

Transformación de bacterias con DNA fágico (48):

El presente método fue utilizado para propagar en bacterias aquellos fagos recombinantes que hubiesen adquirido el inserto proveniente del DNAC de hGH.

Reactivos y soluciones:

- a) Caldo 2YT (NaCl al 0.5%, bactotripton a al 1.6% y extracto de levadura al 1%).
- b) Cloruro de calcio 50 mM almacenado en frío.
- c) IPTG 100 mM.
- d) X-Gal al 2% en dimetil formamida.
- e) Agar blando 2YT (agar al 0.6% en caldo 2YT).
- f) Placas de agar LB.

Procedimiento:

- 1) A partir de un cultivo puro de Escherichia coli cepa JM103 se inocularon 60 ml de caldo 2YT y se permitió el crecimiento hasta que el cultivo alcanzó una D.O. de 0.5 a 600 nm. Se tomaron 60 ml de ese cultivo y se cosecharon las células por centrifugación a 5,000 xg por 5 min. Los restantes 20 ml se colocaron en hielo y se conservaron como bacterias no competentes.
- 2) Se resuspendió la pastilla en 30 ml de CaCl₂ 50 mM y se colocó en hielo por 40 min. Se centrifugó nuevamente a 5,000 xg por 5 min y la pastilla se resuspendió finalmente en 6 ml de CaCl₂ 50 mM. Se tomaron alícuotas de 300 μ l y se transfirieron a tubos de microcentrífuga estériles y colocados en hielo.
- 3) Se tomaron 5 ml de cada mezcla del experimento de subclonación (vector e inserto sin ligasa, vector e inserto con ligasa y vector sin inserto con ligasa) y se agregaron respectivamente a 3 tubos de microcentrífuga que contenían las células competentes. Se dejaron reposar en hielo por 40 min.
- 4) Se dió un choque térmico a 42°C por 2 min y en seguida se regresaron los tubos al hielo por otros 2 min. Se transfirieron a temperatura ambiente y se agregaron 10 μ l de IPTG 100 mM, 50 μ l de X-Gal al 2% y 300 μ l de células no competentes (inciso 1).
- 5) Se agregó la mezcla anterior a 3 ml de agar blando 2YT fundido en baño María y equilibrado a 45°C, se mezcló suavemente en un vortex y se virió sobre placas de LB extendiéndose mediante rotación manual. Finalmente cuando el agar blando se solidificó, se invirtieron las cajas y se colocaron a 37°C durante toda la noche.

Preparación de templados de DNA de cadena sencilla (49):

La transformación de una cepa apropiada de *E. coli* con vectores M13 que contienen un determinado inserto, produce placas blancas después de permitir el crecimiento sobre un medio suplementado con X-Gal. Este reactivo es un sustrato incoloro para la enzima β -galactosidasa, la cual lo convierte a un color azul permitiendo la detección visual de la actividad enzimática. Dichos vectores están diseñados de tal manera que al interrumpir la región de sitios múltiples de clonación se pierde su actividad enzimática, con lo cual se facilita la identificación de los recombinantes por medio de un ensayo de placas blancas y azules.

Una vez que se detectan las placas blancas se requiere preparar a partir de ellas el DNAC monocatenario que será utilizado como molde para el secuenciamiento nucleotídico. Con este propósito se preparó el templado de cadena sencilla de aquellos recombinantes que contenían un inserto de 447 pb proveniente del DNAC de hGH.

Reactivos y soluciones:

- a) Caldo 2YT (NaCl al 0.5%, bacto triptona al 1.6% y extracto de levadura al 1%).
- b) Solución de precipitación (PEG-8,000 al 40% y Acetato de sodio 5 M pH 7).
- c) TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.6 y EDTA 1 mM).
- d) Fenol saturado con Tris-HCl 0.05 M pH 7.5.
- e) Cloroformo.
- f) Acetato de sodio 3M pH 5.2.
- g) Etanol absoluto y etanol al 90%.

Procedimiento:

- 1) A partir de un cultivo exponencial de *Escherichia coli* JM103, se hizo una dilución 1:100 en 1.5 ml de caldo 2YT y se infectó con una placa blanca obtenida durante la transformación. Se incubó a 37°C con agitación vigorosa durante 8 h. Se transfirió el cultivo a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min.
- 2) Cuidadosamente se transfirió el sobrenadante (contiene los fagos) a otro tubo y se agregó una novena parte de solución de precipitación. Se colocó a 4°C por 15 min y se colectaron los fagos por centrifugación a 15,000 rpm por 10 min. Se eliminó minuciosamente el sobrenadante y se secó el interior del tubo con tiras de papel filtro.
- 3) Se resuspendió la pastilla en 200 μ l de TE y se agregaron 200 μ l de fenol-cloroformo (3:1). Se mezcló en el vortex y se centrifugó a 10,000 rpm por 2 min para separar las fases. Se

recuperó la fase acuosa y se repitió la extracción con la mezcla de fenol-cloroformo. Se hizo una última extracción con 200 μ l de cloroformo.

- 4) A la fase acuosa final se le agregó una décima parte de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se colocó a -70°C por 30 min y posteriormente se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min. Se lavó la pastilla con etanol al 90% y se secó en el evaporador centrífugo al vacío.
- 5) Finalmente la pastilla de DNA fue resuspendida en 20 μ l de TE y se tomó una alícuota de 1 μ l para verificar su perfil electroforético (la presencia de una sola banda debe ser evidente después de tinción con bromuro de etidio). El resto de la solución se colocó a 4°C donde fue almacenada hasta su uso posterior. Generalmente esta solución contiene 0.1-1 μg de DNA/ μ l.

Secuenciamiento de nucleótidos por el método de Sanger:

El método de Sanger (50), también conocido como método de terminación de la cadena, implica la síntesis *in vitro* de una cadena de DNA por una DNA polimerasa a partir de un templado de DNA de cadena sencilla.

La síntesis es iniciada a partir de un oligonucleótido iniciador que se aparea al templado y dicha reacción es interrumpida por la incorporación de un análogo de nucleótidos que impide la elongación de la cadena. Los análogos de nucleótidos son los 2',3'-dideoxinucleósidos 5' trifosfatos (ddNTP's). Al realizar mezclas de dNTP's y uno de los cuatro ddNTP's, la polimerización del DNA será interrumpida en una fracción de la población de las cadenas en cada sitio donde el ddNTP llegue a ser incorporado. Cuatro reacciones separadas, cada una con un diferente ddNTP, proporcionan la información necesaria acerca de la secuencia nucleotídica. Durante la reacción de síntesis se incluye también un nucleótido radiactivo de tal manera que las cadenas marcadas, de diferentes longitudes, pueden ser visualizadas por autorradiografía después de separarlas por electroforesis en un gel de alta resolución.

Para la determinación de la secuencia nucleotídica del inserto proveniente del DNAC de hGH se utilizó el conjunto de reactivos "SEQUENASE KIT" disponible comercialmente por la compañía United States Biochemicals (catálogo 70700).

Reactivos y soluciones:

- a) ^{35}S - α -dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$).
- b) TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y EDTA 1 mM).
- c) TBE 10 X (Tris base 0.89 M, ácido bórico 0.89 M y EDTA 20 mM).

- d) Acrilamida, bisacrilamida y TEMED (grado electroforético).
- e) Urea.
- f) Persulfato de amonio al 10% (recientemente preparado).
- g) Solución de lavado de geles (Acido acético al 10% y metanol al 12%).

Componentes de conjunto "SEQUENASE":

- h) Secuenasa (DNA polimerasa del bacteriófago T7).
- i) Amortiguador de secuenciamiento 5 X.
- j) Oligonucleótido iniciador 0.5 pmol/ μ l.
- k) Ditiotreititol 0.1 M.
- l) Mezcla de marcaje 5 X (dGTP, dCTP y dTTP a 7.5 μ M cada uno).
- m) Mezclas de terminación para ddG, ddA, ddT y ddC respectivamente.
- n) Solución inactivadora (Formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05% y Xilencianol 0.05%).

Procedimiento:

Apareamiento del templado y el iniciador.

- 1) En un tubo de microcentrífuga se hizo la siguiente mezcla:

-- Oligonucleótido iniciador	1 μ l
-- Amortiguador de secuenciamiento 5 X	2 μ l
-- DNA (aproximadamente 1-2 μ g)	<u>7 μl</u>
	10 μ l

Se calentó la solución a 65°C por 2 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente por un periodo de 30 min.

Reacción de marcaje.

- 2) A partir de la mezcla de marcaje 5 X se hizo una dilución 1:5 con agua ultrapura estéril mientras que la enzima secuenasa fue diluida 1:8 con TE frío (2 μ l por reacción). La enzima diluida debe ser almacenada en hielo por no mas de 60 min.
- 3) A la mezcla de templado e iniciador se le agregó lo siguiente:

-- Templado-iniciador (inciso 1)	10 μ l
-- Ditiotreititol 0.1 M	1 μ l
-- Mezcla de marcaje diluida	2 μ l
-- ³⁵ S- α -dATP (10 μ Ci/ μ l)	0.5 μ l
-- Secuenasa diluida	<u>2 μl</u>
	15.5 μ l

Se mezcló ligeramente evitando las burbujas y se incubó a temperatura ambiente por 10 min.

Reacciones de terminación.

- 4) Se rotularon 4 tubos de microcentrífuga con las letras G, A, T y C respectivamente. Se colocaron 2.5 μ l de la mezcla de terminación de ddGTP en el tubo rotulado como G. De igual

manera en los tubos rotulados como A, T y C se colocaron 2.5 μ l de la respectiva mezcla de terminación. Se precalentaron los tubos a 37°C por al menos 1 min.

- 5) A partir de la reacción de marcaje se tomaron alícuotas de 3.5 μ l y se transfirieron a cada uno de los tubos G, A, T y C. Se continuó la incubación a 37°C por otros 5 min.
- 6) Se agregaron 4 μ l de solución inactivadora a cada reacción de terminación, se mezcló vigorosamente y se colocaron en hielo hasta realizar la electroforesis. Esta solución es estable a -20°C por una semana.

Preparación del gel de secuenciamiento.

Se utilizaron 2 placas de vidrio de 1/4" de espesor (una de 33x38 cm y otra de 33x40 cm) y separadores laterales de 0.4 mm de espesor. Este material fue adquirido de BRL.

