinantes conteniendo la región promotora proximal (496 pb) y la región codificante de un gen reportero (gen CAT), transfectados en líneas celulares GC (de pituitaria anterior de rata) demostraron que en esta línea celular, el promotor proximal de hPL-4 es activo e incluso 3 veces más fuerte que el de hGH-V <sup>29,30</sup>. De la misma forma, empleando una construcción con el mismo gen reportero CAT y una región promotora más grande (2.1 Kb) derivada de hPL-3; se transfectó la línea

celular de coriocarcinoma BeWo, así como cultivos primarios de células de placenta a término, estos estudios permitieron localizar regiones de importancia en la activación e inhibición de la expresión de este gen<sup>31-37</sup>. Empleando estas construcciones pero con deleciones en el promotor distal se detectó una región involucrada en la inhibición, localizada alrededor de -1200 a -2300 pb antes del sitio de inicio de la transcripción<sup>32</sup>. Estos estudios representan uno de los pocos trabajos encontrados en la literatura en relación a la influencia de la región promotora distal sobre la expresión de los genes placentarios.

Se conocen secuencias que al parecer son claves para esclarecer la actividad de expresión del gen hPL-3. Entre estas regiones reguladoras pueden mencionarse a la caja TATA, que dicta el origen de la transcripción del RNAm, la secuencia GGGAGG, la cual es una variante del sitio de reconocimiento del factor transcripcional Sp1, factor importante en la activación de la transcripción de los genes que se expresan en placenta<sup>38</sup> y elementos de respuesta involucrados en la activación del gen hPL-3 en placenta; dichos elementos se encuentran localizados en una región aproximada de 600 pb, alrededor de 1.8 Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción.

Por lo tanto los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que la expresión diferencial de estos genes puede estar relacionada en parte con la fuerza de sus promotores proximales, así como con secuencias específicas localizadas en el promotor distal.

### **1.3 Expresión tejido-específica.**

El estudio de los diversos factores de regulación que gobiernan la expresión diferencial de los genes del complejo hGH-hPL que se expresan en la placenta, ha permitido localizar secuencias crípticas importantes en la transcripción de estos genes.



Algunos avances en el entendimiento de los mecanismos de regulación génica, así como de la expresión tejido-específica en este locus, se han logrado mediante el empleo de líneas celulares de adenocarcinoma hipofisiario de rata (células GC), el uso de tejido placentario y de líneas celulares derivadas de placenta (coriocarcinoma); siendo en estas últimas, donde se localizó 3 Kb río abajo del gen hPL-3 la primera región "*enhancer*" del complejo hGH-hPL <sup>39</sup>; la función potenciadora de este segmento se ha visto más relacionada con la especificidad de tejido para los genes de expresión placentaria que con la variabilidad en la misma. Regiones similares a esta secuencia también están localizadas al final de la unidad codificante de cada uno de los otros genes del complejo de expresión placentaria (excepto hGH-V), pero hasta el momento la actividad reportada es mínima<sup>40</sup>. Estudios realizados con recombinantes que contenían la región promotora de hPL-4, así como el gen reportero CAT, mostraron que al fusionarles la región *enhancer* de hPL-3 y evaluar su expresión en células en cultivo, el *enhancer* era activo en células de placenta, pero no en células de pituitaria <sup>45</sup>.

La expresión del gen hGH-N en la hipófisis se debe a la acción de un factor transcripcional de expresión específica de este tejido, el factor GHF-1 o Pit 1 <sup>41</sup>, el cual se une de manera específica a dos sitios localizados dentro de la región del promotor de este gen <sup>42</sup>. También se localizó un factor transcripcional similar en hipófisis de rata, mismo que presenta sitios de unión muy conservados dentro del promotor de rGH <sup>43</sup>. Entonces, identificar elementos estructurales de secuencias reguladoras encontrados en una especie y conservados en especies diferentes, puede ayudar a localizar más elementos reguladores, ya sean estos activadores o inhibidores de la transcripción. Los promotores proximales de los genes hPL's o hGH-V también poseen el sitio de unión específico del factor GHF-1, pero hasta el momento la presencia en placenta de este factor transcripcional no ha sido establecida irrefutablemente <sup>41,44</sup>.

Los genes del complejo que se expresan en la placenta, poseen una región de 1 Kb localizada aproximadamente 1.5 Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción<sup>3</sup>, que ha sido identificada como secuencia inhibidora de la expresión de estos genes a nivel hipofisiario. A recombinantes que poseían la región promotora proximal de los genes hPL-4 y hGH-V, regulando la expresión del gen reportero CAT, se les añadió río arriba de cada una de las regiones promotoras, un fragmento de 263 pb correspondiente a un fragmento de la región inhibidora del gen hGH-V. Estos recombinantes al ser transfectados en líneas celulares de adenoma hipofisiario de rata (GC), inhibían la expresión del gen reportero y ensayos de unión al DNA confirmaron que proteínas de extractos nucleares hipofisarios, pero no de extractos placentarios interactuaban, con esta secuencia <sup>44</sup>.

### **1.3.1 Niveles de la regulación génica**

Los mecanismos de control de la expresión génica residen en tres niveles: 1) diferencias en la secuencia nucleotídica de las regiones codificantes, 2) diferencias en las regiones flanqueantes 3) en la expresión tisular diferencial de factores de transcripción (activadores e inhibidores) y 4) en la afinidad diferencial de estos factores por las diversas secuencias nucleotídicas de control.

Sin embargo los diversos estudios llevados a cabo hasta ahora, que involucran los promotores proximales, la región codificante, así como la única región "enhancer" localizada después del gen hPL-3 <sup>39</sup>, no han logrado explicar la expresión diferencial detectada en los genes del complejo que se expresan en la placenta.

## **1.4 Justificación.**

Las investigaciones realizadas hasta el momento a nivel del promotor, se han centrado principalmente sobre el efecto del promotor proximal (496 pb antes del inicio de la transcripción) en hGH-V y hPL-4 o sobre una región más amplia de un solo gen (hPL-3) . Sin embargo no ha sido posible aclarar las diferencias de expresión ya mencionadas. Por lo anterior, nos propusimos estudiar un segmento más grande, al que llamamos promotor distal (de 2000 a 3000 pb incluyendo al promotor proximal) y realizar un estudio de tipo comparativo a nivel del promotor. Para ello construimos recombinantes en los que tales regiones de los genes hPL-3 y hPL-4 ( que se expresan a altos niveles) y del gen hGH-V (de bajo nivel de expresión) dirigen la expresión del gen reportero hGH-N; luego se introdujeron estas construcciones a células en cultivo derivadas de placenta, para detectar posibles diferencias en la expresión y tratar de dilucidar las causas de la expresión diferencial.

## **CAPITULO II**

### **HIPOTESIS**

**La influencia de elementos regulatorios incluidos en una región promotora más extensa de los genes del complejo hGH-hPL que la del promotor proximal, provoca las diferencias en los niveles de expresión de estos genes en la placenta.**

## **CAPITULO III**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si las regiones 5' proximal y distal hasta una región aproximada de 3000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción es participe de la expresión diferencial de los genes del complejo hGH-hPL que se expresan en placenta

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Obtener fragmentos de aproximadamente 2 a 3 Kb de las regiones promotoras correspondientes a los genes hPL-4, hPL-3 y hGH-V.
- 2.- Insertar estos fragmentos en el vector de expresión para células eucariotes pAVEhGH-N, sustituyendo al promotor heterólogo que en éste dirige la expresión del gen hGH-N.
- 3.- Introducir por transfección los recombinantes en una línea celular derivada de placenta.
- 4.- Evaluar la fuerza de los promotores cuantificando la expresión de la unidad transcripcional del gen hGH-N, como gen reportero.

## **CAPITULO IV**

### **MATERIAL Y METODOS**

#### **4.1 Origen de reactivos.**

Las endonucleasas de restricción fueron adquiridas de las casas comerciales Gibco-BRL Life Technologies, Inc.(Gaithersburg, MD. EUA) y New England Biolabs, Inc.(Beverly, MA EUA). y se utilizaron de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial.

Para la purificación de las bandas a partir de los geles de agarosa se usó un kit comercial GlassMAX™ DNA Isolation; de la compañía Gibco-BRL.

El material de plástico de cultivo celular se adquirió de Corning (Cambridge, MA, EUA) y Falcon (Lincoln Park, NJ, EUA)

Los medios de cultivo Opti-MEM® I y DMEM de la compañía GibcoBRL Life Technologies™.

El suero bovino fetal se adquirió de Hyclone, Inc. (Logan, Utha, EUA) y la tripsina de DIFCO Laboratories (Detroit, Michigan EUA).

De Amersham International (Buckinghamshire, UK, se adquirió el D-treo-(dicloroacetil-1-<sup>14</sup>C)-Cloranfenicol.

El reactivo LipofectAMINE<sup>TM</sup> se obtuvo de la compañía GibcoBRL, así como el kit de ELISA para la inmunodetección de la HGH humana recombinante .

La enzima transcriptasa reversa M-MLV, se consiguió de la compañía Gibco-BRL, Inc.; la enzima Taq-DNA polimerasa fue adquirida de Perkin Elmer-Cetus (Alameda, CA, EUA) y los dNTP's de corporación Promega (Madison, WI, EUA)

El oligonucleótido 5' empleado en el análisis de PCR fue sintetizado en el Laboratorio de Química Biomolecular de nuestro Departamento y el 3' usado para completar el juego en los ensayos de amplificación se sintetizó en BioSynthesis (Lewisville, TX, EUA)

## **4.2 Origen de Material Biológico.**

Los vectores que poseían las regiones promotoras, fueron obtenidos de la plasmidoteca del laboratorio de Biología Molecular de la ULIEG.

Las cepas bacterianas Top10 F' y DH5aF' de *Escherichia coli* empleadas en los ensayos de transformación y propagación de los recombinantes, se obtuvieron del cepario existente en el laboratorio de Biotecnología de la ULIEG.

La línea celular de coriocarcinoma JEG-3, fue donada por el Dr. José Luis Castrillo del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" de la Universidad Autónoma de Madrid, en Madrid, España.

Las células COS-7 las cuales derivan de riñón de mono verde y que fueron empleadas como testigos de transfección, fueron donadas por el Dr. Tien Kuo del

Departamento de Patología Experimental del M.D. Anderson Center Research de Houston, TX. EUA.

Todo el material biológico, aunque no presenta ningún riesgo para la salud, fué manejado de acuerdo a los requerimientos impuestos por la Secretaría de Salud y Comités Internacionales, así como por el Comité de Salvaguarda para el manejo de productos radiológicos.

### **4.3 Equipo.**

Se utilizó un horno de microondas GoldStar modelo MA-857M, microcentrífugas Eppendorf modelos 5402 y 5415, una fuente de poder Biorad 200/2.0, un agitador de tubos Barnstead/Termolyne modelo Maxi Mix (Bubuque, Iowa, EUA), una placa agitadora con control de temperatura marca Corning modelo PC320 (N.Y., EUA), un ultracongelador marca So-Low Enviromental Equipment (Cincinnati, Ohio, EUA) y una campana de flujo laminar marca Labconco Corporation (K. C., Missouri, EUA). También se utilizaron dos termocicladores marca MJ Research modelos PT 150 y PT 100 (Watertown, Mass. EUA), una báscula digital marca Sartorius modelo 1206MP (Camibh Göttingen Germany), un evaporador y concentrador marca Labonco Corporation modelo 78100-00 (K. C., Missouri, EUA) .

El procesamiento de datos fue realizado en las computadoras modelo Macintosh LC III (Apple Computer, Inc.; Cupertino California. EUA). Los periféricos compatibles utilizados: Modem Global Village Communication Inc. modelo Teleport/Silver A801 (East Middlefied Road Montain View Ca. EUA); digitalizador de imágenes de cama plana UMAX data System Inc. modelo UC630 MaxColor (Industrial Park Hsinchu Taiwan, R.O.I.) .



Los procesadores de textos utilizados fueron; *Microsoft Word* versión 5.1a (© 1987-1992 Microsoft Corporation), procesadores de gráficos *Microsoft PowerPoint* Versión 3.0 (© 1987-1992 Microsoft Corporation), *Adobe Photoshop Limited Edition* 2.5.1 (© 1989-1993 Adobe Systems Incorporated) y *UMAX Scan* (© 1990-1991 UMAX Scanner Driver, Impact Research Inc.).

Los programas de análisis en biología molecular fueron; *Amplify* Versión 1.2b (Bill Engels ©1992 University of Wisconsin Genetics M. Madison, Wi. EUA), *DNA Strider*™ 1.1 (© Ch. Marck and C.E.A 1989 Service de Biochimie-Département de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), *OLIGO*. Ver 4.0 (© 1992, Plymouth, Mn , EUA), *MacPlasmap* ver. 1.82 (© 1988-1990 Jingdong Liu, Biology Department, University of Utah, Salt Lake City, UT 84112. EUA).

#### **4.4 Métodos.**

El desarrollo de este trabajo, fué implementado en dos etapas que de manera general fueron: 1) Construcción y caracterización de los recombinantes seleccionados para este estudio y 2) Análisis de expresión de los mismos *in vivo* en un modelo de cultivo celular *in vitro*.

La estrategia general formulada para alcanzar los objetivos planteados se presenta en la figura 1 y consistió en lo siguiente:

- 1) Obtención de los fragmentos de las secuencias reguladoras.
- 2) Preparación del vector (eliminación del promotor heterólogo pCMV).
- 3) Ligación de los fragmentos y el vector.
- 4) Transformación y caracterización de clonas.
- 5) Propagación y crecimiento a gran escala de testigos (pCMV-CAT, pAVE-hGHN y pAVEnphGH-N) y problemas (phPL4-hGHN, phPL3-hGHN y phGHV-hGHN).
- 6) Purificación por gradiente de densidad en CsCl.

7) Transfección en células de placenta.

8) Análisis de expresión mediante ELISA y RT-PCR.

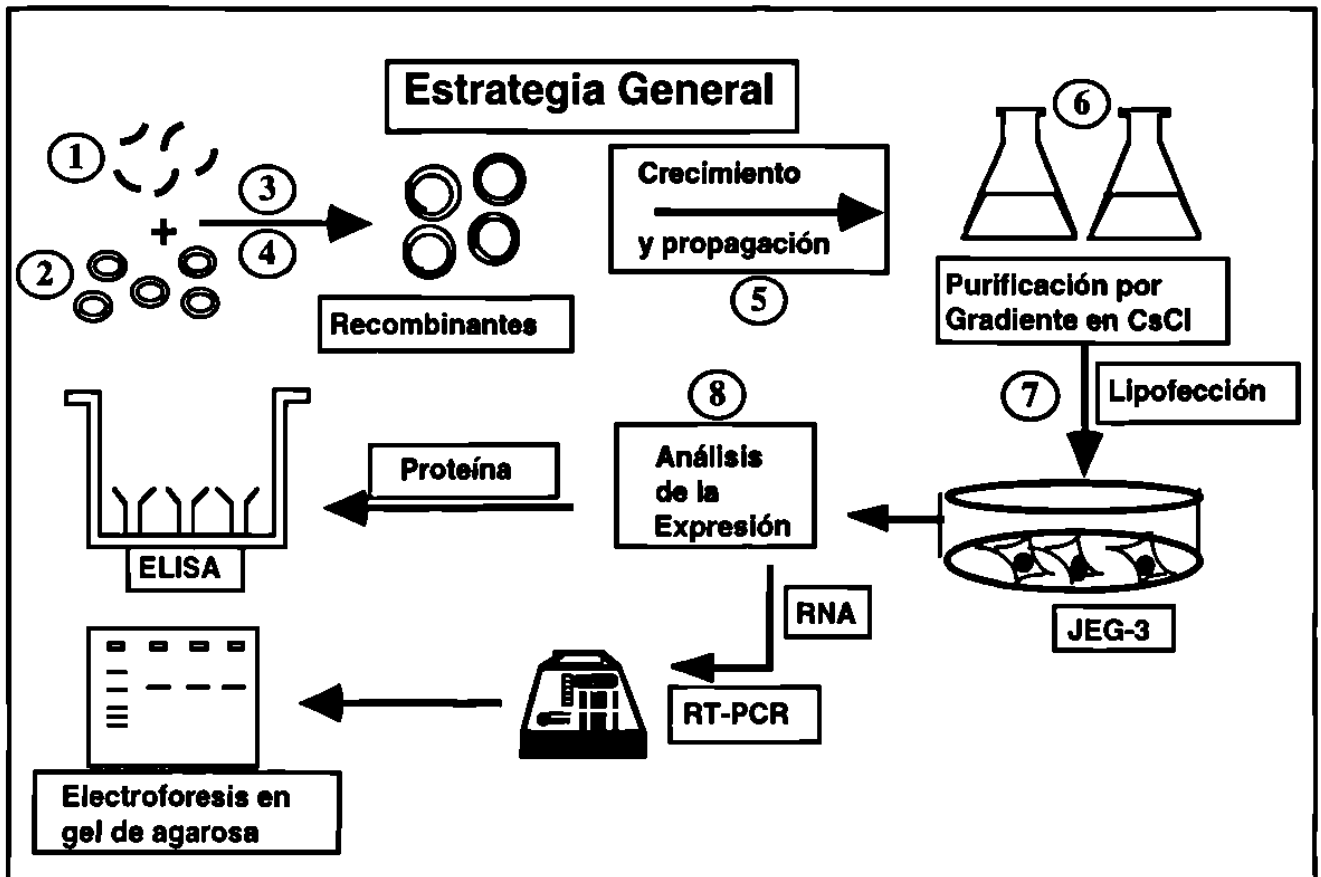


Fig 1.-Estrategia general del proyecto. Los números indicados en esta figura corresponden a los señalados en la estrategia general del trabajo.

#### 4.4.1 Subclonación de las regiones promotoras en el vector de expresión pAVE-hGHN.

##### 4.4.1.1 Selección del vector de clonación.

El vector de expresión para células eucariotes, el pAVE-hGHN contruido con anterioridad por nuestro grupo<sup>46</sup>, se consideró adecuado para construir los recombinantes de este trabajo; debido a las siguientes características: posee una secuencia de resistencia a ampicilina, un origen de replicación para células procariotes, el gen reportero hGH-N, el sitio de policlonación perteneciente a pUC19 y el promotor heterólogo del Citomegalovirus humano el cual, de acuerdo a reportes previos; es más

fuerte que el de SV40 para dirigir la expresión de genes reporteros <sup>47</sup>, siendo así, pAVE-hGHN se empleo también como control positivo de expresión de HGH ya que se conoce de antemano su eficiencia de expresión <sup>28</sup>.

