

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



BIOLOGIA MOLECULAR DEL COMPLEJO
MULTIGENICO hGH-hPL: POTENCIAL
TRANSCRIPCIONAL DE SUS GENES EN UN
SISTEMA DE TRANSCRIPCION *in vitro*.

Por

J. CLAUDIO MORENO ROCHA B. Sc.

Como requisito parcial para obtener el Grado de Maestría
en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular
e Ingeniería Genética

Otoño 1997

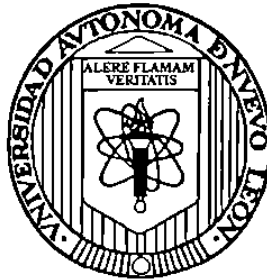
TM
QP572
S6
M6
C.1



1080072429

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



BIOLOGIA MOLECULAR DEL COMPLEJO MULTIGENICO
hGH-hPL: POTENCIAL TRANSCRIPCIONAL DE
SUS GENES EN UN SISTEMA DE
TRANSCRIPCION *in vitro*.

Por

J. CLAUDIO MORENO ROCHA B. Sc.

Como requisito parcial para obtener el Grado
de Maestria en Ciencias con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética

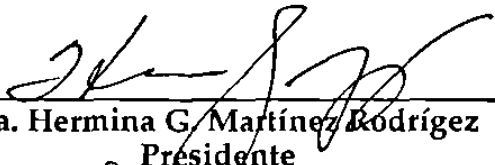
Otoño 1997

TM
QP572
.S6
M6




**BIOLOGIA MOLECULAR DEL COMPLEJO MULTIGENICO
hGH-hPL: POTENCIAL TRANSCRIPCIONAL DE
SUS GENES EN UN SISTEMA DE
TRANSCRIPCION *in vitro*.**

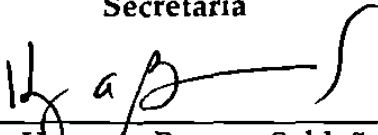
Aprobación de Tesis:



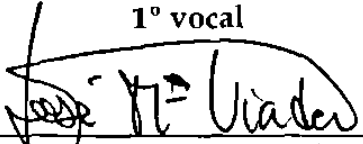
Dra. Hermina G. Martínez Rodríguez
Presidente



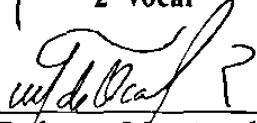
Dra. Agnès Revol de Mendoza
Asesor
Secretaria



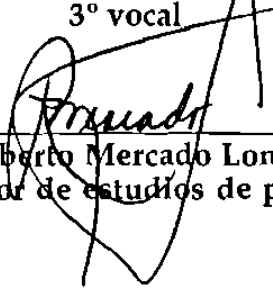
Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
Coasesor
1º vocal



Dr. José Ma. Viader Salvadó
2º vocal



Dr. Roberto Montes de Oca
3º vocal



Dr. Roberto Mercado Longoria
Subdirector de estudios de posgrado

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1.- Introducción	
1.1 El complejo multigénico de la hormona del crecimiento humana.	1
1.2 Productos proteicos del complejo hGH-hPL.	3
1.3 Estudio de la regulación de la expresión de los genes del complejo hGH-hPL.	4
1.4 Secuencias reguladoras de los genes del complejo hGH-hPL.	6
1.5 Ensayos de transcripción <i>in vitro</i> .	12
2.- Objetivos	
2.1 Objetivo general.	13
2.2 Objetivos específicos.	13
3.- Material y Métodos	
3.1 Obtención de templados.	14
3.1.1 Purificación de templados en gradientes de sacarosa.	15
3.1.2 Cuantificación y análisis electroforético de los templados	16
3.2 Preparación de extractos proteicos para transcripción <i>in vitro</i> .	16
3.2.1 Extractos crudos de células HeLa.	16
3.2.2 Extractos crudos de tejido placentario.	18
3.2.3 Semipurificación de los extractos de placenta.	18
3.3 Ensayos de transcripción <i>in vitro</i> .	20
3.4 Análisis de los productos de transcripción <i>in vitro</i> .	22
3.5 Análisis estadístico de los resultados.	22
4.- Resultados	
4.1 Templados.	23
4.2 Transcripción <i>in vitro</i> con extractos de células HeLa.	24
4.2.1 Estandarización del sistema.	24
4.2.2 Ensayos de transcripción con los genes hGH-hPL.	27
4.2.3 Ensayos comparativos de transcripción.	28
4.3 Transcripción <i>in vitro</i> con extractos de placenta.	29
4.3.1 Semipurificación de extractos de placenta.	29
4.3.2 Transcripción <i>in vitro</i> con los extractos de placenta.	32
5.- Discusión	
5.1 Templados para transcripción <i>in vitro</i> .	33
5.2 Ensayos de transcripción con extractos de células HeLa.	33
5.2.1 Ensayos con los genes del complejo con las tres versiones de promotor.	34
5.3 Sistema de transcripción derivado de placenta.	36
5.3.1 Semipurificación de los extractos de placenta.	36
5.3.2 Ensayos de transcripción.	37
6.- Conclusiones	40
7.- Literatura consultada	41

Lista de figuras.

Figura	1. Anatomía de la familia multigénica hGH-hPL.	2
Figura	2. Expresión de los genes del locus hGH-hPL.	4
Figura	3. Modelos de estudio de expresión de los genes del locus hGH-hPL.	5
Figura	4. Secuencias reguladoras de los genes del complejo.	7
Figura	5. Comparación de las secuencias promotoras de los genes del complejo hGH-hPL.	10
Figura	6. Estrategia experimental.	14
Figura	7. Obtención de templados para la transcripción.	15
Figura	8. Extractos de células HeLa y placenta.	17
Figura	9. Semipurificación de los extractos de placenta.	19
Figura	10. Diagrama de flujo de los ensayos de transcripción <i>in vitro</i>.	21
Figura	11. DNAs templados para transcripción <i>in vitro</i>.	24
Figura	12. Ensayo de transcripción usando extractos de células HeLa.	25
Figura	13. Transcripción <i>in vitro</i> de los templados conteniendo 70 pb con extractos de células HeLa	26
Figura	14. Transcripción <i>in vitro</i> de los 15 templados con extractos de células HeLa.	27
Figura	15. Ensayos de transcripción por duplicado en el mismo experimento.	29
Figura	16. Comparación del potencial transcripcional de cada gen en ensayos de transcripción.	30
Figura	17. Comparación entre las tres versiones del promotor en cada uno de los genes del complejo hGH-hPL.	30
Figura	18. Perfiles cromatográficos de las columnas de Heparina-sefarosa y DEAE-celulosa.	31
Figura	19. Ensayo de transcripción <i>in vitro</i> utilizando extractos de placenta.	32

Lista de tablas.

Tabla	I Concentración de los templados usados para la transcripción <i>in vitro</i>.	23
Tabla	II Valores promedio de los ensayos de transcripción <i>in vitro</i> medidas en unidades arbitrarias.	28

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Valor por ciento
%T	Porcentaje de transmitancia
°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitros
AdMLP	Promotor del gen mayor tardío de adenovirus
ANOVA	Análisis de varianza
CAT	Cloranfenicolacetil transferasa
DNA	Acido Desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetra acético
EtBr	Bromuro de etidio
EtOH	Alcohol etílico
h	Horas
HGH	Hormona del crecimiento humano
HPL	Lactógeno placentario humano
k b	Kilopares de bases
kDa	Kilodaltons
L	Litros
Luc	Gen de la luciferasa
min	Minutos
mA	Miliamperios
mCi	Milicurios
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NaOAc	Acetato de sodio
ng	Nanogramos
NH ₄ OAc	Acetato de amonio
nm	Nanometros
pb	Pares de bases
pH	- Log [H ⁺]
PM34	AdMPL de 34 pb de longitud
PBS	Amortiguador de fosfatos
pBS SK	PBlueScript SK™
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TBE	Amortiguador Tris-Borato

CAPITULO 1

Introducción

1.1. El complejo multigénico de la hormona del crecimiento humana

Una familia génica se define como un grupo de unidades transcripcionales que codifican para productos ligeramente diferentes entre sí, y que provienen de un ancestro común (Darnell J. *et al.* 1986, Singer M. and P. Berg 1991). Existen muchos ejemplos de éstas en los genómas de organismos tan dispares como levaduras, plantas y vertebrados. En humanos un ejemplo lo constituye la familia multigénica de la hormona del crecimiento (HGH) y del lactógeno placentario (HPL). Los genes de esta familia multigénica ocupan un área de aproximadamente 50,000 pares de bases (pb) (Figura 1). Este complejo está localizado entre las bandas q22-24 del cromosoma 17 humano (George D.L. *et al.* 1981, Harper M.E. *et al.* 1982, Barrera-Saldaña H.A. *et al.* 1988). La secuencia nucleotídica de estos genes se ha determinado (Chen E.Y. *et al.* 1989), conociéndose con exactitud las secuencias codificantes, los promotores, potenciadores de la transcripción (o enhancers) y las secuencias que flanquean a los genes.

Dentro del locus hGH-hPL existen cinco genes con una similitud de entre 91-95 % (Barrera-Saldaña H.A. *et al.* 1982, Hirt H. *et al.* 1987). Dos de estos codifican para hormonas similares: el gen hGH-N (Normal) con expresión específica en los somatotrófos de la pituitaria y el gen hGH-V, el cual codifica para una variante de GH en la placenta (Frankenne F. *et al.* 1987). Dos genes, hPL-3 y hPL-4 codifican para la hormona lactogénica placentaria (Seeburg P.H. *et al.* 1977 y Barrera-Saldaña H.A. *et al.* 1983) y finalmente el gen hPL-1 se considera un pseudogen por contener una mutación en el segundo intron la cual evita la correcta remoción del mismo (Resendez-Perez D. *et al.* 1990).

Los cinco genes están separados por regiones intergénicas de 6,000 a 13,000 pb (6-13 kb) (Chen E.Y. *et al.* 1989). Dentro de estos fragmentos se encuentran secuencias homólogas y repetidas que si bien no se les han determinado su función, es posible que tengan un papel importante en la regulación de la expresión de los miembros

génicos del locus. La estructura de los cinco genes es muy similar entre sí, todos cuentan con cinco exones y cuatro intrones, regiones promotoras de longitud similar (De Noto F.M. *et al.* 1981, Barrera-Saldaña H.A. *et al.* 1988, Chen E.Y. *et al.* 1989) y en el caso de los tres genes hPL, una secuencia potenciadora o enhancer (Rogers B.L. *et al.* 1986).

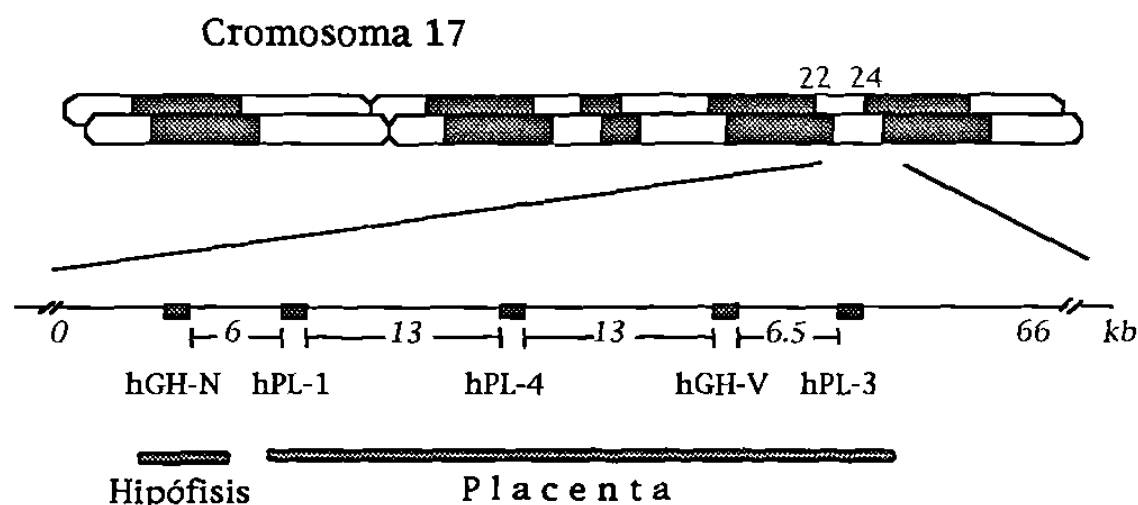


Figura 1. Anatomía de la familia multigénica hGH-hPL. Se muestra la disposición de cada gen y el tejido de expresión de los cinco genes del locus hGH-hPL.

En base a estudios comparativos de las secuencias nucleotídicas, se deduce que los genes hGHs y hPLs poseen un origen común. Se ha establecido que los genes GH aparecieron hace más de 350 millones de años en los primeros vertebrados (Niall H.D. *et al.* 1971, Chen E.Y. *et al.* 1989). Por otro lado, se ha propuesto que la evolución de los genes PL haya iniciado de manera independiente, hace cerca de 80 millones de años a partir del gen de la GH en los primates (Moore D.D. *et al.* 1982).

En primates, la aparición del locus hGH-hPL se basó en una serie de duplicaciones mediadas por secuencias repetitivas pertenecientes a la familia *Alu* (Hirt H. *et al.* 1987, Chen E.Y. *et al.* 1989). Se sabe que estas secuencias están involucradas en fenómenos de recombinación a lo largo del genoma (Calabretta B. *et al.* 1982) por lo que se ha considerado como los puntos de recombinación que dieron origen posteriormente a los miembros del locus (Chen E.Y. *et al.* 1989). Los cinco genes del complejo y sus secuencias flanqueantes se produjeron mediante tres eventos independientes de duplicación

(Hirt H. *et al.* 1987). A partir de un gen ancestral (similar al actual gen hGH-N), aparecieron los precursores de los genes hPLs y hGHs. Algunas mutaciones en la secuencia de ambos genes dieron lugar a las diferencias ahora presentes entre los genes GHs y PLs. Una posterior duplicación en tandem dió origen a los precursores de los genes hGH-V y hPL-3. El tercero y último evento se produjo mediante una duplicación del fragmento que contenía al gen hPL-1, de esta manera surgió el precursor del actual gen hPL-4 (Chen E.Y. *et al.* 1989).

1.2 Productos proteicos del complejo hGH-hPL

El gen hGH-N se expresa en la hipófisis, mientras que el resto de la familia se expresa en la placenta (Chen E.Y. *et al.* 1989). El gen hGH-N (DeNoto F.M. *et al.* 1981) produce un par de isoformas, una de 22 kiloDaltons (kDa) y la otra de 20 kDa. Esta última representa el 10% del total de hormona secretada al torrente circulatorio por la hipófisis. En la placenta se producen varios péptidos, todos derivados de la expresión diferencial de los genes placentarios (Barrera-Saldaña H.A. *et al.* 1983, MacLeod J.N. *et al.* 1992). A su vez, el gen hGH-V produce dos isoformas, una de 22 kDa y otra de 26 kDa (figura 2), ambas en diferente proporción conforme se desarrolla la placenta (MacLeod J.N. *et al.* 1992, Liebhaber S.A. *et al.* 1989). Por otro lado, el lactógeno placentario secretado por la placenta se produce por la expresión conjunta de los genes hPL-3 y hPL-4 (Barrera-Saldaña H.A. *et al.* 1983), pero en diferentes proporciones: así, la relación entre hPL-3 y hPL-4 es de 1.5 a las 4 semanas de formada la placenta y 5 al final del embarazo (MacLeod J.N. *et al.* 1992). Un estudio más reciente, en el cual se incluyeron varias placentas, mostró una relación de 1:1 a 1:6 de hPL-3 : hPL-4 con variación de individuo a individuo (Martínez-Rodríguez H.G. *et al.* 1997).

Inicialmente se había especulado que el gen hPL-1 era inactivo a nivel transcripcional, por no haberse encontrado RNA mensajeros derivados del mismo en una placenta (Kidd V.J. *et al.* 1982, Barrera-Saldaña H.A. 1983). Sin embargo, estudios realizados por hibridación de DNAs complementarios (cDNA) en una placenta, indicaron la presencia de transcritos de hPL-1 (Chen E.Y. *et al.* 1989), los cuales fueron caracterizados posteriormente (MacLeod J.N. *et al.* 1992). Se han descrito transcritos con potencial codificante (MacLeod J.N. *et al.* 1992), pero no se han determinado las causas por las que no existe un producto proteico derivado de este gen.

