

CAPITULO I

1. Introducción

La regulación de la expresión genética (REG) es una característica esencial de las células vivientes y se refiere al proceso por el cual el genoma o material genético es empleado para dar origen al fenotipo. De la cantidad de información genética contenida en todas las células, sólo una pequeña fracción es expresada como proteínas en cada organismo. En organismos pluricelulares, los mecanismos de control son muy finos permitiendo la diferenciación celular y la adaptación al medio ambiente.

La expresión de los genes se puede realizar a diferentes etapas del flujo de la información genética, la primera etapa es la síntesis del RNA o transcripción.

1.1. Regulación de la iniciación de la transcripción.

La activación transcripcional de los genes eucarióticos durante el desarrollo o en respuesta a señales intracelulares involucra el ensamblaje regulado de complejos multiproteicos sobre las regiones reguladoras: promotores, y regiones potenciadoras (enhancers) o inhibidoras (silenciadores). La iniciación de la transcripción es uno de los puntos de control más importantes de la regulación de la expresión genética, siendo en procariotes el principal. Esta regulación está dada principalmente por interacciones entre secuencias específicas del DNA que pueden localizarse a distancias variables del sitio de iniciación (llamados *elementos cis*) y una colección de proteínas, muchas de las cuales se unen a estas secuencias (llamadas *factores de transcripción*) y que actúan en *trans* induciendo o reprimiendo la expresión.

que serán activados, y formando la maquinaria transcripcional, al ensamblarse en el sitio donde inicia la síntesis del RNA mensajero (RNAm) son transcritos por la RNA polimerasa II, la cual transcribe casi exclusivamente a los genes que codifican para proteínas (también lo hace con algunos RNAs pequeños nucleares)¹.

Más de una docena de factores transcripcionales están implicados tanto en la formación del complejo de transcripción basal de los RNAm como en su estabilización. Estas proteínas se ensamblan sobre el promotor de los genes por etapas. El complejo final controla el grado en el cual la enzima RNA polimerasa II comienza a llevar a cabo un paso central en la síntesis de una proteína, la iniciación de la transcripción.

Entre los elementos *cis* más importantes que reconoce el aparato de transcripción basal en el promotor de un gran número de genes está una secuencia consenso llamada "Caja TATA" que se localiza a ~30 pb río arriba (o 5') del sitio de iniciación de la transcripción. El primer paso en la formación del complejo de transcripción basal (Figura 1), es la unión del factor TBP (Proteína de unión a TATA) a la secuencia TATA. Una vez que TBP se une al DNA se unen otras subunidades llamadas TAFs (factores asociados a TBP)².

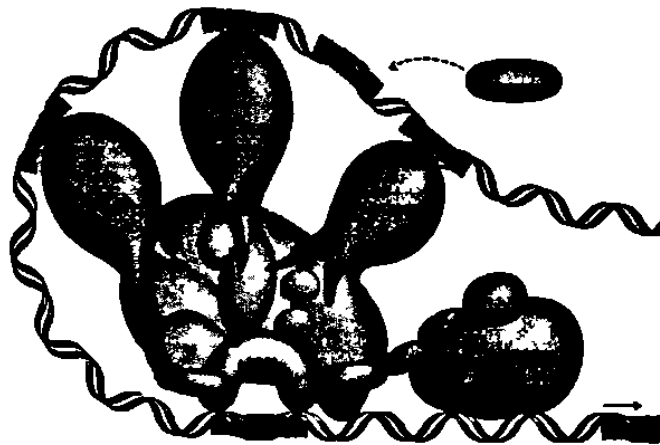


Figura 1. Esquema del aparato de transcripción. Consiste de cuatro componentes: los factores basales, los activadores, los represores y los co-activadores. Tomado de Tjian R (1995).

1.2. Modulación de la transcripción.

El aparato molecular que controla la transcripción en células humanas consiste de cuatro grupos de componentes. Los factores basales son aquellos esenciales para la transcripción no modulada o transcripción basal, pero no pueden por ellos mismos aumentarla o disminuirla. Esta tarea de modular la transcripción basal recae sobre otros factores transcripcionales conocidos como activadores y represores, que varían de un gen a otro. Los factores activadores y represores, se unen a secuencias localizadas dentro del promotor o en regiones distantes de hasta 10 Kb del promotor basal. Estos se comunican con los factores basales a través de coactivadores proteicos que están unidos en un complejo hermético a TBP, y van a activar o reprimir la actividad del gen³.

1.3. El complejo multigénico hGH-hPL

Los primeros estudios realizados para comprender los mecanismos de la regulación transcripcional de las células animales, fueron utilizando como modelo los promotores virales, (vrg. el promotor tardío del adenovirus, entre otros)⁴. Sin embargo, después la expresión de los propios genes de las células también fue estudiada. Entre éstos destaca el complejo multigénico hGH-hPL, que representa un modelo ideal para investigar los mecanismos moleculares por los cuales, genes estrechamente relacionados expresan hormonas relacionadas en tejidos distintos⁵.

La hormona del crecimiento humano (HGH) y el lactógeno placentario (HPL) también llamado somatomamotropina corionica o HCS, son miembros de una familia de proteínas que incluye también a la prolactina (PRL). Estas hormonas derivan de un ancestro común y comparten una alta similitud tanto a nivel nucleotídico como aminoacídico. Sin embargo, difieren drásticamente en sus funciones fisiológicas y en los mecanismos regulatorios de su expresión (Figura 2).

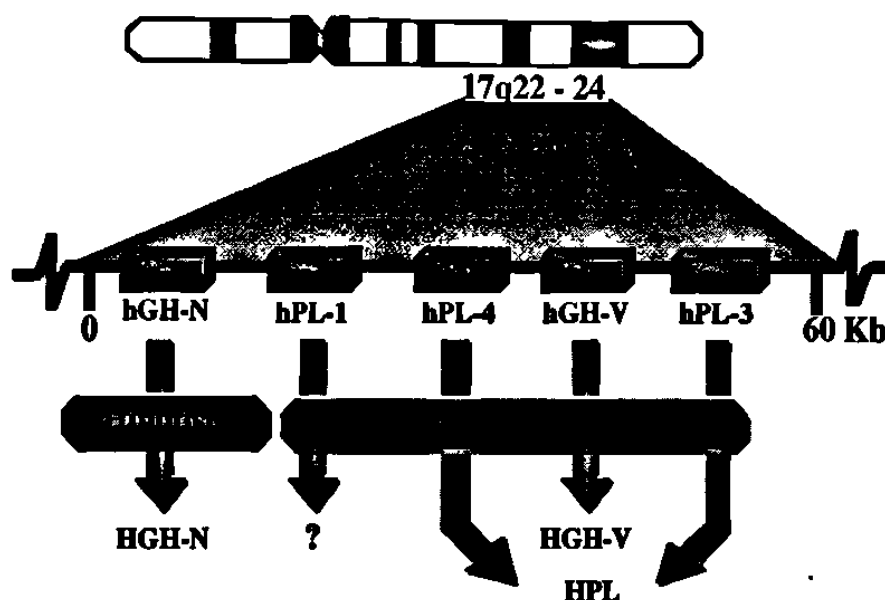


Figura 2. El complejo hGH-hPL. Tres genes de hPL y dos de hGH están localizados en una región de 60 Kpb del cromosoma 17 entre las bandas q22-24.

En el humano los genes que codifican para HGH y HPL se agrupan en una región de 66,500 pb del brazo largo del cromosoma 17 entre las bandas q22-24. El locus está constituido por cinco genes 5' a 3': hGH-N, hPL-1, hPL-4, hGH-V y hPL-3; los cuales presentan la misma orientación y están separados por regiones intergénicas de 6 a 13 kpb⁵.

Los genes de hGH y hPL muestran un 95% de similitud nucleotídica a nivel de las regiones promotoras 5'. Sin embargo, estos genes son expresados de manera tejido-específica; HGH en los somatotrofos de la glándula pituitaria y HPL en el sincitiotrofoblasto de la placenta⁶. Los productos de expresión mejor conocidos del complejo génico son los polipéptidos HGH, y HPL.

El gen hGH-N genera a través de splicing diferencial de un transcrito primario, tanto *in vivo* como *in vitro*, dos isoformas para HGH una de 22 kDa (90%) y otra de 20 kDa (10%). El gen de hGH-V, cuya expresión ha sido demostrada únicamente en la placenta y en un solo tumor de pituitaria humano, genera *in vitro* una isoforma de 22 kDa. Sin embargo, no se ha encontrado ninguna isoforma de 20 kDa, en placenta este gen codifica para una proteína de unión a membrana de 26 kDa⁷.

Los genes hPL-4 y hPL-3 son activos en la placenta y codifican pre-hormonas que difieren en la posición de un solo aminoácido en el péptido señal, sin embargo, las hormonas son idénticas⁸. hPL-1 se considera un pseudogen ya que ningún producto proteico derivado de éste se ha identificado.