#### **4.4.1.2 Estrategia de eliminación del promotor heterólogo.**

Antes de insertar las secuencias reguladoras de hPL-3, hPL-4 y hGH-V en pAVE-hGHN, fué necesario eliminar el promotor heterólogo hCMV con la finalidad de que el gen reportero quedara bajo la influencia exclusiva de las secuencias promotoras en estudio. Basado en el análisis de restricción elaborado en el programa DNA Strider 1.1 al alimentarlo con la secuencia nucleotídica del vector, se identificó que los sitios de restricción para las enzimas *Bam* HI y *Xba* I flanqueaban el sitio múltiple de clonación y la región del promotor de hCMV respectivamente (ver fig. 2); la digestión con estas enzimas libera un fragmento de aproximadamente 670 pb y con ello la región del promotor de hCMV; al mismo tiempo estos sitios permitirían la inserción de las secuencias promotoras.

El DNA plasmídico se utilizó a una concentración de 1µg/µl y primeramente se caracterizó con enzimas de restricción lo que nos permitió corroborar su identidad.

El vector de clonación cuenta con 2 sitios de reconocimiento para la enzima *Xba* I (ver fig 2), por este motivo la digestión preparativa se realizó primero con la enzima *Bam* HI y posteriormente se añadió a la reacción la enzima *Xba* I que permitiría eliminar el promotor de pCMV.

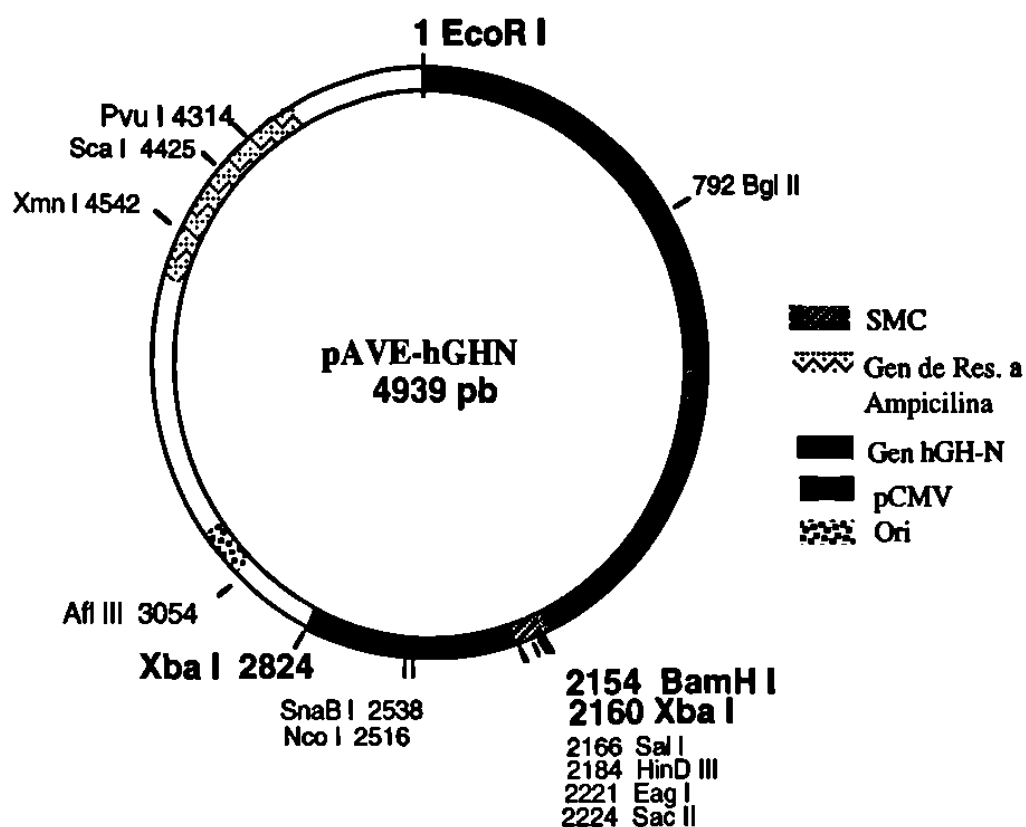


Fig. 2. - Mapa de restricción del vector pAVE-hGHN

#### 4.4.1.3 Digestión preparativa del vector de clonación.

Tabla I Digestión preparativa del vector pAVE-hGHN:

DNA plasmídico (vector) 1µg/µl	10µl
Amortiguador 10X	10µl
Bam HI 10U/µl	10µl
H <sub>2</sub> O milliQ	70µl

La preparación se incubó toda la noche a 37°C (aproximadamente 12 h) para tratar de asegurar un corte total con la enzima (tabla I). Ya corroborada la linearización y el tamaño esperado del vector mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, se llevó a

un volumen de 300  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O milliQ y se realizó un lavado añadiendo 200  $\mu$ l de Fenol:Sevag (1:1) para eliminar proteínas, glicerol y sales.

Después de centrifugar y recuperar la fase acuosa, se adicionaron 2 volúmenes de isopropanol absoluto y se dejó precipitar a -20°C por 3 h; transcurrido este tiempo se centrifugó 5 min a 12000 rpm. La pastilla se secó en un evaporador centrífugo aplicando vacío y al final se resuspendió en 80  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O milliQ.

Para completar la eliminación del promotor heterólogo se agregaron 10  $\mu$ l de la enzima de restricción *Xba* I y 10  $\mu$ l de solución amortiguadora, esta mezcla se incubó a 37°C toda la noche.

El vector se digirió en un mismo tubo con las enzimas de restricción *Bam* HI-*Eco* RI para liberar un fragmento de 2.1 Kb correspondiente a la unidad transcripcional del gen hGH-N y corroborar su identidad. Los productos de la digestión se visualizaron con luz UV después de separarse por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y teñidos con bromuro de etidio.

#### **4.4.1.4 Purificación del vector.**

Una vez demostrada la digestión total del vector de expresión así como su identidad, se separaron los fragmentos en gel preparativo de agarosa de bajo punto de fusión al 1%, mediante el depósito de 50  $\mu$ l del volumen total del digerido (aprox. 5  $\mu$ g). Se resolvió en electroforesis por 1 h con buffer TBE 1X a voltaje constante de 85 V, después de que el xilencianol migró 3/4 partes del largo total del gel de agarosa se apagó el campo eléctrico y con extremo cuidado debido a la naturaleza friable del gel de agarosa de bajo punto de fusión, se colocó en un recipiente con solución de bromuro de etidio a 2  $\mu$ g/ml por 5 min.

Las bandas se detectaron con luz UV de onda larga para de no dañar el DNA, la de 4269 pb correspondiente al vector sin el pCMV fué purificada del gel de agarosa con el kit comercial GlassMax Matrix System .

Una vez identificada la banda de interés, se procedió a cortarla obteniéndose un fragmento de agarosa con peso de 687 mg, el cual fué dividido en dos tubos eppendorf de 1.5 ml y se procedió a purificarla de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial para el uso de GlassMax <sup>48,49</sup>.

El protocolo empleado fué el siguiente:

- 1.- En un tubo eppendorf de 1.5 ml se colocó un trozo de gel de agarosa (343 mg) que contenía el fragmento de interés y se le agregó 1 ml de solución de unión (Ioduro de Sodio 6 M).
- 2.- Se incubó a 50°C por 10 min.
- 3.- Habiéndose fundido, se añadieron 20 µl de la mezcla de GlassMAX, previamente resuspendida en vórtex (El volumen de gel de sílice añadido se determinó siguiendo las indicaciones del manual de instrucción).
- 4.- Se mezcló cuidadosamente y se incubó en hielo con cubierta de papel aluminio por 10 min.
- 5.- Se centrifugó a 3000 rpm por 6 min.
- 6.- Se eliminó la fase líquida y se hicieron 2 lavados cada uno con 500 µl de buffer de lavado 1X a 4°C por resuspensión cuidadosa.
- 7.- Se centrifugó a 3500 rpm/ 10 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla de sílica-DNA se secó en un evaporador centrifugo aplicando calor, sin vacío.
- 8.- Se llevaron a cabo tres eluciones con 50 µl de H<sub>2</sub>O milliQ, cada uno a 50°C/ 10 min. Las eluciones se juntaron y se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C/ 4h.

La pastilla de DNA plasmídico se disolvió en 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O milliQ y se evaluó su pureza y calidad por absorción de luz UV a  $\lambda$  de 260 y 280 nm.

#### **4.4.1.5 Digestión y ligación de las secuencias promotoras de hPL-4.**

Para obtener los fragmentos de DNA correspondiente a las regiones promotoras proximal y distal para cada uno de los recombinantes, se partió de construcciones realizadas previamente, por lo que se procedió primero a caracterizar y establecer la identidad de cada una de ellas y comprobar que se estaba trabajando con las secuencias de interés.

La región perteneciente al promotor proximal y distal del gen hPL-4, estaba clonada en dos partes, una de ellas de 1859 pb que correspondía a la región promotora proximal así como parte del promotor distal en el vector pBlue-Script KS (+) y la secuencia correspondiente al resto del promotor distal se encontraba en una región de 4071 pb en otra construcción en este mismo vector.

La estrategia de clonación consistió en localizar secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción que flanquearan las regiones de interés como sitios únicos y que se encontraran en el vector de clonación también como sitios únicos. Se planeó entonces, obtener por un lado la región correspondiente de 1.8 Kb delimitada por los sitios 5'*Xho* I-*Bam* HI 3' y por otro lado, partiendo de la secuencia clonada de 4071 pb que pertenece al resto del promotor distal, obtener una región de 1273 pb delimitada por los sitios 5'*Xba* I-*Xho* I 3' en base a lo marcado por el mapa de restricción obtenido con el programa DNA Strider, cuando éste fué alimentado con las secuencias de los plásmidos. (ver fig 3 y tabla II).

Con el fin de tener DNA de alta calidad y en suficiente cantidad para los ensayos de digestión enzimática, purificación de las regiones promotoras y las ligaciones, los vectores conteniendo las secuencias reguladoras se crecieron a gran escala y se purificaron mediante ultracentrifugación empleando gradiente de densidad en CsCl usando una modificación a la técnica ya descrita por Clewell, D.B. <sup>50</sup>.

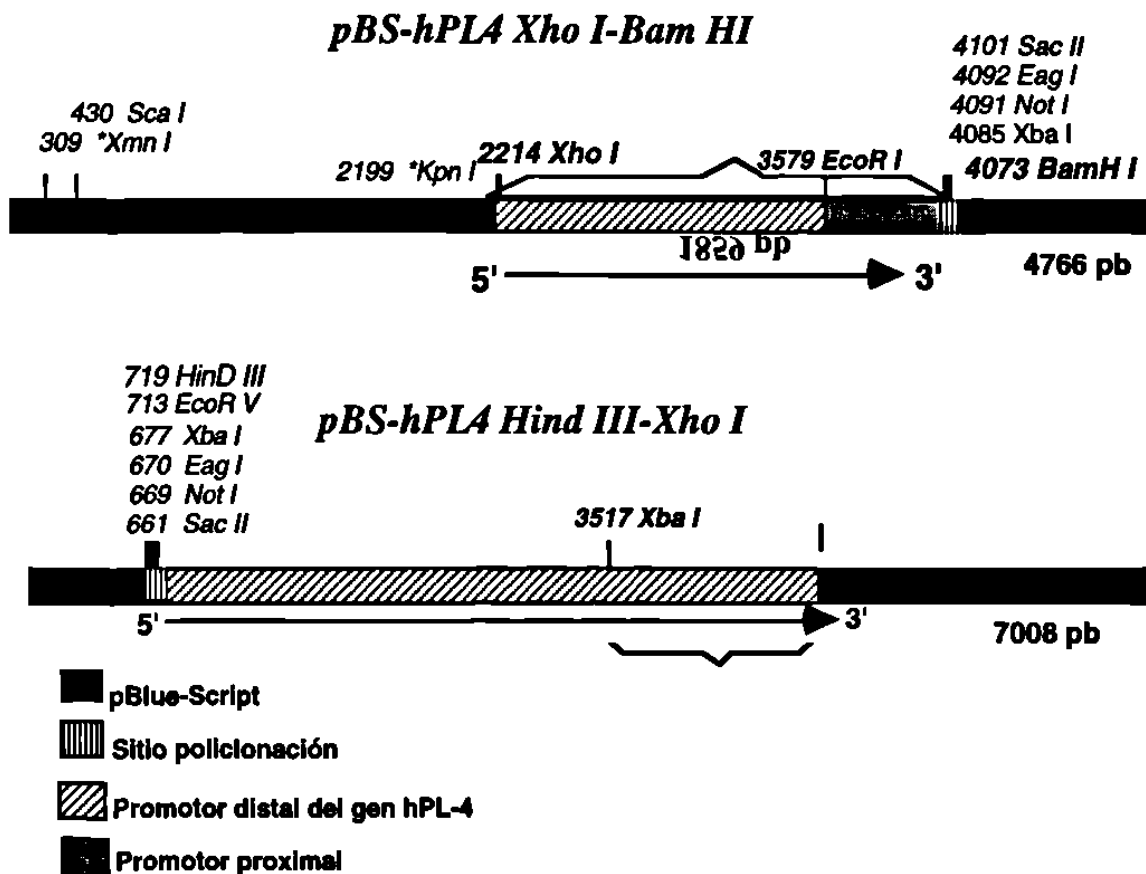


Fig 3.- Regiones del promotor del gen hPL-4 clonadas en el vector para células procaríotes pBlueScript KS (+), los corchetes muestran las regiones de interés en este estudio.

Tabla II Digestión de los vectores pBS hPL-4

pBS hPL-4 <i>Bam HI-Xho I</i> 1 µg/µl.....	5µl	pBS hPL-4 <i>Xho I-Hind III</i> .....	5µl
Amortiguador 10 X.....	..2µl	Amortiguador 10 X.....	2µl
Enzima <i>Bam HI</i> 10 U/ µl.....	1µl	Enzima <i>Xba I</i> 10 U/ µl.....	1µl
Enzima <i>Xho I</i> 10 U/ µl.....	1µl	Enzima <i>Xho I</i> 10 U/ µl.....	1µl
H <sub>2</sub> O MilliQ.....	11µl	H <sub>2</sub> O MilliQ.....	11µl



Una vez obtenida la digestión total, se ajustó a un volumen de 200  $\mu\text{l}$  y se precipitó con 2 volúmenes de isopropanol por 3 h. Se centrifugó 15 min a 12000 rpm y la pastilla se secó en evaporador centrífugo con vacío. La pastilla seca fué resuspendida en 15  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ.

#### 4.4.1.6 Construcción del recombinante phPL-4-hGHN.

El vector previamente digerido, purificado y cuantificado; se puso en contacto con el producto directo de las digestiones de los vectores pBlueScript KS(+) (tabla III) que contienen las secuencias promotoras del gen hPL-4 mediante una reacción de ligación 51,52.

**Tabla III Las condiciones de ligación fueron las siguientes:**

Vector <i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I (~433 ng/ $\mu\text{l}$ ).....	1 $\mu\text{l}$
Digestión pBShPL-4 <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I (~660 ng).....	3 $\mu\text{l}$
Digestión pBShPL-4 <i>Xho</i> I- <i>Xba</i> I (~660 ng).....	3 $\mu\text{l}$
Ligasa BRL 1 U/ $\mu\text{l}$ .....	1.5 $\mu\text{l}$
Buffer de Ligasa 5X BRL.....	1.5 $\mu\text{l}$
H2O milliQ.....	11 $\mu\text{l}$

La incubación se hizo a 16°C toda la noche (12 h). Terminada la reacción de ligación se añadió a la mezcla, empleando el mismo buffer de ligación, 2  $\mu\text{l}$  de la enzima *Kpn* I que de acuerdo a los mapas de restricción solo digiere en el SMC de los vectores pBShPL-4, pero no puede digerir en el vector de clonación o en las secuencias promotoras ya que estos carecen de la secuencia reconocida por *Kpn* I . (ver fig 2 y 3). Se incubó a 37°C por 3 h y se tomó una quinta parte para la transformación en células de E.

coli Top10F' Ca<sup>++</sup> competentes preparadas con la técnica descrita por Maniatis et.al<sup>51</sup> y otros métodos<sup>53,54</sup>.

#### 4.4.1.7 Estrategia de clonación del promotor de hPL-3 y hGH-V.

Las regiones correspondientes a los promotores proximal y distal de los genes hPL-3 y hGH-V, secuencias codificantes y región 3', también se encontraban clonados en el vector para células procariotes pBlue-Script KS(+).

Partiendo del recombinante phPL-4-hGHN se digirió con las enzimas *Bam* HI-*Xba* I para asegurar una digestión total con dos enzimas y eliminar las secuencias reguladoras del gen hPL-4, el resto del vector se purificó a partir del gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% por el protocolo ya descrito para el método GlassMAX<sup>48</sup>.

Tomando en cuenta que la secuencia de restricción para la enzima *Bam* HI se encuentra varias veces localizada en la región del promotor distal de los genes hPL-3 y hGH-V (fig 4), se diseñó una estrategia que permitiría recuperar la secuencia del promotor proximal de 496 pb de hPL-3 y hGH-V mediante digestiones preparativas con las enzimas 5'=*Eco* RI-*Bam* HI=3' (Tabla IV) y simultáneamente, en una digestión aparte, obtener el fragmento del promotor distal de los mismos genes en forma íntegra con las enzimas 5'=*Xba* I-*Eco* RI=3', y fusionarlos en el vector previamente abierto en los mismos sitios *Bam* HI-*Xba* I por ligación de los tres fragmentos.