- 7) Se lavaron escrupulosamente las placas con detergente y se enjuagaron con agua desionizada. Se colocaron sobre la mesa de trabajo y posteriormente se limpiaron con etanol. Se agregaron 3 ml de una solución de silicón sobre una de las placas.
- 8) Se colocaron los separadores laterales sobre la placa grande y sobre ellos se colocó la placa pequeña. Se colocó una tira continua de cinta adhesiva alrededor de los lados y el fondo del molde. Se ensamblaron fuertemente ambas placas con pinzas especiales para este propósito.
- 9) Para preparar un gel al 8% se hizo la siguiente mezcla: 76 g de acrilamida, 0.4 g de bisacrilamida, 48 g de urea, 40 ml de agua ultrapura y 10 ml de TBE 10 X. Se calentó ligeramente hasta completa disolución. Se agregaron 500 μ l de persulfato de amonio al 10% y se filtró la solución a través de una membrana con poros de 0.45 μ m.
- 10) Se añadieron 50 μ l de TEMED, se mezcló suavemente la solución y se tomó con una jeringa de 60 ml sin aguja. Se colocó el molde a una posición de 45° apoyándolo sobre una de sus esquinas inferiores y se vació el gel usando el émbolo para controlar el flujo. Se insertó el peine (BRL) utilizando el lado plano del mismo para formar un carril único y ancho. Se dejó polimerizar por 45 min.

Electroforesis y autorradiografía.

- 11) Se eliminó la cinta que estaba alrededor del molde y éste se ensambló en una cámara vertical para electroforesis. Se retiró cuidadosamente el peine y se lavó el carril utilizando una pizeta con agua para eliminar los residuos de urea. Se reinsertó el peine en posición correcta presionando

ligeramente los dientes sobre la superficie del gel para formar los carriles. Se agregó TBE 1 X y se realizó una precorrida a 1200 V por 2 h.

- 12) Cuando el gel estuvo listo, se calentaron las muestras a 75°C por 2 min y se cargaron inmediatamente. Se usaron 2.5 μ l por cada línea y se aplicaron en el orden G, A, T y C de izquierda a derecha.
- 13) Se realizó la electroforesis a 1,500 volts por 4 h al término de las cuales se repitió el inciso anterior y se aplicaron nuevamente las muestras en las líneas adyacentes.
- 14) Después de otras 4 h de electroforesis al mismo voltaje, se desmontó el molde y se colocó horizontalmente sobre la mesa de trabajo. Se insertó una espátula entre las placas de vidrio y se retiró la placa siliconizada. La placa que contiene el gel fue sumergida en la solución de lavado de geles por 30 min y posteriormente se depositó sobre la mesa.
- 15) Se colocó una pieza de papel Whatman 3 MM (30x40 cm) sobre la superficie del gel y se presionó firmemente utilizando una pipeta como rodillo. Se aplicó presión en una de las esquinas del filtro y se fue levantando lentamente con el gel unido. Se secó el gel adherido al papel filtro en un secador de geles con vacío a 80°C por 2 h. Finalmente se colocó en un cartucho para exposición radiactiva conteniendo una película ultrasensible y se permitió la exposición a temperatura ambiente durante toda la noche. Se reveló la autorradiografía y se interpretaron los resultados.

V) RESULTADOS

Extracción de RNA total de hipófisis humanas.

5 g de tejido hipofisiario humano recuperado a partir de autopsias realizadas en el anfiteatro del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" fueron procesados por el método de isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo, tal y como se describe en la sección de materiales y métodos, lográndose obtener 8 mg de RNA total. Estos RNA's se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa-urea-ácido comparando su perfil electroforético con el de un RNA de buena calidad extraído de placenta humana y disponible en nuestro laboratorio (Figura 3). Los resultados de este análisis demostraron la buena calidad e integridad del RNA de nuestro interés.

CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE RNA'S EXTRAIDOS DE TEJIDOS HUMANOS

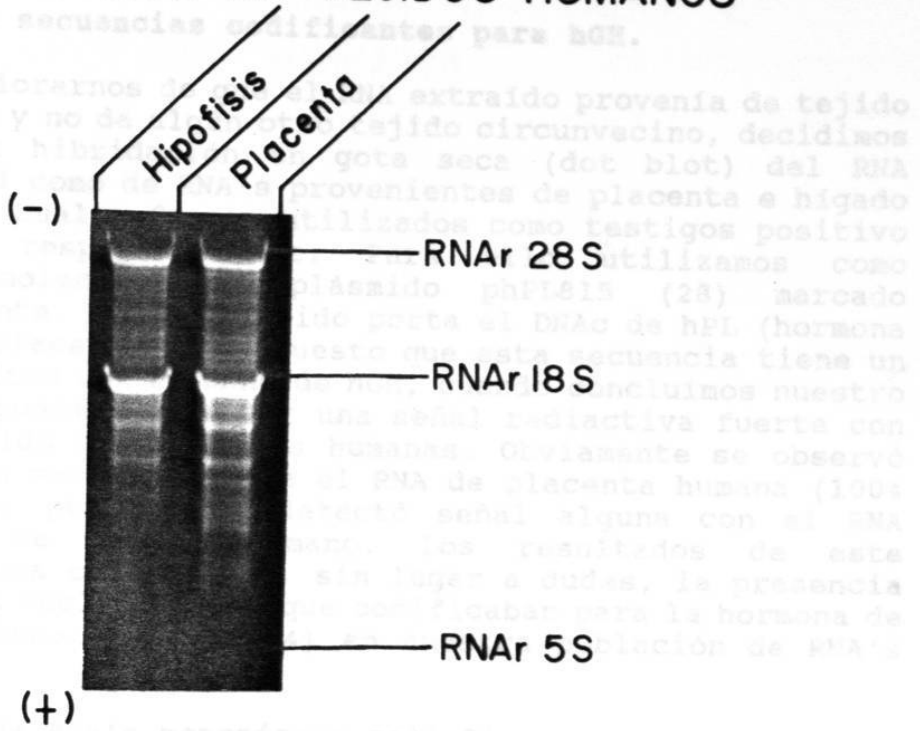


Figura 3.- Electroforesis de RNA's en gel de agarosa - urea-ácido. Se aplicaron a un gel de agarosa al 1.5%, 10 μ g de RNA's totales extraídos de hipófisis y placenta humana. El gel fue teñido con bromuro de etidio y visualizado por iluminación con luz ultravioleta. Se indican las especies de RNA mas abundantes, señaladas de acuerdo a su coeficiente de sedimentación.

El RNA obtenido no mostró signos de degradación ni contaminación con DNA y presentó un índice de pureza de 1.83 (un buen índice de pureza se considera a un valor entre 1.8 y 2).

Detección de secuencias codificantes para hGH.

Para cerciorarnos de que el RNA extraído provenía de tejido hipofisiario y no de algún otro tejido circunvecino, decidimos realizar una hibridación en gota seca (dot blot) del RNA obtenido, así como de RNA's provenientes de placenta e hígado humanos, los cuales fueron utilizados como testigos positivo y negativo respectivamente. Para ello utilizamos como rastreador molecular al plásmido phPL815 (28) marcado radiactivamente. Dicho plásmido porta el DNAC de hPL (hormona lactogénica placentaria) y puesto que esta secuencia tiene un 95% de similitud con el DNAC de hGH, cuando concluimos nuestro experimento pudimos detectar una señal radiactiva fuerte con el RNA extraído de hipófisis humanas. Obviamente se observó una señal aun mas fuerte con el RNA de placenta humana (100% de similitud) pero no se detectó señal alguna con el RNA proveniente de hígado humano. Los resultados de este experimento nos confirmaron, sin lugar a dudas, la presencia de secuencias nucleotídicas que codificaban para la hormona de crecimiento humana (Figura 4) en nuestra población de RNA's totales.

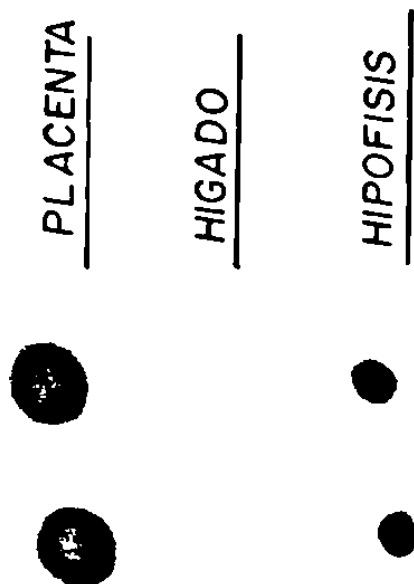
Aislamiento de RNA's mensajeros poli A⁺.

Una vez que se confirmó la presencia de RNAm's específicos para hGH, continuamos con la purificación de los RNAm poli A⁺.

Sobre una columna de celulosa oligo-dT se aplicaron 8 mg de RNA total de hipófisis humanas tal y como se describe en la sección de materiales y métodos. Cuando obtuvimos el RNA poli A⁺ decidimos someterlo a un segundo pasaje a través de dicha columna para lograr una mayor purificación. De esta doble cromatografía logramos recuperar 90 µg de RNAm poli A⁺, lo que corresponde al 1.1% de la cantidad original del RNA total.

El RNAm obtenido fue visualizado por electroforesis en un gel de agarosa-urea-ácido y su perfil electroforético fue analizado al correr en el mismo gel, una alícuota del RNA total tomada previamente al proceso cromatográfico (Figura 5). De esta comparación dedujimos que nuestra fracción poli A⁺ era excelente ya que se pudo apreciar una notable disminución de los RNA ribosomales 28 S y 18 S y una notable desaparición del RNA 5 S. No se observaron signos de degradación y se obtuvo un índice de pureza de 1.81 .

HIBRIDIZACION EN GOTA SECA DE phPL815 (^{32}P)
 CONTRA RNA's DE PLACENTA, HIGADO E
 HIPOFISIS HUMANA



RNA por mancha = 10 μg

Exposición = 72 horas

Figura 4.- Autorradiograma de una hibridización tipo Northern para detectar secuencias de RNAm de hGH o RNA's homólogos a éste. Se aplicaron por duplicado (columnas) 10 μg de RNA total de cada una de las muestras indicadas sobre un papel filtro de nitrocelulosa. Se utilizó RNA de placenta como testigo positivo y RNA de hígado como testigo negativo.

ANALISIS ELECTROFORETICO DE RNA'S DE HIPOFISIS HUMANAS

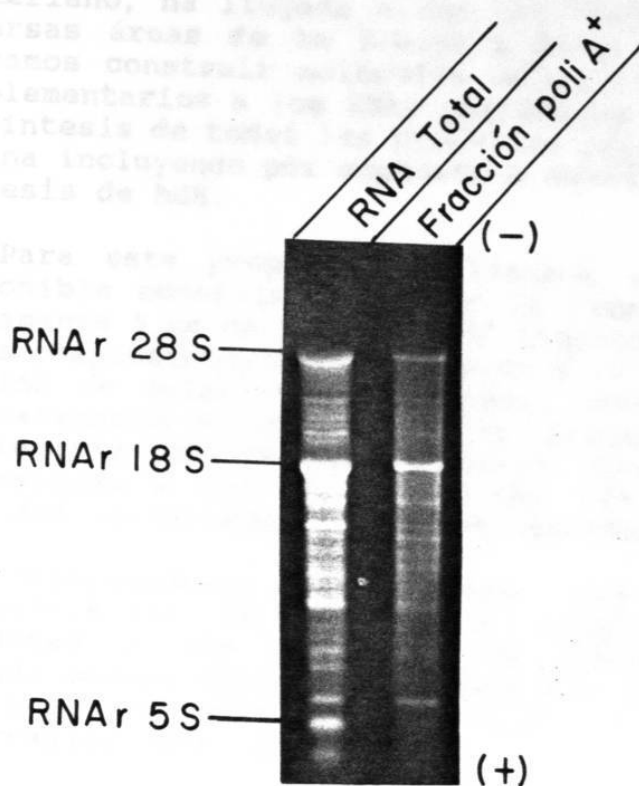


Figura 5.- Perfil electroforético del RNA total aislado de hipófisis humanas y de su fracción RNA poli A⁺. El RNA total se obtuvo por el método de isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo mientras que la fracción poli A⁺ se derivó de éste por cromatografía de afinidad en columna de celulosa oligo-dT. El gel utilizado fue de agarosa-urea-ácido al 1.5%. Después de la electroforesis los RNA's se visualizaron por tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz ultravioleta.