1.4. Estructura y función de HPL.

HPL es secretada por las células del sincitiotrofoblasto de la placenta como una proteína de una sola cadena polipeptídica de 22 kDa, contiene 191 residuos aa con dos enlaces disulfuro y no posee residuos de carbohidratos. La hormona madura es derivada de un precursor de 25 kDa que tiene una secuencia señal de 26 aa⁸.

HPL es mayoritariamente secretada en el suero materno donde alcanza concentraciones de 5-15 µg/ml. Esta proteína se encuentra en concentraciones muy bajas en la sangre fetal y en el líquido amniótico, de 300 a 1000 veces menos que en el suero materno¹⁰. HPL es detectable a partir de la tercera semana después de la concepción y se produce en cantidades importantes (hasta más de 1 g/día) al final del embarazo. En la placenta a término el RNAm de HPL representa más del 5% de la población total de RNAm¹⁰.

HPL recibe este nombre debido a su actividad lactogénica *in vivo* cuando se administra a animales de experimentación. Estudios recientes demuestran que HPL tiene un efecto somatotrópico y metabólico en tejidos aislados humanos; actúa como un antagonista de la insulina por inducir tolerancia a la glucosa, lipólisis y proteólisis en la madre, además de que promueve la transferencia de glucosa y aminoácidos al feto¹⁰.

Sin embargo, su importancia fisiológica no queda claramente demostrada, ya que la ausencia de producción de HPL durante el embarazo, no tiene consecuencias sobre el desarrollo fetal¹⁴.

1.5. Expresión tejido-específica de los genes hPL

Aunque las regiones intrónicas, exónicas y las flanqueantes de los genes de hGH y hPL son altamente homólogas (identidad de secuencia $\geq 93.5\%$), los mecanismos que controlan su expresión específica de tejido son diferentes.

La hormona HPL proviene de la actividad transcripcional de dos genes: hPL-3 y hPL-4; sin embargo, éstos no participan de la misma manera. La construcción de bancos de DNA complementario (DNAC) a partir de placenta, ha contribuido a investigar los niveles de expresión de estos dos genes. Mediante el uso de enzimas de restricción, métodos de extensión de primer y mapeo con la nucleasa S1, se encontró que el 40% de las clonas de DNAC de hPL habían derivado del gen de hPL-3, mientras que el 60% provino del gen hPL-4⁸. En otro banco de DNAC, sin embargo, se encontraron seis veces más clonas de hPL-4 que clonas de hPL-3⁵. El rango de RNAm de hPL-4 y de hPL-3 en estudios *in vitro* varia de 2:1 a 10:1¹⁵. Recientemente, Martínez-Rodríguez y cols, encontraron niveles de expresión desde 1:1 hasta 6:1¹⁶. Aunque la proporción entre los transcritos de hPL-3 y hPL-4 es muy variable, siendo siempre los últimos más abundantes que los primeros¹⁶. Por lo tanto, se concluye que el gen hPL-4 se transcribe en mayor proporción que hPL-3.

La diferencia observada entre la transcripción de los genes de hPL-3 y hPL-4 se puede explicar por regulación de la iniciación de la transcripción, o diferencias en la secuencia transcrita que contribuyan a la estabilidad del RNAm¹³. Esta última teoría se probó transfecando células COS-7, utilizando el promotor de la metalotioneína, el enhancer del SV40 y las unidades transcripcionales de los genes de hPL-3 y hPL-4. Los resultados obtenidos demuestran que los dos primeros exones contribuyen a la expresión diferencial⁹.

En relación al gen hPL-1, sus transcritos han sido detectados en placentas a término; sin embargo, no se ha detectado proteína activa derivada de este gen. Esta falta de expresión fue atribuida a la mutación que contiene este gen (G \rightarrow A) al inicio del segundo intrón¹³. Chen y cols,

en 1990 detectaron transcritos de hPL-1 en un banco de DNAC de placenta usando oligonucleótidos específicos⁵. Reséndez-Pérez y cols, también encontraron evidencia de la importancia de la mutación en el sitio de splicing al comienzo del segundo intrón, sin embargo, determinaron que ésta no era la única causa de la no expresión aparente de este gen, ya que la reversión no la restauró¹⁸.

1.6. Regulación génica.

Recientes estudios se enfocaron en los elementos reguladores involucrados en la expresión específica de tejido de los genes del locus hGH-hPL. Los 500 pb de la región 5' terminal de todos los miembros de la familia multigénica hGH/hPL tienen una identidad de secuencia nucleotídica de más del 90%.

Varios trabajos se dedicaron a explicar la regulación de la expresión específica de hGH-N en los somatotrofos de la pituitaria anterior. Factores transcripcionales ubicuos como Sp-1, USF/MLTF, NF-I/AP2, entre otros están involucrados en establecer su nivel basal de transcripción^{19,20-24}. Su expresión específica de tejido es dirigida por el factor transcripcional Pit-1/GHF1, el cual se une selectivamente a dos elementos localizados en el promotor proximal (500 pb). Por ser Pit-1 un factor específico de hipófisis, el gen hGH-N solamente se expresa en este tejido (Figura 3)^{25,26}.

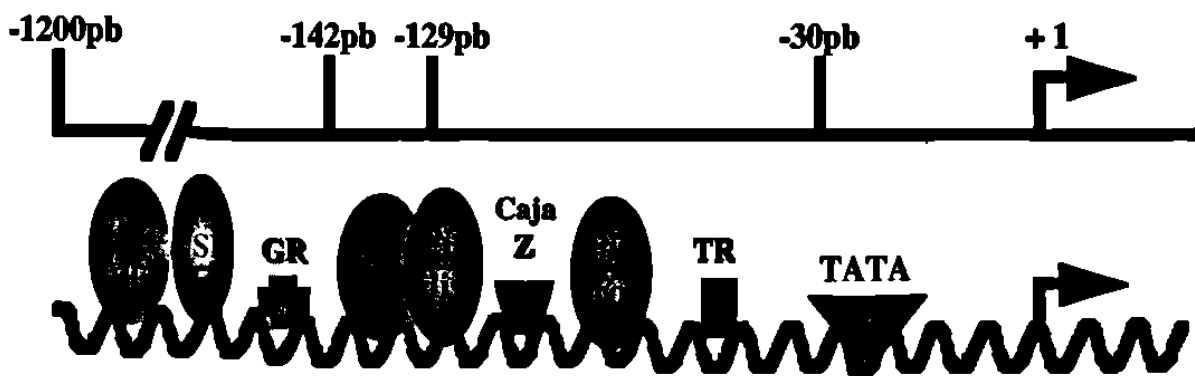


Figura 3. Regulación transcripcional del gen hGH-N. Sitios de unión a factores transcripcionales en el promotor de hGH-N.

Los estudios realizados sobre el promotor del gen hGH han servido de base para comprender la regulación de los genes de hPL. La conservación de los sitios de unión de GHF-1 en el promotor proximal (500 pb) de hPLs permiten una expresión eficiente de estos genes en células de pituitaria, indicando que un complejo control de estos genes es necesario para mantener la expresión específica de tejido.

Los genes de la familia que se expresan en la placenta, poseen una región de 1 Kpb localizada aproximadamente 1.5 Kpb río arriba del sitio de iniciación de la transcripción, que ha sido identificada como secuencia inhibidora de la expresión de estos genes a nivel hipofisario. Estudios de transfección en células derivadas de hipófisis de rata (GC), demostraron que recombinantes que poseían la región proximal de los promotores de los genes hPLs, podían dirigir la expresión de un gen reportero, pero al incluir a estas construcciones la supuesta región inhibidora se disminuía la expresión del gen reportero; ensayos de unión DNA-proteína confirmaron que proteínas de extractos derivados de células GC y no de células derivadas de placenta, se unían a esta secuencia²⁷. Los sitios de unión a factores transcripcionales reportados por hGH-N existen también en los promotores de hPL's, y por lo tanto se podría inferir que participan en la regulación de estos genes.