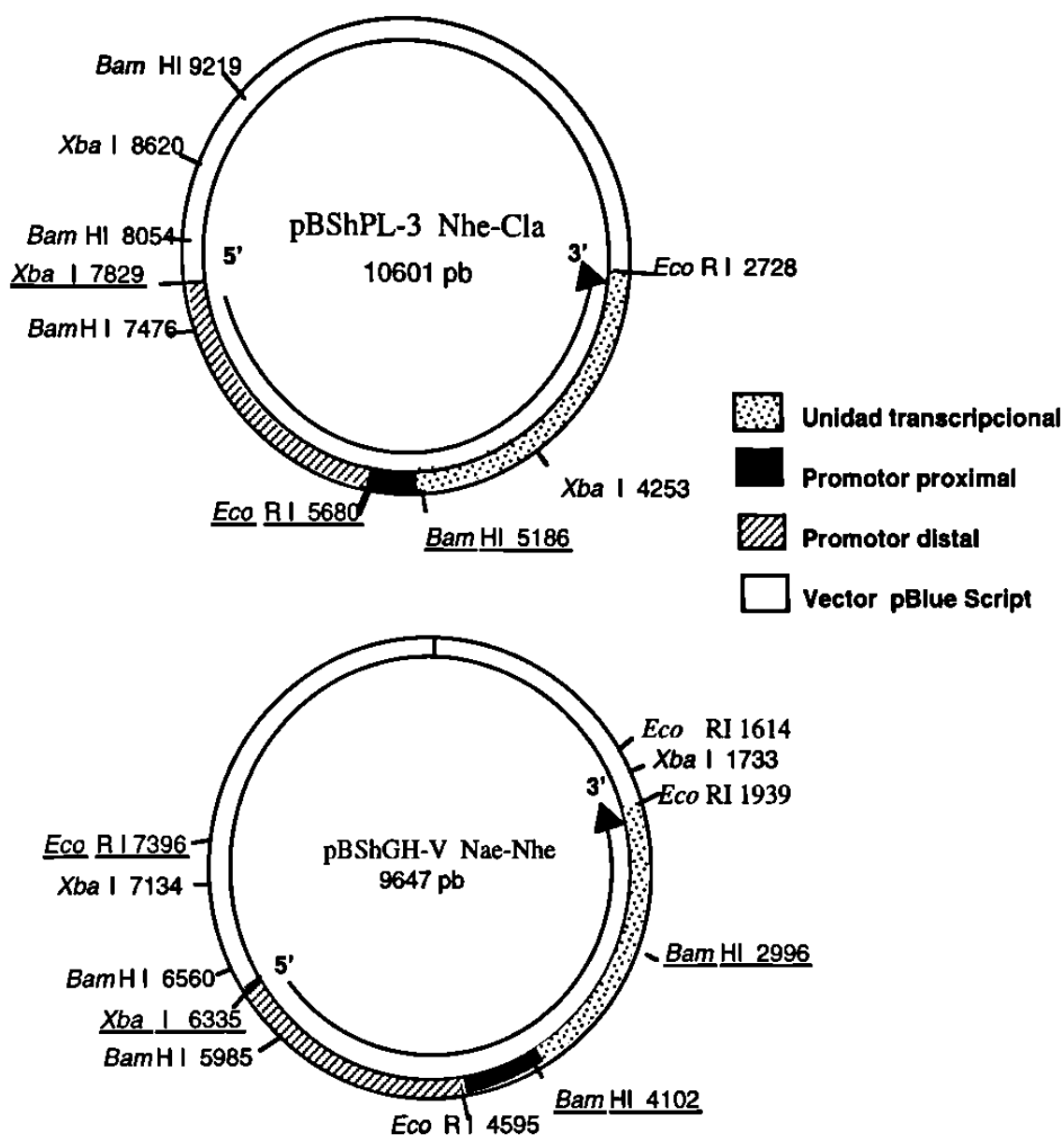


Figura 4.- Mapa de restricción de los vectores que contienen las secuencias reguladoras de hPL-3 y hGH-V.

Tabla IV. Digestión preparativa de los vectores que contienen los promotores de los genes hPL-3 y hGH-V

**pBS hPL-3 y pBS hGH-V (Promotor proximal)**

DNA plasmídico (1µg/µl).....	10µl
Amortiguador 10X.....	5µl
Enzima <i>Bam</i> HI 10 U/µl.....	5µl
H <sub>2</sub> O milliQ.....	30µl

En tubos por separado esta mezcla se incubó a 37°C por 12 h, la digestión total se analizó en gel de agarosa al 0.8 % y se separó mediante electroforesis.

Una vez corroborada la identidad de las secuencias y asegurada una digestión total, se le añadieron 150 µl de H<sub>2</sub>O milliQ y 200 µl de fenol:Sevag (1:1). Después de centrifugar y recuperar la fase acuosa, se añadieron 2 volúmenes de isopropanol absoluto y se dejó precipitar a -20°C por espacio de 3 h; transcurrido este tiempo se centrifugó en una microcentrífuga Eppendorf por 5 min a 12000 rpm. La pastilla se secó en un evaporador centrífugo aplicando vacío y al final se resuspendió en 70 µl de H<sub>2</sub>O milliQ y del digerido con la enzima *Bam* HI se tomaron 5 µl (para después de digerir con *Eco* RI verificar si la digestión fué total) y al resto se le añadieron 10 µl de amortiguador 10 X, 10 µl de *Eco* RI 10 U/µl y 15 µl de H<sub>2</sub>O milliQ. Esta mezcla se dejó incubar por espacio de 5 h a 37°C.

En paralelo se realizó la digestión preparativa del promotor distal de ambos genes con las enzimas *Eco* RI y *Xba* I. Se resolvieron en gel de agarosa al 0.7 % y se tiñeron con solución de bromuro de etidio para evaluar las digestiones y corroborar el tamaño de los fragmentos generados.

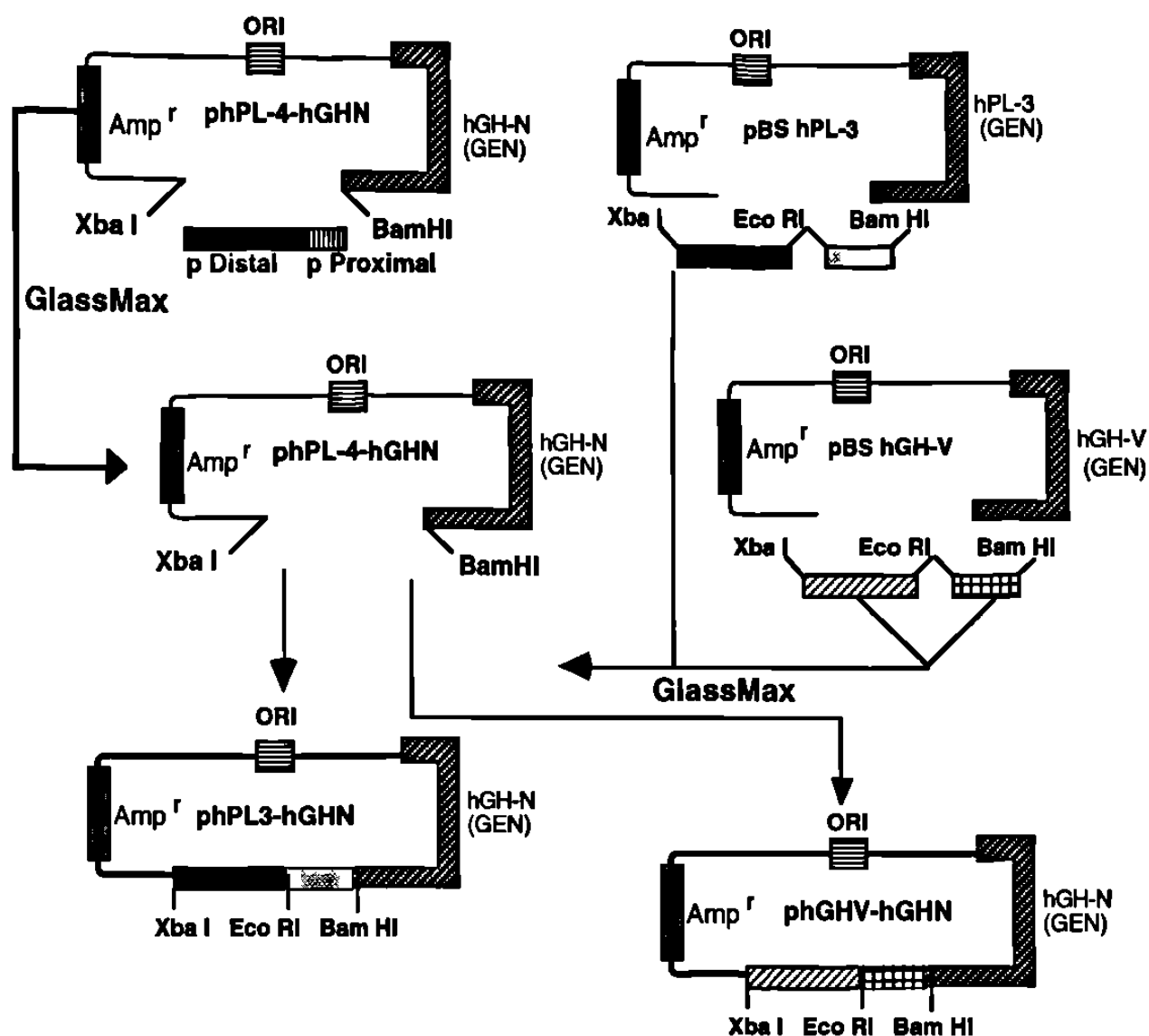


Fig. 5.- Estrategia general para obtener las regiones reguladoras de los genes hPL-3 y hGH-V e insertarlas en el recombinante previamente construido phPL4-hGHN. El recombinante phPL4-hGHN fué usado como "plantilla" sobre el cual construir los recombinantes de phPL3-hGHN y phGHV-hGHN. primeramente phPL4-hGHN se digirió con las enzimas *Bam HI* y *Xba I*, el vector se recuperó y se ligó al promotor proximal digerido con *Eco RI-Bam HI* y al promotor distal de los mismos genes digerido con *Eco RI-Xba I*, ambos obtenidos a partir de pBS-hPL-3 y pBS-hGH-V respectivamente.

#### 4.4.1.8 Purificación, ligación y transformación de secuencias promotoras.

Una vez resueltas las secuencias reguladoras en gel de agarosa, se procedió a recuperarlas y purificarlas empleando el kit de GlassMAX Matrix System de acuerdo a las indicaciones ya descritas para la purificación del vector de clonación <sup>48</sup>.

Para evaluar la cantidad de DNA de los productos purificados se determinaron las lecturas de absorbancia a 260 nm de las muestras y en base a las concentraciones determinadas, se decidió la cantidad de DNA óptima en los ensayos de ligación <sup>52</sup>.

Ya recuperados y cuantificados tanto vector como insertos, se pusieron a ligar con las siguientes concentraciones molares y de reacción: vector (1)/inserto 1 (1.2)/inserto 2 (1.6) en las condiciones mostradas en la tabla V, las reacciones de ligación se incubaron a 16°C por espacio de 12 h (toda la noche) y una cuarta parte de la reacción (5µl) se empleó para transformar células de *E. coli* DH5aF' Ca<sup>++</sup> competentes.

**Tabla V Ligación de promotores de los genes hPL-3 y hGH-V.**

<b>hPL-3</b>	<b>hGH-V</b>
Vector <i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I (~300ng).....5µl (del recombinante phPL4-hGHN)	.....5µl
Fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI (~400ng).....6µl	.....6µl
Fragmento <i>Eco</i> RI- <i>Xba</i> I (~500ng).....4µl	.....4µl
Amortiguador de Ligación 5X.....2µl	.....2µl
T4 DNA Ligasa (BRL).....1µl	.....1µl
H2O milliQ.....2µl	.....2µl

El análisis de las clonas recombinantes que resultaron, se realizó por el método de lisis alcalina descrito por Maniatis y Sambrook <sup>51</sup>.

El testigo negativo que se usó carece de región promotora alguna y se obtuvo al digerir el vector pAVE-hGHN con la endonucleasa *Xba* I, que liberó un segmento de 664 pb correspondiente a la región del SMC y la secuencia del pCMV. El vector abierto en *Xba* I se purificó, religó con la enzima T4 DNA ligasa y se introdujo en células de *E. coli* DH5a Ca<sup>++</sup> competentes.

#### **4.4.2 Crecimiento a gran escala de los recombinantes y los testigos.**

La obtención de DNA plasmídico de alta calidad para ensayos de transfección en cultivo celular se logró por el crecimiento a gran escala y purificación por el método de centrifugación en CsCl <sup>50</sup>.

Descripción del método de crecimiento y purificación.

- 1.-Una colonia bacteriana se inoculó en 4 ml de medio LB con ampicilina y se incubó toda la noche a 37°C con agitación continua.
- 2.-El inóculo se transfirió a 20 ml de medio LB con ampicilina y se propagó a 37 °C por 4 h (tiempo aproximado para tener una absorbancia de 0.4 a una l de 600 nm).
- 3.-Después los 20 ml se adicionaron a un matraz de 2 l conteniendo 1 l de medio LB con 750 mg de ampicilina y se incubó en agitación a 230 rpm a 37°C por 5 h. Se agregaron 250 mg de cloranfenicol y se dejó incubar toda la noche en las mismas condiciones .
- 4.-La masa bacteriana se recuperó por centrifugación a 6500 rpm por 10 min .
- 5.-Las bacterias se lisaron añadiendo 5 ml de solución de sacarosa al 25% en Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y agitando sobre hielo al mismo tiempo en que se añadía 1.2 ml de solución de lisozima (2 mg/ml).
- 6.- 5 min después se agregó 1 ml de solución de EDTA al 0.5 M y 8 ml de solución de triton X-100 2%-EDTA 200 mM-Tris-Cl 150 mM pH 8.0 en agitación continua y se dejó reposar por 15 min con agitación ocasional.
- 7.- El lisado claro se separó por ultracentrifugación a 30,000 rpm por 30 min.
- 8.- El lisado claro se filtró y se tomó una alícuota (1µl) para visualizar en gel de agarosa con el objetivo de estimar calidad y concentración.
- 9.- En un tubo falcon de 50 ml se virtieron 11 ml del lisado, se añadieron 11 g de CsCl (deshidratado previamente) y se disolvió por inversión.
- 10.- La mezcla se colocó en un tubo "Quick seal" con pipeta "pasteur" al que se agregaron 1.2 ml de bromuro de etidio (50 mg/ml) y se completó el volumen del tubo con aceite mineral, se selló usando tapones metálicos y calor, se agitó por inversión y se cubrieron con papel aluminio.

El tiempo y la velocidad de centrifugación necesarios para formar el gradiente de densidad fué de 45000 rpm por 24 h en rotor 60Ti, suficiente para permitir la separación de las bandas de DNA plasmídico del DNA genómico bacteriano.

La recuperación de la banda de interés, se realizó en presencia de luz UV de onda corta y empleando jeringas de 5 ml con agujas No 16, puncionando 2-3 mm por debajo de la banda del DNA plasmídico (banda inferior) y aspirando la misma hasta su recuperación total.

Tres clonas de cada uno de los recombinantes fueron purificadas por esta técnica para evitar variaciones y no restringirnos a la calidad de un solo DNA que pudiera interferir en los experimentos de transfección de células en cultivo. Junto con los recombinantes también se crecieron y purificaron en paralelo pAVE-hGHN (testigo positivo de expresión de GHG), pAVE-nphGHN (testigo negativo de expresión de GHG) y pCMV-CAT (testigo de eficiencia de transfección).

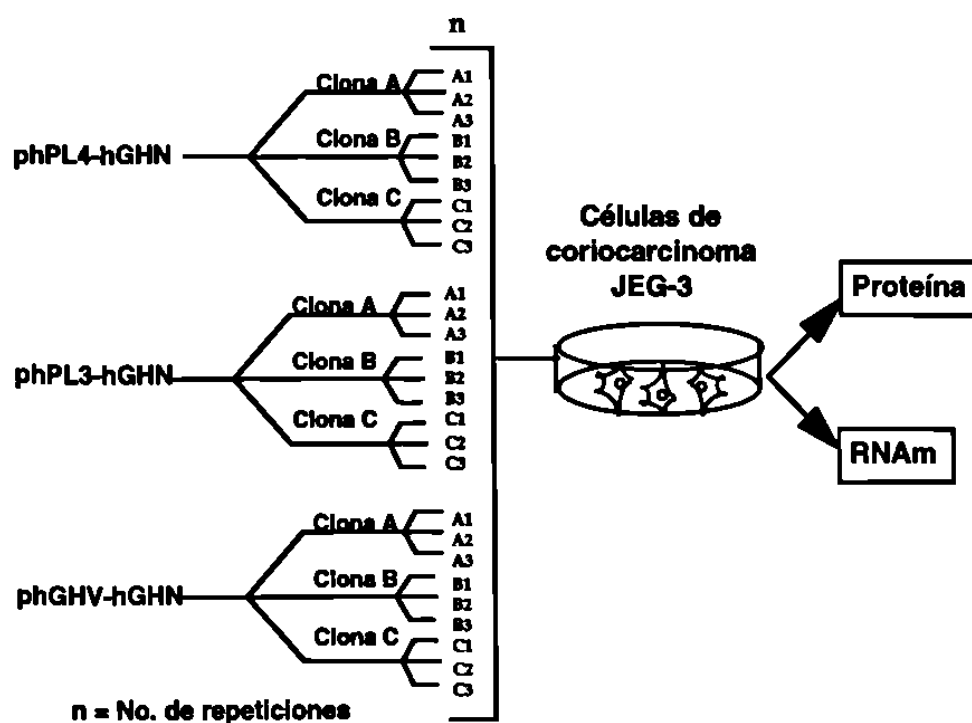


Fig . 6.- Estrategia general de purificación y transfección de los recombinantes.



### **4.4.3 Análisis en cultivo de células.**

#### **4.4.3.1 Condiciones del cultivo celular .**

La línea celular de coriocarcinoma JEG-3 se mantuvo en medio de cultivo Opti-MEM (Gibco-BRL) con SBF al 10% y solución de antibióticos (Sulfato de Estreptomicina 100µg/ml y Penicilina 100U/ml) a 37°C en atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5%.

Para el mantenimiento del cultivo celular se siguió el siguiente protocolo:

- 1).- A un cultivo confluyente se le eliminó el medio y se le agregaron 2 ml de tripsina 1X (para desprenderlas del sustrato) y se incubaron por 5 min
- 2).-Una vez recuperadas las células de la caja y eliminada la tripsina por centrifugación a 3000 rpm por 5 min, se resuspendieron en 3 ml de medio Opti-MEM, se contaron en un hemocímetro <sup>55</sup> y se transfirió una alícuota conteniendo aproximadamente  $7 \times 10^4$  células a una nueva botella.
- 3).- Se agregaron 5 ml de medio (Opti-MEM complementado con 10% de SBF y antibióticos).
- 4).-Se incubaron en CO<sub>2</sub> a 36.5°C y se les realizó cambios diarios de medio de cultivo (72 h).

A partir de cultivos al 80% de confluencia y en fase logarítmica, se procedió a levantar las células con tripsina 1X y realizar la cuenta celular; inoculando  $1.5 \times 10^6$  células en 13 placas con diámetro de 60 mm, se incubó por un período de 10-12 h antes de la transfección.

#### **4.4.3.2 Estandarización de la transfección.**

Para estandarizar las condiciones de transfección, se realizaron diversos ensayos variando volúmenes de Lipofectamina y cotransfectando al vector pCMV-CAT con pAVE-hGHN en diferentes concentraciones <sup>56</sup>.

Los volúmenes de Lipofectamina ensayados fueron: 6, 9, 12 y 15  $\mu$ l y las concentraciones de DNA empleadas fueron las siguientes: 1, 2, 4, 6, 8 y 15 $\mu$ g (fig 14, 15 y 16)

De esta manera fué posible encontrar las condiciones óptimas para la introducción de los plásmidos a los cultivos de células de JEG-3 con el siguiente protocolo de transfección transitoria <sup>57</sup>.

- 1.- En dos tubos eppendorf de 1.5 ml se colocaron 100  $\mu$ l de medio de cultivo Opti-MEM sin antibióticos ni SBF.
- 2.- A uno de los tubos se le añadió Lipofectamina y al otro tubo la cantidad de DNA a utilizar en el ensayo de transfección, esta dilución se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente.
- 3.- El contenido del tubo con Lipofectamina se agregó al que contenía la dilución del DNA y la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 30 min.
- 4.- Se añadieron 800  $\mu$ l de medio Opti-MEM libre de SBF y antibióticos a la mezcla de DNA-Lipofectamina y se homogenizó por agitación.
- 5.- La mezcla se adicionó por goteo a las células JEG-3 en monocapa y se distribuyó con movimientos circulares sobre toda la superficie de la placa.
- 6.- Las células se incubaron con el complejo DNA-Liposoma por 5 h a 37°C en atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5% .