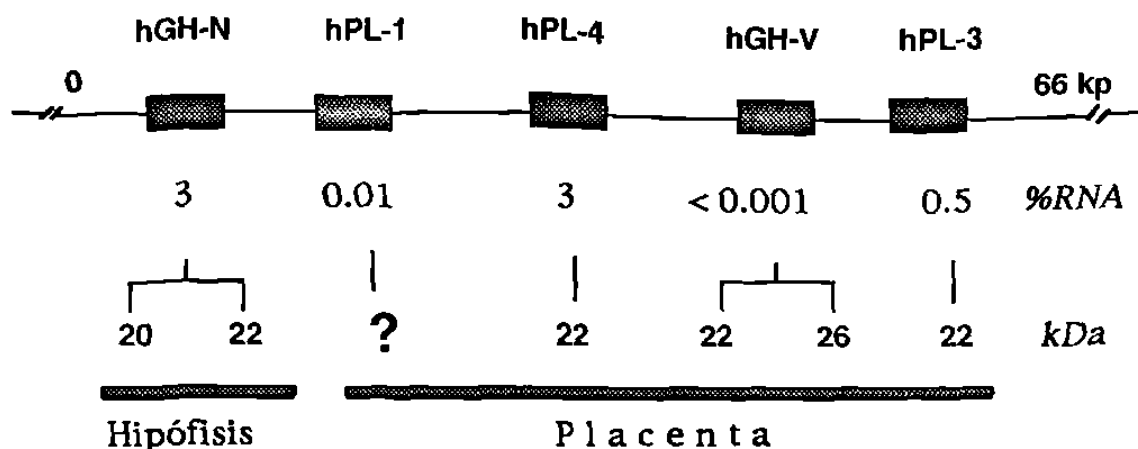


Figura 2. Expresión de los genes del locus hGH-hPL. Cada gen posee un patrón distinto de expresión en tejido y niveles de transcritos.

1.3 Estudio de la regulación de la expresión de los genes del complejo hGH-hPL

El complejo hGH-hPL constituye un modelo de regulación de genes muy similares entre sí en su estructura genómica pero con diferencias radicales en cuanto a su expresión tejido específica, regulación y función (Barrera-Saldaña H.A. *et al.* 1988 y Chen E.Y. *et al.* 1989).

La regulación de la expresión de los genes del complejo hGH-hPL se ha estudiado en placenta y en la hipófisis. También se ha recurrido al desarrollo de líneas celulares para este fin, siendo las más utilizadas las derivadas de carcinomas de hipófisis de rata (células GC) y de coriocarcinoma humano (células JEG-3, JAR y BeWo).

Experimentos de expresión transitoria realizados en estas líneas celulares han permitido estudiar la expresión de genes reporteros (Cloranfenicol acetil transferasa o CAT y luciferasa o Luc) bajo el control de las secuencias promotoras de algunos de los genes del complejo hGH-hPL, permitiendo determinar las secuencias nucleotídicas involucradas en la regulación de estos genes. Generalmente, los esfuerzos de los grupos que han realizado estos trabajos, se han enfocado en determinar la razón de la expresión tejido específica de los mismos.

Así, se han probado en células GC tanto las secuencias promotoras del gen hGH-N (Cattini P.A. *et al.* 1986a, 1986b y 1987 y Lemaigre F.P. *et al.* 1989a), como las del gen hGH-V (Cattini P.A. *et al.*

1987 y Nickel B.E. *et al.* 1990 y 1991b), e incluso las de los genes hPL-3 (Lemaigre F.P. *et al.* 1989a y Voz M.L. *et al.* 1992) y hPL-4 (Cattini P.A. *et al.* 1987, Nachtigal M.W. *et al.* 1989 y Nickel B.E. *et al.* 1990 y 1991b) a pesar que estos genes no se expresan en hipófisis de manera natural. No obstante el gran número de trabajos publicados, no se ha incluido el gen hPL-1 en ninguno de ellos, (figura 3).

Tipo celular	GC	Cultivo Prim. Trofob.	JAR	JEG-3	BeWo
Genes estudiados	hPL-3 y 4 hGH-V hGH-N	hPL-3 y 4	hPL-3 y 4	hPL-3 hPL-4 hGH-V	hPL-3 hPL-4 hGH-V
Secuencias usadas	Genes Prom. - CAT Prom. - Luc	Genes Genes int. Prom. - Luc	Genes int.	Genes Prom. - CAT Genes int.	Genes Prom. - CAT Prom. - Luc Genes int.
Origen de la línea	Hipof. rata	Placenta	Carcinoma	Carcinoma	Carcinoma

Figura 3. Modelos de estudio de expresión de los genes del locus hGH-hPL. Se listan los nombres de las líneas celulares y origen de las mismas, así como los genes estudiados. (CAT = gen de Cloranfenicolacetil transferasa, Enh. = Secuencia potenciadora, Genes int = genes internos, Luc. = gen de Luciferasa, Prom. = secuencia promotora.)

Se han reportado trabajos con las secuencias promotoras de los genes hPL-3 y hPL-4 utilizando cultivo de células las líneas JAR (Nickel B.E. *et al.* 1991a) y JEG-3 (Fitzpatrick S.L. *et al.* 1990, Nickel B.E. *et al.* 1991a y Voz M.L. *et al.* 1992). Sin embargo, la línea celular que preferente se ha utilizado para el estudio de los genes placentarios ha sido BeWo. Se han publicado trabajos en los que se utilizaron secuencias promotoras del gen hGH-V (Nickel B.E. *et al.* 1991a y 1993) y de los genes hPL-3 y hPL-4 (Cattini P.A. *et al.* 1987, Tansey W.P. *et al.* 1991, Voz M.L. *et al.* 1991, Nickel B.E. *et al.* 1991a y 1993 y Stephanou A. *et al.* 1994b, 1995a y c). Incluso, se han ensayado las secuencias promotoras del gen hGH-N (Barlow J.W. *et al.* 1986 y Voz M.L. *et al.* 1991). De nuevo, el gen hPL-1 no ha sido utilizado en estos ensayos.

Otra estrategia experimental aplicada ha sido la implementación de cultivos primarios de células trofoblásticas aisladas a partir de placentas a término (Klassen M.E. *et al.* 1989, Stephanou A. *et al.* 1994a), los cuales semejan el comportamiento y la diferenciación de estas células en placenta (Stephanou A. *et al.* 1994a). No obstante que las condiciones de transfección por medio de liposomas se han estandarizado para esos cultivos (Jacquem P. *et al.* 1993), algunos autores reportan tener problemas para su utilización en técnicas de introducción de DNA (Handwerger S. *et al.* 1995).

1.4 Secuencias reguladoras de los genes del complejo hGH-hPL

Durante el estudio de los genes del complejo multigénico se han descrito varias secuencias involucradas en la regulación de la expresión. Estas se encuentran en un área aproximado de 3000 pb previos al inicio de la transcripción. Sin embargo, en los primeros 300 pb, se encuentran los elementos de regulación básicos para la expresión de los genes (figuras 4 y 5).

La primera de las secuencias regulatorias descrita, fue la región de unión al factor Pit-1 (Bodner M. *et al.* 1987 y Castrillo J.L. *et al.* 1989), también conocido como GHF-1. Esta proteína es el factor responsable de la expresión específica de tejido del gen hGH-N (Karin M *et al.* 1990) y se une a un par de regiones a 40 pb de la caja TATA, denominadas Pit distal y Pit proximal (figuras 4 y 5).

Ambas regiones de unión a Pit-1 se encuentran altamente conservadas al nivel de su secuencia nucleotídica en los promotores de los genes de la familia, a excepción de hGH-V (figura 5). Se sabe que este factor se puede unir a los promotores básicos de los genes hPLs en células GC e inducir su expresión (Nickel B.E. *et al.* 1990). Sin embargo, existe una región (entre 1,500 y 2,000 pb del sitio de inicio de la transcripción según el gen), en la cual se unen proteínas que inhiben la unión de Pit-1 en los genes hPLs y hGH-V. Estas secuencias impiden la expresión de los genes placentarios en la hipófisis (Natchigal M.W. *et al.* 1993). Por ser Pit-1 un factor específico de tejido hipofisiario (Ingaham H.A. *et al.* 1988), aparentemente no está involucrado en la inducción de la expresión de los genes hPLs y hGH-V en la placenta.

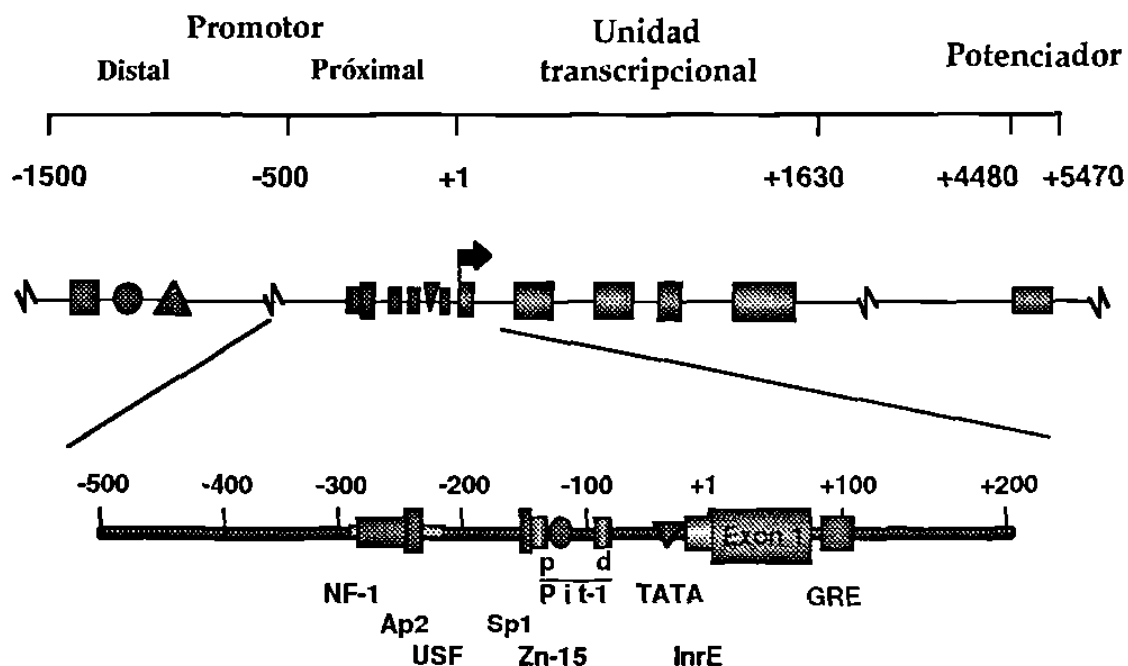


Figura 4. Secuencias reguladoras de los genes del complejo. Se representan las principales regiones donde se unen los factores reguladores a los promotores de los genes del locus hGH-hPL.

Otros factores han sido involucrados en la regulación de la expresión del gen hGH-N en la hipófisis, potenciando la acción de Pit-1. Algunos de éstos son: AP-2 (Lefevre C. *et al.* 1987), NF₁ (Stephanou A. *et al.* 1995a) y USF (Lemaigre F.P. *et al.* 1989b, Courtois S.J. *et al.* 1992). Estos factores se unen al promotor en un región de 290 a 255 pb antes del sitio de inicio de la transcripción (figura 5). Otro par de factores relacionados con Pit-1 son Zn-15 (descrito en rata), el cual funciona como potenciador de Pit-1 (Lipkin S.M. *et al.* 1993) y Sp1 (Lemaigre F.P. *et al.* 1989b), el cual compite con el factor Pit-1 por la región de unión Pit distal en los promotores de los genes de hPLs (Jiang S.W. *et al.* 1995). El factor Sp1 juega un papel muy importante en la regulación tanto de los genes hPL como de hGH-V, ya que la delección de su sitio de unión, disminuye de manera significativa la expresión de estos genes en células BeWo (Fitzpatrick S.L. *et al.* 1990, Karin M *et al.* 1990), no siendo el caso de la delección de la región de unión a Pit-1, al menos en el gen hPL-4 (Fitzpatrick S.L. *et al.* 1990). Otra región involucrada en la regulación de los genes hPLs es el elemento iniciador o InrE, éste se localiza entre la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción (figura 5). La mutación de esta secuencia provoca la disminución de la expresión hasta en un 60% (Jiang S.W. *et al.* 1995).

	-490	-480	-470	-460	-450	-440	-430	-420	-410
	*	*	*	*	*	*	*	*	*
hGH-N	gaattcagggactgaatcggtctcacaaacccccacaatatctattggctgtgctt-gggccctttttcccacacacacacattcttgctctgggtgggt								
hPL-1	gaattcagggactgaatcatgctcacaaacccccacaaatctattggctgtgctt-gggccctttttcccacacacacacattcttgctctgggtgggt								
hPL-4	gaattcagggactcaatggtgctcagaacccccacaaatctattggctgtgctt-gggccctttttcccacacacacacattcttgctctgggtgggt								
hGH-V	gaattcagcactgaatcatgccagaacccccgcgaatctattggctgtgctt-tggccctttttcccacacacacacattcttgctctgggtgggt								
hPL-3	gaattcagggactcaatggtgctcagaacccccacaaatctattggctgtgctt-gggccctttttcccacacacacacattcttgctctgggtgggt								

	-400	-390	-380	-370	-360	-350	-340	-330	-320										
hGH-N	gaggg	ttaaacat	cgcg	ggagg	gaaagg	gatagg	gataag	agaaat	gggat	gctg	gctgg	gaggg	tctca	agg	gact	ggg	ctat	cctg	acat
hPL-1	gaggg	ttaaacat	cgcg	ggagg	gaaagg	gatagg	gataag	agaaat	gggat	gctg	gctgg	gaggg	tctca	agg	gact	ggg	ctat	cctg	acat
hPL-4	ggaag	ttaaacac	cgcg	ggagg	gaaagg	gatagg	gataag	agaaat	gggat	gctg	gctgg	gaggg	tctca	agg	gact	ggg	ctat	cctg	acag
hGH-V	gaggg	gaaacat	cgcg	ggagg	gaaagg	gatagg	gataag	agaaat	gggat	gctg	gctgg	gaggg	tctca	agg	gact	ggg	ctat	cctg	acat
hPL-3	ggaag	ttaaacac	cgcg	ggagg	gaaagg	gatagg	gataag	agaaat	gggat	gctg	gctgg	gaggg	tctca	agg	gact	ggg	ctat	cctg	acag

	-310	-300	-290	-280	-270	-260	-250	-240	-230
hGH-N	* ccttctccgcggttcagggttgccaccataTGGcctgcggCCAgagggcacCCACGTGACCCcttaaagagagggacacaagttaggtgggtatctctct		*		*	*	*	*	*
hPL-1	ccttctccgcgcattcagggttgccaccataTGGcctgcctgctCCAgagggcacCCACCTGACCCcttaaagagagggacacaagttaggtgggtggtctctgt								
hPL-4	ccttccccgcggttcagggttgaccacaataTGGcctgcagCCAgagggcacCCACCTGACCCcttaaagagagggacacaagttaggtgggtggtctctgt								
hGH-V	ccttctccgcggttcagggttgccaccataTGGcctgcctgctCCAgagggcacCCACGTGACCCcttaaagagagggacacaagttaggtgggtatctctct								
hPL-3	ccttccccgcggttcagggttgaccaacaataTGGcctgcagCCAgagggcacCCACCTGACCCctcaaagagagggacacaagttaggtgggtggtctctgt								

[illegible]

	SP1-	-PIT	Distal	-	-----Caja	2-----	PIT	Proximal	-	-----TBE	-----						
	-130	*	-120	*	-110	*	-100	*	-90	-80	*	-70	*	-60	*	-50	*A
hGH-N	GAGGagctt	CTAAAT	TATCCAt	t	AGCACAA	AGCCCGT	CAGTGG	CCCCcat	gCATAA	TGTACAC	agaaacaggt	ggggGC	Aa-	cAGTGGG	agaga		
hPL-1	GAGGagctt	CCAAAT	TATCCAt	t	AGCACAA	AGCCCGT	CAGTGG	CCCCcat	gCATAA	TGTGCAC	agaaacaggt	ggggGC	Aa-	cAGCGAG	agaga		
hPL-4	GAGGagctt	CTAAAT	TATCCAt	t	AGCACAA	AGCCCGT	CAGTGG	CCCCcat	gCATAA	TGTACAC	agaaacaggt	ggggTC	Aagc	AGGGAG	agaga		
hGH-V	GAGGagctt	CTAAAT	TATCCAt	t	AGCACAA	AGCCCGT	CAGTGG	CCCCcag	gCCTAA	ACATG	CAGagaaacaggt	ggag	AGA	agc	AGCGAG	agaga	
hPL-3	GAGGagctt	CCAAAT	TATCCAt	t	AGCACAA	AGCCCGT	CAGTGG	CCCCcat	gCATAA	TGTACAC	agaaacaggt	ggggTC	Aagc	AGGGAG	agaga		

	-40	-30	Caja	TATA	-20	-10	+1	Exon I	10	20	30	40
	*	*			*	*	*		*	*	*	*
hGH-N	gaaggggccagg	-TATAAA	aaagggcccc	aaagagaccagct	caaggatcccc	aaagggcccc	aaactcccc	gaaccactcagggt	cctgtgtggacag			
hPL-1	gaaggggccagg	gTATAAA	aaagggcccc	aaagagaccagct	ccaagcatcccc	aaagggcccc	gaactcccc	gaaccactcagggt	cctgtgtggacag			
hPL-4	gaactggccagg	gTATAAA	aaagggcccc	aaagagaccggct	ctaagatcccc	aaagggcccc	aaactcccc	gaaccactcagggt	cctgtgtggacag			
hGH-V	gaaggggccagg	-TATAAA	aaagggcccc	aaagagaccagct	caaggatcccc	aaagggcccc	aaactcccc	gaaccactcagggt	cctgtgtggacag			
hPL-3	gaactggccagg	gTATAAA	aaagggcccc	aaagagaccggct	ctaagatcccc	aaagggcccc	aaactcccc	gaaccactcagggt	cctgtgtggacag			

[illegible]

Figura 5. Comparación de las secuencias promotoras de los genes del complejo hGH-hPL. Se muestran la ubicación de las principales secuencias de regulación y otras de los genes del complejo hGH-hPL. Se marcan las áreas de unión de proteínas mediante líneas continuas y el nombre de éstas remarcando secuencias importantes con letras mayúsculas subrayadas. Letras minúsculas regiones promotoras e intrónicas, letras mayúsculas exon I, "+1" sitio de inicio de la transcripción.