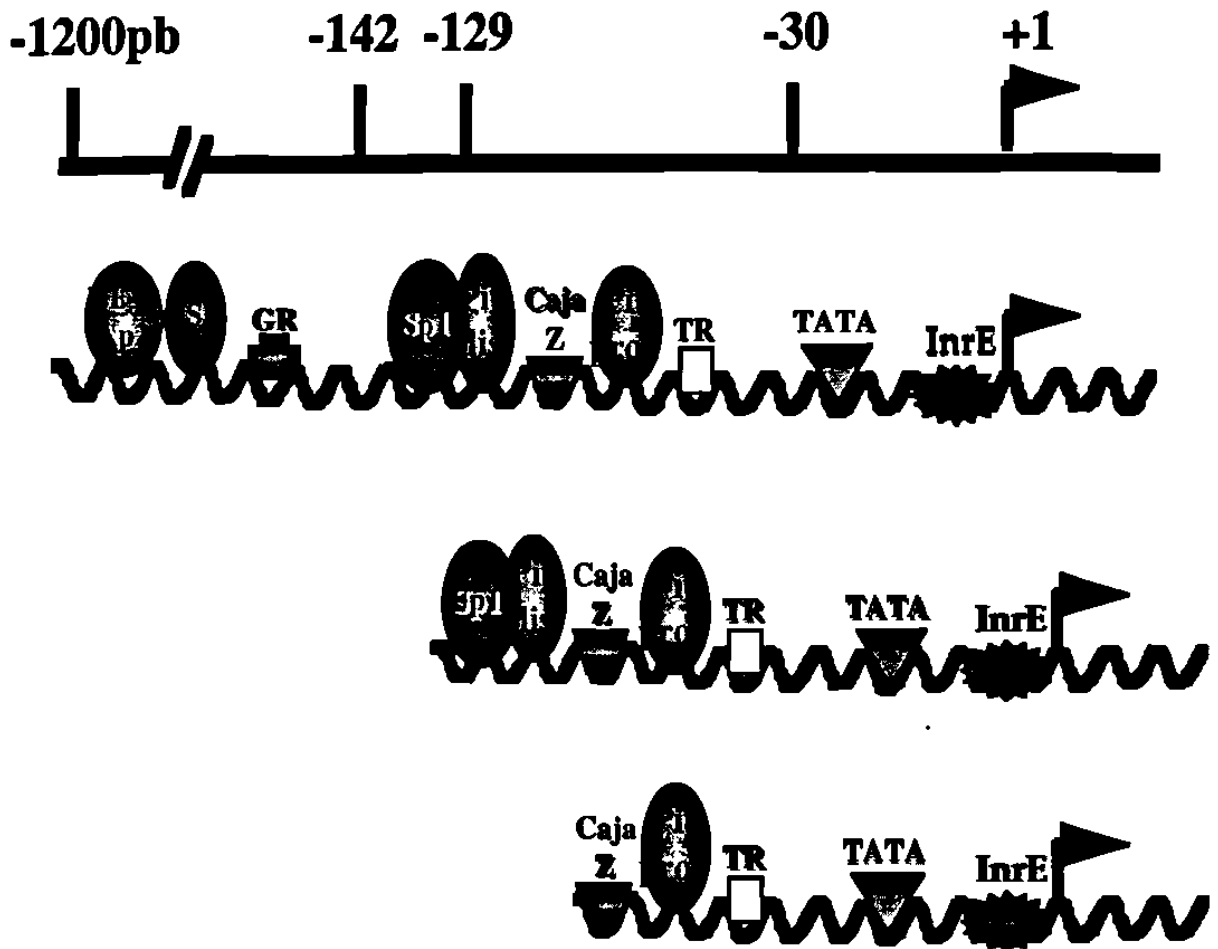


Figura 4. Estudio de la regulación transcripcional de los genes hPL's. Se recapitulan las deleciones efectuadas por Fitzpatrick y cols, para identificar las secuencias implicadas en la regulación de hPL-3.

Haciendo deleciones (Figura 4), Fitzpatrick y col. identificaron un elemento regulatorio en el promotor del gen hPL-3. Este es activador de la transcripción y se encuentra en la región de -142 a -129 pb del sitio de iniciación de la transcripción, la cual incluye una secuencia similar al sitio de unión del factor transcripcional Sp1^{15,20}. Esto sugiere que hPL-3 puede ser regulado transcripcionalmente por factores que actúan en *trans* como Sp1 o similares a Sp1. Esta secuencia regulatoria del promotor de hPL-3 resultó necesaria para la expresión del gen pero no fue responsable de la expresión específica de tejido^{12,15}.

Además, se han identificado elementos de respuesta a hormona tiroidea, a ácidos retinóicos y a 1,25 dihidroxivitamina D₃ en el promotor de los genes hPLs; los cuales juegan un papel importante en la regulación

de éstos, estimulando la expresión y secreción de HPL de las células del trofoblasto²⁰⁻³⁴. También la exposición de células trofoblásticas a interleucina-6 estimula la síntesis y liberación de HPL, aumentando los niveles de los RNAs correspondientes en dichas células²⁸⁻³⁴.

Un elemento iniciador localizado entre los nucleótidos -15/+1 del promotor de hPL-4 se requiere también para obtener una mayor expresión del gen. La proteína se encuentra en altas concentraciones en las células placentarias y contribuye al control de la expresión específica del gen hPL-4³⁵.

También se ha identificado un enhancer específico de placenta, designado como CSEn, localizado a ≈ 3 kb río abajo del gen hPL-3, el cual parece ser el responsable de su expresión en la placenta^{15,19}. CSEn es un clásico enhancer que funciona independientemente de la distancia y la orientación³⁵. Su actividad está limitada a las células de origen placentario (células BeWo y JEG-3)³⁵ y por lo tanto es inactivo en células de cervix uterino (HeLa), de pituitaria (GC) y de hígado (HepG2)¹¹. Estudios recientes demuestran que el CSEn posee múltiples elementos de DNA que interactúan cooperativamente y que son homólogos al de los enhancers SV40 GT-IIC y *Sph I/Sph II*^{19,35}. Los últimos datos sugieren que la función de CSEn puede estar controlada por TEF-1^{41,42}.

Este enhancer, junto con el iniciador es responsable de la especificidad de tejido de los genes hPLs³⁵.

1.7. El Factor Transcripcional Sp1

Uno de los activadores mejor conocidos es el factor transcripcional Sp1 (proteína específica 1). Esta proteína fue identificada primero en células HeLa por William S. Dynan en 1982; se une a una secuencia específica del DNA llamada caja GC (GGGCGG). Sp1 posee dos dominios de unión, uno de ellos contiene una región que se pliega para formar tres "dedos de zinc" alrededor de un átomo de zinc, que hacen una especie de "garfios" con los cuales esta proteína se une al DNA. El otro extremo contiene un dominio rico en el residuo aminoacídico glutamina, esta región juega un papel importante durante la transcripción, ya que le

permite interaccionar con otras proteínas reguladoras que forman el complejo de transcripción basal^{3,15} (Figura 5).

Sp1 es un factor ubicuo, que ha sido implicado en la regulación de diferentes promotores virales y celulares tales como el de SV-40^{40,47}, el del receptor de andrógenos humano^{36,37}, del gen de la timidin-cinasa del herpes simple¹⁷, etc..

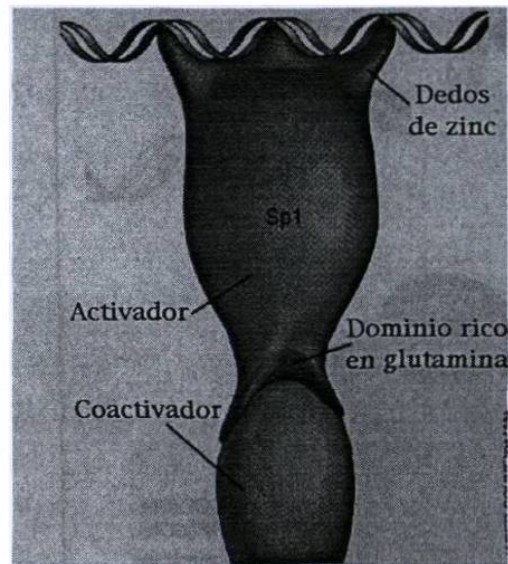


Figura 5. El factor transcripcional Sp1. Posee un dominio de unión al DNA en forma de dedos de zinc y otro rico en glutamina con el cual interacciona con otros factores de transcripción. Tomado de Tjian R (1995).

1.8. Justificación.

Las investigaciones realizadas al nivel del promotor de los genes hPLs parecen indicar que el factor transcripcional Sp1 juega un papel importante en la regulación de estos genes, como lo hace con el promotor del virus SV-40.

Tradicionalmente, para identificar el papel de una secuencia en la regulación de un gen, se realizaba deleciones a lo largo del promotor comparando por transfección o por transcripción *in vitro* el potencial transcripcional de las diferentes versiones. Sin embargo, este método tiene la desventaja de alterar la longitud del promotor, y de eliminar varios sitios adyacentes potencialmente importantes. La mutagénesis sitio dirigida constituye una buena alternativa para alterar únicamente la región de estudio, dejando intactas las otras secuencias del promotor.

Para aclarar el papel que juega Sp1 en la regulación del gen hPL-4 se propuso realizar una mutagénesis sitio dirigida, cambiando solo la secuencia de unión del factor y comparando el efecto de la mutación sobre la expresión en un sistema de transcripción *in vivo*.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación del factor transcripcional Sp1 en la transcripción del gen hPL-4 en un sistema de cultivo celular derivado de placenta.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.** Construir un vector de expresión derivado de pAVE-hGH20K, que incluya las 500 pb del promotor de hPL-4 y el cDNA de HGH20K como gen reportero.
- 2.** Obtener una versión mutada específicamente al nivel del sitio de unión del factor transcripcional Sp1, del vector de expresión anterior, mediante mutagénesis sitio dirigida.
- 3.** Verificar la presencia de la mutación por secuenciación y su funcionalidad mediante ensayos de unión DNA-proteína.
- 4.** Introducir los dos vectores recombinantes por lipofección a una línea celular derivada de coriocarcinoma humano (JEG-3).
- 5.** Evaluar la fuerza de ambos promotores (silvestre y mutante) mediante RT-PCR.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

3.1. Origen de los reactivos

Las enzimas de restricción fueron adquiridas de Gibco-Bethesda Research Laboratories, Inc. (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) y de New England Biolabs, Inc. (NEB, Beverly, MA, EUA).