7.- Pasado este tiempo se añadieron 2 ml de medio de cultivo Opti-MEM sin antibióticos ni SBF, se colocó en la incubadora y se tomaron alícuotas de 200µl del sobrenadante cada 12 h hasta las 48 h en que se detuvo el ensayo.

#### 4.4.3.3 Ensayos de CAT (Cloranfenicol-acetil-transferasa).

Como control interno de los ensayos de transfección se utilizó el plásmido pCMV-CAT el cual se introdujo junto con los testigos o los recombinantes.

El fundamento de este ensayo se ve ilustrada en la figura 7.

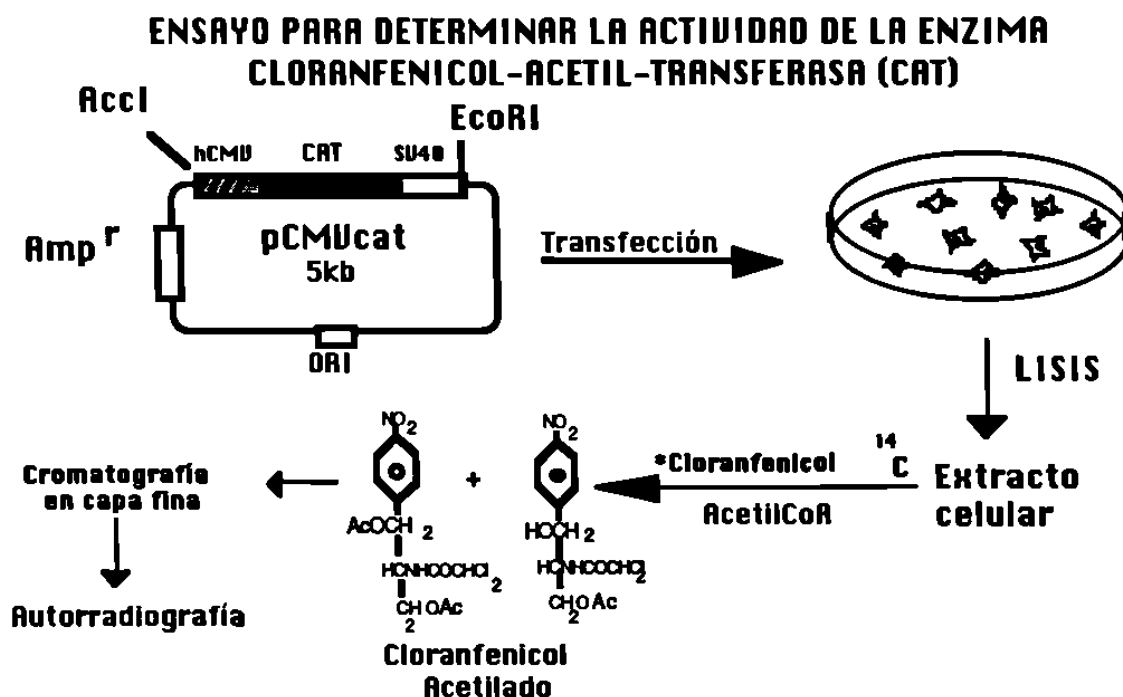


Fig. 7.- Ensayo de CAT, el plásmido pCMV-CAT codifica para la enzima cloranfenicol-acetil-transferasa. Extractos de células transfectadas con este plásmido y mediante la actividad de esta enzima, en presencia de cloranfenicol <sup>14</sup>C y acetil CoA , forma derivados mono y diacetilados del cloranfenicol marcado los cuales pueden detectarse por cromatografía en capa fina y autorradiografía.

Después del período de incubación de las células en presencia de la mezcla de transfección (lipofectamina/DNA), en el que se tomaron alícuotas de 200 µl del sobrenadante para ensayos de ELISA cada 12 h; se detuvo el experimento para proceder a la reacción de CAT y la extracción de RNA. Se realizaron 2 lavados con PBS 1X

(solución salina-fosfatos) y empleando 500µl de Tris-HCl 250 mM pH 8.0 con la ayuda de un “gendarme” se levantaron las células de una de las mitades de la placa, se lisaron, mediante 3 ciclos de congelamiento en N<sub>2</sub> líquido y descongelamiento en baño de agua a 37°C <sup>58</sup>. Las células de la otra mitad de la placa se emplearon para extraer el RNA total, como se describe más adelante.

Para normalizar la reacción de CAT, se determinaron las proteínas totales al extracto celular por el método de Bradford previa centrifugación<sup>59</sup>. La concentración de proteína del extracto celular de JEG-3 se ajustó a 30 µg por reacción, basado en la eficiencia obtenida con el extracto proteico de células COS-7 a esa concentración. La reacción de CAT contenía 26 µl Tris-HCl 0.25 M (pH 8.0); 2µl de cloranfenicol <sup>14</sup>C (60 mCi/mM), 10 µl acetilCoA 4 mM (2.5 mg/ml) y 30µg de extracto celular de JEG-3 transfectadas.

La mezcla de reacción se incubó 30 min a 37°C y se detuvo adicionando 600µl de buffer Tris-HCl 0.25 M pH 8.0; se le realizaron dos extracciones una con 500µl y la otra con 300µl de acetato de etilo. Por centrifugación se recuperaron las fases superiores, se concentraron en evaporador centrífugo con vacío por 1 h y las formas acetiladas del cloranfenicol se resuspendieron lavando las paredes del tubo con 25µl de acetato de etilo para siembra en placa cromatográfica TLC 60 F254. La cuba usada para la separación de los productos mono y diacetilados fué saturada 1 h con 100 ml de la fase móvil cloroformo:metanol (9.5:0.5).

La placa se cubrió con una película Ektascan Kodak de 20.3 x 25.4 cm (No de cat 6013460) y se incubó en la oscuridad por 48 h y a temperatura ambiente. Se reveló y se evaluó la eficiencia de cotransfección de los recombinantes basándonos en la intensidad de las manchas de los productos mono y diacetilados, separados cromatográficamente.

#### **4.4.4 Extracción de RNA total.**

Para detectar transcritos específicos del gen hGH-N y relacionarlos con los resultados obtenidos a nivel de proteína, la mitad de las células transfectadas se sometieron a extracción de RNA total.

Se utilizaron dos técnicas, una de ellas se realizó en base a una modificación de la técnica de Isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo, previamente descrita por Chomczynski y Sachi en 1987 <sup>60</sup> y la segunda con la técnica descrita por Besim Ogretmen et al. en 1995 <sup>61</sup>; obteniéndose mejores resultados en concentración y calidad del RNA con esta última.

Protocolo de purificación y recuperación de RNA:

1. Las placas a las que previamente se les había realizado en una mitad el levantamiento de células para los ensayos de CAT, se colocaron en hielo y se lavaron con 1 ml de PBS 1X.
2. La lisis se hizo añadiendo 1 ml de una emulsión hecha con Fenol saturado con H<sub>2</sub>O DEPC-SDS 0.5%, se raspó con un “gendarme” de plástico y se mezcló por 1 min.
3. El lisado se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 ml con una puntilla estéril.
4. Se adicionaron 100µl de acetato de sodio 2 M pH 4.0 y se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C.
5. La fase acuosa se recuperó y se realizaron 2 lavados con fenol:cloroformo (49:1).
6. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó con 2 volúmenes de etanol al 95% a -70°C por 3 h. La pastilla se obtuvo por centrifugación a 12000 rpm a 4°C 10 min.

7. La pastilla se secó en evaporador centrífugo con vacío y se resuspendió en 40µl H<sub>2</sub>O DEPC.

La cuantificación del RNA se realizó por espectrofotometría tomando 1µl de la muestra y diluyéndola en 1 ml de H<sub>2</sub>O DEPC para tomar la lectura a 260 nm (3 determinaciones ) y estimar la calidad de las muestras mediante la relación de las lecturas obtenidas a 260/280 nm. Una vez cuantificado se conservó a -70°C hasta su uso.

La integridad del RNA también fué corroborada mediante el análisis del perfil electroforético en gel de agarosa desnaturalizante al 1% <sup>61</sup>.

#### **4.4.5 Ensayos de ELISA.**

Después que los ensayos de CAT mostraron que las transfecciones habían sido eficientes; se procedió al análisis de los sobrenadantes de las células transfectadas para cuantificar la HGH secretada al medio de cultivo.

El ensayo empleado para detectar la proteína fué el de ELISA tipo “sandwich”<sup>62</sup>, basado en las indicaciones de la casa comercial Gibco-BRL para el empleo del Kit de inmunodetección no isotópico de HGH recombinante, según el siguiente protocolo.

1.-Los estándares se prepararon con diluciones desde 1:2 hasta 1:16

añadiendo primero 50 µl de estándar HGH (500 ng/µl) a 450 µl de medio OptiMEM.

2.- 100µl de las muestras de las transfecciones con phPL-4hGHN y phGH-VhGHN se diluyeron con 100µl de OptiMEM en tubos eppendorf de 1 ml. Para phPL3-hGHN se agregaron 200µl del sobrenadante de la transfección sin diluir, debido a que en ensayos previos con alícuotas diluídas no hubo detección.

- 4.- Las muestras se colocaron en los pocillos recubiertos con anticuerpo anti-HGH sintetizado en conejo.
- 5.- Se incubaron a 37°C por 30 min, y se realizaron 5 lavados con buffer de lavado 2X.
- 6.- Se añadieron 200µl del primer anticuerpo (IgG monoclonal anti-HGH sintetizado en ratón) y se incubó por 30 min a 37°C.
- 7.- Pasado este período se agregó buffer de lavado 5 veces y se incubó 30 min en presencia de 200 µl del segundo anticuerpo (anti-ratón producido en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano).
- 8.- Se lavó nuevamente con buffer de lavado 5 veces y se aplicaron 200µl del sustrato OPD a temperatura ambiente y en la oscuridad.
- 9.- La reacción se detuvo 30 min después adicionando 100 µl de ácido sulfúrico 2N y la intensidad del color se determinó midiendo la absorbancia en un micro-lector de ELISA a 492 nm.

Con el empleo del programa computacional Microsoft Excel 4.0, se realizó el análisis de los datos y se elaboró una curva de absorbancia x, y. Se calculó el  $r^2$  de la curva, obteniéndose tanto la pendiente de la misma como el intercepto y en base a estos datos, se calculó la concentración de las muestras.

#### **4.4.6 Transcripción reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).**

##### **4.4.6.1 Síntesis de la cadena de cDNA.**

El RNA total extraído de las células en cultivo, se sometió a retrotranscripción empleando la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MML-V). Debido a la pequeña cantidad de RNA con que se contaba, se empleó la mitad tanto

de las concentraciones como de los volúmenes recomendados en la técnica de Gubler y Hoffman <sup>62</sup>.

Para ello se empleó el siguiente protocolo; el RNA se desnaturalizó a temperatura de 95°C en baño de agua por 5 min y fué retrotranscrito a cDNA usando 3µl Buffer de reacción 5X, 0.8µl de dNTP's (10mM), 0.5µl de Ditiotreitól (0.1 M), 0.5µl de Hexámeros al azar (0.3µM), 1.0µl de M-MLV-RT (200 U/µl), 200 ng RNA molde y se completó a 20µl con H<sub>2</sub>O milliQ

Esta mezcla se incubó a 37°C por 1 h y los cDNAs obtenidos se guardaron a -20°C hasta su uso.

#### 4.4.6.2 Reacción de PCR.

Con la finalidad de detectar transcritos específicos del gen hGH-N en las células transfectadas donde normalmente no es posible encontrarlos (JEG-3) y que nos permitiera corroborar lo detectado a nivel de proteína para cada uno de los recombinantes, se procedió a amplificar el cDNA específico para el gen hGH-N empleando la técnica de PCR y un par de oligonucleótidos específicos para este gen.

A continuación se presenta la secuencia del par de oligonucleótidos :

<b>tcgagaaaagattccaaccattcccttat</b>	oligonucleótido (5').
<b>ccgaattccaggagaggcactgggg</b>	oligonucleótido (3').

El iniciador 5' se aparea al inicio de la proteína madura del cDNA de hGH-N y el 3' al final de la secuencia del último exón dentro de la región 3' no traducible de este gen.

Las condiciones estándar para llevar a cabo la amplificación selectiva del cDNA de hGH-N <sup>63</sup>, se determinaron previamente con los programas de computación para



Biología Molecular Oligo 4.0 y Amplify 1.2, el primero nos permitió obtener la temperatura media de fusión del fragmento amplificado realizado el cálculo con la siguiente ecuación <sup>64,65</sup>:

$$T_{mf} = 16.6 \log[X^+] + 0.41(\%GC) - 675/L + 81.5$$

L: Longitud del fragmento teórico amplificado.

X<sup>+</sup>: Concentración del catión monovalente.

Este valor fué sustituido en la siguiente fórmula para obtener el valor de la temperatura óptima teórica de apareamiento para los dos iniciadores:

$$T_{ap} = 0.3 T_{mp} + 0.7 T_{mf} - 14.9$$

T<sub>mp</sub>: Temperatura media de cada primer

La media de las dos temperaturas determinadas nos proporcionó la temperatura óptima con la cual iniciar el alineamiento en el programa de PCR.

En forma simultánea con el programa Amplify 1.2 se simuló una reacción de PCR con la secuencia de los oligonucleótidos y con la de los cDNAs de cada uno de los miembros del complejo reportadas en una base de datos (Gen Bank) y recuperadas por conexión remota.

La reacción de PCR se preparó añadiendo 5µl del cDNA de hGH-N, 5µl del buffer de reacción 10 X, 3µl de Cloruro de Magnesio 25 mM, 1.5µl de dNTP's 10mM, 1.0µl del oligonucleótido 5' a 5µM, 5µl del oligonucleótido 3' a concentración de 5µM, 29µl H<sub>2</sub>O milliQ estéril y enzima Taq-DNApolimerasa (5 U/µl).

La concentración del iniciador 3' empleada en la reacción de PCR se debe a la alta complementaridad que presenta con la región 3' no traducible de todos los genes del complejo, de tal manera que para evitar efecto de competencia entre el cDNA de hGH-N producido por nuestros recombinantes con los cDNA de transcritos internos, producidos

por los genes del complejo de expresión placentaria se decidió aumentar 4 veces la concentración del mismo en relación a la del iniciador 5'.

Párametros usados en el programa de amplificación:

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94°C	1 min
Alineamiento	61°C	1:30 min
Extensión	72°C	1:30 min

Durante 30 ciclos y un último paso de extensión a 72°C por 5 min.

#### 4.4.6.3 Digestión del producto amplificado.

Ya a que los miembros de este complejo presentan una alta homología, existía la posibilidad de que los cDNAs de lactógeno placentario y hormona de crecimiento variante (correspondientes a transcritos endógenos de la línea celular), pudieran ser amplificados con el par de oligonucleótidos empleados en la reacción de PCR; aunque el iniciador 5' bajo las condiciones de amplificación se aparee exclusivamente al cDNA de hGH-N, el iniciador 3' presenta 100% de complementaridad en el extremo 3' de todos los genes del complejo por ello se decidió comprobar que el producto amplificado era de hGH-N y no de hPL's o de hGH-V.

El programa DNA Strider 1.0 permitió analizar la secuencia del cDNA de hGH-N amplificado en el PCR e identificó un sitio único de corte con la enzima *Rsa* I a la mitad del producto amplificado (fig 8) el cual comprobaría que el producto de PCR provenía de hGH-N y diferenciarlo de posibles amplificaciones de los cDNAs correspondientes a transcritos internos de hPL's o hGH-V. El sitio *Rsa* I no se encuentra en los cDNAs de transcritos de hPL's y en hGH-V esta localizado al inicio del mismo, de tal forma que solo en el cDNA de hGH-N es posible obtener un par de fragmentos de 317 pb y 325 pb de longitud.

El producto de PCR se digirió con la enzima *Rsa* I colocando en un tubo eppendorf 2µl del producto amplificado con 1µl de enzima *Rsa* I (8U/µl) y 1µl buffer de Reacción 10X, todo esto en un volumen final de 10 µl completando el volumen restante con 6µl de H<sub>2</sub>O milliQ. Se incubó a 37°C por 2 h y en un gel de agarosa al 1.5% se analizaron los productos de la digestión empleando como marcador de peso molecular pBR322 digerido con *Alu* I.

#### **4.4.7 Densitometría de geles.**

El producto de PCR digerido con la enzima *Rsa* I se separó en gel de agarosa al 1.5%, se obtuvo una fotografía y el negativo de la misma se analizó mediante scanner con densitometría de láser, los parámetros se ajustaron en base a la banda de mayor intensidad (transmitancia 100%) y en al carril que correspondía al testigo negativo (transmitancia 0%).

#### **4.4.8 Método estadístico**

Las medias de concentración de HGH obtenidas para cada uno de los recombinantes se se analizaron por un método estadístico que nos permitiera discernir si existía diferencia significativa entre ellas; para ello se empleó la técnica de análisis de varianza (ANOVA) de un solo sentido.

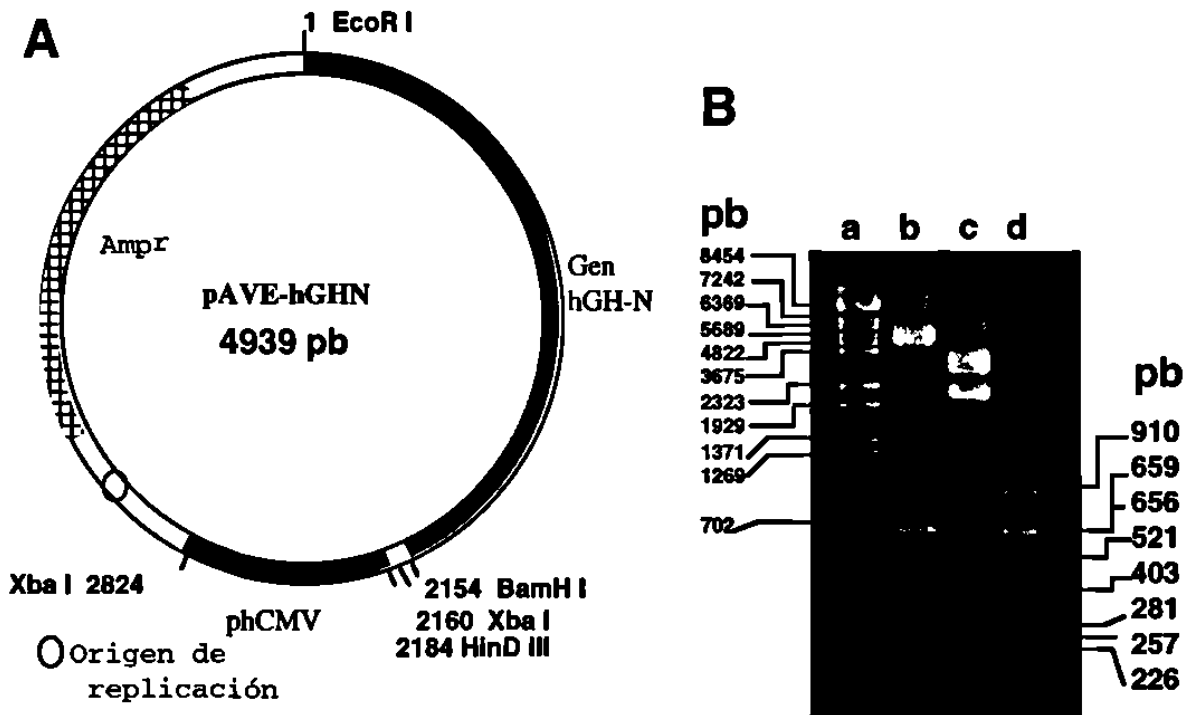
Los cálculos y análisis se realizaron con el programa estadístico computacional Microsoft Excel 4.0.