Síntesis de los DNA's complementarios.

La conversión enzimática del RNAm poli A⁺ a DNAc de doble cadena y la posterior inserción de este DNA en un plásmido bacteriano, ha llegado a ser una herramienta fundamental en diversas áreas de la Biología Molecular. En nuestro caso, logramos construir moléculas de ácidos desoxirribonucleicos complementarios a los RNAm portadores de la información para la síntesis de todas las proteínas producidas en la hipófisis humana incluyendo por supuesto a aquella que codifica para la síntesis de hGH.

Para este propósito utilizamos un conjunto enzimático disponible comercialmente por la compañía BRL. A partir de únicamente 5 µg de RNAm poli A⁺ logramos sintetizar 3.2 µg de DNA's complementarios. De acuerdo a la fórmula enunciada en la sección de materiales y métodos, obtuvimos 2.1 µg de DNAc monocatenario mientras que la producción total de DNA's complementarios de doble cadena fue de 3.2 µg, lo que corresponde a una eficiencia del 64% tomando en cuenta la cantidad inicialmente utilizada de RNAm poli A⁺.

Posteriormente continuamos con la caracterización electroforética de los DNA's complementarios obtenidos. Alícuotas de las reacciones de síntesis de la primera y segunda cadena fueron analizadas por electroforesis en un gel alcalino de agarosa al 1.4% y posteriormente por autorradiografía (Figura 6).

Los resultados de este análisis indicaron que los RNAm mas abundantes en la hipófisis humana presentan un rango de tamaño entre 500 y 1700 pb, con una mayor acentuación en la región de 700 a 1200 pb. Lo anterior se dedujo de la fuerte señal radiactiva emitida en la región del gel correspondiente a DNA's complementarios con tales longitudes según los marcadores de peso molecular usados como referencia.

Una nueva estrategia de clonación.

Como se explicó en la sección de materiales y métodos, diseñamos una innovadora estrategia para favorecer, en forma casi exclusiva, la inserción del DNAc de hGH en un vector de clonación.

Una vez que obtuvimos los DNA's complementarios, éstos fueron sometidos a la acción de las enzimas de restricción Aat II y Xma I y los fragmentos derivados de esta doble digestión fueron clonados en el plásmido pUC 19, el cual había sido digerido previamente también con las mismas enzimas de restricción y purificado por electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Figura 7). Durante este procedimiento verificamos que la digestión del DNAc de hGH

ANALISIS DE LOS DNAs COMPLEMENTARIOS DE HIPOFISIS HUMANAS

PREPARACION DE PLASMIDOS pUC 19 PARA
LA CLONACION DEL DNAs DE hGH

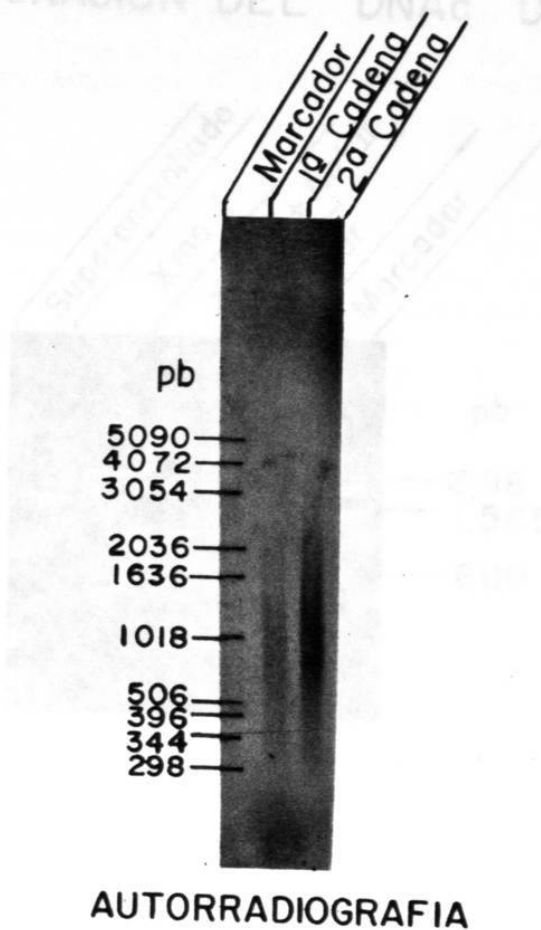


Figura 6.- Caracterización electroforética de los DNAs complementarios de hipófisis humanas. Alícuotas de las reacciones de síntesis de la primera y segunda cadena de los DNAs complementarios fueron analizadas en un gel alcalino de agarosa al 1.4% y posterior autorradiografía. El radioisótopo utilizado corresponde a ^{35}S -dATP y tanto el gel como su autorradiografía se efectuaron de acuerdo a Maniatis y cols. Se utilizó 1 Kb Ladder como marcador de peso molecular.

(820 pb) con las enzimas *Xma* I y *Aat* II, obteniéndose un fragmento de 640 pb, el cual codifica el sitio de unión para el receptor de la hormona de crecimiento humano (hGH).

PREPARACION DEL PLASMIDO pUC 19 PARA LA CLONACION DEL DNAC DE hGH

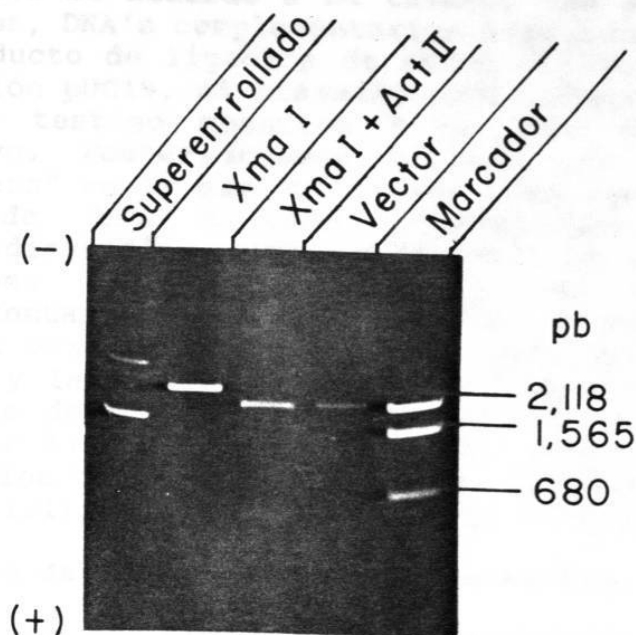


Figura 7.- Obtención del vector para la clonación del DNAC de hGH. El plásmido pUC19 fue linearizado con la enzima *Xma* I y posteriormente fue sometido a digestión con la enzima *Aat* II obteniéndose dos fragmentos (2205 y 481 pb). El fragmento mayor, el cual se utilizó como vector para la clonación del DNAC de hGH, fue purificado a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Se utilizó DNA de pBR322 cortado con *Rsa* I como marcador de peso molecular. El gel fue de agarosa al 1% y las bandas de DNA se visualizaron por tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz ultravioleta.

(820 pb) con las enzimas Aat II y Xma I produjera un fragmento de 640 pb, el cual codifica para la hGH madura, así como también corroboramos la integración de este fragmento en el vector de clonación.

Lo anterior se llevó a cabo al transferir a un papel filtro de nitrocelulosa, el DNA de un gel que contenía resueltos de acuerdo a su tamaño, los DNA's complementarios intactos, DNA's complementarios digeridos con Aat II y Xma I, el producto de ligación de estos últimos con el vehículo de clonación pUC19, el plásmido pUC19 digerido con Aat II y Xma I como testigo negativo y el DNAC de hPL como testigo positivo. Posteriormente hicimos una hibridización tipo "Southern" en la que utilizamos como rastreador molecular al DNAC de hPL marcado radiactivamente. Por análisis autorradiográfico logramos detectar la presencia del DNAC de hGH como una banda de 820 pb en la mezcla de DNA's complementarios intactos, así como la digestión de este DNAC con las enzimas Aat II y Xma I para generar un fragmento de 640 pb y la inserción de esta última secuencia génica en el vehículo de clonación (Figura 8). Lo anterior se dedujo al observar la posición de la señal radiactiva emitida en cada uno de los tres casos. Con estos resultados pudimos demostrar la factibilidad y versatilidad de nuestra estrategia.

Tamizaje de los plásmidos recombinantes.

Una vez que los DNA's complementarios fueron integrados en el vehículo de clonación, las moléculas recombinantes así obtenidas fueron introducidas en bacterias Escherichia coli cepa RR1, a las cuales se les había inducido previamente la capacidad de incorporar DNA foráneo por tratamiento con cloruro de calcio en frío. Las bacterias transformadas fueron propagadas en medio de cultivo suplementado con ampicilina, con lo cual se permitiría únicamente el crecimiento de aquellas bacterias que hubiesen adquirido plásmidos recombinantes.