La enzima transcriptasa reversa M-MLV junto con los reactivos necesarios para realizar la síntesis de la primera cadena de cDNA se obtuvieron de la compañía Gibco-BRL, Inc., así como la enzima T4 DNA ligasa; la enzima *Taq* DNA polimerasa al igual que los dNTP's y los reactivos necesarios para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron adquiridos de Promega (Madison, WI, EUA).

El medio de cultivo Opti-MEM[®] fue adquirido de la compañía Gibco-BRL Life technologies[™].

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

La lipofectamina se obtuvo de la compañía Gibco-BRL Life technologies[™].

Los reactivos para elaborar las soluciones, amortiguadores, medios de cultivo, geles, etc., necesarios para realizar este trabajo se obtuvieron de las compañías Sigma Chemical, Merck (Monterrey, México), Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, EUA), DIFCO Laboratories (Detroit, MI, EUA) y United States Biochemical (USB, Cleveland, OH, EUA).

El material de plástico para cultivo celular se obtuvo de Corning (Cambridge, MA, EUA) y Falcon (Lincon Park, NJ, EUA).

El nucleótido radiactivo [³²P]-αdATP se compró a la compañía Amersham International (Buckinghamshire, UK).

Las secuencias de los primers es la siguiente: PIT3' (5'-tttaggaagcttacctgcagccat-3'), PM430 (5'-gggtctcaaggactggctatcc-3'), 402 (5'-gggatcctgtggacagctcaccta-3') y 403 (5'-ccgaattccaggagaggcactgggg-3').

La proteína Sp1 humana recombinante (50 unidades footprint/ μ l; 1ufp= es la cantidad de proteína requerida para dar una protección total contra la digestión con DNasa I sobre el DNA del promotor temprano del virus SV-40) se consiguió de Promega (Madison, WI, EUA).

El poly[dI-dC] Poly-deoxy-inosinic-deoxy-cytidylic acid (10 A₂₆₀ unidades) se adquirió de Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN, EUA).

El Kit de secuenciación AmpliCycle fue de Perkin-Elmer Cetus (Norwalk, CT, EUA).

El buffer TG10EDK50 contiene 50mMTris-Cl pH 7.9, 10% de Glicerol, 0.1mM de EDTA, 0.5mM de DTT y 50mM de KCl.

El reactivo NP40 (Nodidet-P40) se adquirió de Sigma Chemical, Merck (Monterrey, México).

3.2. Material biológico

El vector utilizado para la obtención de la región promotora de hPL-4 (pP₅₀₀-hPL4) pertenece a la plasmidoteca del laboratorio de Biología Molecular de la ULIEG.

Las cepas bacterianas Top10F' y DH5 α F' de *Escherichia coli* empleadas en los ensayos de transformación y propagación de los plásmidos recombinantes, se obtuvieron de la bacterioteca del laboratorio de Biotecnología de la ULIEG.

La cepa bacteriana BMH71-18 *mutS* de *Escherichia coli*; genotipo: thi, supE, Δ (lac-proAB), [mutS::Tn10] [F'proAB, lac 19Z Δ M15], empleada en los ensayos de mutagénesis sitio dirigida fue donada por el Dr. Manuel Villa del laboratorio de Biotecnología del ITESM, Mty., N.L.

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

Los vectores pAVE-HGH20K y pAVE-HGH22K construídos por Alvidrez-Quihui⁴³ y el plásmido pCMVcat fueron proporcionados por el laboratorio de Biología Celular de la ULIEG.

Todo el material biológico, aunque no presenta ningun riesgo para la salud, fue manejado de acuerdo a los requerimientos impuestos por la Secretaría de Salud y Comités Internacionales, además el manejo de productos radiológicos se realizó siguiendo los alineamientos del Comité de Salvaguarda.

3.3. Equipo.

Se utilizó un horno de microondas GoldStar modelo MA-857M, microcentrífugas Eppendorf modelos 5402 y 5415, fuentes de poder EC600 e ISCO494, un agitador de tubos Barnstead Termolyne modelo Maxi Mix (Bubuque, Iowa, EUA), una placa agitadora con control de temperatura marca Corning modelo PC320 (N.Y., EUA), un ultracongelador marca So-Low Enviromental Equipment (Cincinnati, Ohio, EUA) y una campana de flujo laminar marca Labconco Corporation (K. C., Missouri, EUA).

También se utilizaron dos termocicladores marca MJ Research modelos PT 150 y PT 100 (Watertown, Mass., EUA), una báscula digital marca Sartorius modelo 1206MP (Camibh Göttingen Germany).

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

Los procesadores de textos utilizados fueron: *Microsoft Word* Versión 5.1a (© 1987-1992 Microsoft Corporation), procesadores de gráficos *Microsoft Power Point* Versión 3.0 (© 1987-1992 Microsoft Corporation), el procesador de datos *Microsoft Excel* Versión 4.0 (© 1987-1992 Microsoft Corporation); *Adobe Photoshop Limited Edition*

2.5.1. (© 1989-1993 Adobe Systems Incorporated) y *UMAX Scan* (© 1990-1991 UMAX Scanner Driver, Impact Research Inc.).

Los programas de análisis en Biología Molecular fueron: *Amplify* Versión 1.2b (Bill Engels © 1992 University of Wisconsin Genetics M. Madison, WI, EUA), *DNA Strider*™ 1.1 (© Ch. Merck and C.E.A. 1989 Service de Biochimie-Département de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), *OLIGO* Versión 4.0 (© 1992, Plymount, Mn, EUA), *MacPlasmap* Versión 1.82 (© 1988-1990 Jingdong Liu, Biology Department, University of Utha, Salt Lake City, UT 84112. EUA).

Para el análisis densitométrico se utilizó el aparato Gel Doc 1000 de Bio-Rad (United Kingdom).

3.4. Estrategia General

Para conseguir los objetivos planteados en este proyecto se propuso la siguiente estrategia general experimental que se muestra en la figura 6.

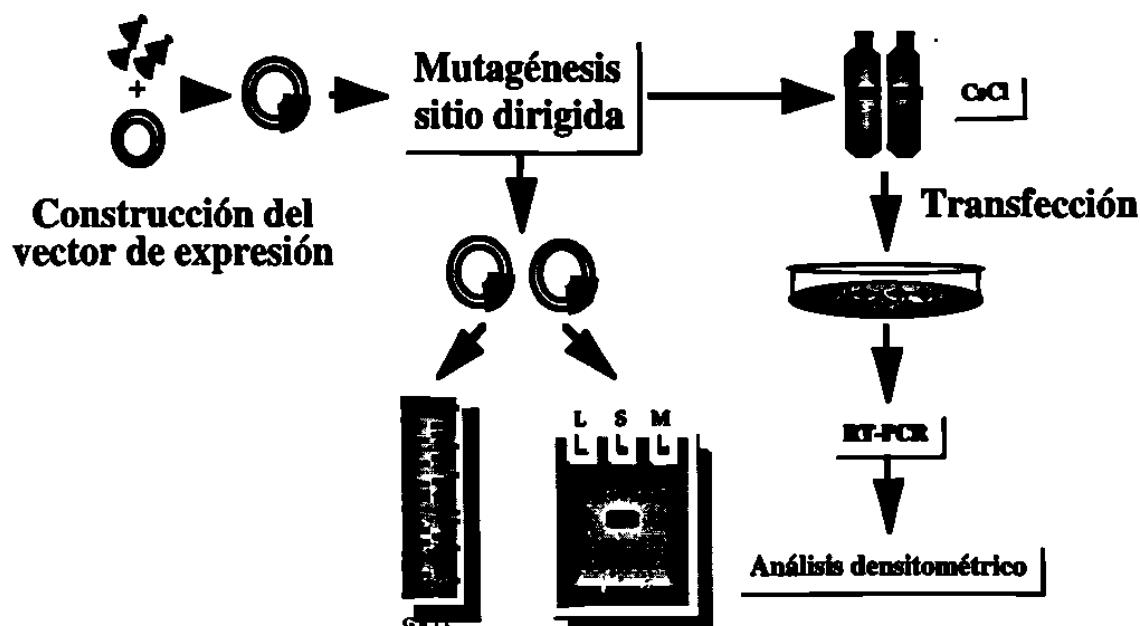


Figura 6. Estrategia General. Se muestran las etapas involucradas en el proyecto experimental, en orden cronológico: construcción de los vectores de expresión, mutagénesis sitio dirigida, transfección y comparación de los potenciales transcripcionales.

3.5. Construcción de pAVE-HGH20K/P500hPL4

Para estudiar el potencial transcripcional de las 500 pb del promotor del gen hPL-4, se construyó un vector de expresión para células eucariotas derivado de pAVE, que incluyera el DNAC que codifica para la isoforma de 20KDa de la HGH como gen reportero, bajo el control de dicha región promotora.