## V RESULTADOS.

### 5.1 Caracterización del vector pAVE-hGHN y eliminación de su promotor del hCMV.

El vector de clonación pAVE-hGHN fué digerido en un ensayo preparativo con las enzimas *Bam* HI-*Xba* I para eliminar el promotor heterólogo del Citomegalovirus humano y los productos se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1%.

Se realizó otra digestión con *Bam* HI -*Eco* RI de tipo analítica para verificar la identidad del vector. Como se observa en el carril b de la figura 8, se liberó un fragmento de 670 pb correspondiente al promotor del CMV y el SMC. En la misma figura en el carril c, el fragmento liberado de 2.1 Kb aproximadamente corresponde a la unidad transcripcional del gen hGH-N



**Fig. 8.-** Caracterización del vector pAVE-hGHN A) Mapa de restricción del vector representando las regiones de interés, las enzimas *Bam* HI-*Hin* D III flanquean el sitio múltiple de clonación y la localización de las enzimas empleadas, B) Digestión del vector pAVE-hGHN y electroforesis en gel de agarosa al 1%: a) *BstE* II; b) Vector con *Bam* HI-*Xba* I liberando el fragmento que contiene el pCMV y el SMC, c) Vector digerido con *Bam* HI-*Eco* RI que libera la unidad transcripcional del gen hGH-N de 2.1 Kb, d) pBR 322 *Alu* I .

## 5.2 Obtención de las secuencias promotoras de los genes hPL-4 ,hPL-3 y hGH-V.

### 5.2.1 Promotor del gen hPL-4.

Para recuperar el promotor de 3131 pb del gen hPL-4, se partió de dos construcciones realizadas previamente en nuestro departamento en el vector pBlueScript KS(+). Cada una de ellas contenía parte de la región de interés, por lo cual se digirieron de forma independiente: pBS hPL4 B-X se digirió con las enzimas *Bam* HI-*Xho* I y pBS hPL4 X-H con *Xho* I-*Xba* I y los productos de digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Los resultados de esta digestión se muestran en la fig 9, donde puede observarse que se liberan los fragmentos de tamaño previstos. Estas regiones están sombreadas en el mapa de restricción.

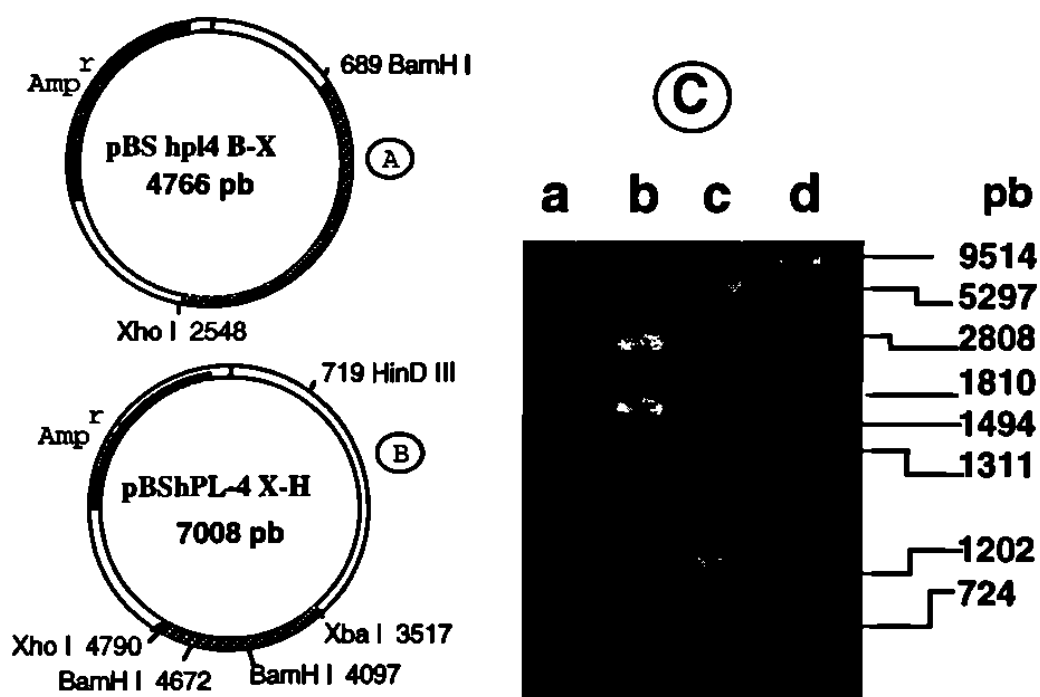
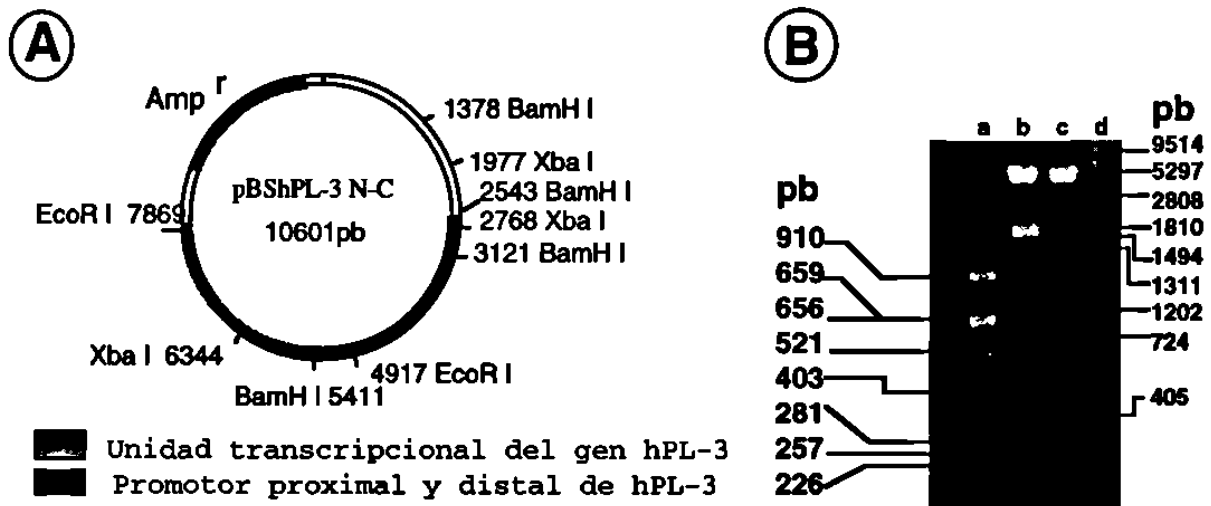


Fig 9. Mapa de restricción y caracterización de vectores conteniendo la región promotora del gen hPL-4. Mapa de restricción del los vectores pBS hPL-4 *Bam* HI-*Xho*I (A) y pBS hPL-4 *Xho* I-*Hind* III (B). C) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% que muestra la separación del producto de digestión los vectores en el carril b) Vector pBS hPL-4 B-X con las enzimas *Bam* HI y *Xho* I que libera un fragmento de 1.8 Kb conteniendo el promotor proximal y una porción del promotor distal y carril; c) Digestión del vector pBS hPL-4 X-H con las enzimas *Xho* I y *Xba* I liberando un fragmento de 1273 pb, en los carriles a y d) Marcador de PM .

### 5.2.2 Promotor del gen hPL-3.

Los fragmentos para reconstruir el promotor del gen hPL-3 se obtuvieron de la digestión de una construcción previa (pBS-hPL-3 *Nhe* I-*Cla* I) realizada en la ULIEG en el vector pBlue-Script KS(+). Se realizaron dos digestiones preparativas de esta construcción por separado empleando la combinación de enzimas *Bam* HI-*Eco* RI por un lado para obtener el fragmento de 496 pb que corresponde al promotor proximal y las enzimas *Eco* RI-*Xba* I en una digestión aparte que liberan un fragmento de 2149 pb, perteneciente al promotor distal. En la fig 10 se muestra el mapa de restricción con las regiones de interés sombreadas, así como los tamaños que corresponden a los fragmentos liberados.



**Fig. 10** Recuperación del promotor del gen hPL-3. A) Mapa de restricción del vector pBS-hPL3 N-C, la región sombreada en oscuro ejemplifica la secuencia del promotor del gen hPL-3, (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% en la que se separó el producto de digestión del vector pBS-hPL-3 N-C en el carril: a) pBR-322 digerido con *Alu* como marcador de peso molecular, b) vector pBS-hPL-3 N-C digerido con *Bam* HI y *Eco* RI c) vector con *Eco* RI y *Xba* I, d) Marcador de PM. Es posible visualizar en el carril B la liberación de un fragmento de aproximadamente 496 pb correspondiente al promotor proximal y en el carril C un fragmento de 2149 pb que corresponde a la región del promotor distal.

### 5.2.3 Promotor del gen hGH-V

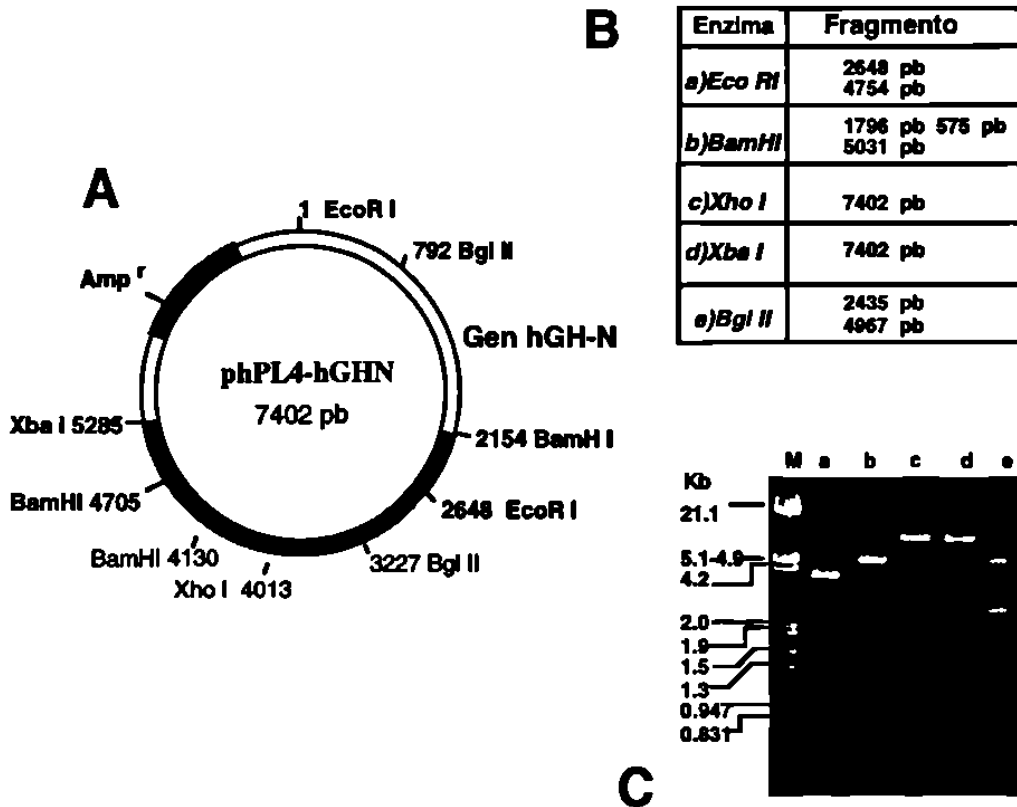
Las regiones correspondientes a las secuencias promotoras proximal y distal del gen hGH-V se obtuvieron por una metodología igual a la descrita para el promotor del gen hPL-3 (resultados no mostrados). Estas regiones correspondían a dos fragmentos, uno de 493 pb perteneciente al promotor proximal y un segmento de 1740 pb que corresponde al promotor distal dando un total de 2233 pb.

## 5.3 Construcción de los recombinantes.

### 5.3.1 Recombinante phPL4-hGHN

La transformación de bacterias  $Ca^{++}$  competentes usando el producto de la ligación entre el promotor del gen hPL-4 flanqueado con las enzimas *Bam* HI y *Eco* RI con el vector de clonación pAVE-hGHN abierto en los mismos sitios, permitió seleccionar y caracterizar con enzimas de restricción 18 colonias de las cuales 6 portaban el fragmento de interés. Las enzimas usadas en la caracterización cortan en uno o en dos sitios en el fragmento clonado; uno en la región codificante del gen hGH-N y el otro en el inserto, permitiendo la liberación de un fragmento. La caracterización de una clona se muestra en la Fig. 11, donde puede observarse que la digestión con las enzimas *Eco* RI, *Bam* HI, *Xho* I, *Xba* I y *Bgl* II liberaron fragmentos con la longitud esperada.

Una vez corroborada la identidad del recombinante phPL4-hGHN, éste se creció a gran escala y se purificó por gradiente en cloruro de cesio mediante ultracentrifugación y se utilizó como fuente del vector de clonación, requiriéndose solo de realizar cambios de "cassette" sustituyendo en éste la región del promotor proximal y distal del gen hPL-4, por las correspondientes de los genes hPL-3 y hGH-V.



**Fig.11.-Caracterización del recombinante phPL4-hGHN.** Se emplearon enzimas de restricción diagnósticas localizadas en el mapa de restricción (A) y los productos de las digestiones se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. (B) La tabla muestra las enzimas empleadas y en la fotografía (C), el carril a) La digestión con *Eco RI* libera un fragmento de 2.6 Kb que contiene la unidad transcripcional del gen hGH-N y el promotor proximal de hPL-4; carril b) La digestión con *Bam HI* reconoce una secuencia al inicio del gen hGH-N y otras en el promotor distal; carril c) *Xho I*, cuenta con sitio único a la mitad del promotor distal y lineariza el vector; carril d) Digestión usando *Xba I* con reconocimiento al inicio del promotor distal; carril e) *Bgl II* corta dentro de la unidad transcripcional del gen hGH-N y en el promotor distal liberando un fragmento de 2.4 Kb, M marcador de PM. Todos los fragmentos generados fueron los esperados como nos lo indica el mapa de restricción.

### 5.3.2 Recombinante phPL3-hGHN

Al recombinante phPL4-hGHN se le eliminó el fragmento del promotor de hPL-4 y se le sustituyó con los fragmentos generados en las digestiones con *Bam HI-Eco RI* y *Eco RI-Xba I* del vector pBShPL-3 mostrados en la fig 10. Después de ligar estos fragmentos con el vector pAVE-hGHN abierto en *Bam HI-Xba I*, se obtuvo el



recombinante phPL3-hGHN. Se lograron 5 clonas las cuales se caracterizaron con enzimas de restricción para corroborar su identidad; una de éstas se muestra en la Fig 12.

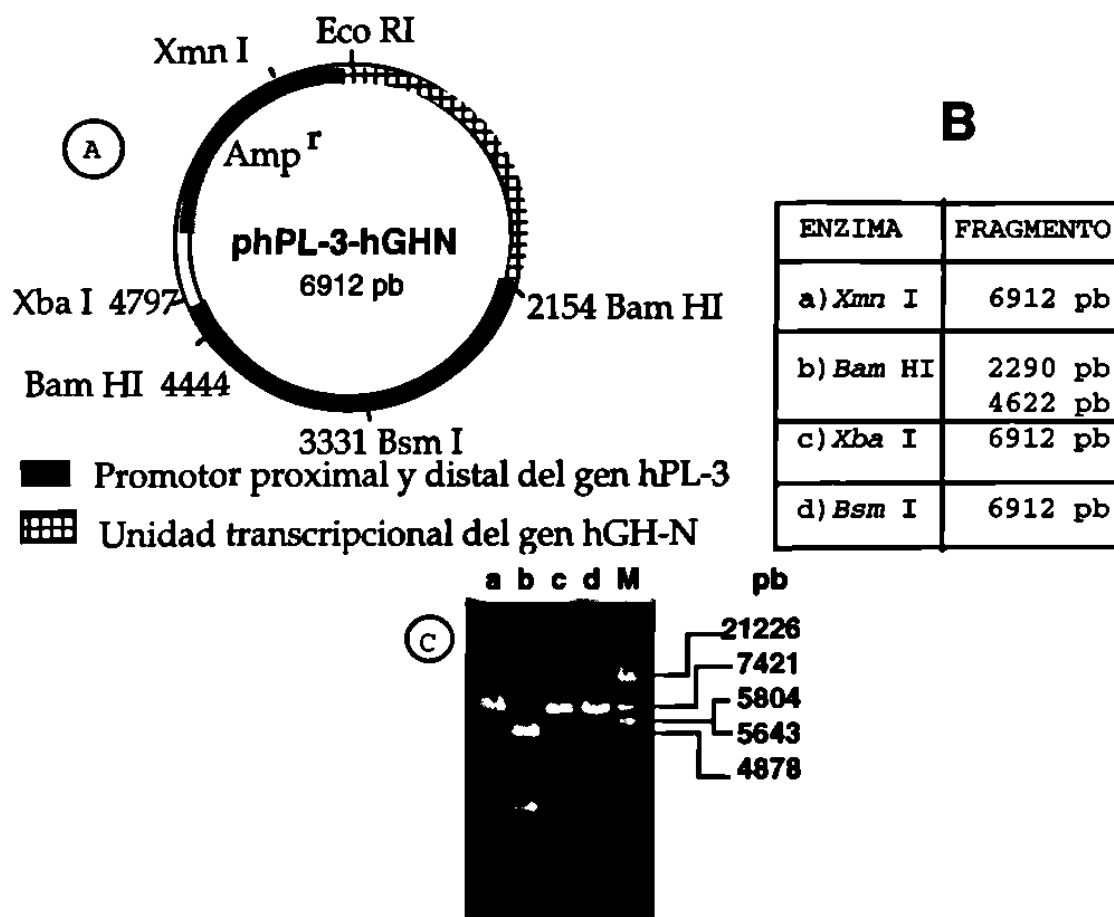


Fig 12 Mapa de restricción y caracterización del recombinante phPL3-hGHN . A) muestra el mapa de restricción del recombinante conteniendo el promotor del gen hPL-3, éste se identificó con el empleo de enzimas de restricción, las cuales se encuentran enlistadas en B junto con los fragmentos teóricos liberados y C) Electroforesis en gel de agarosa al 1% del recombinante digerido en el carril a) Con la enzima *Xmn* I que presenta sitio de corte único en el vector por lo que lineariza el recombinante; carril b) Con *Bam* HI cuenta con sitio de corte doble, uno dentro del promotor distal y otro al inicio de la secuencia codificante del gen hGHN, libera un fragmento de 2.3 Kb que pertenece al promotor proximal y parte del promotor distal clonado; carril c) La enzima *Xba* I localizada al inicio de la región promotora distal, lineariza el plásmido; carril d) La enzima *Bsm* I cuenta con sitio único de corte dentro del promotor distal y lineariza el recombinante.