Al final de dicho procedimiento obtuvimos 18 clones bacterianas provenientes de la ligación de los DNA's complementarios con el plásmido pUC19 y no se detectó colonia alguna en la ligación del vector solo sin insertos. Lo anterior nos indicó que aquellas clones deberían de poseer plásmidos recombinantes. Posteriormente se colectó cada una de esas clones y se sometieron a un protocolo de extracción de plásmidos por el método de lisis alcalina. Cada uno de los plásmidos recombinantes fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 2% para inferir, en base al perfil electroforético, el tamaño del inserto que contenían. De las 18 clones, 4 de ellas (clones 3,7,9 y 10) portaban plásmidos que coincidían con el perfil electroforético esperado (Figura 9). Lo anterior se dedujo por el hecho de que en el análisis

CLONACION MOLECULAR DEL DNAC DE hGH EN PLASMIDO pUC 19

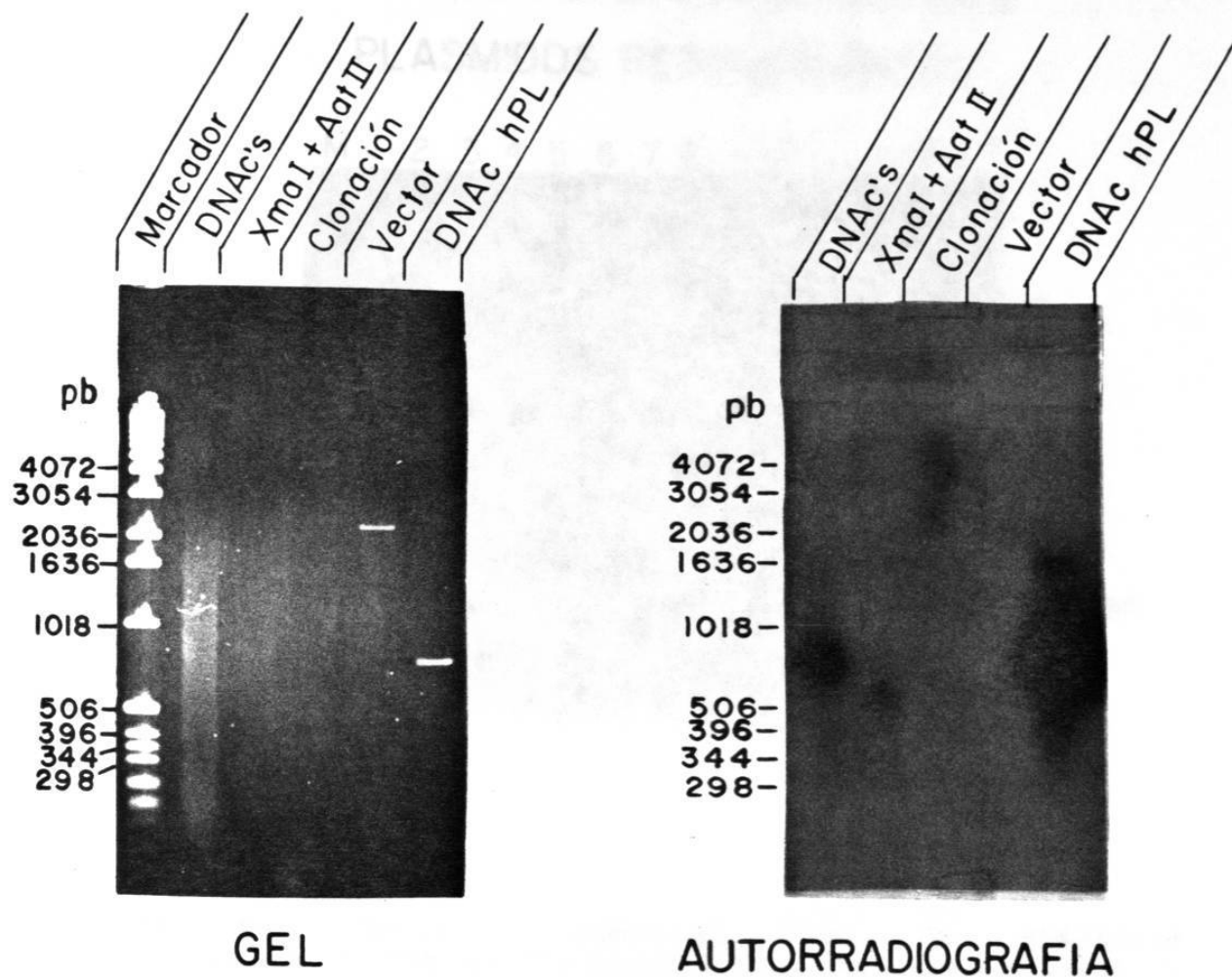


Figura 8.- Análisis tipo Southern para detectar la clonación molecular del DNAC de hGH en el plásmido pUC19. A la izquierda se observa un gel de agarosa al 1.4% que contiene en el orden acostumbrado: 1 Kb Ladder como marcador de peso molecular; DNAs complementarios intactos; DNAs complementarios digeridos con Aat II y Xma I; ligación de estos últimos con el plásmido pUC19; pUC19 linearizado y DNAC de hPL. A la derecha se aprecia la autorradiografía después de hibridar estos DNAs contra el DNAC de hPL.

electroforético se corrió también el plásmido pUC19 superenrollado, de tal manera que todos aquellos plásmidos que migraran por arriba de este DNA, deberían de tener insertos de mayor longitud que el DNAC de hGH.

PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS PLASMIDOS RECOMBINANTES

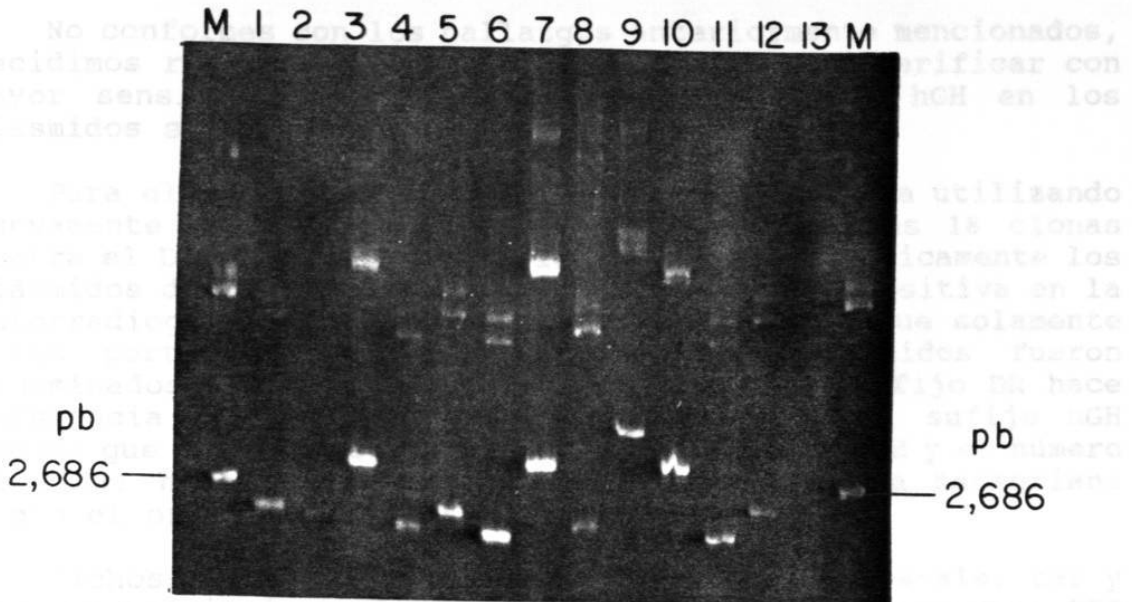


Figura 9.- Análisis electroforético de plásmidos recombinantes. La fotografía muestra el perfil electroforético de trece de los plásmidos recombinantes obtenidos al transformar bacterias *E. coli* RR1. Su movilidad se compara contra aquella del vector plasmídico pUC19 (carriles M). Los carriles 3, 7, 9 y 10 corresponden a los recombinantes con insertos de mayor longitud, lo cual los hizo sospechosos de portar el DNAC de hGH. El gel fue de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y fotografiado bajo luz ultravioleta.

electroforético se corrió también el plásmido pUC19 superenrollado, de tal manera que todos aquellos plásmidos que migraran por arriba de este DNA, deberían de tener insertos grandes y serían sospechosos de portar el DNAC de hGH.

pDRhGH3, pDRhGH7 y pDRhGH10: plásmidos portadores del DNAC de hGH.

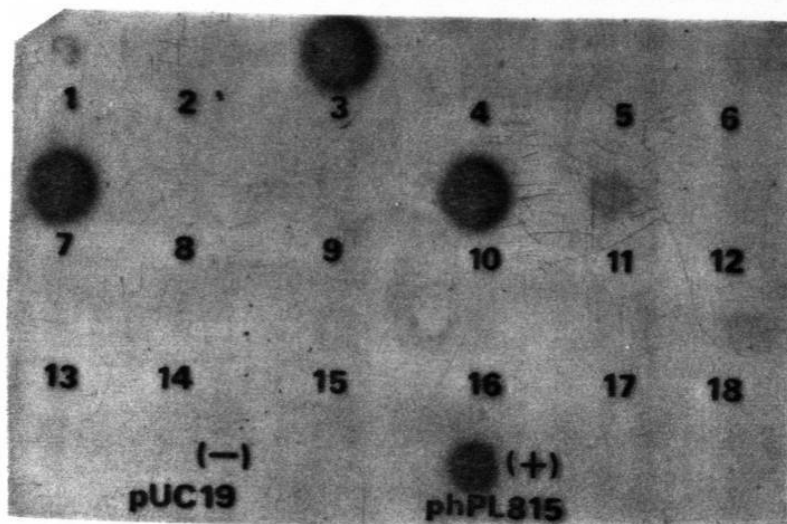
No conformes con los hallazgos anteriormente mencionados, decidimos realizar un segundo experimento para verificar con mayor sensibilidad, la presencia del DNAC de hGH en los plásmidos sospechosos.

Para ello hicimos una hibridación en gota seca utilizando nuevamente el DNA plasmídico de cada una de las 18 clonas contra el DNAC de hPL marcado radiactivamente. Unicamente los plásmidos de las clonas 3, 7 y 10 dieron señal positiva en la autorradiografía (Figura 10) lo que nos indicó que solamente ellos portaban el DNAC de hGH. Estos plásmidos fueron denominados pDRhGH3, pDRhGH7 y pDRhGH10; el prefijo DR hace referencia al nombre y apellido del autor, el sufijo hGH indica que portan secuencias codificantes para hGH y el número al final hace referencia al número de la clona bacteriana según el orden en el cual fue cosechada.

Dichos plásmidos fueron crecidos a mediana escala, tal y como se mencionó en el respectivo protocolo, obteniéndose 259 μg de pDRhGH3, 192 μg de pDRhGH7 y 226 μg de pDRhGH10 con índice de pureza superior a 1.8 y una buena apariencia de su perfil electroforético (datos no mostrados).

Una vez que se obtuvo suficiente cantidad de cada uno de los plásmidos mencionados, posteriormente fueron caracterizados con enzimas de restricción diagnósticas para verificar la certeza de su identidad. Después de haber digerido con las enzimas Pvu II, Ava II y Rsa I y posterior electroforesis en un gel de agarosa al 2%, encontramos que los productos de esas digestiones coincidían con el patrón de restricción esperado, previamente mencionado en la sección de materiales y métodos. En dichas digestiones, Pvu II generó 3 fragmentos de 2113, 497 y 227 pb; Ava II, 3 fragmentos de 1638, 963 y 222 pb y de la digestión con Rsa I se liberaron 2 fragmentos de 2018 y 812 pb. Estos resultados nos indicaron sin lugar a dudas, que efectivamente habíamos logrado la clonación molecular del DNAC de hGH (Figura 11).