3.5.1. Selección del vector de expresión.

Se seleccionó el vector de expresión para células eucariotas pAVE-HGH20K (Figura 7) construido previamente por nuestro grupo⁴³, ya que posee el gen de resistencia a ampicilina, un origen de replicación para células procariotes, el cDNA de la HGH de 20 KDa como gen reportero,

bajo el control del promotor heterólogo del citomegalovirus humano (CMV), el cual es un promotor muy fuerte. El pAVE-HGH20K también se emplea como control positivo de expresión en los experimentos de transfección.

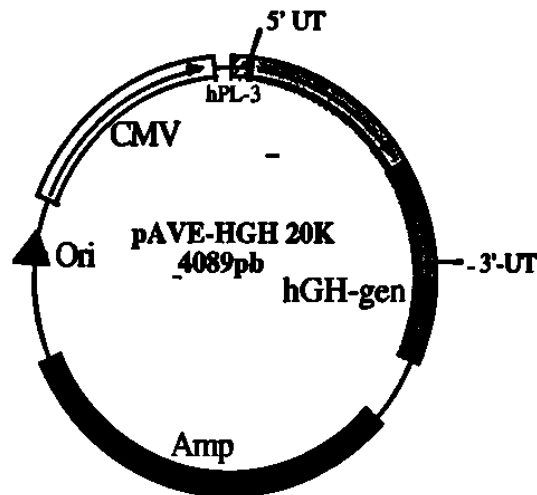


Figura 7. Esquema del plásmido pAVE-HGH20K. Este plásmido posee el DNAc de la HGH20K bajo el control del promotor de CMV, además de un gen de resistencia a ampicilina y un origen de replicación para células procariotas.

3.5.2. Origen de las 500 pb del promotor del gen hPL-4.

Para obtener las 500 pb del promotor del gen hPL-4, se partió del plásmido pP₅₀₀-hPL4 (Figura 8) previamente construido en nuestro laboratorio, ya que posee esta región del promotor además de una porción de su unidad transcripcional.

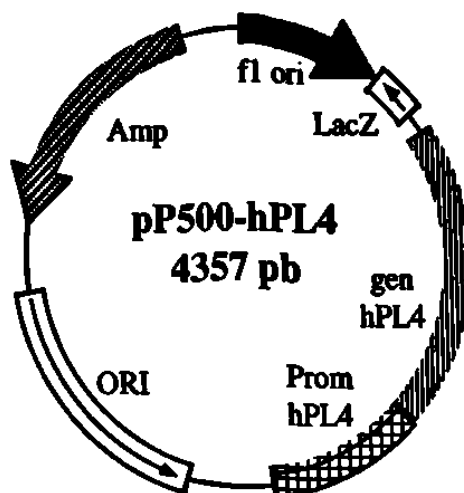


Figura 8. Esquema del plásmido pP500-hPL4. Este plásmido posee las 500pb del promotor de hPL-4 y una porción de su unidad transcripcional, además del gen de resistencia a ampicilina y un origen de replicación para células procariontas.

3.5.3. Obtención del plásmido intermediario.

Para construir el vector de interés, se tenía que sustituir el promotor del citomegalovirus por el promotor en estudio del gen hPL-4.

Esta construcción se realizó en dos etapas:

- inserción de las 500 pb del promotor de hPL-4;
- y eliminación del promotor del citomegalovirus.

Ambos plásmidos pAVE-HGH20K y pP₅₀₀-hPL4, fueron digeridos con las enzimas *Bam*H I y *Hind* III (Tabla I), para insertar las 500 pb del promotor del gen hPL-4 en pAVE-HGH20K y dar origen al plásmido intermediario pAVE-HGH20K/CMV/P₅₀₀-hPL4.

Tabla I. Digestión preparativa de los plásmidos pAVE-HGH20K y pP₅₀₀-hPL4

DNA plasmídico (1 µg/µl)	5.0 µl
Buffer 2 BRL 10X	5.0 µl
<i>Bam</i> H I (10 U/µl)	1.0 µl
<i>Hind</i> III (10 U/µl)	1.0 µl
H ₂ O	38.0 µl
Volumen final	50.0 µl

Las enzimas se utilizaron bajo las condiciones establecidas por el proveedor. La reacción se incubó durante 4 hrs a 37°C para asegurar el corte total con ambas enzimas. Las digestiones se corroboraron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (EtBr)⁴⁵.

El fragmento de 500 pb correspondiente al promotor de hPL-4 se cortó del gel de agarosa y fue purificado mediante centrifugación sobre fibra de vidrio⁴⁶. Posteriormente se ligó el fragmento de 500 pb purificado con los productos de pAVE-HGH20K (Tabla II).

Tabla II. Condiciones de ligación.

Digestión pAVE-HGH20K/ <i>Bam</i> H I- <i>Hind</i> III (250 ng/µl)	2.5 µl
500 pb de hPL4 (500 ng/µl)	2.0 µl
Buffer de Ligasa T4 5X	3.0 µl
Ligasa T4 (1 U/µl)	1.0 µl
H ₂ O	6.5 µl
Volumen final	15.0 µl

La incubación se realizó a 16°C durante toda la noche. Se utilizó una alícuota 5 µl de la reacción ligación para transformar 100 µl

bacterias Top10 Ca⁺⁺ competentes. Las clonas obtenidas se procesaron para la obtención del DNA plasmídico mediante la técnica de Minipreparación de DNA Plasmídico⁴⁵.

Las clonas obtenidas se caracterizaron preliminarmente con la enzima *EcoR* I (Tabla III), ya que pAVE-HGH20K contiene un solo sitio de reconocimiento para esta enzima, mientras que la construcción esperada posee dos sitios de reconocimiento.

Tabla III. Digestión de las subclonas con *EcoR* I.

DNA plasmídico (1 µg/µl)	1.0 µl
Buffer 3 BRL 10X	1.0 µl
<i>EcoR</i> I (10 U/µl)	0.5 µl
H ₂ O	7.5 µl
Volumen final	10.0 µl

La reacción se incubó durante 2 hrs a 37°C. Las digestiones se corroboraron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y tinción con EtBr. Se identificó una subclona que poseía dos sitios de restricción para *EcoR* I; esta subclona se caracterizó con varias enzimas para corroborar que correspondía a la construcción esperada pAVE-HGH20K/P500hPL4/CMV.

3.5.4. Obtención de la construcción final pAVE-HGH20K/P500-hPL4.

3.5.4.1. Eliminación del promotor de CMV.

Para eliminar el promotor de CMV de la construcción pAVE-HGH20K/CMV/P₅₀₀-hPL4, se realizó una doble digestión con las enzimas *Hind*III y *Afl* III las cuales flanquean el promotor completo de CMV (Tabla IV).

Tabla IV. Digestión de la subclona pAVE-HGH20K /P500hPL4/CMV con *Hind* III y *Afl* III.

DNA plasmídico (1 µg/µl)	4.0 µl
Buffer 2 BRL 10X	2.0 µl
<i>Afl</i> III (10 U/µl)	1.0 µl
<i>Hind</i> III (10 U/µl)	1.0 µl
H ₂ O	12.0 µl
Volumen final	20.0 µl

La reacción se incubó durante 4 hrs a 37°C para asegurar el corte total con ambas enzimas. Las digestiones se corroboraron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, teñido con EtBr.

El fragmento de 3686 pb se purificó mediante centrifugación sobre fibra de vidrio⁴⁶. Como ambas enzimas no tienen extremos compatibles, se rellenaron los extremos con la T4 DNA polimerasa para hacerlos romos y poder ligarlos (Tabla V).

Tabla V. Polimerización del fragmento de 3686 pb.

DNA plasmídico (200 ng/µl)	1.0 µl
Buffer T4 DNA pol 10X	2.0 µl
T4 DNA polimerasa (5 U/µl)	2.0 µl
H ₂ O	15.0 µl
Volumen final	20.0 µl

La reacción se incubó a 37°C durante 1 hr; la mitad de la reacción se sometió a ligación utilizando las condiciones mencionadas anteriormente (Tabla II), una alícuota de la reacción de ligación se utilizó para transformar bacterias Top10 Ca⁺⁺ competentes.

3.5.4.2. Caracterización de las clonas.

Para identificar la construcción final las clonas obtenidas se caracterizaron con las enzimas *Bam*H I y *Eco*R I; la primera lineariza el

plásmido en un fragmento de 3690 pb y la otra lo parte a la mitad en dos fragmentos 1788 pb y 1902 pb.

El plásmido recombinante se caracterizó más ampliamente con otras enzimas para corroborar la identidad de pAVE-HGH20K/P₅₀₀hPL-4, y se purificó a gran escala para obtener un mayor número de copias y una mejor calidad de DNA.

3.6. Purificación del vector a Gran Escala.

Se utilizó el método de lisis alcalina, porque es rápido y produce una buena cantidad de DNA plasmídico puro⁴⁴.