### 5.3.3 Recombinante phGHV-hGHN

Al igual que la construcción realizada con el recombinante phPL3-hGH-N, el recombinante phPL4-hGHN se aprovechó para eliminar en él la región promotora perteneciente al gen hPL-4 y sustituirla por la del gen hGH-V en el vector purificado. La transformación con el producto ligado permitió analizar 18 clonas de las cuales 3

presentaron un patrón de restricción que correspondía al esperado, empleando un conjunto de enzimas de restricción que nos permitió diferenciar los productos recombinantes; una de estas caracterizaciones se presenta en la Fig 13.

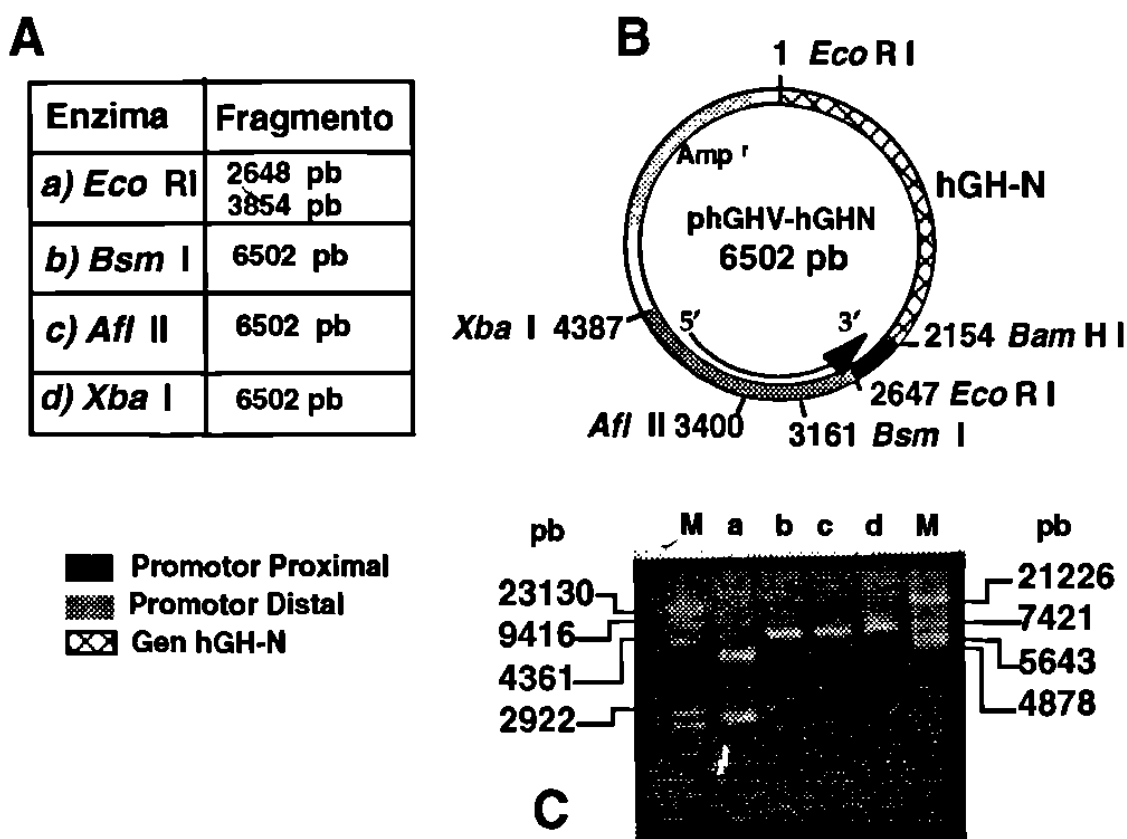


Fig 13.- Mapa de restricción y caracterización del recombinante phGHV-hGHN

A)Tabla que muestra las enzimas empleadas en la caracterización del recombinante y fragmentos teóricos liberados, B) Mapa de restricción del recombinante phGHV-hGHN en donde se representan las principales regiones del mismo y la localización de las enzimas empleadas para su caracterización, C) Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se separan los fragmentos liberados al digerir el DNA del recombinante con las enzimas de restricción. a) *Eco* RI, b) *Bsm* I, c) *Afl* II, d) *Xba* I, M) Marcador de PM  $\lambda$  *Eco* RI (izq.) M  $\lambda$  *Hind* III (der.).

## 5.4 Cuantificación y calidad de los recombinantes .

Las preparaciones a gran escala de los recombinantes y testigos resultaron de buena calidad ya que los valores obtenidos en la relación de absorbancias a  $\lambda$  de 260/280 nm fueron aceptables (considerándose los valores óptimos de calidad superiores a 1.8). El rendimiento de la técnica seguida también fué aceptable y semejante para todos los recombinantes (ver tabla VI).

**Tabla VI Calidad y rendimiento de los DNAs de los recombinantes crecidos a gran escala y purificados por ultracentrifugación en gradiente de CsCl.**

DNA plasmídico	Relación 260/280	Rendimiento mg/l
phPL4-hGHN A	2.33 ± 0.02	1.95 ± 0.09
phPL4-hGHN B	1.90 ± 0.03	2.17 ± 0.082
phPL4-hGHN C	2.15 ± 0.03	2.46 ± 0.094
phPL3-hGHN A	2.0 ± 0.04	2.29 ± 0.078
phPL3-hGHN B	1.96 ± 0.02	2.56 ± 0.082
phPL3-hGHN C	1.88 ± 0.05	2.02 ± 0.071
phGHV-hGHN A	1.98 ± 0.05	1.84 ± 0.086
phGHV-hGHN B	1.93 ± 0.02	2.32 ± 0.082
phGHV-hGHN C	2.05 ± 0.04	2.74 ± 0.088

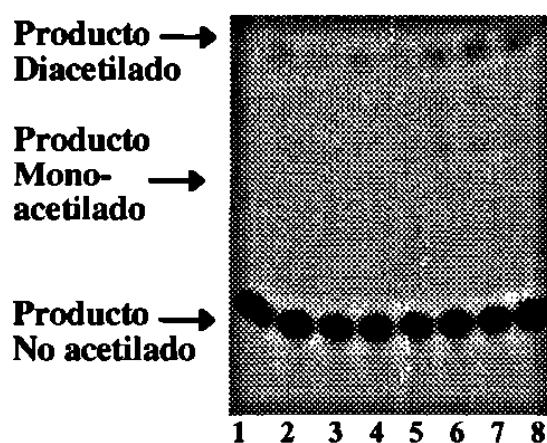
## 5.5 Transfección.

Para determinar las condiciones óptimas para los ensayos de transfección, se probaron diferentes concentraciones de lipofectamina y de DNA transfectando el plásmido pCMV-CAT en células JAR y analizando la actividad de la enzima cloranfenicol-acetil-transferasa, resultante de la expresión, precisamente del gen CAT.

La influencia de la concentración del DNA se puso de manifiesto al probar 6, 9, 12 y 15µg de DNA por caja y observar un aumento progresivo en la intensidad de las manchas que corresponden a los productos mono y diacetilados en las autorradiografías (Fig 14 y 15). Para determinar el volumen adecuado de lipofectamina, se probaron 6,9,12 y 15 µl de este reactivo por placa de cultivo y los resultados de estos experimentos se muestran en las Fig 14 y 15.

Con estos ensayos, se determinó que las condiciones óptimas para los experimentos de transfección fueron 8µg de DNA y 9µl de lipofectamina por placa de 60 mm de diámetro. Las condiciones ensayadas para la línea celular JAR, fueron luego

probadas en la línea celular JEG-3, obteniéndose buena eficiencia de transfección, lo cual se aprecia en la Fig 16. En todos estos ensayos se usó como referencia la intensidad de acetilación obtenida con extracto proteico de células COS-7 transfectadas en paralelo, ya que conocíamos por estudios previos de optimización llevados a cabo en nuestro laboratorio en éstas células,<sup>67</sup> que las condiciones de transfección (concentración de DNA y volumen de lipofectamina) que evaluábamos en las células JAR permitirían obtener una buena eficiencia y acetilación casi total en las células COS-7.



**Fig 14.-** Influencia de la concentración de DNA y el volumen de lipofectamina en la transfección de células JAR con el plásmido pCMV-CAT.  $1.5 \times 10^6$  células JAR se cotransfectaron con los plásmidos pCMV-CAT y pAVE-hGHN empleando diferentes volúmenes de lipofectamina y 1 ó 2  $\mu\text{g}$  de cada DNA por placa. Después de 48 h de incubación se obtuvieron los extractos celulares, el extracto etílico de la reacción de CAT se separó por cromatografía en placa fina y se hizo una autorradiografía que se muestra en esta figura. En los carriles 1 al 4 se ensayaron 1  $\mu\text{g}$  de DNA con 6, 9, 12 y 15  $\mu\text{l}$  de lipofectamina respectivamente y carriles 5 al 8, 2  $\mu\text{g}$  de DNA con 6, 9, 12 y 15  $\mu\text{l}$  de lipofectamina, respectivamente.

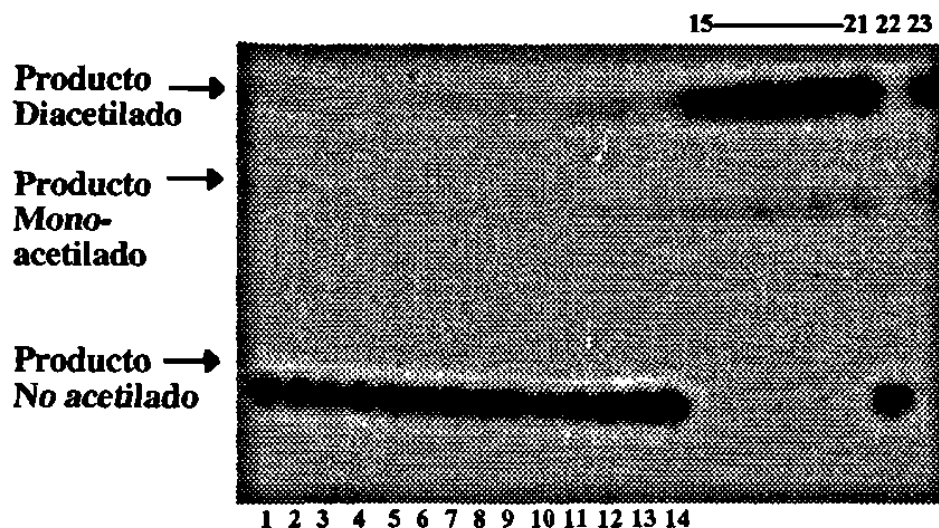


Fig 15.- Estandarización de la transfección en células JAR cotransfectando pAVE-hGHN y pCMV-CAT. Se analizaron las siguientes condiciones de transfección empleando concentraciones variables de DNA y lipofectamina en células JAR: Carriles 1 y 2) 9 $\mu$ l de lipofectamina con 1  $\mu$ g de cada DNA; carriles 3 y 4), 12  $\mu$ l de lipofectamina con 2  $\mu$ g de cada DNA; carriles 5 y 6) 9 $\mu$ l con 3  $\mu$ g de DNA; carriles 7 y 8) 12  $\mu$ l de lipofectamina con 3  $\mu$ g de cada DNA; carriles 15 al 21) células COS-7 transfectadas con los mismos parámetros pero como ensayos únicos, 22) células JAR no transfectadas y 23) COS-7 transfectada con 6 $\mu$ l/1 $\mu$ g.

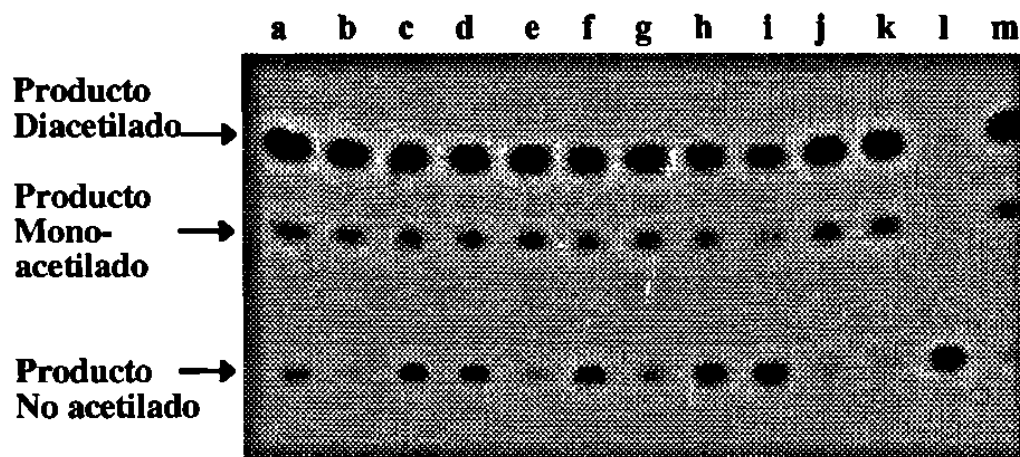


Fig 16.- Optimización de la cotransfección en células JEG-3. Las condiciones ensayadas para la línea JAR se sometieron a análisis en células JEG-3, carriles a-c) 9 $\mu$ l Lipofectamina/ 8 $\mu$ g de DNA (pAVEhGHN-pCMVCAT); carriles d-f) 9 $\mu$ l/10 $\mu$ g; carriles g-i) 9 $\mu$ l /15 $\mu$ g; carril j) Células transfectadas solo con 8 $\mu$ g de pCMV-CAT; carril k) Transfección de 10  $\mu$ g de pCMV-CAT; carril l) células JEG-3 no transfectadas (negativo) y m) células COS-7 cotransfectadas con 8 $\mu$ g de cada DNA y 9 $\mu$ l de lipofectamina.

## 5.5.1 Eficiencia de transfección con los recombinantes.

### 5.5.1.1 Eficiencia de transfección con phPL4-hGHN.

Los ensayos de cotransfección de los recombinantes se realizaron con el plásmido pCMV-CAT empleando 9  $\mu$ l de lipofectamina. La eficiencia se estimó en base a la intensidad de las manchas generadas por la cantidad de productos mono y diacetilados del cloranfenicol marcado radioactivamente, detectados por autorradiografía (Fig 17).

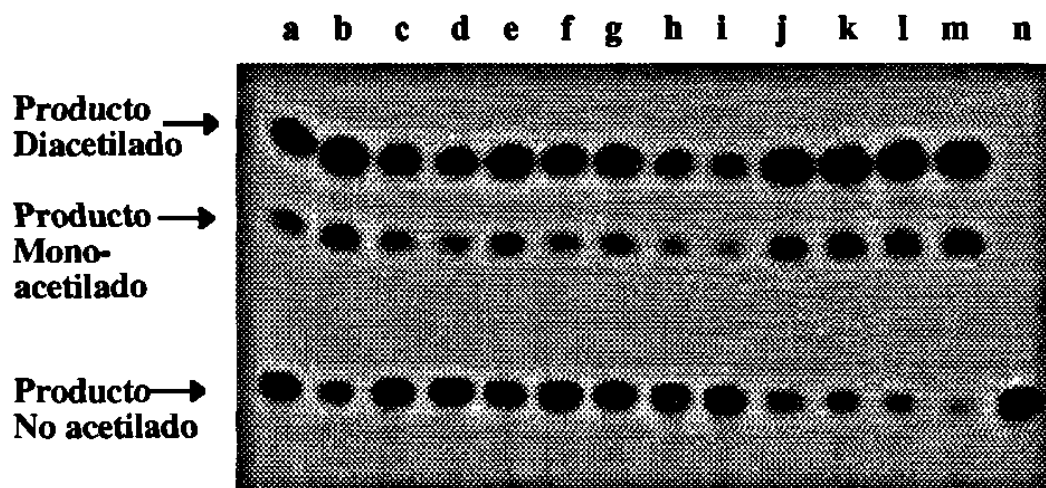


Fig 17.- Eficiencia de cotransfección en JEG-3 del recombinante phPL4-hGHN y pCMV-CAT empleando 9  $\mu$ l de lipofectamina y 8  $\mu$ g de DNA se probaron 3 clonas, cada una por triplicado: Carriles a-c) Clona A de phPL4-hGHN, carriles d-f) Clona B de phPL4-hGHN, g-i) Clona C de phPL4-hGHN, j) JEG-3 con pAVE-hGHN, k) JEG-3 pAVEnphGH-N (testigo neg. de la expresión de HGH), l) Células COS-7 pAVE-hGHN, m) COS-7 pAVEnp-hGHN, n) Células JEG-3 no transfectadas.

### 5.5.1.2 Eficiencia de transfección con phPL3-hGHN.

La intensidad en las manchas de los productos mono y diacetilados en la autorradiografía se puede apreciar homogénea en la transfección realizada con el recombinante phPL3-hGHN (ver Fig 18); 3 clonas del recombinante se transfectaron 3 veces, es decir el recombinante fue transfectado nueve veces para disminuir el porcentaje de error que pudiera presentarse por variabilidad en la calidad del DNA de las diferentes clonas.

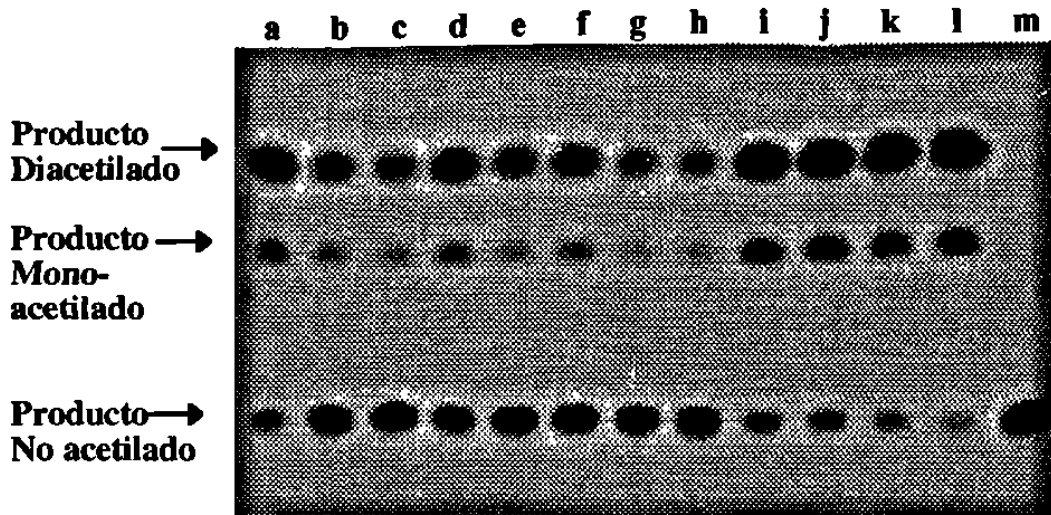


Fig 18.- Cotransfección en JEG-3 de las tres clonas de phPL3-hGHN con pCMV-CAT . Carriles a-c) Clona A; carriles d-f) Clona B; carriles g-i) Clona C; carril j) JEG-3 con pAVE-hGHN; carril k) JEG-3 pAVE<sub>np</sub>-hGHN; l) COS-7 pAVE-hGHN/; carril m) JEG-3 no transfectadas, cada clona se ensayó por triplicado.