Varias hormonas tienen también un papel regulador sobre los genes hPLs. Se han reportado sitios de unión para los receptores de glucocorticoides en el primer intron del gen hGH-N (Slater E.P. *et al.* 1985 y Cattini P.A. *et al.* 1986b). La hormona triyodo tironina (T3), es importante para la regulación de la expresión de los genes hPL-3 (Nickel B.E. *et al.* 1991a, Voz M.L. *et al.* 1991 y Stephanou A. *et al.* 1995a, 1995b) y hPL-4 (Cattini P.A. *et al.* 1987, Nickel B.E. *et al.* 1991a, 1993 y Tansey W.P. *et al.* 1991). Cabe mencionar, que el gen hGH-N no responde a la inducción de la hormona T3 (Cattini P.A. *et al.* 1986b, 1987 e Ingaham H.A. *et al.* 1988).

Existen otros receptores que se unen a los promotores de los genes hPLs, éstos son: los de la vitamina D (Stephanou A. *et al.* 1994b, 1995a, 1995b), el del ácido retinoico (Stephanou A. *et al.* 1995b), el de la apolipoproteína A1 (Handwerger S. *et al.* 1995) e incluso el de la interleucina-6 (Stephanou A. *et al.* 1994b). También se ha localizado una región que responde a la inducción por AMP cíclico (Dana S. *et al.* 1989). Extrañamente, para el gen hPL-1 no se ha publicado ningún estudio sobre la unión de los receptores descritos anteriormente sobre su promotor, aunque contiene también las secuencias implicadas en la unión de estos factores (figura 5).

Aunque los sitios de unión de todos estos factores transcripcionales y receptores de segundos mensajeros se han localizado sobre los promotores de los genes del complejo hGH-hPL, no se sabe con exactitud como regulan la expresión de cada miembro del complejo, ni como participan en la expresión diferencial de los mismos.

Si bien los modelos de cultivo celular han sido de gran ayuda en el estudio de la expresión de los genes del complejo, presentan limitantes. Por ejemplo, las células GC son derivadas de hipófisis de rata, mientras que JAR, JEG-3 y BeWo son derivadas de carcinoma de córion (el cual no expresa lactógeno placentario *in vivo*). Sin embargo, estas tres líneas celulares expresan HPL y HGH variante, pero con diferente patrón en comparación a la placenta (Lytras A. *et al.* 1994). Otro modelo empleado es el cultivo primario de trofoblastos pero su reducida sobrevivencia en cultivo es una gran limitante para su utilización en los estudios de expresión de los genes del complejo hGH-hPL.

1.5 Ensayos de transcripción *in vitro*

Una alternativa a los estudios de expresión génica en líneas celulares o directamente *in vivo*, son los ensayos de transcripción *in vitro*. Para realizar éstos se requieren extractos crudos o purificados, los cuales contengan tanto la RNA polimerasa II como los factores transcripcionales básicos. Desde su desarrollo (Manley J.L. *et al.* 1980, Dignam J.D. *et al.* 1983), esta herramienta ha permitido identificar las proteínas implicadas en la transcripción y entender la regulación génica (Ge H. *et al.* 1996).

Utilizando un sistema de transcripción *in vitro*, se reportó la actividad del promotor del gen hGH-N tanto en extractos de células HeLa, como en células GC de hipófisis de rata (Courtois S.J. *et al.* 1992 y Labarrière N. 1995), no obstante, el trabajo se enfoca a estudiar los múltiples sitios de inicio de la transcripción de este gen más que a estudiar su regulación.

En otro trabajo se utilizaron los promotores proximales (500 pb) de los genes hPL-1, hPL-3 y hPL-4, utilizando de nuevo extractos de células HeLa como fuente de la RNA polimerasa II y factores transcripcionales (Selvanayagam C.S. *et al.* 1984). Los resultados demostraron la funcionalidad de los tres promotores en este sistema. Adicionalmente se describieron varios sitios de iniciación alternativos al inicialmente descrito para estos genes (Barrera-Saldaña H.A. *et al.* 1983). En este trabajo no se comparó el potencial transcripcional de los genes de lactógeno probados, ni se incluyeron los genes hGH-N y V.

No se ha desarrollado aún un sistema de transcripción a partir de tejido placentario y a la fecha no se ha comparado la actividad de los promotores de los genes hPL's o hGH-V en un sistema *in vitro* derivado del tejido donde se expresan naturalmente como lo es la placenta. Por lo tanto, en este trabajo se propone un estudio comparativo del potencial transcripcional de los promotores de los genes del complejo hGH-hPL usando tanto extractos de células HeLa como extractos de placenta humana.

CAPITULO 2

Objetivos

2.1 Objetivo general

Comparar el potencial transcripcional de los cinco promotores de los genes del complejo multigénico hGH-hPL en un sistema *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Estandarizar el sistema de transcripción *in vitro* a partir de extractos de células HeLa.
- Comparar en el sistema estandarizado el potencial transcripcional de las cinco regiones promotoras básicas (-500 pb) de los genes hGH-hPL.
- Implementar un sistema de transcripción *in vitro* derivado de placenta a término.
- Inferir la posible participación de las principales regiones regulatorias de dichos promotores en la transcripción, mediante deleciones de las mismas.

CAPITULO 3

Material y Métodos

Los objetivos marcados anteriormente fueron desarrollados siguiendo la estrategia general ilustrada en la figura 6.

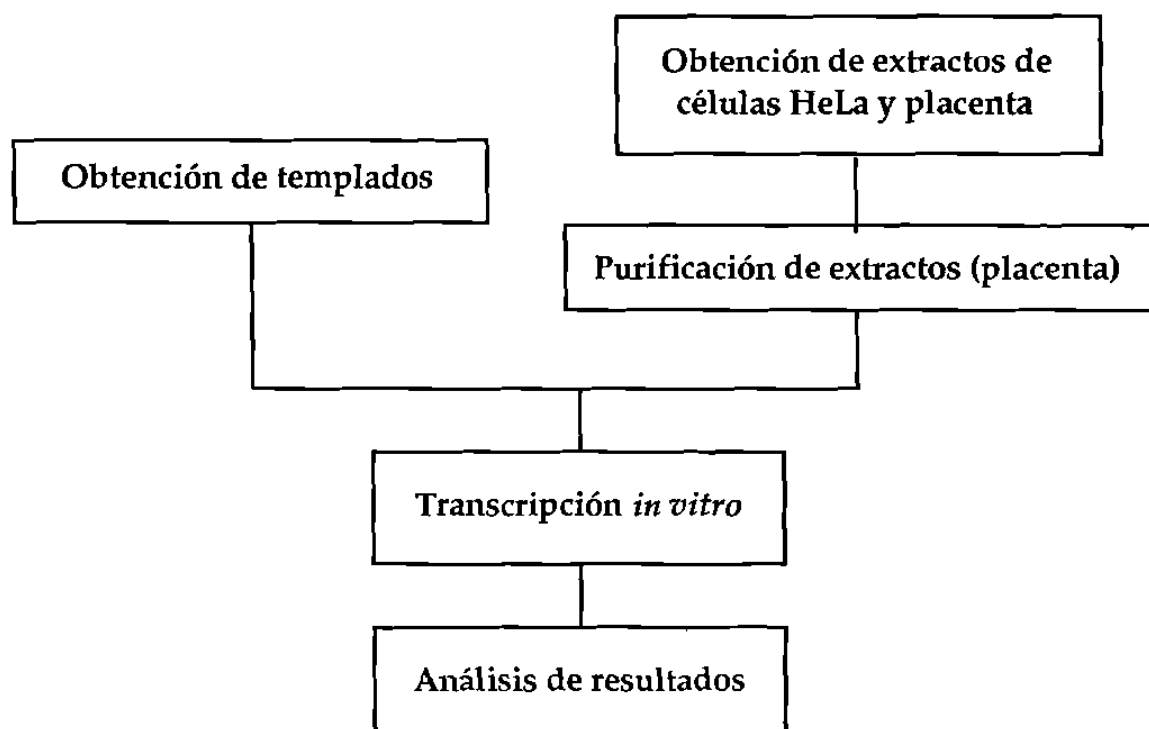


Figura 6. Estrategia experimental. En este esquema se ilustran los pasos que se siguieron para lograr los objetivos de este trabajo.

3.1 Obtención de templados

Para la realización de la transcripción *in vitro* se requirió de preparar templados que tuvieran el promotor a estudiar y una porción de la unidad transcripcional. Para este trabajo se utilizó la región de 500 pb. denominada "promotor básico" de cada uno de los cinco genes del complejo hGH-hPL y aproximadamente 460 pb de la región estructural correspondiente. Se construyeron dos delecciones de cada región promotora: una con las primeras 140 pb y la otra con solo 70 pb sin cambiar la longitud de la región a transcribir (figura 7).

3.1.1 Purificación de templados en gradientes de sacarosa

A partir de las construcciones mencionadas anteriormente (Barrera-Saldaña H.A. datos no publicados) fueron obtenidos los fragmentos de 960, 600 y 530 pb que corresponden a las tres versiones de templados a ensayar para cada uno de los cinco genes del complejo hGH-hPL tal como se ilustra en la figura 7. Estas construcciones una vez caracterizadas enzimáticamente y secuenciadas para corroborar su identidad, fueron obtenidas a gran escala utilizando el método de lisis alcalina (Sambrook J. *et al.* 1989). Fueron digeridos con las enzimas de restricción *Sac* I y *Kpn* I, 200 μ g de DNA plasmídico siguiendo las recomendaciones del fabricante, de esta manera se liberaron los templados del vector de clonación.

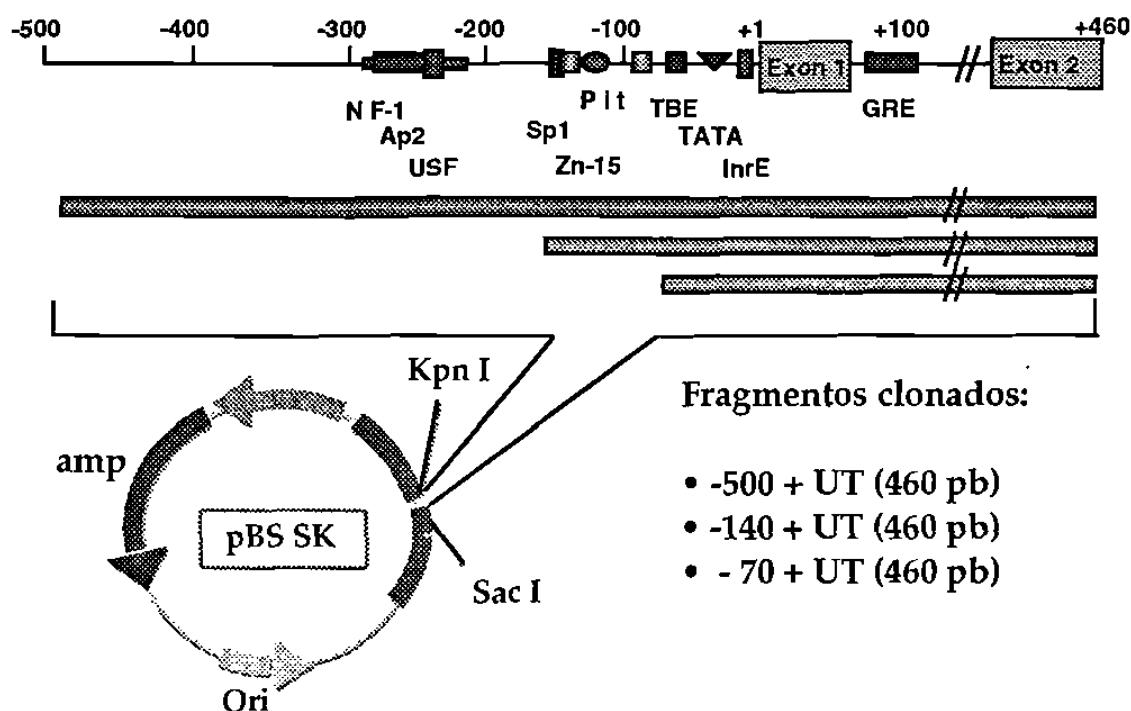


Figura 7. Obtención de templados para la transcripción. Una vez subclonados en el vector plasmídico pBlueScript SK⁺, los templados fueron liberados por cortes enzimáticos con *Sac* I y *Kpn* I (amp, gen de resistencia a ampicilina; Ori, origen de replicación; UT, unidad transcripcional).

Los fragmentos derivados de la digestión fueron purificados mediante gradientes de sacarosa de 5 a 20 %, preparados en una

solución conteniendo Tris HCl (20mM, pH 8.0), EDTA (2mM), NaCl (200mM) y EtBr (5 µg/mL). Se centrifugaron en un rotor SW41 (Beckman) a 35,000 rpm por 16 h a 4 °C. Se recuperaron las bandas de los templados mediante punción con una aguja. El DNA fue precipitado al agregar 1/10 del volumen de NaOAc 3M y 2 volúmenes de EtOH 100 %. Se precipitó a -20 °C por 30 min, la pastilla se lavó con EtOH al 70 % y se secó al aire para posteriormente disolverse en agua.

3.1.2 Cuantificación y análisis electroforético de los templados

Una vez purificados los templados, se realizó una medición de la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro Beckman modelo DU50 para determinar su concentración, tomando en cuenta que cada unidad de absorbancia a 260 nm, corresponde a 50 mg/mL de DNA de cadena doble en solución (Catalogo de New England BioLabs, 1995 pp 232). Adicionalmente los templados se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % en un amortiguador TBE, para verificar que efectivamente se habían separado del vector.

3.2 Preparación de extractos proteicos para transcripción *in vitro*

Para realizar la transcripción de un templado purificado es necesario la RNA polimerasa y todos los factores transcripcionales asociados a ésta. La fuente común de éstos son extractos celulares, ya sean de cultivo o directamente de tejidos. En este trabajo se utilizaron tanto extractos derivados de células HeLa como de placenta.

3.2.1 Extractos crudos de células HeLa

Desde la aparición de los primeros artículos en los que se describió la técnica de transcripción *in vitro* (Manley J.L. *et al.* 1980, Dignam J.D. *et al.* 1983) comunmente se han utilizado extractos crudos de células HeLa como fuente de la maquinaria transcripcional.