3.6.1 Preparación del lisado crudo.

1. Una colonia bacteriana conteniendo el plásmido recombinante se inoculó en 4 ml de medio LB con ampicilina y se incubó toda la noche a 37°C con agitación continua.
2. El inóculo se transfirió a un matraz de 2 litros con 500 ml de medio LB con ampicilina y se incubó a 37°C hasta alcanzar una absorbancia de 0.4 a una λ de 600 nm.
3. La masa bacteriana se recuperó mediante centrifugación a 6,500 rpm durante 10 min a 4°C, (Rotor JA-18).
4. La pastilla se resuspendió en 4 ml de GTE (50mM Glucosa-25mM Tris pH 8.0-10mM EDTA).
5. Se agregó 1 ml de GTE adicionado con lizosima (25mg/ml) y se mezcló rápidamente la pastilla.
6. Se incubó 10 min a 4°C, agitando ocasionalmente.
7. Se añadieron 10 ml de una solución de NaOH 0.2M/SDS 1% y se agitó por inversión rápidamente y se incubó 10 min a 4°C.
8. Se agregaron 7.5 ml de una solución de acetato de potasio (3M pH~5.5) y se agitó por inversión.
9. Se incubó durante 10 min a 4°C.

10. La centrifugación se realizó a 12,500 rpm durante 10 min a 4°C (Rotor JA-17).
12. El sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un tubo nuevo.
Nota: evitar que se pase el precipitado.
13. Para precipitar el DNA se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol.
14. Se precipitó el DNA a -20°C toda la noche.
15. Se centrifugó a 10,500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. (Rotor JA-17).
16. La pastilla se lavó con EtOH al 70%, se seco y se resuspendió en 4 ml de TE 1X.

3.6.2. Gradiente de CsCl/Bromuro de Etidio⁴⁴.

1. Al DNA resuspendido en 4 ml de TE 1X, se agregaron 4.4 gr de CsCl, se disolvieron y añadieron 0.4 ml de EtBr (10 mg/ml).
2. Se transfirió la solución a un tubo para ultracentrifuga quick-seal de 5 ml. Se centrifugó 3.5 hr a 20°C a 96,000 rpm. para permitir la formación del gradiente de densidad suficiente para que se separen las bandas del DNA plasmídico y del DNA genómico.
3. Se visualizaron las bandas con luz UV de onda corta y se recuperó la banda de interés utilizando una jeringa de 5 ml con aguja No.20, puncionando aproximadamente 1 cm por debajo de la banda de DNA plasmídico (banda inferior). Se aspiró cuidadosamente sin jalar la banda de DNA genómico.
4. La solución aspirada se pasó por una columna de Dowex AG50W-X8 para eliminar el EtBr. Inmediatamente se recoletó el eluido.
5. El DNA plasmídico se precipitó con 2 volúmenes de EtOH al 100% durante 30 min a -20°C. Se centrifugó a 10,500 rpm durante 15 min a 25°C.
6. Se lavó la pastilla con EtOH al 70%, y se resuspendió en 500 µl de TE 1X.
7. El DNA se cuantificó a 260 nm.

3.7. Obtención del vector de expresión mutado en el sitio de unión a Sp1.

Para estudiar la participación de Sp1 en la regulación del gen hPL-4 se construyó una versión mutada del mismo vector de expresión anteriormente construido.

3.7.1 Mutagenesis sitio dirigida

Utilizando como molde el plásmido pAVE-HGH20K/P₅₀₀-hPL4 construido anteriormente, se diseñó un oligonucleótido que cambia la secuencia de unión de Sp1 GGGAGG a GGAAAG, sobre la cual este factor transcripcional no se puede unir⁴⁷.

La secuencia del oligonucleótido utilizado para estos ensayos se muestra en la figura 9.

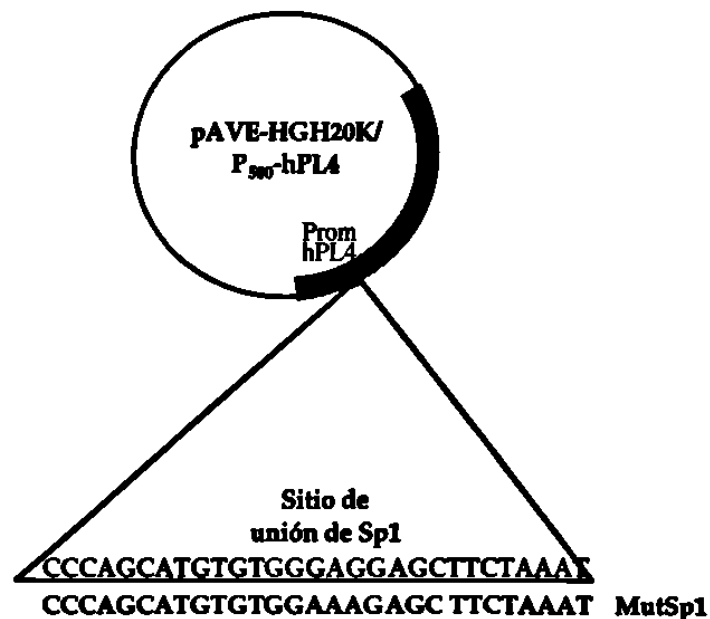


Figura 9. Secuencia del oligonucleótido mutagénico.

La estrategia que seguimos para la mutagénesis se presenta en la figura 10, y fue adaptado del protocolo inicial de Clontech Laboratories, Inc⁴⁸.

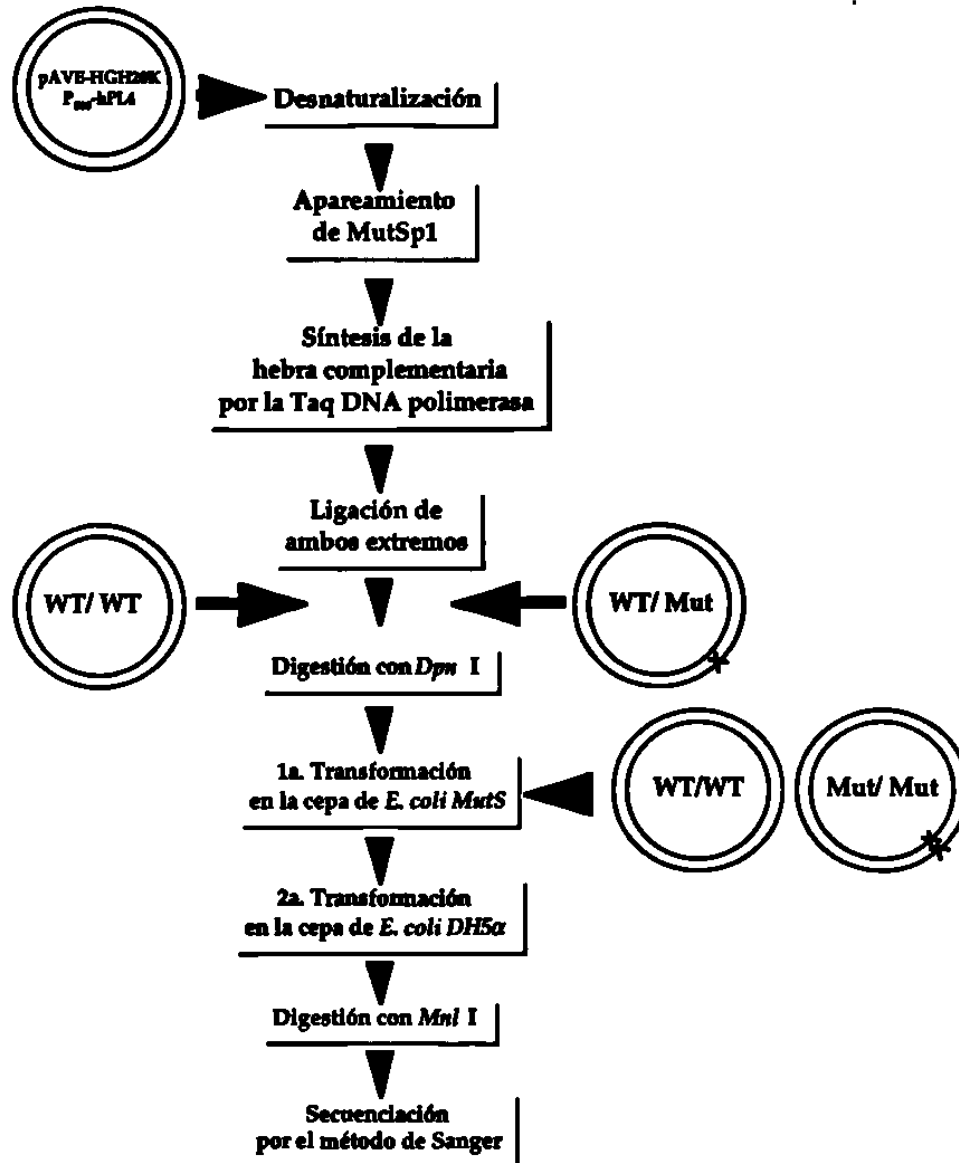


Figura 10. Estrategia de Mutagénesis sitio dirigida. El método constó de una desnaturalización del plásmido blanco, alineamiento del primer MutSp1, extensión con la *Taq* DNA polimerasa, digestión con *Dpn* I para eliminar la mayor parte del plásmido WT/WT, primera transformación en la cepa *mutS* y una segunda transformación para separar ambas poblaciones de plásmidos.