DETECCION DE LOS PLASMIDOS PORTADORES DEL DNAC DE hGH

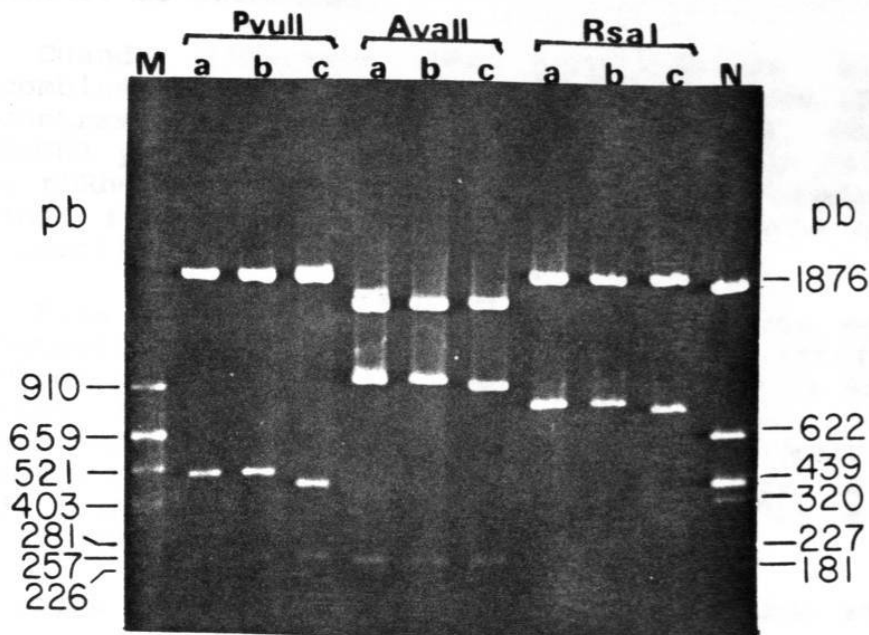


Sonda = DNAC hPL

Exposición = 12 h / -70 °C

Figura 10.- Autorradiograma del tamizaje de DNA plasmídico en gota seca. Se muestra la señal obtenida al hibridar el DNA (100 ng) de los 18 plásmidos recombinantes contra el DNAC de hPL marcado radiactivamente. Las posiciones 3, 7 y 10 corresponden a plásmidos portadores del DNAC de hGH. Se utilizaron 10 ng de phPL815 y pUC19 como testigos positivo y negativo respectivamente.

ANALISIS DE RESTRICCION DE LOS PLASMIDOS PORTADORES DEL DNAC DE hGH



a = pDRhGH3
 b = pDRhGH7
 c = pDRhGH10

Figura 11.- Digestiones analíticas de los plásmidos portadores del DNAC de hGH. Se muestra el análisis electroforético de los fragmentos obtenidos al digerir los plásmidos pDRhGH3 (a), pDRhGH7 (b) y pDRhGH10 (c) con las enzimas de restricción Pvu II, Ava II y Rsa I. Los patrones de restricción obtenidos demostraron que los tres plásmidos portan el DNAC de hGH. Los marcadores corresponden a pBR322 digerido con Alu I (M) y pBR322 digerido con Hae II (N). El gel fue de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y visualizado por iluminación con luz ultravioleta.

Los insertos de DNAC en los plásmidos.

A pesar de que todo indicaba que poseíamos ya el DNAC de nuestro interés, decidimos recuperar dicha secuencia génica de cada uno de los plásmidos recombinantes mediante una digestión con Aat II y Xma I. Esto nos permitiría realizar una disección enzimática mas fina exclusivamente sobre el DNAC de hGH evitando así la presencia de fragmentos provenientes del vehículo de clonación.

Cuando liberamos los insertos de los plásmidos recombinantes con las enzimas de restricción Aat II y Xma I encontramos un resultado muy interesante. Observamos que pDRhGH3 y pDRhGH7 liberaron un fragmento de 640 pb mientras que pDRhGH10 liberó un fragmento de aproximadamente 595 pb cuando fueron analizados por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 4%.

Para evitar la posibilidad de que este comportamiento electroforético hubiese sido debido a algún artefacto del gel, hicimos una mezcla de los tres plásmidos y la sometimos a la acción de dichas enzimas de restricción, ante lo cual observamos nuevamente la liberación de dos insertos diferentes (Figura 12). Lo anterior nos hizo suponer que los dos primeros codificaban para la hGH de 22 Kd mientras que el último codificaba para la variante hGH de 20 Kd.

Se logra también la clonación del DNAC de hGH 20 Kd.

A partir del gen de la hormona de crecimiento humana se producen dos diferentes RNA mensajeros como consecuencia de un "splicing" diferencial (51). El primero de ellos se traduce en la bien estudiada hGH de 22 Kd, mientras que el otro acarrea una deleción interna de 45 pb generando así su traducción una proteína de 20 Kd. Dicha proteína corresponde al 10% de la hGH hipofisiaria y presenta la misma secuencia aminoacídica que la hGH de 22 Kd excepto por una deleción de 15 aminoácidos localizados entre los residuos 32 al 46 (52).

Para verificar nuestra suposición decidimos primeramente recuperar los insertos de 640 y 595 pb por electroelución en geles de poliacrilamida. Posteriormente ambos insertos fueron digeridos con una batería de enzimas de restricción integrada por Rsa I, Ava II, Hinf I y Pst I. En la digestión con las primeras tres enzimas observamos la liberación de dos fragmentos génicos, uno de los cuales siempre permanecía constante al digerir ambos insertos con la misma enzima, mientras que el otro presentaba un menor tamaño en el inserto de 595 pb (Figura 13).

PERFIL ELECTROFORETICO DE LOS DNAC DE hGH

ANALISIS DE RESTRICCIÓN DE LOS
DNAC DE hGH 20 Y 30

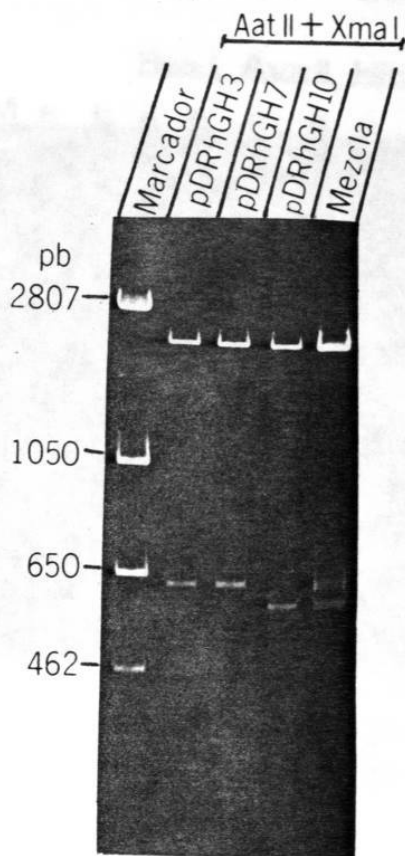
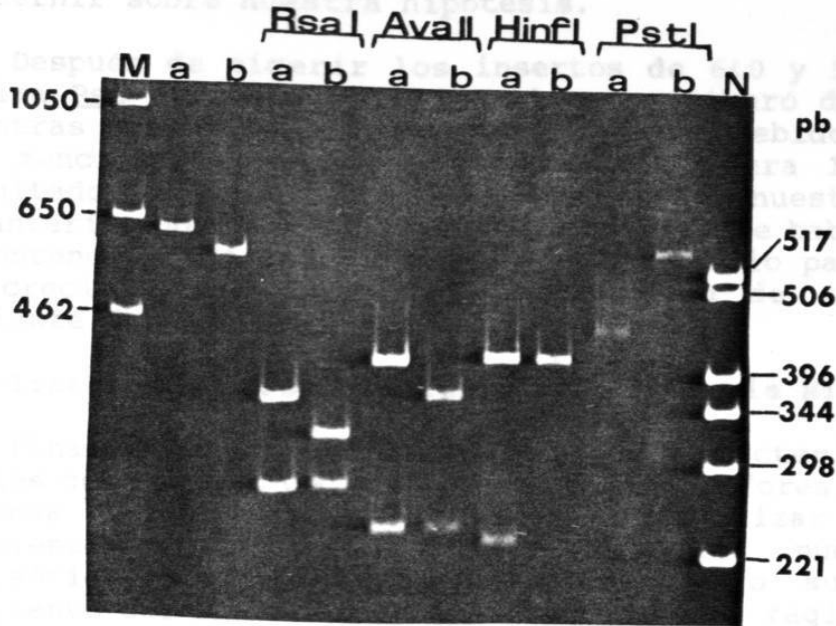


Figura 12.- Comportamiento electroforético del DNAC de hGH inserto en los plásmidos recombinantes. Los plásmidos pDRhGH3, pDRhGH7, pDRhGH10 y una mezcla de todos ellos fueron digeridos con las enzimas de restricción Aat II y Xma I para analizar la migración de los fragmentos liberados. pDRhGH3 y pDRhGH7 liberaron un inserto de 640 pb mientras que pDRhGH10 liberó un inserto de aproximadamente 595 pb. El gel fue de poliacrilamida al 4%, teñido con bromuro de etidio (2 μ g/ml) y fotografiado bajo luz ultravioleta.

Quando revisamos la secuencia del DNAc de hGH 20 Kd con la ayuda de una computadora y programas computacionales especiales para Biología Molecular, encontramos que esta carecía del sitio Rsa I presente en el DNAc de hGH 22 Kd (Figura 13). Este hallazgo nos sugiere la hipótesis de una delección en el DNAc de hGH 20 Kd que carece los primeros 45 nucleótidos. Por lo anterior es claro que dicha enzima de restricción sería la clave para discernir sobre nuestra hipótesis.



a: DNAc hGH 22K

b: DNAc hGH 20K

Figura 13.- Digestiones analíticas de los DNAs complementarios que codifican para las hormonas de crecimiento humana de 20 y 22 Kd. Los DNAs complementarios para la hGH 22 Kd (a) y hGH 20 Kd (b) fueron digeridos con Rsa I, Ava II, Hinf I y Pst I. Esta última enzima cortó el inserto de 640 pb (DNAc hGH 22 Kd) en dos fragmentos mientras que aquel de 595 pb (DNAc hGH 20 Kd) permaneció intacto. El gel fue de poliacrilamida al 6%, teñido con bromuro de etidio (2 μ g/ml) y visualizado al ser iluminado con luz ultravioleta.

Cuando revisamos la secuencia del DNAC de hGH 20 Kd con la ayuda de una computadora y programas computacionales especiales para Biología Molecular, encontramos que ésta carecía del sitio Pst I presente en el DNAC de hGH 22 Kd (Figura 14). Tal sitio está ausente como consecuencia de una delección en el RNAm de la hGH 20 Kd que comprende los primeros 45 nucleótidos del tercer exón del gen hGH. Por lo anterior es claro que dicha enzima de restricción sería la clave para discernir sobre nuestra hipótesis.

Después de digerir los insertos de 640 y 595 pb con la enzima Pst I, el primero de ellos nos liberó dos fragmentos mientras que el último permaneció intacto debido a que carece del mencionado sitio de restricción (Figura 13). Con este resultado pudimos respaldar la veracidad de nuestra hipótesis. Lo anterior nos demostró con toda certeza que habíamos logrado la obtención, no solo del DNA complementario para la hormona de crecimiento de 22 Kd, sino también de aquel para la variante de hGH de 20 Kd.