Los extractos de células HeLa utilizados en este trabajo fueron donados por el grupo de investigación del Dr. Jean-Marc Egly del "Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire" (IGBMC) de Estrasburgo, Francia. Estos fueron preparados como se describe a continuación y en la figura 8.

Todo el proceso se realizó en el cuarto frío a 4 °C, usando materiales y soluciones enfriadas previamente en hielo. A partir de 50 mL de células HeLa cultivadas en medio mínimo DMEM (a 37 °C y con 5% de CO₂) se hizo mecánicamente una lisis celular con un homogenizador de vidrio Potter-Elevehjem (Wheaton) con 100 mL del amortiguador A (10mM Tris-HCl pH 7.9, 1mM EDTA y 5mM DTT). Se mezcló el lisado con un volumen igual de amortiguador B (50mM Tris-HCl pH 7.9, 10mM MgCl₂, 2mM DTT, 25 % sacarosa y 50 % glicerol). Se agregó 1/8 del volumen final de una solución saturada de (NH₄)₂SO₄ (4M) gota a gota, mezclándose a velocidad media con un agitador magnético por 30 min.

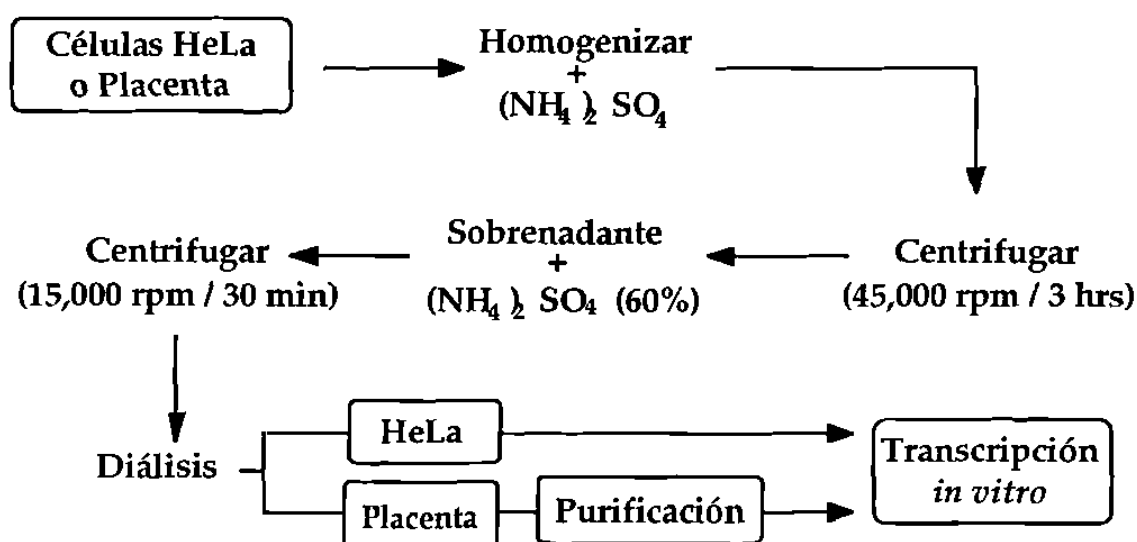


Figura 8. Extractos de células HeLa y placenta. Se homogenizó las células HeLa o cotiledones de placenta en un amortiguador. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación. Se adicionó sulfato de amonio al sobrenadante hasta un 60% para precipitar las proteínas. Se dializaron y para el caso de los extractos de placenta se procedió a un paso de semi-purificación por cromatografía.

La mezcla se centrifugó en un rotor 60Ti (Beckman) a 50,000 rpm a 4 °C por 3 h. Se agregó 0.33 g de (NH₄)₂SO₄ sólido y 0.33 µL de NaOH (1M) por cada mL de sobrenadante, mezclándose por 30 min. Se centrifugó en un rotor 60Ti (Beckman) a 15,000 rpm a 4 °C por 20 min. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó escurrir sobre papel absorbente a 4 °C. Posteriormente se disolvió en el menor volumen posible con amortiguador C (50mM Tris-HCl pH 7.9, 0.2mM EDTA, 5mM MgCl₂, 40mM (NH₄)₂SO₄, 1mM DTT y 15 % de glicerol). Finalmente se dializó contra 500 mL del mismo amortiguador C

durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, los extractos se guardaron en alícuotas de 200 µL a -70 °C hasta su uso. La concentración de los extractos se obtuvo mediante la técnica de Bradford (Bradford M.M. 1976).

3.2.2 Extractos crudos de tejido placentario

Los extractos de placenta fueron obtenidos siguiendo la misma metodología descrita para los extractos de células HeLa (Figura 8) con las siguientes modificaciones. A partir de placentas obtenidas por cesáreas (Servicio de Ginecología del Hospital Universitario José Eleuterio Gonzalez de la Facultad de Medicina de la UANL), les fueron cortados los cotiledones y se éstos se lavaron en un amortiguador PBS para eliminar lo más posible la sangre. Se homogenizaron 80 g de cotiledones en 100 mL de amortiguador A en una licuadora estéril, se agregó un volumen igual de amortiguador B y 1/8 del volumen final de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado. El homogenado se centrifugó en un rotor JA-18 (Beckman) a 18,000 rpm a 4 °C por 1.5 h. A partir del sobrenadante se precipitaron las proteínas como se describió para los extractos de células HeLa. Se centrifugó en el mismo rotor a 15,000 rpm a 4 °C por 30 min. La pastilla se disolvió en amortiguador C y se dializó contra el mismo amortiguador durante toda la noche a 4 °C. Se almacenó a -70 °C hasta su uso.

3.2.3 Semipurificación de los extractos de placenta

Los extractos crudos de placenta, a diferencia de los de células HeLa, no son activos en ensayos de transcripción *in vitro* (Revol A. 1996, datos no publicados) y se requiere de una semipurificación de los mismos por cromatografía, la cual se realizó como se ilustra en la figura 9.

Una columna de 14 X 2 cm (BioRad) fue empacada con 10 mL de resina de heparina-sefarosa (IBF Biotechnics, Estrasburgo, Francia), se lavó y se equilibró con 5 volúmenes de un amortiguador denominado TG₁₀EDK₅₀ (50mM Tris-HCl pH 7.9, 10 % glicerol, 0.1mM EDTA, 0.5mM DTT y 50mM KCl). Se depositó el extracto crudo de placenta (aproximadamente de 10 a 15 mL) con un flujo de 0.8 mL/min. El filtrado se almacenó en hielo para posteriormente depositarlo en una columna de DEAE-celulosa. La columna de heparina-sefarosa se lavó primeramente con cinco

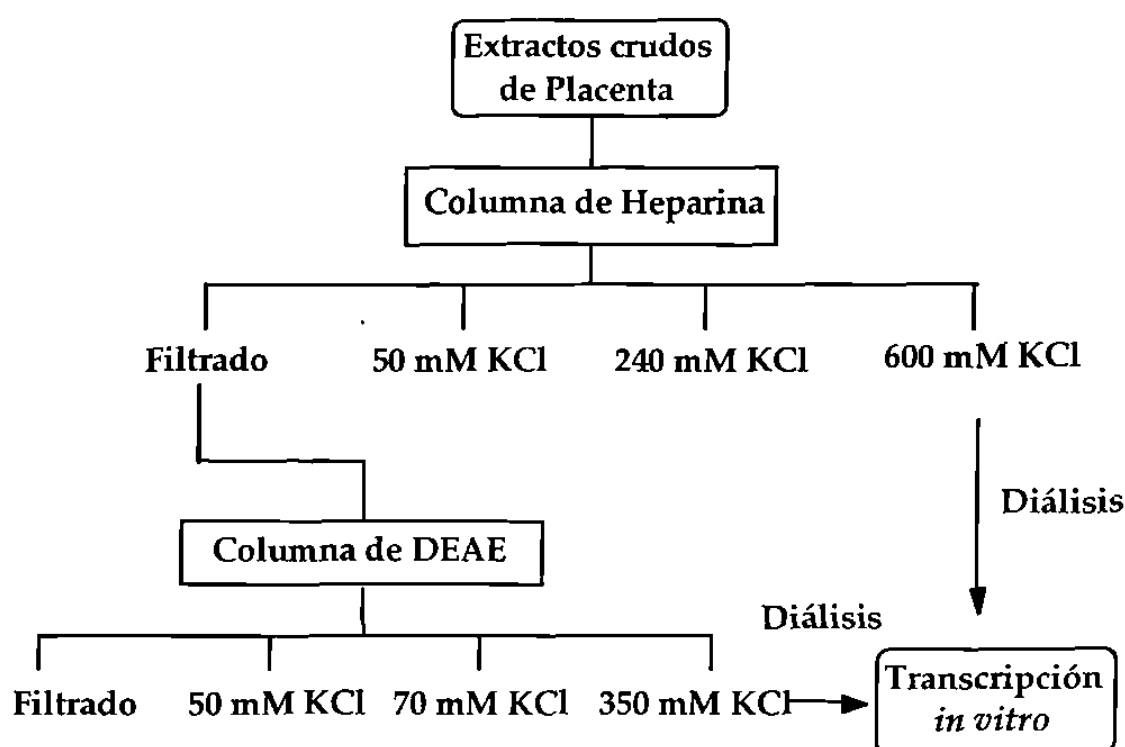


Figura 9. Semipurificación de los extractos de placenta. El extracto crudo se fraccionó primeramente en una columna de heparina-sefarosa y después en una de DEAE-celulosa. La elución se hizo a 600mM (heparina-sefarosa) y 350mM (DEAE-celulosa) de KCl. Ambas fracciones fueron dializadas antes de su uso.

volúmenes de TG₁₀EDK₅₀, después con TG₁₀EDK₂₄₀ (240mM KCl) y la elución de las proteínas de interés se llevó al cabo con TG₁₀EDK₆₀₀ (600mM KCl) con un flujo de 0.8 mL/min. Se colectaron alícuotas de 0.8 mL a la salida de la columna y la concentración de proteínas se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 280 nm con un espectrofotómetro (Beckman, modelo DU50). Al finalizar la cromatografía, se lavó la columna con 5 volúmenes de TG₁₀EDK_{1M}, almacenándose en este amortiguador a 4 °C hasta su uso (Gerard M. *et al.* 1991).

Para la columna de intercambio aniónico (DEAE-celulosa, IBF Biotechnics, Estrasbourg Francia) se procedió de igual manera. Se equilibró con cinco volúmenes de TG₁₀EDK₅₀ una columna empacada con 10 mL de esta resina, se procedió a un lavado con cinco volúmenes de TG₁₀EDK₇₀, la elución final se hizo con TG₁₀EDK₃₅₀ a un flujo constante de 0.8 mL/min, colectando alícuotas de 0.8 mL

siguiendo la absorbancia de las mismas a 280 nm. Como en el caso anterior se lavó la columna con TG₁₀EDK_{1M} para eluir completamente las proteínas remanentes. Se almacenó en este amortiguador a 4 °C hasta su uso.

Las alícuotas colectadas de ambas columnas (TG₁₀EDK₆₀₀ de heparina-sefarosa y TG₁₀EDK₃₅₀ de DEAE-celulosa) se dializaron contra 500 mL de TG₁₀EDK₅₀ durante dos horas a 4 °C y se usaron inmediatamente para los ensayos de transcripción o se congelaron por inmersión en N₂ líquido y almacenaron a -70 °C hasta su uso.

3.3 Ensayos de Transcripción *in vitro*

La transcripción *in vitro* es una herramienta utilizada para el estudio de la expresión y regulación génica. Esta consiste en colocar un fragmento de DNA el cual posee una región promotora con las secuencias necesarias para que la maquinaria transcripcional suministrada por extractos de células o tejidos, las reconozca y dirijan la síntesis de un fragmento de RNA de tamaño predeterminado, al limitar el fragmento a transcribir. De esta manera, se puede estudiar tanto la capacidad de un promotor para dirigir la transcripción como su potencia y especificidad.

Los ensayos de transcripción *in vitro* fueron realizados siguiendo el protocolo descrito en la literatura (Miyamoto N.G. *et al.* 1985, Gerard M. *et al.* 1991) con las siguientes modificaciones:

Primeramente se realizó una preincubación de los extractos proteicos y del templado para favorecer la unión los factores transcripcionales. Se utilizaron como DNAs templados tanto el promotor mayor tardío del Adenovirus-2 (Ad2MLP, Miyamoto N.G. *et al.* 1984, 100ng) como alguna de las tres versiones de promotores de cada gen del complejo hGH-hPL (100 a 200 ng de cada uno). A cada templado se le agregó 1 µL MgCl₂ (100mM) y los extractos crudos de células HeLa o de placenta, 2 µL de la fracción eluida con TG₁₀EDK₃₅ de la columna de DEAE-celulosa y 5 µL de la fracción eluida con TG₁₀EDK₆₀₀ de la columna de heparina-sefarosa, ajustando a 25 µL de volumen final con TG₁₀EDK₅₀. Se incubó esta mezcla en un baño de agua a 25 °C por 15 min.

Después de la preincubación, se inició la reacción de transcripción al agregar 5 µL de una mezcla conteniendo 1 µL de CTP (0.25mM), 0.65 µL de MgCl₂ (100mM), 0.2 µL de una mezcla de

ATP/UTP/GTP (25 mM cada uno) y 0.3 a 0.5 μL de CTP marcado con fósforo 32 (^{32}P - α -CTP, 10 mCi/mL de Amersham), completado a un volumen final de 5 μL con TG10EDK50. Se mezcló y se incubó en un baño de agua a 25 °C por 45 min.

La reacción se detuvo agregando 400 μL de una solución con 0.5 % SDS, 50mM NaOAc y 50 mg/mL tRNA de levadura o de *E. coli*. Los RNAs se extrajeron con 200 μL de Fenol saturado con Tris-HCl 1M, pH 8.0 (Sambrook *et al.* 1989), agitándose en vortex por 10 s. Posteriormente se adicionaron 200 μL de cloroformo a la mezcla y se agitó nuevamente por 10 s en vortex. Se separaron las fases por microcentrifugación (Eppendorf, modelo 5415c) a 14,000 rpm por 5 min. Una vez recuperado el sobrenadante, los RNAs se precipitaron al agregar 20 μL de NH_4OAc (5M) y 1 mL de EtOH 100%, incubando a -20 °C por 20 min. Se colectó el precipitado por centrifugación a 14,000 rpm por 25 min, se decantó el sobrenadante secándose los tubos con un papel absorbente. Las pastillas se dejaron secar al aire por 10 min y la pastilla se disolvió en 4 μL de amortiguador de muestra para secuenciación (80 % formamida, 0.5X amortiguador TBE, 0.2 % azul de bromofenol y 0.2 % xilencianol).

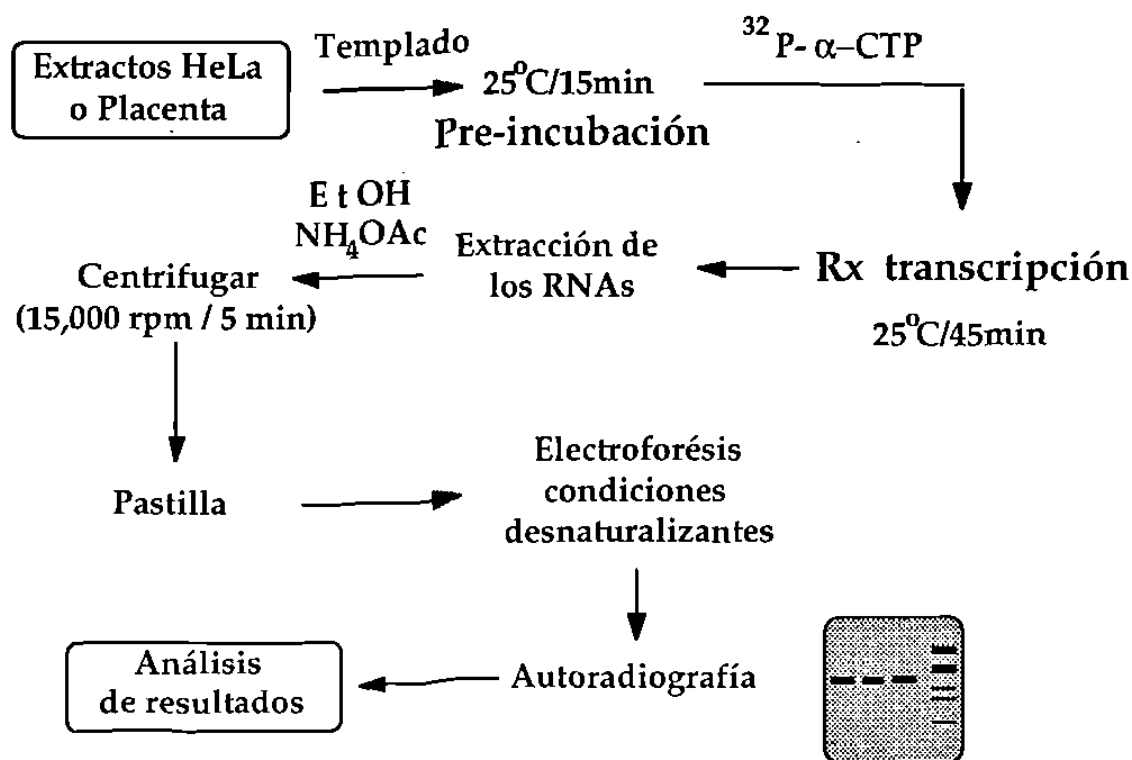


Figura 10. Diagrama de flujo de los ensayos de transcripción *in vitro*.