La reacción de mutagénesis se llevo a cabo en tubos de 0.5 ml en un volumen final de 25 μ l, utilizando un solo iniciador (Tabla V).

Tabla VI. Reacción de mutagénesis sitio dirigida.

Reactivo	Concentración final
Primer MutSp1	0.5 μ M
dNTP's	200 μ M
Buffer 10X	1X
MgCl ₂	1.5mM
Taq DNA polimerasa	1.25 U
pAVE-HGH20K/P ₅₀₀ -hPL4	50 ng

La reacción constó de tres pasos sucesivos:

- desnaturalización a 98°C por 3 min.
- alineamiento a 60°C por 1 min.
- extensión a 72°C por 5 min.

Después de la reacción de mutagénesis se tomaron 11 μ l de la reacción y se llevó a cabo una ligación utilizando 1 U de la enzima T4 DNA ligasa en un volumen final de 15 μ l.

La reacción se incubó a 16°C durante toda la noche. Posteriormente, la ligación se precipitó con 2.5 volúmenes de EtOH al 100% y 0.1 volumen de acetato de sodio 3M, la pastilla de DNA se resuspendió en 8 μ l de H₂O.

Los 8 μ l DNA se sometieron a digestión con la enzima *Dpn* I (la cual corta el DNA metilado sobre ambas cadenas), para eliminar la mayor parte del DNA plasmídico que sirvió como molde, quedando sólo el DNA que incluye una cadena recién sintetizada (no metilada).

La primera transformación se realizó en la cepa *E. coli mutS* ya que ésta es defectuosa en la reparación de desapareamientos.

3.7.2. Preparación de células BMH 71-18 *mutS* competentes

- 1.** Se inocula una sola colonia en 5 ml de medio LB más 50 μ l de tetraciclina (5mg/ml). Incubar toda la noche a 37°C con agitación constante.
- 2.** Se transfiere 1 ml del cultivo saturado de células BMH 71-18 *mutS* a un matraz de 500 ml conteniendo 100 ml de medio LB (en este paso no se agrega tetraciclina). Incubar las células a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.5 (\pm 0.03) a una λ 600 nm; esto usualmente toma de 2.5-3.0 hr. Se determinó la densidad óptica frecuentemente, una vez alcanzado 0.2 DO para evitar un sobrecrecimiento.
- 3.** Cuando el cultivo alcance la fase exponencial, el matraz se coloca en hielo durante 20 min. y después se colectan las células por centrifugación a 5,000 rpm/5 min a 4°C.

3.7.3. Transformación en células BMH 71-18 *mutS* competentes.

- a.** Se resuspendieron las células en 10 ml de solución TSS (85% de medio LB, 10% de PEG, 5% DMSO y 50 mM MgCl₂; pH 6.5) fría. Las células competentes están listas para ser transformadas.
- b.** Se utilizaron 100 μ l de células competentes para cada transformación.

Después de la digestión con *Dpn* I, el DNA se precipitó y se resuspendió en 5 μ l de H₂O los cuales se utilizaron para transformar la cepa de *E. coli mutS*. Las colonias obtenidas de esta transformación poseen ambas poblaciones de plásmidos (silvestre y mutante). La identificación preliminar de las clonas conteniendo el mutante se realizó mediante digestión enzimática con *Mnl* I.

Para separar ambas poblaciones de plásmidos, se realizó una segunda transformación en la cepa *E. coli DH5 α 3*.

3.8. Secuenciación.

Las clonas que dieron el patrón de restricción con la enzima *Mnl* I para la construcción del plásmido mutante, fueron sometidas a secuenciación para corroborar el cambio de bases en el sitio de unión a Sp1.

La secuenciación enzimática se realizó siguiendo las especificaciones del Kit AmpliCycle (PerkinElmer). Los fragmentos sintetizados se marcaron al incorporar dATP α P³² y se resolvieron en un gel de electroforesis de acrilamida 6%-urea 50%. La lectura de la secuencia se realizó sobre la autoradiografía. El iniciador sentido que se utilizó fue el PM430, el cual se aparea al promotor de hPL-4.

3.9. Ensayos de unión DNA-proteína.

Para determinar si la mutación de la secuencia 5'GGGAGG3'a 5'GGAAAG3' impide la unión del factor transcripcional Sp1 al DNA, realizamos ensayos de retardación en gel. Para obtener la sonda necesaria para estos ensayos se amplificó una región del promotor de hPL-4 que incluye el sitio de unión a Sp1 (Figura 11).

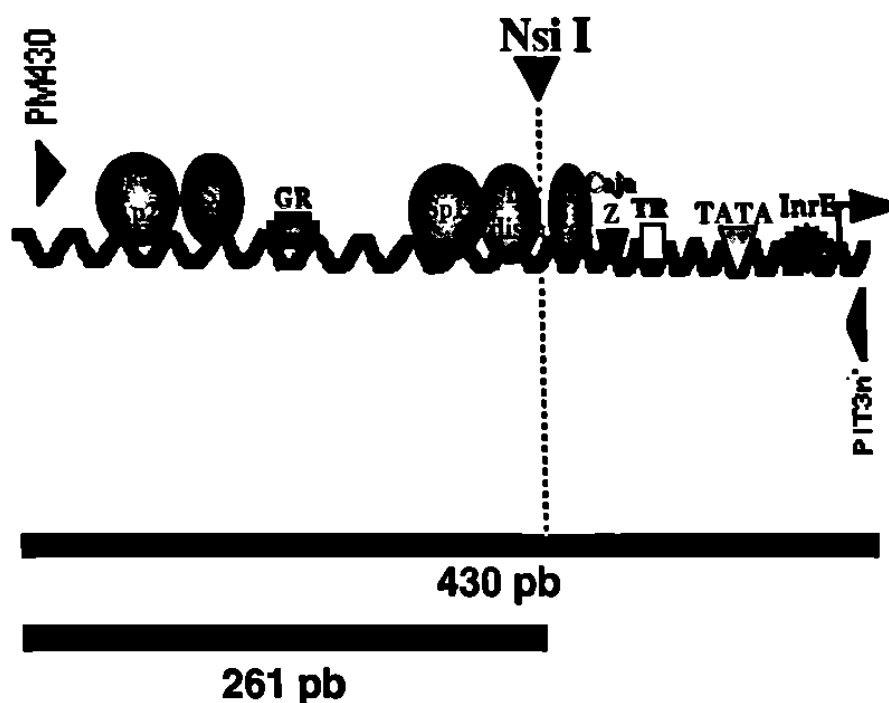


Figura 11. Obtención de la sonda por PCR. Los iniciadores PM430 y Pit 3' amplifican específicamente una región de 430 pb del promotor de hPL-4 que incluye el sitio de unión a Sp1. El producto de amplificación marcado radioactivamente con dATP α P³², se corta con *Nsi* I y el fragmento de 261 pb se purifica para servir de sonda.

La preparación de la sonda (tanto del plásmido silvestre como del plásmido mutante), se realizó mediante PCR de ambos, con iniciadores específicos, los cuales amplifican una región de 430 pb del promotor del gen hPL-4. Las condiciones se recopilan en la tabla VII.

Tabla VII. PCR para la obtención de la sonda para los ensayos de retardación en gel.

Reactivo	Volumen
Primer PM430 (5mM)	5.0 μ l
Primer PIT 3' (5mM)	5.0 μ l
dNTP's (10mM)	2.0 μ l
MgCl ₂ (25mM)	3.0 μ l
H ₂ O	22.5 μ l
Buffer 10X	5.0 μ l
<i>Taq</i> DNA polimerasa (5 U)	0.5 μ l
DNA (10 ng/ μ l)	5.0 μ l
dATP α P ³² (10mCi/ μ l)	2.0 μ l
Volúmen final	50.0 μ l

* PM430 y PIT3' ver secuencias en la sección 3.1.

Una vez montadas las reacciones de PCR, éstas se colocaron en un termociclador y el programa que se utilizó fue el siguiente:

Etapa	Temperatura	Tiempo
35 Ciclos incluyendo una etapa de:		
Desnaturalización	94°C	1.00 min.
Apareamiento	60°C	1.00 min.
Síntesis	72°C	1.00 min.
Extensión final	72°C	5.00 min.

Una vez obtenido el producto de amplificación, éste fue digerido con la enzima *Nsi* I para obtener un tamaño de sonda más apropiado para nuestros ensayos. Después de la digestión, la sonda se purificó mediante centrifugación con fibra de vidrio⁴⁶.

Las reacciones de unión sonda-Sp1 utilizando tanto la sonda silvestre o la sonda mutante, se describen en la tabla VIII.

Tabla VIII. Preparación del coctel para cada una de las sondas.

Mix	WT	Mut
sonda *P32	1.0 µl	2.0 µl
p [dI-dC]	4.0 µl	4.0 µl
NP40 (1%)	1.0 µl	1.0 µl
MgCl ₂ (0.5M)	0.4 µl	0.4 µl
TG10EDK ₅₀	17.6 µl	16.6 µl
Volúmen final	24.0 µl	24.0 µl

Una vez obtenida la mezcla de reacción para cada sonda, se procedió a la incubación con la proteína Sp1 (Tabla XI).