Subclonación en vectores fágicos de la serie M13.

Finalmente no conformes con las caracterizaciones por cortes con enzimas de restricción y electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida, decidimos realizar experimentos tendientes a determinar la secuencia, nucleótido por nucleótido, del DNAC de hGH. Para ello subclonamos un fragmento del DNAC de hGH 22 Kd en vectores fágico especiales para la determinación de secuencias nucleotídicas por el método enzimático de Sanger.

A partir del plásmido pDRhGH3 se escindió el DNAC de hGH de 22 Kd mediante una doble digestión con Aat II y Sma I (isosquizómero de Xma I). El fragmento liberado (640 pb) fue recuperado por electroelución de acuerdo al protocolo descrito en la sección de materiales y métodos. Posteriormente fue sometido a una segunda digestión con Pst I para generar un fragmento de 447 pb, el cual fue recuperado también por electroelución.

Este último fragmento, que comprende el 70% de nuestra secuencia génica, fue integrado en el vector M13mp18 como requisito indispensable para el secuenciamiento nucleotídico. En esta etapa digerimos también el vector con las enzimas Pst I y Sma I, las cuales reconocen secuencias localizadas en la región de sitios múltiples de clonación ("polylinker"); sin embargo dicho vector no fué purificado, es decir, permaneció premeditadamente en la mezcla de digestión junto con un pequeño fragmento de 25 pb localizado sobre el "polylinker" y liberado también durante la doble acción enzimática. Esta mezcla de ambos fragmentos del fago M13mp18 fue utilizada en la reacción de ligación con el inserto del DNAC de hGH.

COMPARACION DE MAPAS DE RESTRICCION DE LOS DNAC DE hGH

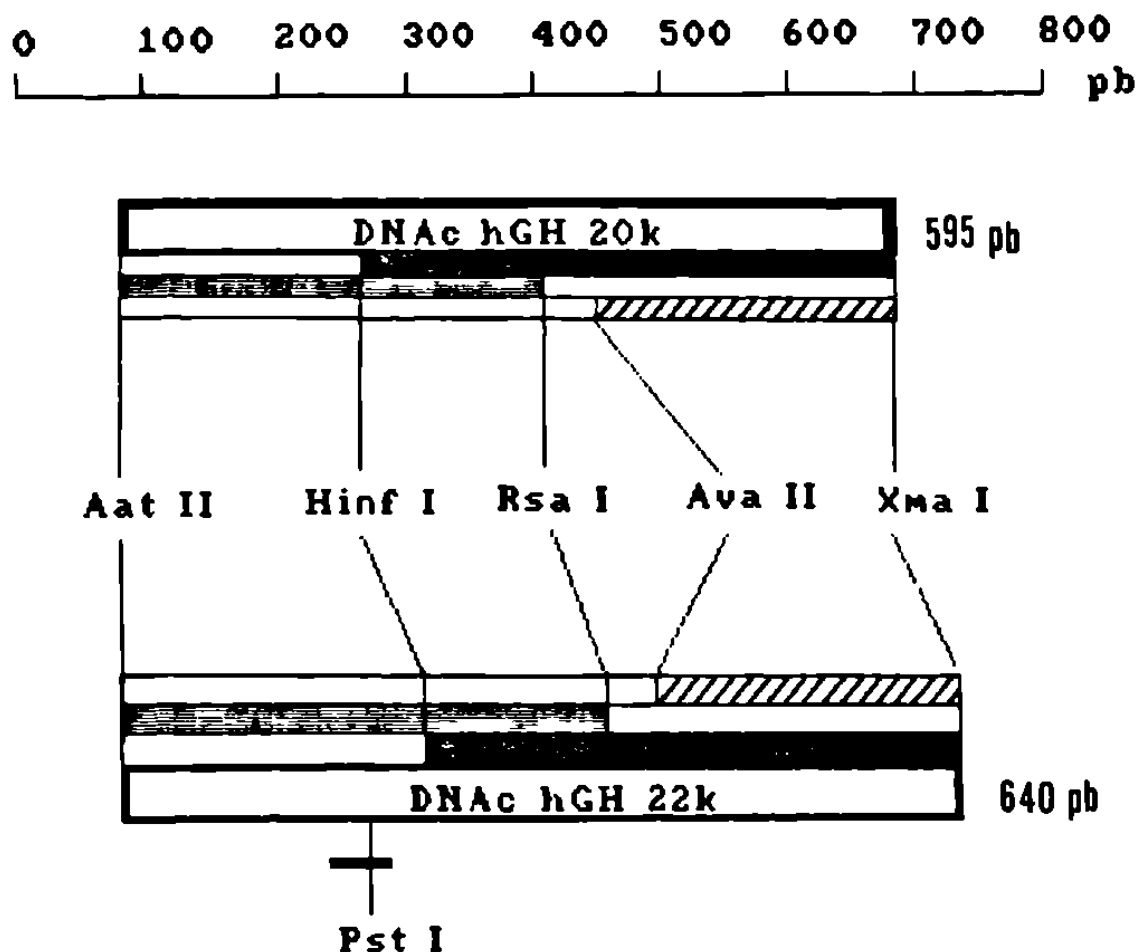


Figura 14.- Análisis de restricción computacional de los DNAC's de hGH 20 y 22 Kd. Se ilustran las regiones génicas desde Aat II hasta Xma I que corresponden a 595 pb para el DNAC de hGH 20 Kd y 640 pb para el DNAC de hGH 22 Kd. Las enzimas Hinf I, Rsa I y Ava II cortan esas regiones en dos fragmentos, uno de los cuales siempre permanece constante en ambos DNAC's mientras que el otro difiere en longitud como consecuencia de una delección de 45 pb en el DNAC de hGH 20 Kd. La región deletada se muestra como una barra gruesa por debajo del DNAC de hGH 22 Kd e incluye un sitio único para la enzima de restricción Pst I.

Para ello se hicieron las siguientes mezclas de reacción: vector e inserto sin ligasa, vector e inserto con ligasa y vector sin inserto con ligasa. Al término de la incubación, tomamos una alícuota de cada mezcla y verificamos los productos de ligación por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Figura 15). En nuestro testigo sin ligasa no encontramos ligación detectable, en cambio en las reacciones de vector e inserto con ligasa y vector solo con ligasa si pudimos detectar productos de ligación. La reacción de vector solo con ligasa fue utilizada para demostrar la calidad del vector al determinar que fuera capaz de reensamblarse con el pequeño fragmento de 25 pb presente en dicha reacción.

Posteriormente tomamos alícuotas de ambos productos de ligación y las introdujimos en bacterias competentes Escherichia coli cepa JM103 en presencia de IPTG y X-Gal. Al terminar la transformación con los productos del vector solo en presencia de ligasa, logramos detectar únicamente placas azules sobre el césped de bacterias no competentes, mientras que con la mezcla de vector e inserto con ligasa logramos detectar una combinación de placas blancas y azules (datos no mostrados) lo que nos indicó la presencia de fagos recombinantes portadores de un inserto proveniente del DNAC de hGH.

Determinación de la secuencia nucleotídica y su análisis computacional.

Para establecer inequívocamente la identidad de nuestro DNAC de hGH, decidimos someterlo al secuenciamiento nucleotídico por el método de Sanger.

Para ello subclonamos un fragmento de 447 pb, que incluye el 70% del DNAC de hGH, en el vector M13mp18. A partir de las placas blancas de crecimiento lento obtenidas después de la transformación, preparamos el templado de DNA de cadena sencilla tal y como se mencionó en la sección metodológica correspondiente. Por análisis electroforético verificamos la buena calidad de nuestra preparación (datos no mostrados). Posteriormente dicho templado fue utilizado para realizar una serie de reacciones que incluían básicamente a la enzima secuenasa, a los cuatro ddNTP's y a sus correspondientes análogos dideoxirribonucleotídicos. Al término de las reacciones se tomaron alícuotas de cada una de ellas y se sometieron a electroforesis desnaturalizante en un gel de urea y poliacrilamida al 8%. Al obtener la autorradiografía del gel utilizado pudimos apreciar la excelente nitidez de nuestra separación electroforética (Figura 16).

AUTORRADIOGRAFIAS DEL GEL UTILIZADO PARA DETERMINAR
 SUBCLONACION DE UN FRAGMENTO DEL DNAC
 DE hGH EN EL FAGO M13 mp 18

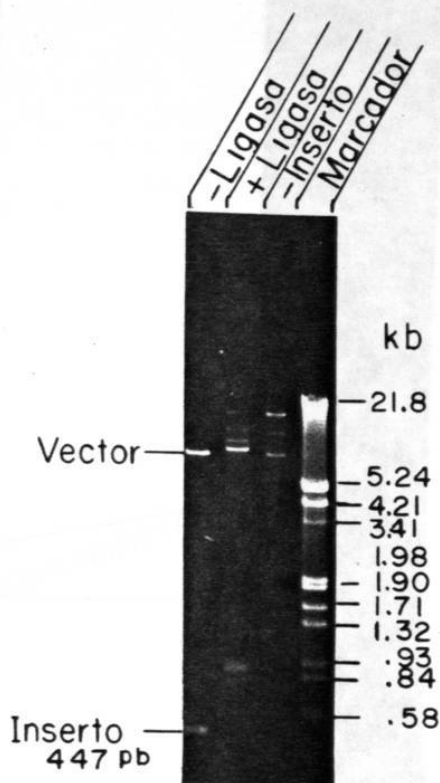


Figura 15.- Subclonación del DNac en vectores fágicos de la serie M13. El fragmento de 447 pb recuperado del DNac de hGH fue subclonado en el vector M13mp18. Se utilizó una reacción de vector sin ligasa como testigo negativo y una reacción de vector sin inserto en presencia de ligasa como testigo positivo. El marcador fue fago lambda digerido con Eco RI y Hind III.