3.4 Análisis de los productos de transcripción *in vitro*

Los productos de transcripción se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida(5 %)-Urea(50 %) de 19 X 25 cm, en amortiguador de TBE a 20 mA por 1 h. Se desmontó el gel y se fijó sobre un papel filtro por adherencia, se cubrió con plástico autoadherente KleenPack (Keemberly-Clark) y se expuso a una película de rayos X (HyperFilm MP de Amersham) con pantalla intensificadora (Kodak) por 16 h a -70 °C. Una vez revelada la película se analizaron las bandas mediante densitometría utilizando un procesador de imagenes Bio-imaging analyzer Bas 2000 (Fuji, Japón).

3.5 Análisis estadístico de los resultados

Se agruparon las mediciones por tamaño de región promotora (500, 140 y 70 pb) por gen del cual se originaron (hGH-N, hGH-V, hPL-1, hPL-3 y hPL-4). Los valores de cada grupo fueron procesados estadísticamente por un análisis de ANOVA mediante el programa computacional Excel 4.0 (Microsoft corporation). Los valores utilizados fueron solo los de los ensayos en los que todas las muestras procesadas se leían en la misma película. Cualquier ensayo incompleto se descartó. Así mismo, se determinó el valor promedio para cada grupo de mediciones y la desviación estandar graficandose en el mismo programa Excel 4.0.

CAPITULO 4

Resultados

4.1 Templados

Los fragmentos de DNA utilizados como templados fueron purificados por gradiente de sacarosa. La concentración de cada preparación de templados se calculó midiendo su absorbancia a 260nm (tabla I).

Tabla I. Concentración de los templados utilizados para la transcripción *in vitro*

Templado	Conc ng/mL
N-500	466
1-500	686
4-500	660
V-500	692
3-500	706
N-140	672
1-140	560
4-140	620
V-140	792
3-140	652
N-70	632
1-70	880
4-70	952
V-70	966
3-70	812

Los templados se identificaron asignando el nombre de cada gen seguido de la versión de promotor, a saber, para el gen hGH-N con 500 pb de promotor se asignó "N-500". Se verificó la integridad de los DNAs mediante un gel de agarosa al 0.8 % teñidos con una solución de bromuro de etidio (2 mg/mL), como se muestra en la figura 11.

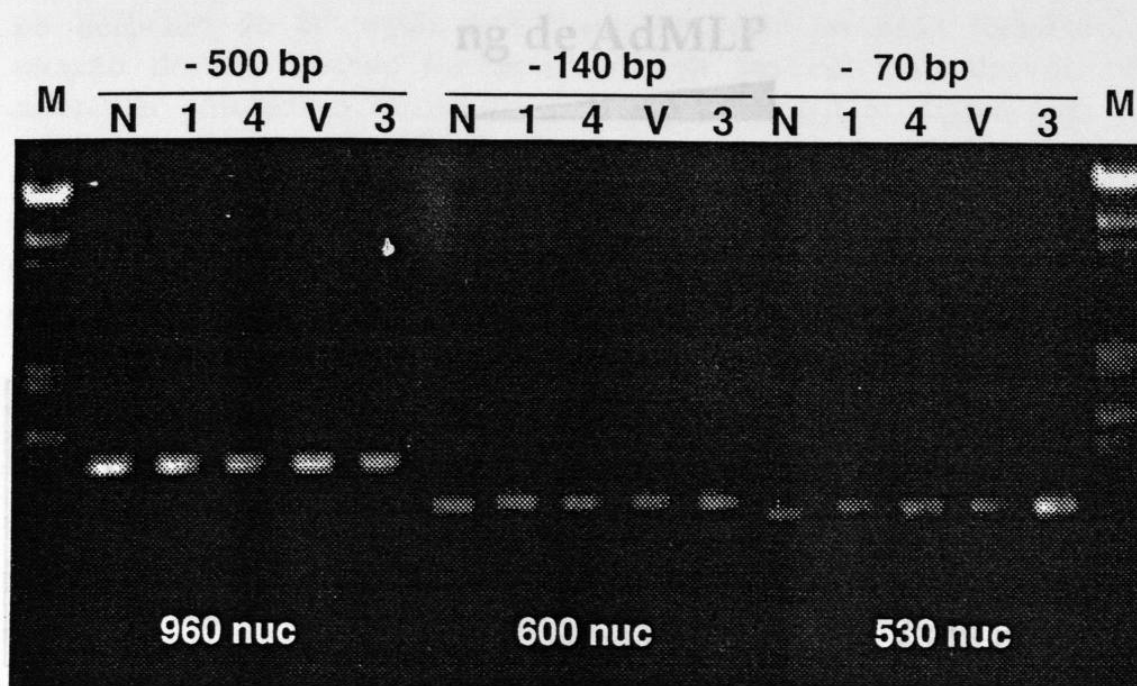


Figura 11. DNAs templados para transcripción *in vitro*. Se muestran los DNA templados resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Las longitudes de las tres versiones son 960, 600 y 530 pb respectivamente.

4.2 Transcripción *in vitro* con extractos de células HeLa

4.2.1 Estandarización del sistema

Primeramente, se realizó una serie de ensayos en los cuales se probó el extracto de células HeLa para encontrar las condiciones óptimas para el mismo, ya que se sabe que podrían variar de preparación a preparación (Miyamoto N.G. *et al.* 1984). Se utilizó el promotor del gen mayor tardío de Adenovirus (AdMLP) en cantidades de 50, 100 y 200 ng. Los resultados se ilustran en la figura 12. Se observa una banda prominente a 309 nucleótidos que corresponde al transcrito esperado a partir de este templado. A medida que la cantidad de templado se incrementa, la señal del transcrito también lo hace (carriles 1 al 3, figura 12). Sin embargo, al aumentar la cantidad de 100 a 200 ng de templado, el incremento de señal ya no es proporcional (carriles 2 y 3, figura 12), por lo que se decidió utilizar 100 ng para los posteriores ensayos.

de los ensayos realizados. La señal principal que se visualiza en la figura 13 (señalado con una flecha) es el transcrito de aproximadamente 460

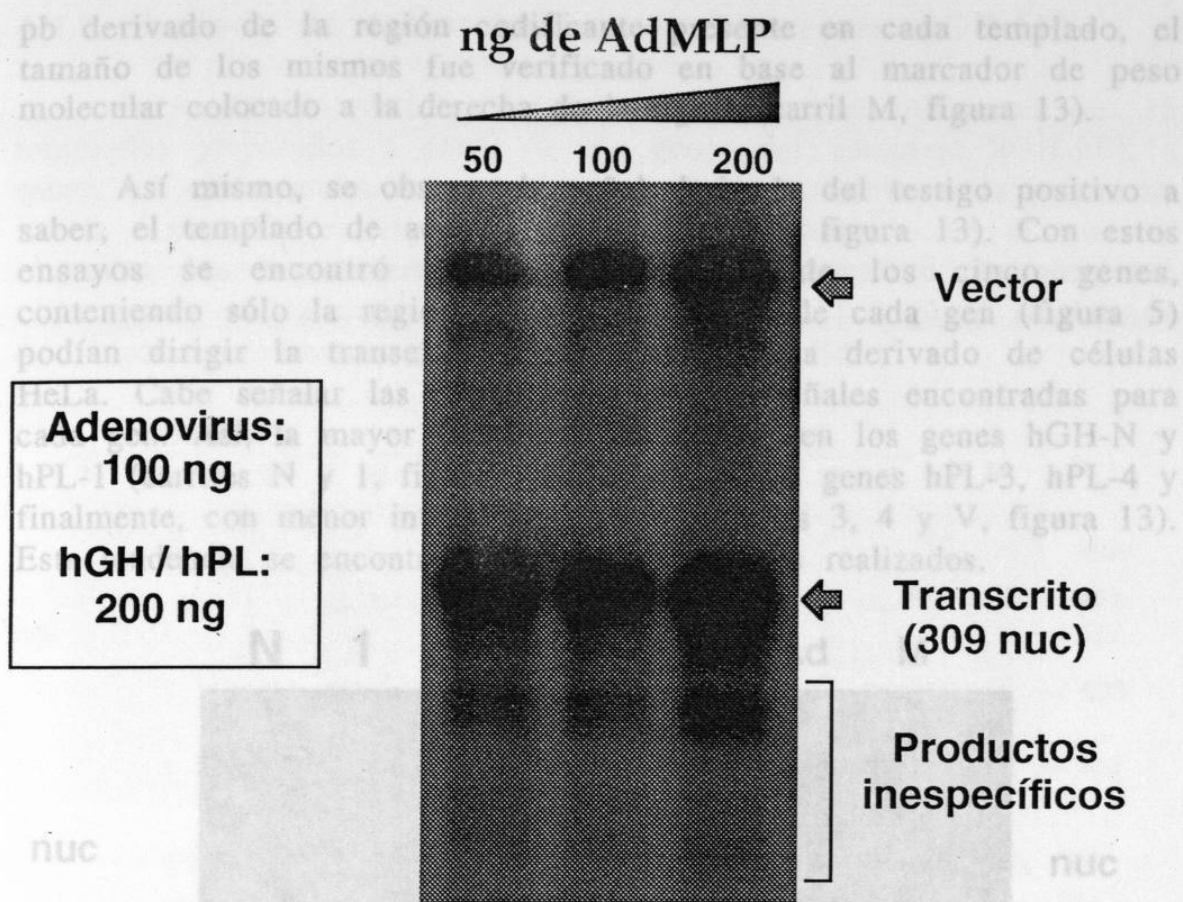


Figura 12. Ensayo de transcripción usando extractos de células HeLa. Se muestra el incremento de la señal conforme se aumenta la concentración de templado, el cual fue AdMLP (M= marcador de peso molecular, el plásmido pBR322 digerido con la enzima de restricción *Msp* I).

De igual manera, se realizó un ensayo con los templados conteniendo las secuencias promotoras de 70 pb de cada uno de los genes del complejo y se determinó una cantidad de 200 ng como la mejor para obtener una señal clara pero sin llegar al punto de saturación del sistema. De esta manera, se trató de permanecer dentro de la fase proporcional del sistema.

Figura 13. Transcripción *in vitro* de los

El ensayo con los templados de 70 pb de la región promotora se realizó de igual forma para probar la funcionalidad de estos promotores mínimos de cada gen del complejo, en el sistema de HeLa. En la figura 13, se observa el resultado de uno de los ensayos realizados. La señal principal que se visualiza en la figura 13 (señalado con una flecha) es el transcrito de aproximadamente 460

pb derivado de la región codificante presente en cada templado, el tamaño de los mismos fue verificado en base al marcador de peso molecular colocado a la derecha de la figura (carril M, figura 13).

Así mismo, se observa la señal derivada del testigo positivo a saber, el templado de adenovirus (carril "Ad", figura 13). Con estos ensayos se encontró que los templados de los cinco genes, conteniendo sólo la región mínima promotora de cada gen (figura 5) podían dirigir la transcripción en este sistema derivado de células HeLa. Cabe señalar las intensidades de las señales encontradas para cada gen. Así, la mayor intensidad se observó en los genes hGH-N y hPL-1 (carriles N y 1, figura 13). Le siguen los genes hPL-3, hPL-4 y finalmente, con menor intensidad hGH-V (carriles 3, 4 y V, figura 13). Esta tendencia se encontró en todos los ensayos realizados.

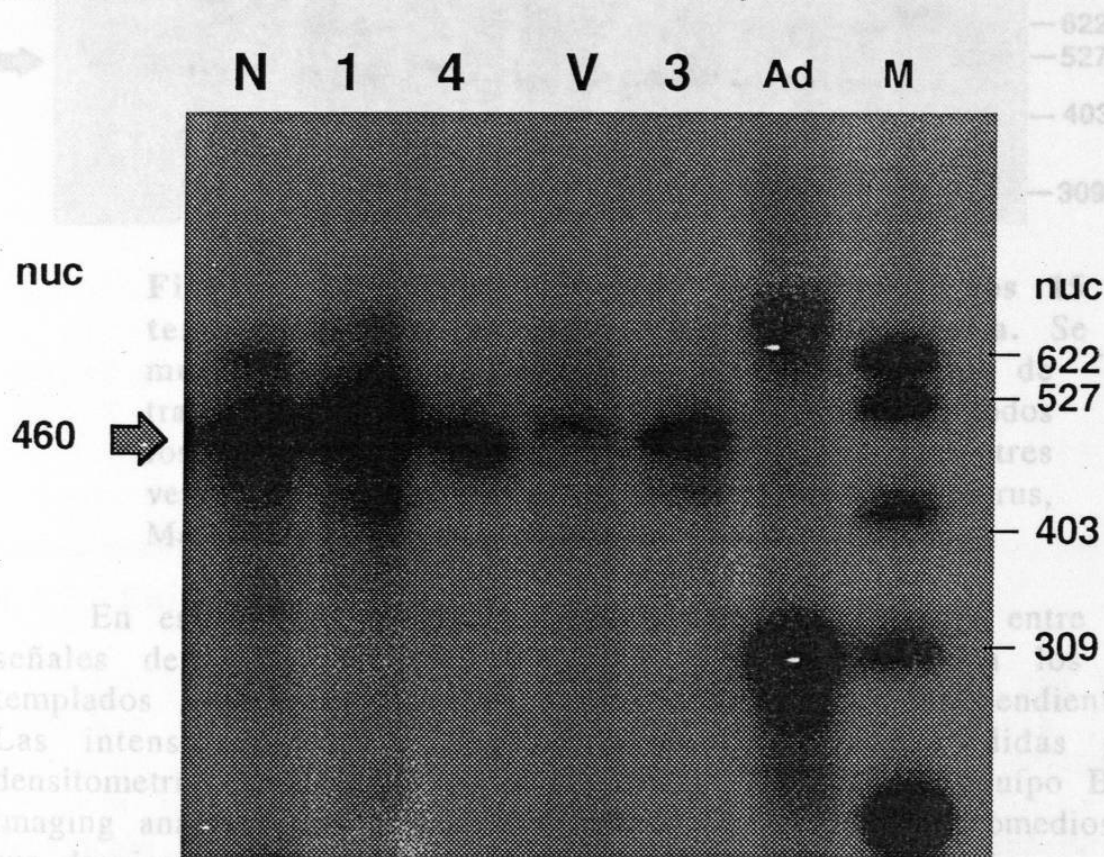


Figura 13. Transcripción *in vitro* de los templados 70 pb con extractos de células HeLa. Se observa la actividad de los templados con el promotor mínimo de cada gen del complejo hGH-hPL. (Ad= Adenovirus, M= marcador de peso molecular, pBR322 + *Msp* I).

4.2.2 Ensayos de transcripción con los genes hGH-hPL

Se realizaron varios ensayos en los que se utilizaron los 15 templados preparados a partir de los genes del complejo hGH-hPL a saber, los cinco genes del complejo en sus tres versiones de promotor. En la figura 14 se ilustra un ensayo representativo en el que se observan los transcritos derivados de cada templado, primero los cinco genes en la versión con 500 pb, después 140 pb y finalmente de 70 pb del promotor. El testigo positivo fue AdMPL.