### 5.5.1.3 Eficiencia de transfección con phGHV-hGHN.

El recombinante phGHV-hGHN también se transfectó en las mismas condiciones que los anteriores recombinantes. El ensayo se consideró con buena eficiencia, basado en el análisis semicuantitativo de la intensidad de las manchas generadas por los derivados radioactivos separados por cromatografía (ver Fig 19); esto en comparación con la intensidad obtenida en células COS-7 que se usaron como testigos positivos.

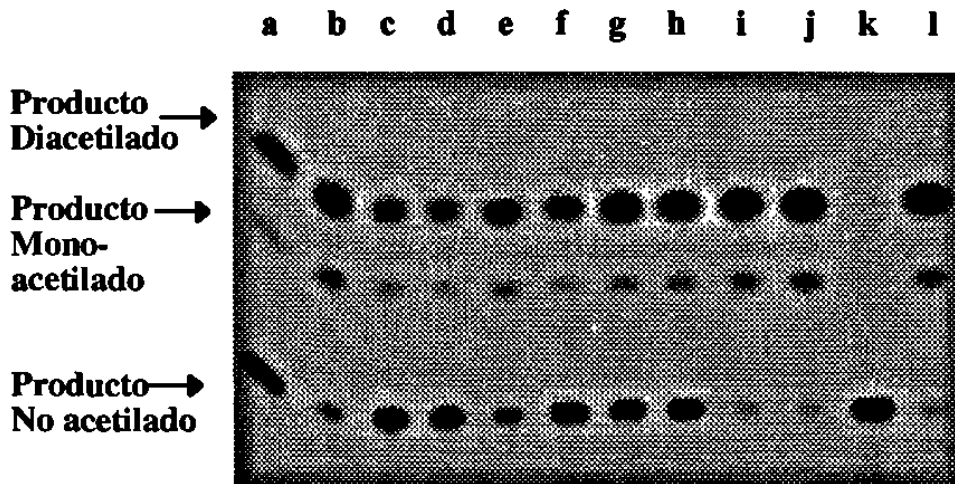


Fig 19.- Eficiencia de cotransfección de las tres clonas de phGHV-hGHN con pCMV-CAT. Se emplearon 9 $\mu$ l de lipofectamina con 8  $\mu$ g de DNA y cada clona se ensayó por triplicado. Carriles a-c) Cotransfección de la clona A de phGHV-hGHN, d-f) Clona B , g-i) Clona C , j) Cotransfección de pAVE-hGHN (+), k) Células JEG-3 no transfectadas (-), l) células COS-7 con pAVEh-GHN.

## 5.6 Análisis de expresión.

### 5.6.1 Análisis del RNA total obtenido de las células transfectadas.

El RNA que se recuperó de las células JEG-3 transfectadas presentó buena calidad en base al patrón de bandas que se observó cuando se separó por electroforesis en gel desnaturante de agarosa al 1%-formaldehído en donde las principales especies del RNA pudieron visualizarse al teñir el gel con bromuro de etidio (ver fig 20).

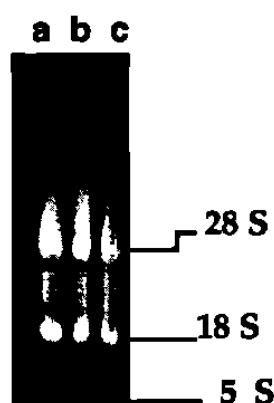


Fig 20.-Perfil electroforético de RNA total de células JEG-3 transfectadas. La electroforesis se practicó en gel desnaturante de agarosa al 1%-formaldehído a) Extracción a partir de células JEG-3; b) RNA de células COS-7, c) RNA de células JEG-3 transfectadas con los recombinantes. La calidad del RNA total extraído se consideró alta en base a abundancia relativa de las diferentes especies del RNA, así como a los valores obtenidos espectrofotométricamente .

### 5.6.2 Inmunodetección de HGH.

El uso de anticuerpos monoclonales específicos contra HGH recombinante nos permitió detectar la secreción de la hormona al medio de cultivo. Se utilizó la técnica de ELISA tipo "sandwich" de doble anticuerpo, la cual presenta un límite de detección menor a 0.5 ng/ml, siendo el rango dinámico del ensayo de alrededor de 0.2-25 ng/ml <sup>72</sup>.



Los resultados de la tabla VII, representan una media de nueve determinaciones de la concentración de proteína presente en el medio extracelular, para cada uno de los recombinantes involucrados en el estudio y corresponden a la alícuota tomada 48 h después de la transfección. La concentración se obtuvo por interpolación de la absorbancia media calculada para cada uno de los recombinantes, en la curva presentada en la Fig 21.

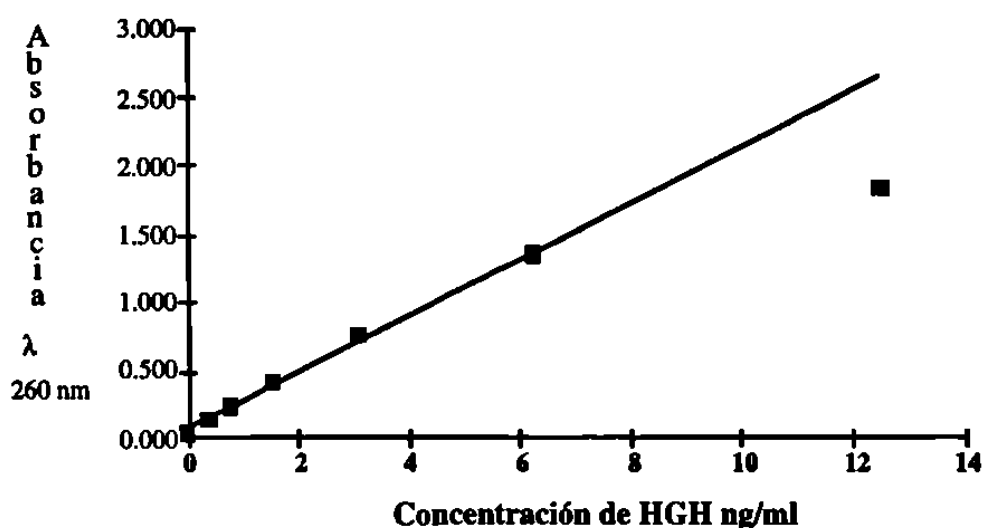


Fig 21.- Curva corregida de detección de GHG por la técnica de ELISA de doble anticuerpo. Los puntos que conforman la curva de calibración representan la media de 2 repeticiones por estándar. Se presentan el coeficiente de variación  $r^2= 0.952$ ; la pendiente,  $m= 0.146$  y el intercepto,  $b= 0.169$ .

Tabla VII Concentración de GHG encontrada para cada uno de los recombinantes\*.

phPL4-hGHN	phPL3-hGHN	phGHV-hGHN
Clona A: $1.502 \pm 0.105$	Clona A: $0.848 \pm 0.088$	Clona A: $1.393 \pm 0.105$
B: $1.409 \pm 0.098$	B: $0.775 \pm 0.102$	B: $1.475 \pm 0.081$
C: $1.364 \pm 0.120$	C: $0.705 \pm 0.093$	C: $1.477 \pm 0.143$
$\bar{X} = 1.425 \text{ ng/ml (DS} \pm 0.098)$	$\bar{X} = 0.776 \text{ ng/ml (DS} \pm 0.101)$	$\bar{X} = 1.448 \text{ ng/ml (DS} \pm 0.059)$

\*Los valores corresponden a la media de tres determinaciones para cada clona expresada como ng/ml y de igual forma la media de la concentración de las tres clonas para cada recombinante.

### 5.6.3 Amplificación del cDNA de hGH-N por PCR.

Una vez realizada la reacción de retrotranscripción se procedió a la amplificación selectiva del cDNA de hGH-N empleando la técnica de PCR.

El resultado de la simulación del PCR en el programa Amplify 1.2 nos pronosticó la amplificación selectiva de una banda con tamaño de 642 pb que corresponde al cDNA que codifica para la proteína madura de HGH (fig 22). El oligonucleótido 5' presenta este apareamiento selectivo debido a que se alinea al inicio de la proteína madura de HGH, lo que le permite discernir y aparearse selectivamente al cDNA del gen reportero.

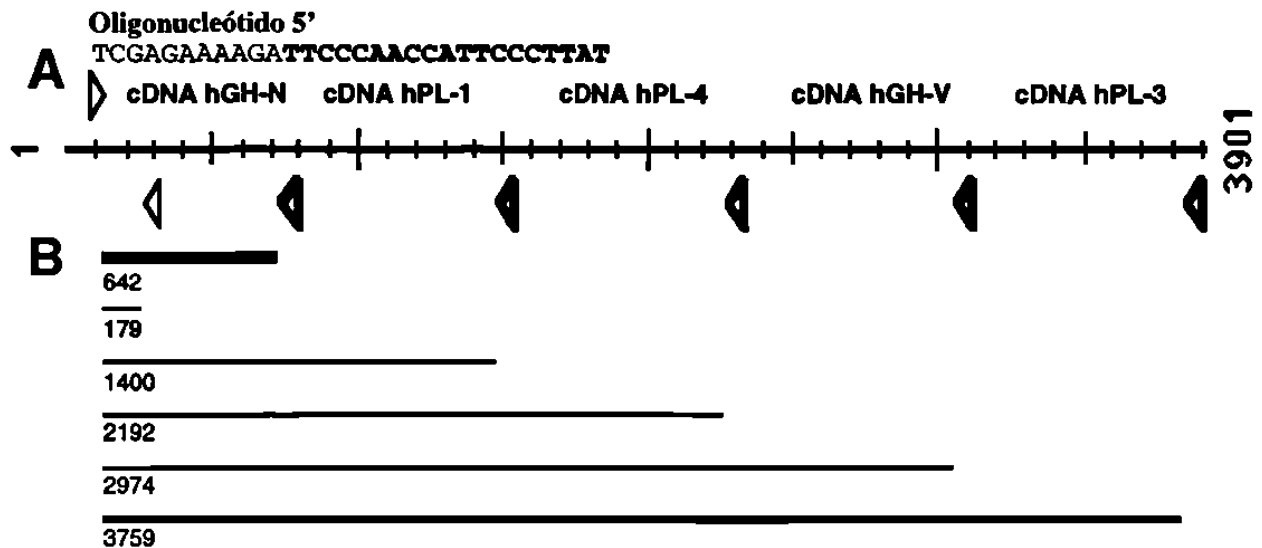


Fig 22.- Simulación del PCR proporcionado por el programa Amplify 1.2. Empleando las secuencias de los cDNAs reportadas para los genes del complejo y la secuencia del par de iniciadores, se simuló una reacción de PCR en el programa Amplify 1.2 A) Presenta la secuencia del oligonucleótido 5' y su alineamiento representado como un triángulo, al inicio de la secuencia del cDNA del gen hGH-N, las letras en negritas en la secuencia del oligonucleótido representan la secuencia de apareamiento, ésta codifica para el inicio de la proteína madura de HGH, B) productos teóricos amplificados con el par de oligonucleótidos, la banda preferentemente amplificada corresponde a un fragmento de 642 pb.

El PCR confirmó el análisis hecho en el Amplify 1.2, pues se logró amplificar una banda que correspondía en tamaño (basado en el marcador de peso molecular) a un fragmento de aproximadamente 640 pb. (Fig. 23).

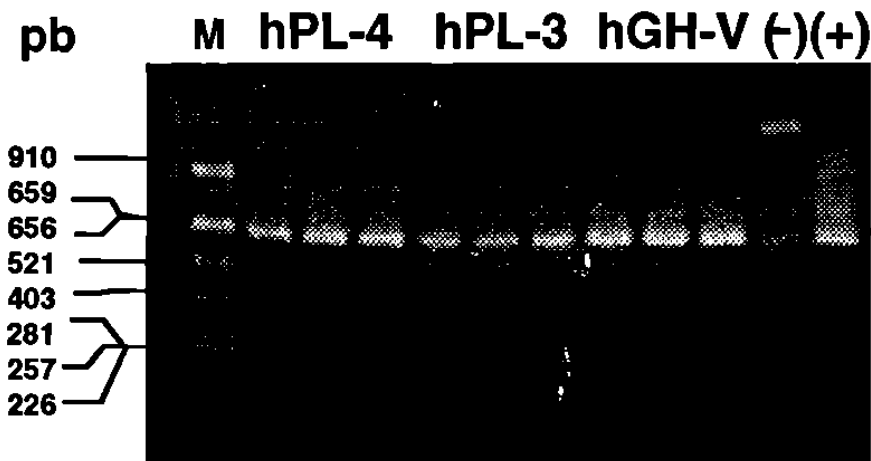


Fig 23.- Perfil electroforetico del producto de PCR correspondiente a los cDNAs de transcritos de hGH-N , gen reportero de cada uno de los recombinantes. La banda generada corresponde a un fragmento de alrededor de 642 pb en base al marcador de peso molecular M) pBR322 digerido con la enzima *Alu I*; (-) Células JEG-3 no transfectadas; (+) Células JEG-3 transfectadas con pAVE-hGHN.

#### 5.6.4 Caracterización del producto amplificado por digestión con la enzima *Rsa I*

La enzima *Rsa I* corta el producto amplificado de hGH-N en dos fragmentos: uno de 317 pb y otro de 325 pb. Con el propósito de demostrar la identidad del producto amplificado se digirió con esta enzima y 3µl de esta digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, empleando pBR-322 digerido con *Alu I* como marcador de peso molecular. Como se muestra en la Fig 24, los productos amplificados de los recombinantes se digirieron con *Rsa I* obteniéndose una sola banda ya que los tamaños de los fragmentos son tan parecidos y no llegan a resolverse en el gel de agarosa.

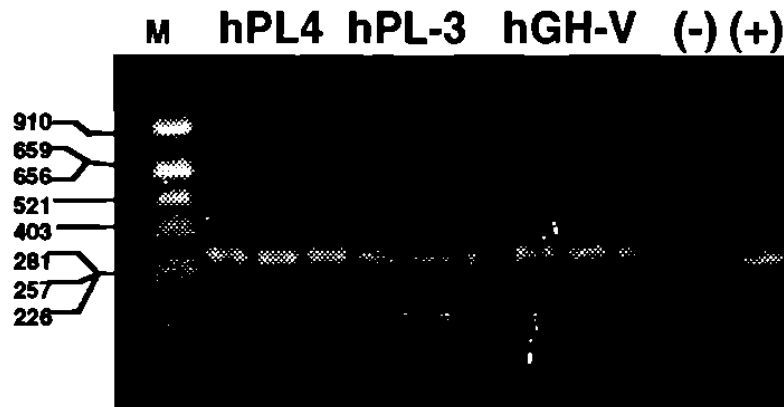


Fig 24.- Gel de agarosa al 1.5% donde se separó el producto amplificado de 642 pbla digerido con la endonucleasa *Rsa I*. Los productos de PCR se digirieron con la enzima *Rsa I* y su separación por electroforesis en gel de agarosa liberan dos fragmentos uno de 317 y otro de 325 pb, mismos que en función de las características del gel de agarosa empleado (1.5%) no pueden ser resueltos y comigran a la altura de 300 pb aproximadamente, de acuerdo al marcador de peso molecular (M), (-) células JEG-3 no transfectadas, (+) células JEG-3 transfectadas con pAVE-hGHN.

### 5.6.5 Análisis de niveles de expresión de los genes híbridos por densitometría de geles.

Uno de los geles del producto amplificado digerido con *Rsa* I se fotografió y el negativo se analizó por densitometría. Se obtuvo el valor densitométrico reportándose como un número absoluto y corresponde a la media de tres determinaciones para cada recombinante (ver tabla VIII), el testigo negativo se empleó como blanco, con el cual se ajustó el valor cero de transmitancia

**Tabla VIII Análisis densitométrico de el amplicón digerido con la enzima *Rsa* I**

Recombinante	Media del área relativa (3)*
JEG-3/ phPL-4hGHN	22677
JEG-3/ phPL-3hGHN	7967
JEG-3/ phGH-VhGHN	17618
JEG-3/ pAVE-hGHN	63778

\* El número entre paréntesis específica que son ensayos por triplicado y el valor reportado corresponde a la media de esas tres determinaciones.

### 5.6.6 Análisis estadístico.

El análisis de las medias de concentración de cada uno de los recombinantes se realizó por el método de ANOVA para determinar si la diferencia entre las medias de grupos era significativa<sup>66</sup>. Los datos sometidos al análisis corresponden a la media de la concentración de HGH en la alícuota del medio extracelular, tomada a las 48h después de la transfección de cada recombinante.

Los resultados obtenidos nos demuestran una diferencia significativa entre la media de concentración obtenida con el recombinante hGH-V y el recombinante hPL-4 contra la media de concentración obtenida con el recombinante que posee la región promotora del gen hPL-3 (Tabla IX).

**Tabla IX ANOVA de la media de concentración encontrada para cada uno de los recombinantes**

Grupos	Media de la Concentración de HGh (ng/ml)	Valor F Calculado	Valor F de tablas
phPL-4hGHN	1.425 + 0.098	65.40	3.402
phPL-3hGHN	0.770 + 0.101		
phGH-VhGHN	1.448 + 0.059		

## CAPITULO VI

### Discusión

En la estrategia que diseñamos, se seleccionaron las secuencias río arriba de los genes hPL-4 y hPL-3 (de expresión alta en placenta) y del gen hGH-V (de expresión baja). Por otro lado elegimos como gen reportero a la unidad transcripcional de hGH-N, ya que pertenece al mismo complejo génico pero de expresión en la hipófisis y al mismo tiempo nos permitió la construcción de recombinantes que se acercarán lo más posible a lo que se tiene en la célula. Por otra parte, la expresión del gen reportero hGH-N ya estaba implementada en nuestro laboratorio, midiéndose tanto por RT-PCR el nivel de transcritos, como por ELISA el de la hormona secretada por las células transfectadas. Por último el sistema de expresión seleccionado fué una línea celular derivada de placenta, en la que las secuencias promotoras estudiadas presentan actividad.

Nuestro objetivo principal fué comparar la fuerza de los promotores naturales, empleando un sistema de ensayo muy sensible que permitiera detectar el nivel de expresión que esperábamos <sup>14,15</sup>.