AUTORRADIOGRAFIAS DEL GEL UTILIZADO PARA DETERMINAR LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL DNAC DE hGH

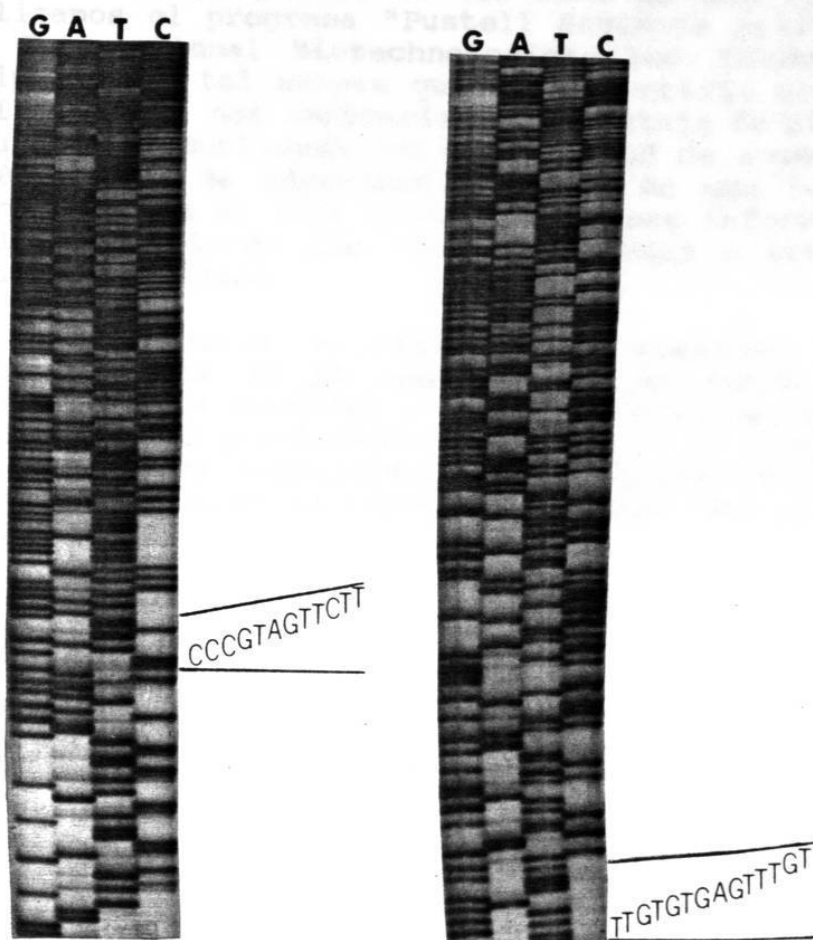


Figura 16.- Determinación de la secuencia nucleotídica del DNAC de hGH. Se muestran porciones autorradiográficas del gel de secuenciamiento en el que se aplicaron reacciones dideoxinucleotídicas del DNA de cadena sencilla proveniente del inserto de pDRhGH3. Se utilizó un gel de urea-poliacrilamida al 8%, secuenasa como enzima polimerizante y ^{35}S -dATP como trazador radiactivo.

Finalmente lo que hicimos fue leer la autorradiografía registrando, de abajo hacia arriba, cada señal radiactiva según el carril al que pertenecía (G, A, T o C). Con la información así recabada alimentamos una computadora para determinar la integridad de nuestros resultados de acuerdo a la secuencia ya publicada del DNAC de hGH (18). Para ello utilizamos el programa "Pustell Sequence Analysis" diseñado por International Biotechnologies, Inc..Dicho programa fue manipulado de tal manera que al alimentarlo con la secuencia aquí obtenida, nos indicaría el porcentaje de similitud con la secuencia ya publicada del DNAC de hGH de acuerdo a un rango de 80 a 100% de identidad. En caso de que la secuencia no correspondiera al 100% de similitud, nos informaría acerca de la localización de las regiones mutadas o artefactos en la secuencia problema.

Se procesaron 8 regiones de nuestra secuencia, de aproximadamente 50 pb cada una, y en todos los casos la computadora nos confirmó un 100% de similitud con la secuencia del DNAC de hGH previamente reportada en la literatura (Figura 17). Con estos resultados pudimos demostrar de una manera clara y conclusiva la identidad e integridad plena de nuestro DNAC de hGH.

P U S T E L L S E Q U E N C E A N A L Y S I S P R O G R A M S
International Biotechnologies, Inc.

SUBSEQUENCE HOMOLOGY SEARCH PROGRAM Version 4.0

HOMOLOGIES OF CDNAHGHN

with the subsequence: PDRHGH3

CTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCCT

A,G,C,T=known bases; () enclose alternate bases
P=purine; Q=pyrimidine; N=any base
X under a base that is required to be a match

All matches have 80% homology or greater.

MATCH	BASE	SEQUENCE
-------	------	----------

100%	623	CTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCCT
------	-----	---

Figura 17.- Análisis computacional de la secuencia nucleotídica del DNAC de hGH. Se muestra un ejemplo representativo de los datos obtenidos durante la determinación de la estructura primaria del DNAC de hGH. Se alimentó el programa Pustell con una secuencia de 47 pb (línea continua) proveniente del inserto de pDRhGH3 y se investigó la homología con el DNAC de hGH previamente publicado (caja rectangular). Los resultados indicaron un 100% de homología a partir de la posición número 623.

VI) DISCUSION.

En el presente trabajo se ha descrito una serie de experimentos diseñados para obtener la información genética que en humanos es responsable de dirigir la síntesis de hGH.

Para lograr nuestra meta comenzamos primeramente con la recuperación del RNA total a partir de tejido hipofisiario humano. La calidad del RNA extraído fue aceptable ya que se obtuvo un índice de pureza de 1.83. Además cuando analizamos su perfil electroforético observamos que la fluorescencia de las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28 y 18 S, correspondía a una intensidad de 2:1, respectivamente. Esta observación está basada en los comentarios que acerca de la integridad de las moléculas de RNA se dieron en la sección de materiales y métodos.

En la purificación de la fracción poli A* a partir de los RNA's totales, pudimos percibir una notable disminución de los RNA ribosomales además de que obtuvimos valores óptimos de rendimiento si los comparamos con aquellos reportados en la literatura (53).

Aunque se ha descrito un gran número de diferentes metodologías para la síntesis de DNA's complementarios (33,53,54), nosotros hemos utilizado aquella que involucra la síntesis de la primera cadena con transcriptasa inversa, seguido de la eliminación del templado de RNAm con RNasa H y la síntesis de la segunda cadena con DNA polimerasa I de Escherichia coli. Con este equipo enzimático pudimos obtener una eficiencia de síntesis del 64%, valor superior a los que generalmente se obtienen con otras metodologías (55).

La inspección computarizada de la secuencia previamente publicada del DNAC de hGH, nos permitió identificar dos sitios únicos de restricción que flanquean la región génica que codifica para la hGH madura. Hacia el extremo 5' del DNAC de hGH identificamos un sitio Aat II localizado en el codón -20 del péptido señalador (extensión aminoterminal de 26 aminoácidos), mientras que en el extremo opuesto detectamos un sitio Xma I localizado 4 nucleótidos después del codón de terminación. De acuerdo con estos hallazgos postulamos como hipótesis que la ligación de los DNA's complementarios de origen hipofisiario digeridos con Aat II y Xma I, con el fragmento mayor del plásmido pUC19, similarmente cortado, nos permitiría obtener fácilmente los plásmidos recombinantes portadores del DNAC de hGH. Lo anterior fue apoyado por el hecho de que Aat II y Xma I reconocen secuencias nucleotídicas que no son muy repetitivas en el genoma humano, de manera que solo una mínima fracción de los DNA's complementarios serían afectados por dichas enzimas de restricción, incluyendo por supuesto al DNAC de hGH.

Cuando analizamos el perfil electroforético de los DNA's complementarios intactos y aquellos que fueron digeridos con Aat II y Xma I, no pudimos detectar el DNAC de hGH como bandas de 820 y 640 pb, respectivamente. Lo anterior era de cualquier manera poco probable debido a la heterogeneidad de las moléculas de DNA's complementarios, por lo que únicamente pudimos apreciar un barrido de material génico en los carriles donde fueron aplicadas dichas muestras. Para solventar esta limitación, diseñamos un experimento de hibridación tipo Southern por medio del cual pudimos comprobar que la digestión del DNAC de hGH (820 pb) con Aat II y Xma I liberó un fragmento de 640 pb, el cual codifica para la hGH madura, así como también corroboramos la integración de dicho fragmento en el plásmido pUC19. Con los resultados de este experimento pudimos demostrar el éxito de nuestra estrategia de clonación preferencial.

Un resultado todavía más impactante y de "bona fide" fue que nuestra estrategia de clonación preferencial nos permitió obtener no solamente el DNA complementario para la hormona de crecimiento de 22 Kd, sino también el de aquel que codifica para la variante de 20 Kd.

Recientemente en nuestro laboratorio, Amaya Manzanares obtuvo el DNAC de la hormona de crecimiento bovina (bGH) mediante la elaboración de un banco de DNA's complementarios (56). En este trabajo solamente se pudo detectar un plásmido portador del DNAC de bGH de entre 2,000 clonas recombinantes. Por otra parte, en 1988 un extenso grupo de investigadores japoneses lograron la obtención del DNAC de la forma variante de hGH de 20 kd (57). Para ello cosecharon 2,400 clonas transformantes y después de realizar un tedioso análisis de hibridación de colonias in situ, detectaron 5 clonas positivas de las cuales únicamente 2 de ellas portaban la secuencia génica de longitud completa. En nuestro caso, el tamizaje de únicamente 18 clonas bacterianas nos permitió identificar 3 clonas portadoras del DNAC de hGH (dos que codifican para la hGH 22 kd y una para hGH 20 kd), lo cual pone de manifiesto la eficiencia y potencialidad de nuestra estrategia.

Dado que solamente se conocen las propiedades terapéuticas de la hGH de 22 Kd y puesto que ese es nuestro principal interés, únicamente determinamos la secuencia nucleotídica del DNAC de hGH de 22 Kd. Por análisis computacional encontramos que dicha secuencia presentó un 100% de homología con aquella reportada previamente en la literatura, con lo cual pudimos demostrar inequívocamente la integridad de nuestros resultados.

Debido al reciente descubrimiento y la baja abundancia de la hGH de 20 Kd en el tejido hipofisiario, el papel fisiológico de dicha variante permanece desconocido. Nuestro entendimiento acerca de la biología molecular, fisiología y evolución de ambas formas alternativas de hGH, dependerá de una futura fuente de versiones recombinantes de esas proteínas para realizar estudios comparativos.

VII) CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Utilizando técnicas modernas de Ingeniería Genética logramos obtener la secuencias nucleotídicas que en humanos son responsables de dirigir la síntesis de hGHs hipofisarias.

Nuestra modesta pero significativa aportación a los campos de la biotecnología para la salud y la endocrinología molecular, ha sido gracias a la realización de una serie de experimentos apoyados por estudios computacionales.

La estrategia experimental que diseñamos y utilizamos con éxito para el aislamiento del DNAC de hGH, fue una contribución original de nuestro grupo. Algunos grupos de investigadores han optado por simplificar los procesos de clonación molecular al enriquecer los RNA mensajeros o los DNA's complementarios de interés, ya sea en un gradiente de densidad, en electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida, o mediante una cromatografía de filtración en sefarosa, con el propósito de favorecer la clonación de aquellas moléculas con un tamaño similar al de la secuencia nucleotídica deseada. En nuestro caso, la digestión de los DNA's complementarios de hipófisis humanas con un par de enzimas de restricción y su directa ligación en el plásmido pUC19 nos permitió clonar rápida y eficientemente el DNAC de hGH. Esta innovadora estrategia nos condujo a obtener, por primera vez en toda América Latina, los DNA's complementarios tanto para la hormona de crecimiento humana de 22 Kd como para la forma variante de 20 Kd.