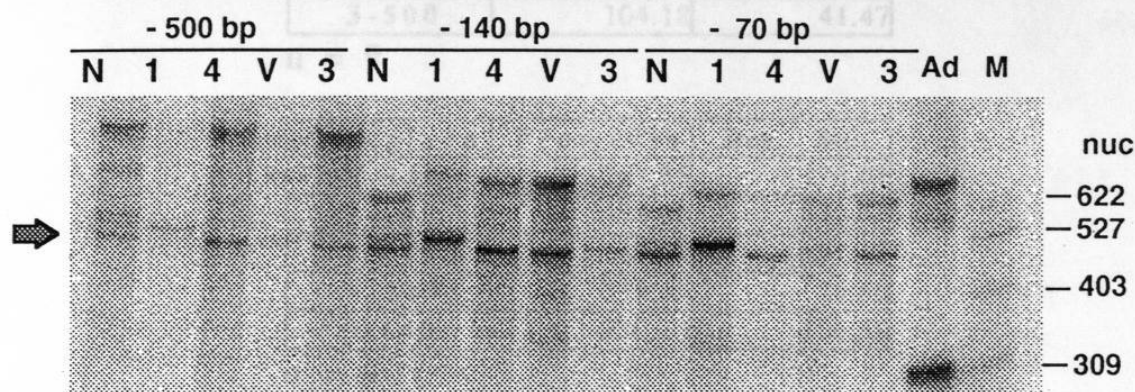


Figura 14. Transcripción *in vitro* de los 15 templados con extractos de células HeLa. Se muestran los resultados de un experimento de transcripción *in vitro*, en el cual se incluyeron todos los miembros del complejo hGH-hPL en sus tres versiones de longitud de promotor. (Ad= Adenovirus, M= marcador de peso molecular, pBR322 +*Msp* I).

En esta figura se observa nuevamente la diferencia entre las señales derivadas de cada templado. Los ensayos con los 15 templados fueron repetidos en varios experimentos independientes. Las intensidades de las bandas obtenidas fueron medidas por densitometría directamente sobre la película mediante el equipo Bio-imaging analyzer Bas 2000 (Fuji, Japón). Los resultados promedios y sus desviaciones estandares se presentan en la tabla II.

Dada la alta variación en los ensayos se decidió realizar un experimento en el que se incluyeron duplicados de un mismo templado bajo las mismas condiciones experimentales, para determinar el origen de las variaciones (figura 15). Se observan variaciones de la intensidad de las bandas de cada transcrito aún y cuando se hicieron bajo las mismas condiciones experimentales.

Tabla II. Valores promedio de los ensayos de transcripción *in vitro* medidas en unidades arbitrarias

Templado	Promedio	Dev. Std
N-500	123.66	74.99
1-500	98.96	81.34
4-500	165.01	128.02
V-500	89.46	59.69
3-500	104.18	41.47

n = 9

Templado	Promedio	Dev. Std.
N-140	257.35	128.01
1-140	188.08	21.53
4-140	169.80	97.17
V-140	135.60	24.86
3-140	230.70	124.58

n = 4

Templado	Promedio	Dev. Std.
N-70	189.55	61.12
1-70	183.53	54.30
4-70	113.85	38.40
V-70	86.78	15.13
3-70	105.28	15.69

n = 4

4.2.3 Ensayos comparativos de transcripción

En base a los valores obtenidos para cada gen en sus tres versiones de promotor, se utilizó un análisis de varianza para determinar si existían diferencias significativas entre las mediciones de cada muestra. La tabla II incluye los valores promedio y la desviación estandar de cada grupo analizado, a saber la comparación entre los cinco genes y la comparación entre las tres versiones de cada gen individual.

En la figura 16, se ilustra de manera gráfica el resultado de estos análisis. Para la versión de 500 pb de promotor, no se observaron diferencias significativas entre los cinco genes. (gráfica a, figura 16), esto mismo sucedió con la versión de 140 pb (gráfica b).

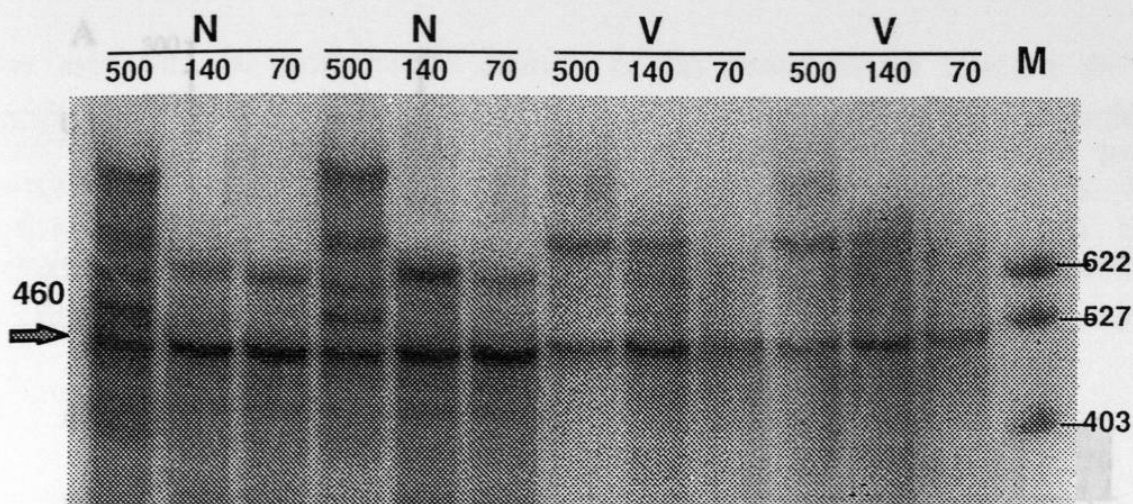


Figura 15. Ensayos de transcripción por duplicado en el mismo experimento. La figura presenta los resultados de uno de los ensayos por duplicado utilizando los promotores de los genes hGH-N y hGH-V (Ad= Adenovirus, M= marcador de peso molecular).

Sin embargo, en la gráfica correspondiente a los resultados de la mediciones de la versión de 70 pb (gráfica c) se observan diferencias significativas ($p = 0.022$), entre el gen hGH-V, que presenta el menor índice transcripcional y los genes hGH-N y hPL-1 los mayores. Adicionalmente se observa que los genes hPL-3 y hPL-4 presentan valores muy similares para esta versión del promotor.

Por otro lado, la comparación entre cada versión del promotor de cada gen se muestra en la figura 17. Se realizó un análisis de varianza para cada gen en sus tres versiones, 500, 140 y 70 pb. El análisis no mostró diferencias significativas entre las mediciones, lo que indica que para un mismo gen el potencial transcripcional entre las tres versiones de promotor ensayadas no es mayor que la variabilidad observada entre los ensayos.

4.3 Transcripción *in vitro* con extractos de placenta

4.3.1 Semipurificación de extractos de placenta

Una vez que se obtuvo el extracto crudo, se procedió semipurificarlo por medio de cromatografía de afinidad (heparina-safarosa) y de intercambio aniónico (DEAE-celulosa). En la figura 18

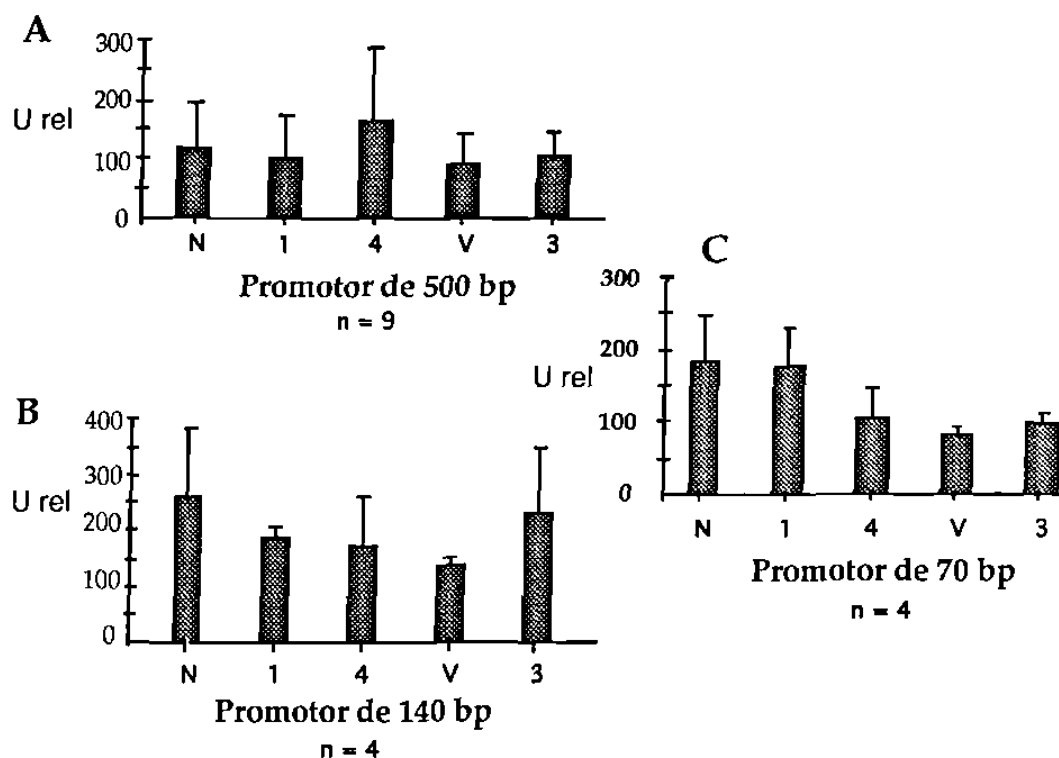


Figura 16. Comparación del potencial transcripcional de cada gen en ensayos de transcripción. Las tres gráficas representan el promedio de varias mediciones del índice transcripcional de cada gen así como la desviación estandar de las mismas.

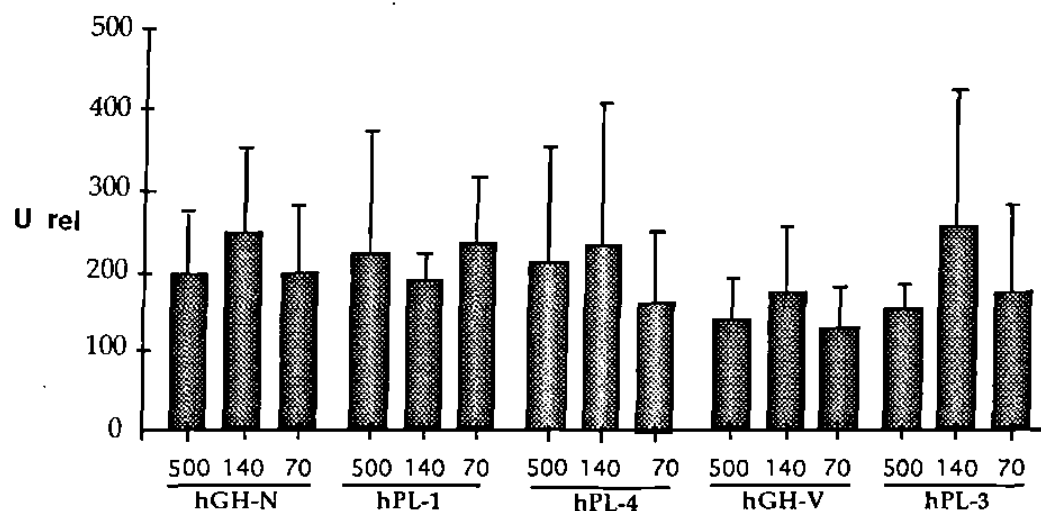
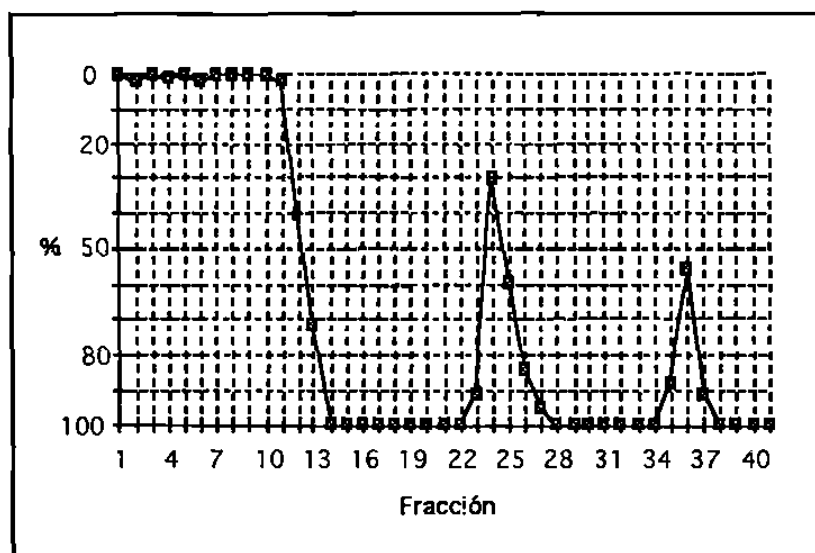


Figura 17. Comparación entre las tres versiones del promotor de cada uno de los genes del complejo hGH-hPL. Se graficó el promedio de los índices transcripcionales obtenidos por cada promotor y la desviación estandar asociada.

se muestran las gráficas de elución de las proteínas en función de la concentración de KCl, para cada cromatografía. Las fracciones que corresponden al máximo del pico de elución fueron colectadas para utilizarlas, una vez dializadas en los ensayos de transcripción. Se siguió el mismo protocolo ya descrito para los ensayos con los extractos de células HeLa (ver material y métodos).

A



B

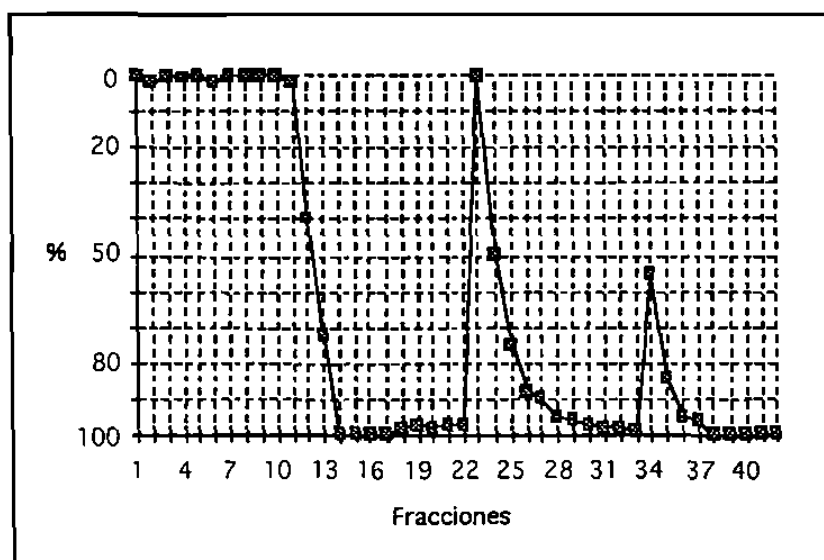


Figura 18 Perfiles cromatográficos de las columnas de heparina-sefarosa (a) y DEAE-celulosa (b). Se graficaron los perfiles cromatográficos (% de transmitancia) de cada una de las columnas utilizadas para la semipurificación de los extractos crudos de placenta.

4.3.2 Transcripción *in vitro* con los extractos de placenta

En la figura 19 se presenta uno ensayo representativo de transcripción *in vitro* con los extractos de placenta. En esta figura se observan los transcritos derivados de cada uno de los genes en sus tres versiones. Estos productos de transcripción presentan el tamaño de aproximadamente 460 pb.

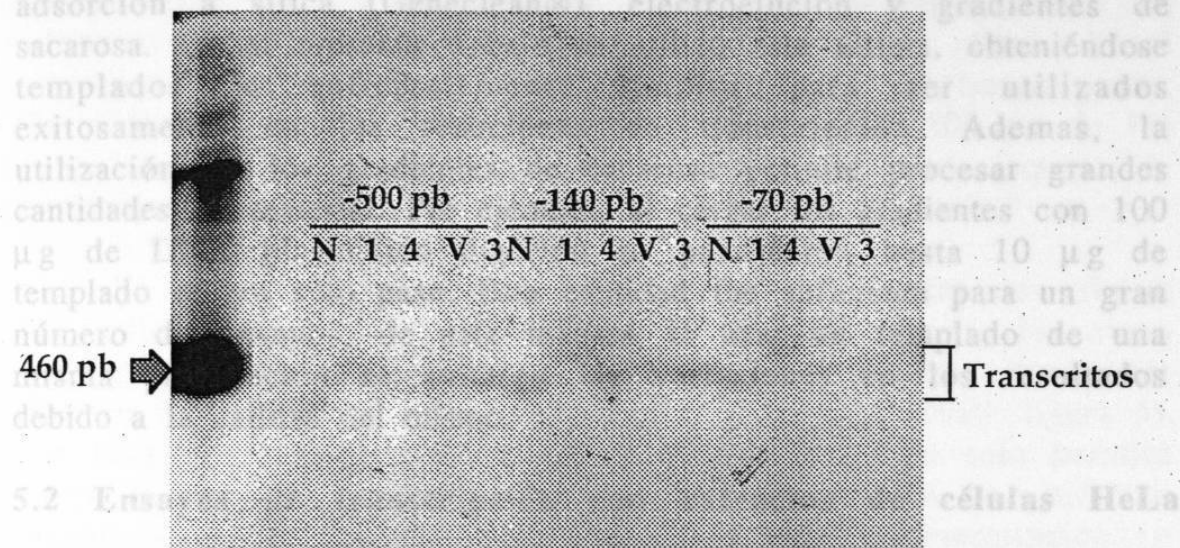


Figura 19. Ensayo de transcripción *in vitro* utilizando extractos de placenta. Se observa el resultado de un ensayo de transcripción *in vitro* utilizando los 15 templados del complejo hGH-hPL.