Una vez construídos los recombinantes y probados en células en cultivo, encontramos que la regulación promovida por el promotor de hPL-4 fué superior a la de hPL-3 (1.8 veces más), lo cual concuerda con lo que se se observa en la placenta. Pero resultó sorprendente encontrar que el promotor del gen hGH-V tuvo niveles de expresión superiores a los del promotor del gen hPL-3, pues igualó al encontrado para el promotor del gen hPL-4. Este hallazgo resulta interesante porque es muy diferente a lo que sucede en la placenta donde los niveles de expresión del gen hGH-V son 1000 veces menores que los de hPL-4.

Respecto a los resultados obtenidos para el promotor del gen hPL-3, éstos concuerdan con estudios realizados por otros investigadores <sup>30,33</sup> en los que se utilizó una región semilar en tamaño (2.3 Kb) a la empleada en este trabajo.

En placenta se ha determinado que la producción de lactógenos se estimula por el ácido retinoico (RAR) y la hormona tiroidea (RT3) y se han identificado secuencias consenso de unión para los receptores de estas hormonas en varias especies <sup>31</sup>. Un análisis computacional del promotor de hPL-3 permitió localizar tres secuencias potenciales de unión para estos receptores entre -500 y -1200 pb antes del inicio de la transcripción <sup>33</sup>. El centro de estas regiones se encuentra constituido por elementos repetidos de la secuencia (A/G) GGT (C/G), la cual es reconocida por los receptores retinoicos/tiroideos. Un análisis de las secuencias promotoras realizado por nosotros mostró que hPL-4 tiene las mismas secuencias localizadas en la misma posición, pero que éstas se encuentran modificadas en el promotor de hGH-V.

Uno de los pocos estudios en los que se involucra una región río arriba más grande que el promotor proximal (500 pb), se realizó con una región promotora de 2.3 kb del gen hPL-3 comparado contra una región de 1.2 kb del mismo gen. Se determinó así que la región de 2.3 kb producía niveles de expresión mas bajos en el gen reportero (CAT) que la de 1.2 Kb, por lo que se propuso la existencia de un inhibidor actuando en cis sobre esta región. Sinembargo, hasta ahora se desconoce la secuencia que pudiera actuar como inhibidor y no sabemos si el promotor de hPL-4 también pudiera tenerla. Si bien es cierto que los genes del complejo hGH-hPL presentan una similitud de al menos 92% en su secuencia codificante, ésta disminuye conforme se avanza hacia los flancos del gen; si existieran diferencias en secuencias en estas regiones entre los genes hPL-4 y hPL-3, podría explicar porque hPL-4 no se ve afectado en nuestro estudio.

En la línea celular JEG-3 se han encontrado factores nucleares denominados receptores de hormonas esteroideas "huérfanos" (EAR/COUP), para los cuales los ligandos no han sido aún identificados <sup>68</sup>, recientemente uno de estos receptores se describió en la línea celular de coriocarcinoma BeWo y fué denominado factor Ear-3/ARP-1 <sup>31</sup>. Se conoce que estos receptores tienen la capacidad de interactuar mediante la formación de heterodímeros con receptores de ácido retinoico, hormona tiroidea y el receptor X del ácido retinoico e inhibir la actividad promotora de genes regulados por estas hormonas <sup>69,70</sup>. El hecho de que en el promotor del gen hGH-V haya diferencias en las secuencias de interacción con los receptores retinoicos/tiroideos, podría influir en la unión de los inhibidores anteriores; ello pudiera explicar el por que el promotor de hGH-V presenta mayor fuerza promotora que su contraparte del gen hPL-3, aspecto que no se presenta *in vivo* tal vez por la cercanía del único enhancer del locus al gen hPL-3.

Otro aspecto importante de aclarar es el hecho de que la longitud de las secuencias promotoras en estudio no son iguales en tamaño, por tanto un mecanismo represor actuante en la región promotora del gen hGH-V de manera natural en la placenta, pero que no funciona en el promotor estudiado por nosotros, debido quizás a que carece de la secuencia de interacción con el inhibidor, ello también pudiera explicar los altos niveles de expresión alcanzados por el gen reportero empleando éste promotor.

Recombinantes que contenían la región promotora proximal de los genes hPL-4, hGH-V y hGH-N dirigiendo la expresión del gen reportero CAT se transfectaron en células de adenohipófisis de rata y se demostró que el promotor proximal de hPL-4 es activo e incluso más fuerte que el de hGH-V y hGH-N, sin embargo el modelo celular empleado no permite llegar a conclusiones claras como pudiera haberlo hecho un modelo que se acerque lo más posible a la placenta; por ésta razón, en este trabajo decidimos emplear células humanas derivadas de éste órgano y un gen reportero que forma parte del mismo complejo multigénico.



## **CAPITULO VII**

### **Conclusiones**

- 1) El promotor del gen hPL-4 y el promotor del gen hGH-V expresan 1.8 veces más proteína que el del gen hPL-3.
  
- 2) El promotor del gen hGH-V iguala la fuerza del gen promtor del gen hPL-4.
  
- 3) Estos resultados pudieran explicarse por:
  - a) Diferencias en el número de sitios funcionales de interacción con los receptores para ácido retinoico y hormona tiroidea.
  
  - b) Presencia en la línea celular empleada de factores nucleares desconocidos de unión a receptores "huerfanos" que interactuan con los receptores de hormonas esteroides y se sabe pueden inhibir la actividad promotora de los genes regulados por hormonas retinoico/tiroideas.
  
  - c) Al colocar el promotor de hGH-V fuera del contexto genómico de la placenta, esta región podría quedar más accesible a la acción de activadores hasta ahora desconocidos.
  
  - d) Mecanismo de represión presente naturalmente en la placenta y que no funciona en la porción del promotor del gen hGH-V estudiada en el presente trabajo.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Barrera-Saldaña, H. A. (1982) "Expression of the human placental lactogen genes". Tesis doctoral, The university of Texas Health Science at Houston.
2. Harper, M.E., Barrera-Saldaña, H.A., y Saunders, G.F. (1982). "Chromosomal localization of the human placental lactogen growth hormone gene cluster to 17q22-24" *Am. J. Hum. Genet.* **34**:227-234.
3. Chen, E.Y., Liao, Y.C., 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.
4. 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.
5. Hirt H., J. Kimelman, M.J. Birnbaum, E.Y. Chen, P.H. Seeburg, N.L. Eberhardt and A. Barta 1987 "The Human Growth Hormone Locus: Structure , evolution and allelic variations" *DNA* **6**:59-70.
- 6 De Noto, F.M., Moore, D.D. y Goodman, H.M. (1981). Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure:possible alternative splicing. *Nucleic. Acid. Res.* **9**:3719-3730.
7. Barrera-Saldaña, H.A., Seeburg, P.H., y Saunders, G.F.(1983) "Two structurally different genes produce the same secreted human placental lactogen hormone" *J. Biol. Chem.* **258**:3787-3793.
8. Paladini, A.A., Peña, C.,Poskus,E., (1983). "Molecular biology of growth hormone" Editado por Hurrell J.G.R. Vol. 15 pp 25-26 CRC. Press Cleveland Ohio.
9. Press, M., (1988) "Growth hormone and metabolism In: Diabetes/Metabolim Reviews. Jown Wiley and sons, Inc. New York. U.S.A. **4**:391-414.
10. Masuda, N., Watahiki, M., Tanaka, M., Yamakawa M., Shimizu, K., Nagai, J. y Nakasima, K.,Molecular cloning of cDNA encoding 20 kDa variant human growth

hormone and the alternative splicing mechanism. *Biochem. Biophys. Acta*, 949:125-131 (1988).

11. DeZegher, F., Vanderschueren-Lodeweyckx, M., Spitz, B., Faijerson, Y., Blomberg, F., Beckers, A., Hennen, G., Frankenne, F. (1990) Perinatal growth hormone (GH) physiology; effect of GH-releasing factor on maternal and fetal secretion of pituitary and placental GH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77:520-522.

12. Beckers, A., Stevenaert, P., Foidart, J.M., Hennen, G., Frankenne, F. (1990). Placental and pituitary growth hormone secretion during pregnancy in acromegalic women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71:725-731.

13. Cooke, N.E., Ray, J., Emery, J.G., y Liebhaber, A. (1988) "Two distinct species of human growth hormone variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins" *J. Biol. Chem.* 263:9001-9006.

14. Kaplan, S.L., Gurbide, E., Sciarra, J.J., Grumbach, M.M., Metabolic clearance rate and production rate of chorionic growth hormone-prolactin in late pregnancy, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 28:1450-1460 (1968).

15. Kim, Y.G. y Feling (1971) " Plasma chorionic somatomotropin levels during starvation in midpregnancy". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 32:864.

16. Nielsen, P.V., Pedersen, H. and Kampmann, E-M., Absence of human placental lactogen in a otherwise uneventful pregnancy, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 135:322-326 (1979).

17. Wursel, J.M., Parks, J.S., Herd, J.E. y Nielsen , P.V., A gen deletion is responsible for absence of human chorionic somatomotropin, *DNA*, 1:251 (1982).

18. Parks, J.S., Nielsen P.V., Sexton, L.A., Jorgensen, E.H., An effect of gene dosage on production of human chorionic somatomotropin, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60:994-997 (1985).

19. Ellson, Y., Chen, et.al. (1989) The human growth hormone locus: Nucleotide sequence, biology and evolution. *Genomics* 4:479-497.

20. Reséndez-Pérez, D., Ramírez-Solís, R., Varela -Echavarría, A., Martínez-Rodríguez, H.G. y Barrera-Saldaña, H. Coding potential of transfected human placental lactogen genes" *Nucleic Acids Research*, 18:4665-4670.
21. A. Misra-Press, N. E. Cooke and S.A. Liebhaber (1994), Complex alternative splicing inactivates the chorionic somatomammotropin-like (hCS-L) gene. *J. Biol. Chem.* 269:23220-23229
22. Selvanayagam, C.S., S.Y. Tsai, M.J. Tsai and P. Sevanayagam 1984 " Multiple origins of transcription for the human placental lactogen genes" *J. Biol. Chem.* 259: 14642.
23. Press-Misra, A., Cooke, N.E., and Liebhaber, S.A., (1994) Complex alternative splicing partially inactivates the human chorionic somatomammotropin-like (hCS-L) gene. *The Journal of Biological Chemistry.* 269:37:23220-23229.
24. Cooke, N.E., ray, J., Emery, J.G., and Liebhaber, A. Two distinct species of novel growth hormone proteins, *J. Biol. Chem.*, 263:9001-9006 (1988).
25. Barrera-Saldaña, H.A., Robberson, D.L., and Saunders, G.F.(1982) "Transcriptional products of the human placental lactogen gene" *J. Biol.Chem.* 257:12399-12404.
26. Lytras, A., Bock, M.E., Dodd, J.G., Cattini, P.A., (1994) "Detection of placental growth hormone variant and chorionic Somatomammotropin Ribonucleic Acid Expression in Human trophoblastic Neoplasms by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction" *Endocrinology.* 134:2461-2466.
27. James N. MacLeod, Alice K. Lee, Stephen A. Liebhaber, and Nancy E. Cooke (1991) "Development control and alternative splicing of the placentally expressed transcripts from the human growth hormone gene cluster", *The Journal of biological Chemistry.* 267:20:14219-14226.
28. Reséndez-Pérez, D., and Barrera-Saldaña, H.A.(1990) "Expression studies of trasfected multigene families by homologous DNA mutagenesis" *Biotechniques* 9:281-286.
29. Natchigal, M.W., B.E. Nickel, Klassen, M.E., Zhang, W., Eberhardt, N.L. and Cattini, P.A. (1989) Human chorionic somatomammotropin and growth hormone gene expression in rat pituitary tumour cells is independent on proximal promoter sequences. *Nucleic. Acids Res.* 17.

30. Nickel, B.F., Kardam, E., y Catinni, P.A. (1990). "Differential expression of human placental growth hormone variant and chorionic somatomammotropin in culture" *Biochem. J.* 267:653-658.
31. Stephanou A. and Handwerger, S. (1995) "Identification of a composite steroid hormone response element on the human placental lactogen promoter". *Mol Cell Endocrinol* 112: 123-129.
32. Stephanou A. and Handwerger, S. (1995) "Retinoic acid and thyroid hormone regulate placental lactogen expression in human trophoblast cells". *Endocrinology* 136: 933-938.
33. Stephanou A. and Handwerger, S. (1995) "The nuclear factor NF-IL6 activates human placental lactogen gene expression". *Biochem Biophys Res Commun* 206: 215-222
34. Stephanou A. and Handwerger, S. (1994) "Regulation of human placental lactogen expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3". *Endocrinology* 135: 2651-2656
35. Stephanou A. and Handwerger, S. (1994) "Expression of retinoic acid receptor subtypes and cellular retinoic acid binding protein-II mRNAs during differentiation of human trophoblast cells". *Biochem Biophys Res Commun* 202: 772-780.
36. Stephanou A. and Handwerger, S. (1994) "Interleukin-6 stimulates placental lactogen expression by human trophoblast cells". *Endocrinology* 135: 719-723
37. S. Handwerger, S. Myers, R. Richards, B. Richardson, L. Turzai, C. Moeykins, T. Meyer and G. M. Anantharamahiah (1995), "Apolipoprotein A-I stimulates placental lactogen expression by human trophoblast cells". *Endocrinology* 136: 5555-5560.
38. Jiang, Shi-Wen., Allan, R., Shepard, and Norman L. Eberhard. (1994) An initiator element is required for maximal human chorionic somatomammotropin gene promoter and enhancer function. *The Journal of Biol. Chem.* 270:8:3683-3692.
39. Rogers, B.L., Sobnosky, M.G., and Saunders, G.F. (1986) Transcriptional enhancer within the human placental lactogen and growth hormone multigene cluster. *Nucleic Acids Res.* 14:7647-7659.

40. Jacquemin, P., Oury, C., Peers, B., Morin, A., Belayew, A., and Marthial, J.A. (1994) Characterization of a single strong tissue-specific enhancer downstream from the three human genes encoding placental lactogen. *Molecular and Cellular Biology* 14:1:93-103.
41. Ingraham, H.A., Chen, R., Mangalam, H.J., Elsholtz, H.P., Flynn, S.E., Lin, C.R., Simmons, D.M., Swanson, L., Rosenfeld, M.G. (1988); A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55:519-529
42. Bodner, M., Castrillo, J.L., Theill, L.E., Deernick, T., Ellisman, M., Karin, M. (1988); The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* 55:505-518.
43. Bheringer, R.R., Mathews, L.S., Palmiter, R.D., Brinster, R.L., (1988); Dwarf mice produced by genetic ablation of growth hormone expressing cells. *Genes and Development* 2:453-461.
44. Lefevre, C., Imagawa M., Dana S., Grindlay J., Bodner M., Karin M., (1987) Tissue-specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific trans-acting factor. *EMBO J* 6:971-981.
45. Natchigal, M.W., Nickel, B.E., Cattini, P.A., (1993) Especific repression of placental members of the human hormone gene family. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 11:8473-8479.
46. Ramírez-Solis, R., Reséndez-Pérez, D., Alvidrez-Quihui., L., Varela-Martínez, R., Martínez-Rodríguez, H.G., Barrera-Saldaña, H.A. (1990) New vector the efficient expression of mammalian genes in cultured cells.
- 47 Foecking, M.K., y Hofstetter, H., (1986), Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene* 45:101-105.
48. Murray, V., (1989) *Nucl. Acids Res.* 17. Instruction Manual, DNA isolation matrix system. Gibco-BRL. No cat. 5549UA.
49. Widmaier., E. Mertz, L.M. Fox, D.K. (1995) Purification of biotinylated DNA using GlassMAX DNA isolation system. *Focus* 17:3:89
50. Clewell, D.B.; Helsinki, D.R., (1972) Purification of closed circular DNA by equilibrium centrifugation in CsCl-ethidium bromide gradient. *J Bacteriol.* 110:1135.

51. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
52. King, P.V., Blakesley, R.W., (1986) Optimizing DNA ligations for transformation. *Focus* 8:1-3
53. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
54. Dagert, M. and Ehrlich, S.D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6:23-28.
55. Catalogue Sigma Biosciences. 1996 Cell Culture. Technical Information 201-203
56. Ciccarone, V., Hawley-Nelson, P., (1995) Lipofectin transfection activity increased by protocol improvement. *Focus* 17:3:103.
57. Hawley-Nelson, P., Ciccarone, V., Jessee, J. (1993) Lipofectamine reagent: A new, higher efficiency polycation liposome transfection reagent. *Focus* 15:3:73-79.
58. Neumann, J.R., Morency, C.A., Russian, C.O. (1987) A novel rapid assay for chloramphenicol acetyl transferase gene expression. *Biotechniques*. 5:44-47, (1987).
59. Bradford MM (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.
60. Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) , Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
61. Ogretmen, B., Safa, A.R., (1995), Mini-preparation of total RNA for RT-PCR from cultured human cells. *BioTechniques*, 19:3:374-376.
62. Instruction Manual. Cat No. 19670-017 Human Growth Hormone. Non-Isotopic Immunoassay for transfection reporter proteins. Gibco-BRL pg.11

63. Gubler, V., Hoffman, B.J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-269.
64. Mullis, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262:43-46.
65. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Snisky, J.J. (1990); *PCR Protocols, A guide to methods and applications*. Capt. 1:3-12.
66. Daniel, W. M. ( 1992) *Bioestadística : Base para el análisis de las ciencias de la salud*. 3 ed. Capt. 7:283-311.
67. Castro-Peralta, F. (1995) *Clonación molecular, caracterización y expresión del cDNA de la hormona de crecimiento del gato (FcGH)*. Tesis de maestría,
68. Kliewer S., Umesono K., Heyman, RA, Mangelsdorf, D.J., Dyck, JA, Evan, R.M., (1992) Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 89:1448-1452.
69. Cooney A.J., Leng X., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W., Tsai, M-J. 1993 Multiple mechanisms of chicken ovoalbumin upstream promoter transcription factor-dependent repression of transactivation by the vitamin D, thyroid hormone, and retinoic acid response. *J. Biol. Chem.* 268:4152-4160.
70. Lehmann, JM, Zhang X-K., Graupner, G., Lee M-O., Hermann T., Hoffmann B., Pfahl, M., 1993 Formation of retinoid X receptor homodimers leads to repression of T3 response: hormonal cross talk by ligand-induced squelching. *Mol. Cell. Biol.* 13:7698-7707.



## RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

**Martín Canizales Espinosa**

**Candidato para el Grado de**

**Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería  
Genética**

**Tesis: ESTUDIO COMPARATIVO DE PROMOTORES DE GENES  
DEL COMPLEJO hGH-hPL QUE SE EXPRESAN EN PLACENTA**

**Campo de Estudio: Ciencias Básicas.**

**Biografía:**

**Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 14 de  
Diciembre de 1968, hijo de Liborio Canizales Cisneros e Irene Espinosa de  
Canizales.**

**Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado  
obtenido Licenciatura en Químico Clínico Biólogo en 1992.**