Si bien es cierto que únicamente obtuvimos la secuencia nucleotídica del DNAC de hGH de 22 Kd, recientemente realizamos una serie de experimentos encaminados a determinar si los dos DNA's complementarios eran capaces de producir proteína recombinante en células en cultivo (58). De una manera clara y conclusiva, los resultados de este trabajo demostraron que ambos DNAC's fueron capaces de expresar en células de mamífero, un polipéptido que es reconocido por anticuerpos anti-hGH.

Especial interés se le debe dar al origen, regulación e interacción de ambas formas de hGH y principalmente al papel fisiológico de la variante de 20 Kd. En nuestro laboratorio ya hemos iniciado los primeros estudios tendientes a elucidar el papel fisiológico de dicha variante (59). Estamos seguros que el contar ahora con el DNAC de hGH de 20 y 22 Kd, nos ayudará a entender las relaciones entre estructura y función de estos importantes reguladores metabólicos.

Finalmente, a partir de los resultados de las investigaciones aquí presentadas, se dará inicio a un proyecto en caminado a obtener a mediano plazo, hormona de crecimiento humana recombinante por fermentación bacteriana. El presente trabajo obedece a nuestro deseo y responsabilidad de demostrar a nuestro país el potencial que ofrece la Ingeniería Genética para mejorar las condiciones de vida de algunos miembros de nuestra sociedad condenados a una vida con serias limitaciones. Estamos concientes que un esfuerzo mas de nuestra parte podrá ofrecerles la posibilidad de una mejor vida.

VIII) BIBLIOGRAFIA

- 1- Paladini,A.C., Peña,C. y Poskus,E. (1982). Molecular biology of growth hormone. CRC Crit. Rev. Biochem. 19:25-36.
- 2- Martin,D.W., Rodwell,V.W., Mayer,P.A. y Granner,D.K. (1986). Bioquímica de Harper. El Manual Moderno,S.A. 10a. Edición, México,pp 525-529.
- 3- Wyngaarden,J.B. y Smith,L.H. (1988). Cecil Textbook of Medicine. W.B. Saunders Company. 18th Edition, Philadelphia,pp 1290-1297.
- 4- Kidd,V.J. (1983). The human growth hormone and placental lactogen gene complex. En "Perspectives on genes and the molecular biology of cancer". Ed. D.L. Robberson y G.F. Saunders. Raven Press, pp 143-167.
- 5- Harper,M.E., Barrera-Saldaña,H.A. y Saunders,G.F. (1982). Chromosomal localization of the human placental lactogen gene-growth hormone gene cluster to 17q22-24. Am. J. Hum. Genet. 34:227-234.
- 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- Chen,E.Y., Liao,Y., Smith, D.H., Barrera-Saldaña,H.A., Gelinas, R.E. y Seeburg,P.H. (1989). The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. Genomics 4:479-497.
- 8- Raity,S. y Tolman,R.A. (1986). Human Growth Hormone. Plenum Medical. 1st. Edition, New York, pp 1-66.
- 9- Frazer,T., Gavin,J.R., Daughaday,W.H., Hillman,R.E. y Weldon, V.V. (1982). Growth hormone dependt growth failure. J. Pediatr. 101:12-15.
- 10- Underwood,L.E., Fisher,D.A., Frasier,D.A., Gertner,J.M., Kaplan, S.L., Kirkland,R.T., Lipne,B.M. y Raiti,S. (1985). Degenerative neurologic disease in patients formerly treated with human growth hormone. J. Pediatr. 107:10-12.
- 11- The Medical Letter on Drugs and Therapeutics.(1985). Problems with growth hormone. The Medical Letter,Inc.,New Rochelle, N.Y.,27 (Issue 691):57-58.
- 12- The Medical Letter on Drugs and Therapeutics.(1985). Biosynthetic growth hormone. The Medical Letter,Inc.,New Rochelle, N.Y.,27 (Issue 702):101-102.

- 13- Norman, C. (1985). Virus scare halts hormone research. *Science* 228:1176-1177.
- 14- Joklik, W.K., Willet, H.P. y Amos, D.B. (1983). *Microbiología de Zinsser*. Editorial Médica Panamericana. 17a. Edición, Buenos Aires, 1217-1219.
- 15- Goeddel, D.V., Heyneker, H.L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D.G., Ross, M.J., Miozzari, G., Crea, R. y Seeburg, P.H. (1979). Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* 281:544-548.
- 16- Becker, G.W. y Hsiung, H.M. (1986). Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 204:145-150.
- 17- Gray, G.L., Balridge, J.S., Mckeown, K.S., Heyneker, H.L. y Chang, C.N. (1985). Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in *Escherichia coli* : natural and bacterial signal sequences are interchangeable. *Gene* 39:247-254.
- 18- Seeburg, P.H., Shine, J., Martial, J.A., Baxter, J.D. y Goodman. (1977). Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. *Nature* 270:486-494.
- 19- Seeburg, P.H., Sias, S., Adelman, J., de Baer, H.A., Hayflick, J., Jhurani, P., Goeddel, D.V. y Heyneker, H.L. (1983). Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormones. *DNA* 2:37-45.
- 20- Roskam, W.G. y Rougeon, F. (1979). Molecular cloning and nucleotide sequence of the human growth hormone structural gene. *Nucleic Acids Res.* 7:305-320.
- 21- Miller, W.L., Martial, J.A. y Baxter, J.D. (1980). Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. *J. Biol. Chem.* 255:7521-7524.
- 22- Martial, J.A., Hallewell, R.A., Baxter, J.D. y Goodman, H.M. (1979). Human growth hormone : complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science* 205:602-607.
- 23- Sun, M. (1985). Gene-spliced hormone for growth approved. *Science* 248:523.
- 24- Olson, K.C., Fenno, J., Lin, N., Harkins, R.N., Snider, C., Kohr, W.H., Ross, M.J., Douglas, F., Prender, G. y Stebbing, N. (1981). Purified human growth hormone from *Escherichia coli* is biologically active. *Nature* 293:408-411.

- 25- Jonsdottir, I., Ekre, H.P. y Perlman, P. (1983). Comparative study of pituitary and bacteria-derived human growth hormone by monoclonal antibodies. *Molec. Immun.* 20:871-876.
- 26- Beardsley, T. (1985). Human growth hormone : approval for synthetic products in U.S., Britain. *Nature* 317:659.
- 27- Brown, W.R.A. y Bird, A.P. (1986). Long-range restriction site mapping of mammalian genomic DNA. *Nature* 322:477-479.
- 28- Barrera-Saldaña, H.A. (1982). Expression of the human placental lactogen genes. Ph.D. Thesis. The University of Texas Health Science Center of Houston.
- 29- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- 30- Rosen, J.M., Woo, S.L.C., Holder, J.W., Means, A.R. y O'Malley, B.W. (1975). Preparation and preliminary characterization of purified ovoalbumin messenger RNA from the hen oviduct. *Biochemistry* 14:69-78.
- 31- Davis, L.G., Dibner, M.D. y Battey, J.F. (1986). *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing Co. New York, pp 147-149.
- 32- Aviv, H. y Leder, P. (1972). Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligo thymidilic acid cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69:1408-1415.
- 33- Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., pp 188-209.
- 34- Gubler, V. y Hoffman, B.J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-269.
- 35- D'Alessio, J.M., Noon, M.C., Ley, H.L. y Gerard, G.F. (1987). One-tube double stranded cDNA synthesis using cloned MMLV reverse transcriptase. *Focus* 9:1-4.
- 36- Bethesda Research Laboratories. (1988). *cDNA Synthesis System. Instruction Manual*. Life Technologies Inc., Gaithersburg, M.D., pp 19-20.
- 37- Meesing, J. (1985). pUC18 and pUC19 restriction maps. *Focus* 7:11-13.
- 38- King, P.V. y Blakesly, R.W. (1986). Optimizing DNA ligations for transformation. *Focus* 8:1-3.

- 39- Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-511.
- 40- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- 41- Dagert, M. y Ehrlich, S.D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6:23-28.
- 42- Morelle, G. (1989). A plasmid extraction procedure on a miniprep scale. *Focus* 11:7-8.
- 43- Sadhu, C. y Gedamu, L. (1988). A procedure for the preparation of RNA-free plasmid DNA. *Biotechniques* 6:20-21.
- 44- Gobel, U., Maas, R., Bantel-Schal, U. y Clad, A. (1987). Rapid and quantitative electroelution and electro dialysis of DNA from gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* 14:245-260.
- 45- Appleby, D.W. (1984). Diagnostic restriction enzyme digestion. *Focus* 6:5-6.
- 46- Meesing, J. (1988). M13, the universal primer and the polylinker. *Focus* 4:21-26.
- 47- Bethesda Research Laboratories. (1988). M13 Cloning/Dideoxy Sequencing. Instruction Manual. Life Technologies Inc., Gaithersburg, M.D., pp 8-27.
- 48- Mande, M. y Higa, A. (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53:159-162.
- 49- United States Biochemical Corporation. (1988). Step-by-step protocols for DNA sequencing with sequenase. USB Press, Cleaveland, pp 3-12.
- 50- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5463-5467.
- 51- Seeburg, P.H. (1982). The human growth hormone gene family : nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone. *DNA* 1:239-249.
- 52- Cooke, N.E., Ray, J., Watson, M.A., Kuo, B.A. y Liebhaber, S.A. (1988). Human growth hormone gene and the highly homologous growth hormone variant gene display different splicing patterns. *J. Clin. Invest.* 82:270-275.

- 53- Walker, J.M. (1984). *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2. Humana Press. Clifton, N.J., pp 101-120.
- 54- Berger, S.L. y Kimmel, A.R. (1987). *Guide to Molecular Cloning Techniques*. *Methods in Enzimology* 152:307-371.
- 55- Polites, H.G. y Marotti, K.R. (1986). A step-wise protocol for cDNA synthesis. *Biotechniques* 4:514-520.
- 56- Amaya Manzanares, F. (1988). Obtención del DNA complementario de la hormona de crecimiento bovina. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, México.
- 57- Masuda, M., Watahiki, M., Tanaka, N., Yamakawa, M., Shimizu, K., Nagai, J. y Nakashima, K. (1988). Molecular cloning of cDNA encoding 20 KDa variant human growth hormone and the alternative splicing mechanism. *Bioch. Biophys. Acta* 949: 125-131.
- 58- Ramírez-Solís, R., Reséndez-Pérez, D., Alvidrez-Quihui, L.E., Rincón-Limas, D.E., Varela-Martínez, R., Martínez-Rodríguez, H.G. y Barrera-Saldaña, H.A. (1990). New vectors for the efficient expression of mammalian genes in cultured cells. *Gene* (en prensa).
- 59- Rincón-Limas, D.E., Reséndez-Pérez, D., Alvidrez-Quihui, L.E., Castro-Muñoz Ledo, F., Kuri-Karcuch, W. y Barrera-Saldaña, H.A. (1990). Cloning, expression and demonstration of in vitro adipogenic activity of human pituitary growth hormones. *Gene* (sometido para publicación).