Se utilizaron extractos crudos de células HeLa con la ventaja de que este sistema ha sido ampliamente utilizado en la descripción de los promotores. Este ha sido el más utilizado en sistemas de transcripción *in vitro* desde el desarrollo de esta técnica (Manley J.L. et al. 1980).

Las condiciones utilizadas para las reacciones de transcripción *in vitro* en este trabajo fueron reportadas por el grupo de J.M. Egly y colaboradores (Gerard M. et al. 1991), los cuales optimaron los ensayos de transcripción con extractos de HeLa y el AdMLP como templado. Estas condiciones permitieron obtener una señal abundante para el templado de AdMLP y una buena señal en el caso de los templados derivados del complejo hGH-hPL (figura 12). Sin embargo, se utilizó casi el doble de templado derivado de los genes del complejo hGH-hPL para obtener una señal comparable con la obtenida con el templado de AdMLP. Varias razones podrían explicar

CAPITULO 5

Discusión

5.1 Templados para transcripción *in vitro*

Han sido descritas diversas técnicas para la purificación de templados para transcripción *in vitro*, como purificación por adsorción a sílica (Geneclean®), electroelución y gradientes de sacarosa. En el presente trabajo se utilizó esta última, obteniéndose templados lo suficientemente limpios para ser utilizados exitosamente en las reacciones de transcripción. Además, la utilización de los gradientes de sacarosa permite procesar grandes cantidades de material. Por ejemplo, al cargar los gradientes con 100 μ g de DNA plasmidico digerido se purificaron hasta 10 μ g de templado en un sólo paso. Esta cantidad fue suficiente para un gran número de ensayos, de esta manera al usar un templado de una misma preparación se evitaron las variaciones en los resultados debido a la calidad del mismo.

5.2 Ensayos de transcripción con extractos de células HeLa

Se utilizaron extractos crudos de células HeLa con la ventaja de que este sistema ha sido ampliamente estudiado y que la mayoría de las proteínas reguladoras presentes en estas células han sido descritas (Ge H. *et al.* 1996). Como templado testigo se utilizó el promotor AdMLP, caracterizado por N.G. Miyamoto y colaboradores (1984), quienes identificaron las regiones básicas necesarias para su funcionamiento. Este ha sido el más utilizado en sistemas de transcripción *in vitro* desde el desarrollo de esta técnica (Manley J.L. *et al.* 1980).

Las condiciones utilizadas para las reacciones de transcripción *in vitro* en este trabajo fueron reportadas por el grupo de J.M. Egly y colaboradores (Gerard M. *et al.* 1991), los cuales optimaron los ensayos de transcripción con extractos de HeLa y el AdMLP como templado. Estas condiciones permitieron obtener una señal abundante para el templado de AdMLP y una buena señal en el caso de los templados derivados del complejo hGH-hPL (figura 12). Sin embargo, se utilizó casi el doble de templado derivado de los genes del complejo hGH-hPL para obtener una señal comparable con la obtenida con el templado de AdMLP. Varias razones podrían explicar

estas diferencias a saber, el potencial diferencial intrínseco entre los promotores o que las condiciones óptimas para cada uno de los genes hGH-hPL no fuesen las mismas.

Las tres versiones de los promotores de los genes del complejo hGH-hPL pudieran dirigir la transcripción en el sistema derivado de HeLa (figura 13) incluyendo la versión reducida de 70 pb, la cual incluye las secuencias mínimas necesarias para dirigir la transcripción (Lewin B. 1994 y Hawkins J.D. 1996). La utilización de un promotor reducido a la caja TATA (34 pb en el caso del adenovirus) es suficiente para obtener una señal basal correspondiente a la acción del complejo básico de transcripción. Hasta la fecha, las regiones promotoras menores de 500 pb de los genes hGH-hPL no habían sido probados en un sistema de transcripción *in vitro*.

El tamaño de los transcritos obtenidos (460 nucleótidos, figura 13) indica que la transcripción derivada de cada uno de los cinco templados se inició en la posición +1, ya descrita para estos genes (Barrera-Saldaña H.A. *et al.* 1982 y Chen E.Y. *et al.* 1989, figura 5). Por lo tanto, el sistema derivado de células HeLa no sólo permitió dirigir la transcripción a partir de los templados usados sino también iniciar ésta en el sitio correcto. En los ensayos de transcripción *in vitro* se observó un tamaño ligeramente mayor del transcrito del gen hPL-1, debido al tamaño algo mayor del templado utilizado en comparación con el resto (Barrera-Saldaña H.A., datos no publicados).

5.2.1 Ensayos con los genes del complejo con las tres versiones de promotor

El análisis comparativo de las señales obtenidas para cada longitud del promotor de los cinco genes del complejo se dificultó por la variabilidad que se obtuvo entre los ensayos de transcripción (figura 14). Como se puede observar en la figura 15, al colocar en un sólo gel repeticiones del mismo experimento se obtienen diferencias entre las intensidades de las bandas del transcrito. Una de las principales causas de esto es la variabilidad en la técnica, la cual implica varios pasos críticos, como la extracción del RNA, la aplicación de las muestras en el gel entre otros. En conclusión, la variación observada no permitió poner en evidencia diferencias significativas a nivel estadístico que pudieran existir entre el potencial transcripcional de estos promotores y las diferentes versiones en longitud.

Aún y con estas variaciones, las gráficas arrojan datos interesantes. Al comparar el potencial transcripcional de los cinco promotores se observa que no existen diferencias notables entre sí (Figura 16). Sin embargo, el promotor del gen hGH-V muestra una tendencia a una transcripción más débil que el resto de los promotores probados. Esta observación es más evidente para la versión de 70 pb del promotor (figura 16, gráfica C). Si se revisa la región que abarca los 70 pb del promotor (figura 5), se observan varios cambios nucleotídicos: 12 diferencias nucleotídicas con al menos uno de los otros genes del complejo; cuatro de éstas corresponden a diferencias que se presentan exclusivamente en este gen (Figura 5), las más relevantes son los cambios situados en la región de unión del receptor de la hormona T₃ (TBE, figura 5), cambiando la secuencia "GGCA" conservada en el resto de los genes y reportada como importante para la unión de este receptor (Voz M.L. *et al.* 1991 y 1992). Sin embargo, no se puede atribuir a éstas la disminución en el potencial transcripcional del gen hGH-V al menos en los experimentos realizados en este trabajo.

Las diferencias observadas en el índice transcripcional de cada versión de promotor utilizado son mínimas (figura 17). Sólo la versión de 140 pb posee una tendencia aparente hacia una transcripción más intensa en casi todos los promotores a excepción del promotor del gen hPL-1 (figura 17), aunque lo disperso de los datos impide considerar estas diferencias como significativas. Cada versión incluye elementos diferentes de regulación. En comparación a la versión de 500 pb, la de 140 pb carece de los sitios de unión a USF (Courtois S.J. *et al.* 1992) y NF₁-AP-2 (Courtois S.J. *et al.* 1990). Mientras que en la versión de 70 pb, se pierden el sitio de unión a Sp1 (Lemaigre F.P. *et al.* 1989b), Pit-1 (Bodner M. *et al.* 1987 y Castrillo J.L. *et al.* 1989) y Zn-15 (Lipkin S.M. *et al.* 1993), permaneciendo sólo la caja TATA y el sitio de unión a T₃ (Voz M.L. *et al.* 1991 y 1992) y el iniciador (InrE, Jiang S.W. *et al.* 1995).

Los resultados tan similares en potencial transcripcional indicarían que en este sistema derivado de células HeLa se observa sólo la transcripción basal de estos promotores y que la intervención de los factores que unen algunas de las regiones de los promotores es mínima, al menos en estas condiciones. Se ha reportado que el AdMLP puede disminuir su eficiencia de transcripción entre 10 a 20 veces si se elimina la región de unión a USF en un sistema de transcripción *in vitro* derivado de células HeLa como éste (Sawadogo

M. *et al.* 1985). Si bien no todos los factores transcripcionales citados están presentes en el extracto de células HeLa, como Pit-1 o el iniciador, se sabe que por lo menos están Spl (Jackson S.P. *et al.* 1989), NF κ B, AP-2 (Descheemaeker K.A. *et al.* 1992), USF (Sawadogo M. *et al.* 1985) y Zn-15 (Lipkin S.M. *et al.* 1993). Por lo tanto, teóricamente podrían potenciar la transcripción al unirse a templados con los sitios de unión respectivos.

Una razón por la que no se observó el efecto de los factores potenciadores sobre la transcripción de estos templados, podría ser la cantidad de templado, usado que en este caso fue de dos veces la utilizada para AdMPL. Si la concentración de estos factores es limitada en los extractos y la cantidad de moléculas de templado es muy alta, estos últimos podrían competir por la unión de las proteínas y disminuir así la eficiencia de la activación sobre el complejo transcripcional. Sin embargo, generalmente en los ensayos de competición que se utilizan en experimentos de "footprinting" (Galas D.J. *et al.* 1978) se requieren cantidades hasta 10 veces mayores de competidor para evidenciar el efecto. Una explicación más viable sería la ausencia de algún elemento regulador crucial en la función de los factores potenciadores generales, a saber Pit-1 para el gen hGH-N y las proteínas que unen al iniciador para los genes hPLs y hGH-V.

5.3 Sistema de transcripción derivado de placenta

Uno de los objetivos del trabajo fue desarrollar un sistema de transcripción *in vitro* derivado de extractos de placenta, el cual es el más idóneo para el estudio de la transcripción de genes hPLs y hGH-V, los cuales se expresan en éste tejido.

5.3.1 Semipurificación de los extractos de placenta

Por trabajos previos realizados sobre extractos crudos de placenta como fuente de la maquinaria transcripcional (Revol A., datos no publicados), se sabía que éstos no tenían la actividad de transcripción. Sin embargo, aplicando técnicas de purificación ya descritas para otros sistemas derivados de células HeLa (Gerard M. *et al.* 1991) o levaduras (Moncollin V., comunicación personal) se logró obtener extractos con actividad de transcripción.

Se realizaron sucesivamente dos cromatografías para obtener a partir del extracto placentario, las proteínas de la maquinaria transcripcional. La primera consistió en una columna de afinidad

sobre heparina-sefarosa, que retiene la mayoría de las proteínas que se unen al DNA, una elución a 600 mM de KCl permite recuperar la mayoría de los factores transcripcionales. Sin embargo, algunos de ellos (como TFIIA) no se unen con eficiencia a la columna, y pasan en el filtrado. Estos se pueden purificar, al pasar el filtrado de la primera columna por una cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-celulosa), y al eluirla a 350 mM de KCl se recupera el resto de los factores. La mezcla de los eluidos de las dos columnas permite reconstituir un sistema con actividad transcripcional. Los perfiles cromatográficos obtenidos en los ensayos de separación mostrados en la figura 18, son representativos de varios ensayos realizados, en todos se registró el mismo perfil de elución por lo que se considera que la técnica fue reproducible.

Los primeros ensayos, tanto de purificación como de transcripción, se tuvieron que realizar en el mismo día, ya que los extractos perdían notablemente la actividad al congelarse. Sin embargo, al aumentar la concentración protéica de los mismos se obtuvieron fracciones más estables. Esto se logró incrementando la cantidad de tejido inicialmente procesado (hasta 80 g). La concentración de las fracciones protéicas fué el doble que las provenientes de los extractos iniciales, los cuales partían de 20 g de tejido. Los extractos más concentrados fueron los que mantuvieron la actividad aún y después de varios ciclos de congelación y descongelación. Además, mostraron en varios ensayos sucesivos una actividad transcripcional similar (datos no mostrados).

5.3.2 Ensayos de transcripción

Para probar los extractos semipurificados de placenta se utilizó inicialmente el promotor de adenovirus, el cual no dió señal para estos ensayos. Posteriormente se recurrió al uso de los templados de los genes del complejo hGH-hPL, utilizando las mismas condiciones de reacción que para los ensayos con extractos de células HeLa se obtuvo señal. Para estos experimentos se utilizó una cantidad de templado mayor que en los ensayos con extractos de células HeLa (400 ng por muestra), alcanzándose así a obtener una señal, que si bien fue débil, fue reproducible a lo largo de varias repeticiones de estos ensayos (figura 19).

La razón por la que los templados de adenovirus no dieron señal en este sistema placentario no está aún clara. En el sistema derivado de células HeLa el adenovirus produjo una señal más

abundante que cualquiera de los templados o variantes de los genes del complejo hGH-hPL. Sin embargo, en estos ensayos se utilizó un templado que incluía una región del AdMLP de aproximadamente 130 pb en el cual está el sitio de unión al factor de transcripción USF (Sawadogo M. *et al.* 1985), mientras que en los ensayos con extractos de placenta se utilizó una versión menor del promotor (PM34), la cual sólo contiene 34 pb del mismo (Miyamoto N.G. *et al.* 1984). Al utilizarse un promotor con sólo la caja TATA se obtendría sólo una transcripción basal. Sin embargo, se ha reportado que el PM34 se ha utilizado de manera exitosa en varios trabajos (Miyamoto N.G. 1984, 1985 y Gerard M. *et al.* 1991), más estos fueron realizados en sistemas de transcripción derivados de células HeLa. Esto implica que en el caso del sistema placentario, al optimizarlo podría observarse un nivel basal de transcripción *in vitro* para éste promotor viral.

Si bien los resultados de los ensayos en placenta no permitieron comparar el potencial transcripcional de los cinco promotores, como lo fue posible en el sistema derivado de células HeLa, los datos obtenidos fueron interesantes. Por ejemplo, se observó que el promotor del gen hGH-N a pesar de su expresión específica en la hipófisis, muestra una transcripción a niveles similares que los otros genes del complejo en este sistema producido a partir de placenta. Además, en estos ensayos tampoco observamos diferencias muy marcadas entre los potenciales de transcripción en los promotores de los genes y las diferentes versiones usadas, a pesar de que *in vivo* pueden ser hasta en cuatro ordenes de magnitud (Chen E.Y. *et al.* 1989).

Sin embargo, estos resultados son preliminares y necesitan ser corroborados utilizando para ello un sistema mejor caracterizado además de un testigo interno que permita la cuantificación las señales obtenidas.

Finalmente, se logró obtener un sistema de transcripción *in vitro* derivado de placenta, en el cual los promotores del complejo hGH-hPL pudieron dirigir una transcripción sitio específica. Este sistema de transcripción derivado de placenta es una nueva alternativa para el estudio de la regulación de la transcripción de genes como los del complejo multigénico hGH-hPL. Si bien es necesario caracterizarlo a fondo, muestra una actividad transcripcional y presenta ventajas sobre el sistema de HeLa. Por ejemplo, la facilidad de procesar grandes cantidades de tejido y costos de producción de estos extractos en comparación con el

proceso para la obtención de células HeLa en los que se emplean medios de cultivo y fermentadores muy caros. Por ser la placenta un órgano transcripcionalmente muy activo y con un sistema de receptores y segundos mensajeros muy complejo constituye una buena fuente para la obtención de la maquinaria transcripcional. De esta manera, este sistema de transcripción *in vitro* puede representar una nueva alternativa para el estudio de la regulación de la expresión génica en eucariotes.

CAPITULO 6

Conclusiones

De los experimentos realizados y los resultados obtenidos se derivan las siguientes conclusiones:

- Todas las versiones de los promotores de los genes del complejo son funcionales en el sistema de transcripción *in vitro* derivado de células HeLa.
- No se observan diferencias significativas entre los niveles de transcripción de los promotores y en las diferentes longitudes de los mismos, a excepción de hGH-V, el cual presenta una tendencia hacia un menor índice transcripcional.
- Las diferencias marcadas en los niveles de transcripción de estos genes observadas *in vivo* no se reflejan en los ensayos *in vitro* realizados en este trabajo.
- La semi-purificación de los extractos crudos de placenta mediante cromatografías de heparina-sefarosa y DEAE-celulosa permitió obtener un nuevo sistema de transcripción *in vitro*.
- Todos los promotores del complejo hGH-hPL son funcionales también en el sistema de transcripción *in vitro* derivado de placenta.

CAPITULO 7

Literatura consultada

- Barlow J.W., M.L. Voz, P.H. Eliard, M. Mathy-Hartert, P. DeNayer, I.V. Economidis, A. Belayew, J. Martial and G.G. Rousseau (1986) Thyroid hormone receptor bind to defined region of the growth hormone and placental lactogen genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**,9021-9025
- Barrera-Saladaña H.A., P.H. Seeburg and G.F. Saunders (1983) Two structurally different genes produce the same secreted human placental lactogen hormone. *J. Biol. Chem.* **258**,3787-3793
- Barrera-Saldaña H.A. (1982) Expression of human placental lactogen genes. Ph.D. Thesis, Graduate School of Biomedical Sciences Texas University
- Barrera-Saldaña H.A., D.L. Robberson and G.F. Saunders (1982) Transcriptional products of the human placental lactogen gene. *J. Biol. Chem.* **257**,12399-12404
- Barrera-Saldaña H.A., R. Ramírez-Solis, W.H. Waiker, S.L. Fitzpatrick, D. Resendez-Pérez and G.F. Saunders (1988) The human placental and growth hormone multi-gene family. In "Cell and Function Disease", Cañedo L.E., L.E. Todd, L. Parker and J. Jaz Editors, Plenum press, pp 33-57
- Barsh G.S., P.H. Seeburg and R.E. Gelinas (1983) The human growth hormone gene family: Structure and evolution of the chromosomal locus. *Nucleic Acids Res.* **11**,3939-3958
- Bodner M. and M. Karin (1987) A pituitary specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of non-expressing cells. *Cell* **50**,267-275
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**,248-254
- Calabretta B., D.L. Robberson, H.A. Barrera-Saldaña, T.P. Lambrou and G.F. Saunders (1982) Genome instability in region of human DNA enriched in *Alu* repeat sequences. *Nature* **296**,219-225

- Castrillo J.L., M. Bodner and M. Karin (1989) Purification of growth hormone transcription factor GHF-1 containing homeobox. *Science* **243**,814-819
- Cattini P.A., L.N. Perit, T.R. Anderson, J.D. Baxter and N.L. Eberhardt (1986a) The 5'-flanking sequences of the human growth hormone gene contain a cell specific control element. *DNA* **5**,503-509
- Cattini P.A., T.R. Anderson, J.D. Baxter, P. Mellon and N.L. Eberhardt (1986b) The human growth hormone gene regulated by tri-iodo thyronine when transfected into rat pituitary tumour cells. *J.Biol. Chem.* **261**,13367-13372
- Cattini P.A. and N.L. Eberhardt (1987) Regulated expression of chimeric genes containing 5'-flanking regions of human growth hormone related genes in transiently transfected rat anterior pituitary tumor cells. *Nucleic Acids Res.* **15**,1297-1309
- Chen E.Y., Y.C. Liao, D.H. Smith, H.A. Barrera-Saladaña, R.E. Gelinas and P.H. Seeburg (1989) The human growth hormone locus: nucleotide sequences, biology and evolution. *Genomics* **4**,479-497
- Courtois S.J., D.A. LaFontaine, F.P. Lemaigre, S.M. Durvieux and G.G. Rousseau (1990) Nuclear Factor-1 and Activator Protein-2 bind in a mutually exclusive way to overlapping promoter sequence and trans-activate the human growth hormone gene. *Nucleic Acids Res.* **18**,57-64
- Courtois S.J., D.A. LaFontaine and G.G. Rousseau (1992) Characterization of an alternative promoter in the human growth hormone gene. *J. Biol. Chem.* **267**,19736-19743
- Dana S. and M. Karin (1989) Induction of human growth hormone promoter activity by the adenosine 3'5'-Monophosphate pathway involves a novel responsive element. *Mol. Endocrin.* **3**,815-821
- Darnell J., H. Lodish and D. Baltimore (1986) Molecular Cell Biology. Scientific American Books, pp 441-420
- De Noto F.M., D.D. Moore and H.M. Goodman (1981) Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* **9**,3719-3730

- Descheemaeker K.A., S. Wyns, L. Nelles, J. Auwerx, T. Ny and D. Collen (1992) Interaction of Ap-1, Ap-2 and Sp1-like proteins with two distinct sites in the upstream regulatory region of the plasminogen activator inhibitor-1 gene mediates the phorbol 12-myristate, 13-acetate response. *J. Biol. Chem.* **267**,15086-15091
- Dignam J.D., R.M. Lebovitz and R.G. Roeder (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids. Res.* **11**,1475-1489
- Fitzpatrick S.L., W.H. Walker and G.F. Saunders (1990) DNA sequences involved in the transcription activation of a human placental lactogen gene. *Mol. Endocrin.* **4**,1815-1826
- Frankenne F., F. Rentier-Delrue, M.L. Scippo, J. Martial and G. Hennen (1987) Expression of the growth hormone variant gene in human placenta. *J. Clin. Endocrin. Metab.* **64**,635-637
- Gerard M., L. Fischer, V. Moncollin, J.M. Chipoulet, P. Chambon and J.M. Egly (1991) Purification and interaction properties of the human RNA polymerase B(II) general transcription factor BTF2. *J. Biol. Chem.* **266**,20940-20945
- Galas D.J. and A. Schimitz (1978) DNase footprinting, a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.* **5**,3157-3170
- Ge H., E. Martínez, C.M. Chiang and R.G. Roeder (1996) Activator-dependent transcription by mammalian RNA polymerase II: *in vitro* reconstitution with general transcription factors and cofactors. *Methods in Enzymology* **274**,57-71
- George D.L., J.A. Phillips III, U. Francke and P.H. Seeburg (1981) The genes from growth hormone and chorionic somatomammotropin are on the long arm of the chromosome 17 in region q21-q22. *Hum. Genet.* **57**,138-141
- Handwerger S., J. Myers, R. Richards, B. Richardson, L. Turzai, C. Moeykins, T. Meyers and G.M. Ananthanamahiah (1995) Apolipoprotein A1 stimulates placental lactogen expression by human trophoblast cells. *Endocrinology* **136**,5555-5560

- Harper M.E., H.A. Barrera-Sladaña and G.F. Saunders (1982) Chromosome localization of the human placental lactogen-growth hormone gene cluster to 17q22-24. *Am. J. Hum. Genet.* **34**,227-234
- Hawkings J.D. (1996) Gene structure and expression. 3° Ed. Cambridge University press, pp. 98-106
- 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
- Ingraham H.A., R. Chen, H.J. Mangalam, H.P. Elsholtz, S.F. Flynn, C.R. Lin, D.M. Simmons, L. Swanson and M.G. Rosendfeld (1988) A tissue specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* **55**,519-529
- Jackson S.P. and R. Tjian (1989) Purification and analysis of RNA polymerase II transcription factors by using wheat germ agglutinin affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **86**,1781-1785
- Jacquem P., E. Alsat, C. Oury, A. Belayew, J.A. Martial and D. Evain-Brion (1993) Efficient lipofection of human trophoblast cells in primary cultures. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **193**,376-381
- Jiang S.W., A.R. Sephard and N.L. Eberhardt (1995) An initiator element is required for maximal human chorionic somatomammotropin gene promoter and enhancer function. *J. Biol. Chem.* **270**,3683-3692
- Karin M, J.L. Castrillo and L.E. Thiell (1990) Growth hormone gene regulation: a paradigm for cell-type specific gene activation. *Trends in Genetics* (TIG) **6**,92-96
- Kidd V.J. and G.F. Saunders (1982) Linkage arrangement of human placental lactogen and growth hormone genes. *J. Biol. Chem.* **257**,10673-10680
- Klassen M.E., M.W. Nachtigal and P.A. Cattini (1989) Human chorionic somatomammotropin gene expression in primary placental cells culture. *Placenta* **10**,321-329

- Labarrière N., P.L. Selvais, F.P. Lemaigre, A. Michel, D.M. Maiter and G.G. Rousseau (1995) A novel transcriptional activator originating from an upstream promoter in the human growth hormone gene. *J. Biol. Chem.* **270**,19205-19208
- Lefevre C., I. Imagawa, S. Dana, J. Grindlay, M. Bodner and M. Karin (1987) Tissue specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific transacting factor. *EMBO J.* **6**,971-981
- Lemaigre F.P., B. Peers, D.A. LaFontaine, M. Mathy-Hartert, G.G. Rousseau, A. Belayew and J.A. Martial (1989a) Pituitary specific factor binding to the human prolactin, growth hormone and placental lactogen genes. *DNA* **8**,149-159
- Lemaigre F.P., S.J. Cortois, D.A. LaFontaine and G.G. Rousseau (1989b) Evidence that the upstream stimulatory factor and the Sp1 transcription factor bind *in vitro* to the promoter of the human growth hormone. *Eur. J. Biochem.* **181**,555-561
- Lewin B. (1994) *Genes* V 3rd Ed. Oxford University Press pp. 860-869
- Liebhaber S.A., M. Urbane, J. Ray, R.S. Tuan and N.E. Cooke (1989) Characterization and histological localization of human growth hormone variant gene expression in the placenta. *J. Clin. Invest.* **83**,1985-1991
- Lipkin S.M., A.M. Näär, K.A. Kalla, R.A. Sack and M.G. Rosenfeld (1993) Identification of a novel zinc finger protein binding: a conserved element critical for Pit-1 dependent growth hormone gene expression. *Gen. & Dev.* **7**,1674-1687
- Lytras A., M.E. Bock, J.G. Dodd and P.A. Cattini (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**,2461-2467
- MacLeod J.N., A.K. Lee, S.A. Lieberhardt and N.E. Cooke (1992) Developmental control and alternative splicing of the placental expressed transcripts from the human growth hormone gene cluster. *J. Biol. Chem.* **267**,14219-14226

- Manley J.L., A. Fire, A. Cano, P.A. Sharp and M.L. Gefter (1980) DNA-dependent transcription of adenovirus genes in a soluble whole-cell extract. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **77**,3855-3859
- Martínez-Rodríguez H.G., N.E. Guerra-Rodríguez, M.A. Iturbe-Cantú, A. Martínez-Torres and H.A. Barrera-Saldaña (1997) Expression of the human placental lactogen and variant growth hormone genes in placentas. *Arch. of Medical Res.* en prensa
- Miyamoto N.G., V. Moncollin, M. Wintzerith, R. Hen, J.M. Egly and P. Chambon (1984) Stimulation of *in vitro* transcription by the upstream element of the adenovirus-2 major late promoter involves a specific factor. *Nucleic Acids Res.* **12**,8779-8799
- Miyamoto N.G., V Moncollin, J.M. Egly and P. Chambon (1985) Specific interaction between a transcription factor and the upstream element of the adenovirus-2 major late promoter. *EMBO J.* **4**,3563-3570
- Moore D.D., A.R. Marks, D.I. Buckley, G. Kapler, F. Pavvar and H. M. Goodman (1985) The first intron of the human growth hormone gene contains a binding site for a glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**,699-702
- Moore D.D., M.A. Conkling, H.M. Goodman (1982) Human growth hormone: a multigene family. *Cell* **29**,285-286
- Nachtigal M.W., B.E. Nickel, M.E. Klassen, W.G. Zhang, N.L. Eberhardt and P.A. Cattini (1989) Human chorionic somatomammotropin and growth hormone gene expression in rat pituitary tumor cells is dependent on a proximal promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **17**,4327-4337
- Nachtigal M.W., B.E. Nicke and P.A. Cattini (1993) Pituitary-specific repression of placental members of the human growth hormone gene family. *J. Biol. Chem.* **268**,8473-8479
- Niall H.D., M.L. Hogan, R. Sauer, I.Y. Rosenblum and F. C. Greenwood (1971) Sequence of pituitary and placental lactogenic growth hormone: evolution from primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**,866-869

- Nickel B.E., E. Kardami and P.A. Cattini (1990a) Differential expression of human placental growth hormone variant and chorionic somatomammotropin in culture. *Biochem. J.* **267**,653-658
- Nickel B.E. and P.A. Cattini (1991a) Tissue specific expression and thyroid hormone regulation of the endogenous placental growth hormone and chorionic somatomammotropin genes in human choriocarcinoma cell line. *Endocrinology* **128**,2353-2359
- Nickel B.E., M.W. Nachtigal , M.E. Bock and P.A. Cattini (1991b) Differential binding of rat pituitary specific nuclear factors to the 5'-flanking region of pituitary and placental members of the human growth hormone gene family. *Mol. Cell. Biochem.* **106**,181-187
- Nickel B.E., M.E. Bock, M.W. Natchigal and P.Cattini (1993) Differential expression of human placental growth hormone variant and chorionic somatomammotropin genes in choriocarcinoma cells treated with methatrexate. *Mol. Cell. Endocrin.* **91**,159-166
- Reséndez-Pérez D., R. Ramírez-Solís, A. Varela-Echavarria, H.G. Martínez-Rodríguez and H.A. Barrera-Saldaña (1990) Coding potential of transfected human placental genes. *Nucleic Acids Res.* **18**,4665-4670
- Rogers B.L., M.G Sobnosky and G.F. Saunders (1986) Transcriptional enhancer within the human placental lactogen and growth hormone multigene cluster. *Nucleic Acids Res.* **14**, 7647-7659
- Sambrook J., F.F. Fritsch and T. Maniatis (1989) Molecular cloning, A laboratory manual. 2° Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sawadogo M. and R.G. Roeder (1985) Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell* **43**,165-175
- Seeburg P.H., J. Shine, J.A. Martial, A. Ullrich, J.D. Baxter and H. M. Goodman (1977) Nucleotide sequence of part of the gene for human chorionic somatomammotropin: purification of DNA complementary to predominant mRNA species. *Cell* **2**,157-165

- Selvanayagam C.S., S.Y. Tsai, M.J. Tsai, P. Selvanayagam and G.F. Saunders (1984) Multiple origins of transcription for the human placental lactogen genes. *J. Biol Chem.* **259**,14642-14646
- Slater E.P., O. Rabenau, M. Karin, J.D. Baxter and M. Beato (1985) Glucocorticoid binding and activation of an heterologous promoter by dexamethasone by the first intron of the human growth hormone gene. *Mol. Cell. Biol.* **5**,2984-2992
- Stephanou A., N.J. Sarlis, R. Richards and S. Handwerger (1994a) Expression of retinoic acid receptor subtypes and cellular retinoic acid binding protein-II mRNAs during differentiation of human trophoblasts cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **202**,722-780
- Stephanou A. and S. Handwerger (1994b) Interleukin-6 stimulates placental lactogen expression by human trophoblast cells. *Endocrinology* **135**,719-723
- Stephanou A., R. Ross and S. Handwerger (1994c) Regulation of human lactogen expression by 1,25 Dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* **135**,2651-2656
- Stephanou A. and S. Handwerger (1995a) Retonic acid and thyroid hormone regulate placental lactogen expression in human trophoblast cells. *Endocrinology* **136**,933-938
- Stephanou A. and S. Handwerger (1995b) Identification of a composite steroid hormone response element on the human placental lactogen promoter. *Mol. Cell. Endocrin.* **112**,123-129
- Tansey W.P. and D.F. Cantanzaro (1991) Sp1 and thyroid hormone receptor differentially active expression of human growth hormone and chorionic somatomammotropin genes. *J. Biol. Chem.* **266**,9805-9813
- Voz M.L., B. Peers, A. Belayew and J.A. Martial (1991) Characterization of an unusual thyroid response unit in the promoter of the human placental lactogen gene. *J. Biol. Chem.* **266**,13391-13404
- Voz M.L., B. Peers, M.J. Wieding, P. Jaquemin, A. Belayew and J.A. Martial (1992) Transcription regulation by tri-iodothyronine requires synergistic action of the thyroid receptor with an other trans-acting factor. *Mol. Cell. Biol.* **12**,3991-3997