Tabla XI. Condiciones de incubación de cada una de las sondas con la proteína Sp1.

Cantidad de Sp1	WT		Mut	
	0.2U	0.1U	0.2U	0.1U
TG10EDK ₅₀	4 µl	2 µl	4 µl	2 µl
Sp1 dil. (1:5)		2 µl		2 µl
Sp1 dil. (1:10)				2 µl
Mix WT	6 µl	6 µl		
Mix Mut			6 µl	6 µl
Volúmen final	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Las reacciones se incubaron a 25°C durante 30 min, las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida al 4.5% en condiciones no

desnaturalizantes, que previamente se había pre-corrído durante 1 hr. a 25mA; se agregaron 2.0 µl de glicerol a las muestras antes de depositarlas en el gel. El corrimiento del gel se realizó en buffer TNE (134mM Tris-66mM AcONa-20mM EDTA) a un amperaje de 25 mA y a una temperatura constante de 4°C; después del corrimiento, el gel se seco durante 30 min a 80°C con vacío y se dejó exponer una película sensible de rayos X toda la noche a -70°C con pantalla intensificadora.

3.10. Experimentos de transfección en JEG-3.

3.10.1. Condiciones del cultivo celular.

La línea celular de coriocarcinoma JEG-3 se cultivó en placas con medio Opti-MEM (Gibco-BRL) con SBF al 10% y solución de antibióticos (sulfato de estreptomina 100µg/ml y penicilina 100U/ml) a 37°C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5%.

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

1. A un cultivo confluyente se le eliminó el medio y se le agregaron 2 ml de tripsina 1X (para desprender las células del sustrato) y se incubaron a 37°C por 5 min.
2. Una vez recuperadas las células de la caja y eliminada la tripsina por centrifugación a 3,000 rpm por 5 min, se resuspendieron en 3 ml de medio Opti-MEM, se contaron en un hemocitómetro y se transfirió una alícuota conteniendo aproximadamente 7×10^4 células a una nueva botella.
3. Se agregaron 5 ml de medio (Opti-MEM complementado con un 10% de SBF y antibióticos).
4. Las células se incubaron en CO₂ a 37°C y se les realizó cambios diarios de medio de cultivo (72 hrs).

A partir de cultivos al 80% de confluencia y en fase logarítmica, se procedió a levantar las células con tripsina 1X y realizar la cuenta celular. Se inocularon 3×10^5 células en 21 placas de 25 mm de diámetro, las cuales se incubaron por un periodo de 12-24 hrs antes de la transfección.

3.10.2. Transfección mediante lipofección.

Esta técnica de gran utilidad para introducir DNA a células eucarióticas, se basa en la formación de vesículas unilamelares (liposomas) de lípidos catiónicos que pueden obtenerse comercialmente de varios tipos (lipofectina, lipofectamina, DOTAP, etc.)⁴⁹ y que engloban el DNA o el RNA. Estos complejos facilitan la introducción del ácido nucleico dentro de las células. Es un método sencillo que da buenos niveles de expresión.

Para las transfecciones se utilizó el protocolo previamente estandarizado por el laboratorio de Biología Celular⁵⁰ para las células JEG-3.

Cada uno de los plásmidos recombinantes (silvestre y mutante) fueron co-transfectados con el plásmido pAVE-HGH22K por triplicado; se incluyeron como controles los plásmidos pAVE-HGH22K y pCMVcat, los cuales fueron co-transfectados también con pAVE-HGH22K.

El protocolo de co-transfección fue el siguiente:

- 1.** Las células se sembraron en cajas de cultivo de 35 mm con 2 ml de medio de cultivo completo.
- 2** Se incubaron las células a 37°C en una incubadora de CO₂ hasta una confluencia del 50-80%. Esto ocurre usualmente a las 12-24 hrs.
- 3.** Se prepararon las siguientes soluciones en tubos de microcentrífuga estériles de 1.5 ml.

Solución A: Para cada transfección diluir 1 μ g de DNA (500ng del control interno pAVE-HGH22K y 500ng del plásmido de interés) en 100 μ l de medio libre de suero (OPTI-MEM I Reduced Serum Medium).

Solución B: Para cada transfección diluir 6 μ l de lipofectamina en 100 μ l de medio libre de suero.

4. Se combinaron las dos soluciones mezclando gentilmente y se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 30 min.
5. Para cada transfección, se adicionaron 0.8 ml de medio libre de suero a cada tubo conteniendo los complejos. Se mezcló gentilmente y agregó a las cajas de células a las cuales se les había previamente eliminado el medio de cultivo anterior. La mezcla se distribuyó suavemente por toda la placa.
6. Se incubaron las células con el complejo por 5 hrs a 37°C en una incubadora de CO₂.
7. Después de la incubación se adicionó 1 ml de medio conteniendo la concentración normal de suero sin remover la mezcla de transfección.
8. Se reemplazó el medio, por medio fresco a las 24 hrs después de la transfección.

3.11. Extracción de RNA Total.

Para detectar los transcritos específicos correspondientes a los DNAs de las HGH-N de 20 KDa y de la HGH-N de 22 KDa, de las células transfectadas se extrajo el RNA total mediante la técnica descrita por Ogretmen et al⁵².

El protocolo que se siguió fue el siguiente:

1. Después de completar el tiempo de incubación las placas se colocaron en hielo y se lavaron con 1 ml de PBS 1X.
2. La lisis se llevó a cabo añadiendo 1 ml de fenol saturado con una solución de 0.5% de SDS y 0.1 M de Tris-HCl a pH 8.0, la monocapa de células se raspó con un raspador o "gendarme" de plástico y se mezcló por 1 min.
3. El lisado se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 ml con una puntilla estéril.
4. Se agregaron 100 μ l de acetato de sodio 2M pH 4.2 y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C.
5. Se recuperó la fase acuosa y ésta se sometió a una extracción fenol:cloroformo (49:1).
6. Se recuperó nuevamente la fase acuosa, se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol al 100% y se incubó a -20°C durante toda la noche.
7. El RNA total se recuperó mediante centrifugación a 12,000 rpm durante 20 min a 4°C.
8. La pastilla se lavó con etanol 70% y se secó al aire, para posteriormente disolverla en 10 μ l de H₂O DEPC (dietilpirocarbonato).

Los RNA's se conservaron a -70°C hasta su utilización.

3.12. Transcripción Reversa.

El RNA total extraído de las células en cultivo, se sometió a transcripción reversa utilizando la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MML-V), siguiendo las condiciones descritas en la tabla X.

Tabla X. Condiciones de reacción para la retrotranscripción.

Reactivo	Volumen
Buffer 5X	3.0 μ l
dNTP's (10mM)	0.8 μ l
RT MML-V (200U/ μ l)	1.0 μ l
Random primers (0.3 μ M)	0.5 μ l
H ₂ O DEPC	0.2 μ l
DTT (0.1M)	0.5 μ l
RNA total	9.0 μ l
Volúmen final	15.0 μl

Antes de agregar la enzima la mezcla se incubó durante 10 min a 99°C para desnaturalizar el RNA, al finalizar se colocaron los tubos inmediatamente en hielo, se agregó la retrotranscriptasa y la síntesis de DNAC se llevó a cabo a 37°C por 2 hrs. Los DNAC's se colocaron a -20°C hasta su uso.

3.13. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.13.1. Determinación de las condiciones de PCR.

Para determinar las condiciones de amplificación necesarias para hacer un PCR semi-cuantitativo, realizamos una curva de calibración utilizando los plásmidos pAVE-HGH20K y pAVE-HGH22K. Variando la concentración de pAVE-HGH20K y manteniendo constante la de pAVE-HGH22K, se efectuó un ensayo de PCR utilizando un juego de iniciadores (402/403) que se aparean en las partes 5' y 3' no traducibles (UT) de los DNAC's de la GH.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados en esta reacción se presenta a continuación:

5'CCGAATTCCAGGAGAGGCACTGGGG3'	403
5'GGGGATCCTGTGGACAGCTCACCTA3'	402

Los ensayos realizados para la curva de calibración fueron los siguientes:

DNA plasmídico	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5
pAVE-HGH20K	2 ng	4 ng	6 ng	8 ng	10 ng
pAVE-HGH22K	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng	10 ng

Las reacciones de PCR se montaron de acuerdo a las condiciones ya establecidas en nuestro laboratorio (Tabla XI).

Tabla XI. Condiciones de la PCR.

Reactivo	Volumen
Primer 402	1.0 μ l
Primer 403	1.0 μ l
dNTP's (10mM)	1.5 μ l
MgCl ₂ (25mM)	3.0 μ l
H ₂ O	33.0 μ l
Buffer 10X	5.0 μ l
<i>Taq</i> DNA polimerasa (5 U)	0.5 μ l
DNA molde	x
Volúmen final	50.0 μ l

x= ng del DNA molde para cada ensayo.

Una vez preparadas las reacciones de PCR, éstas se colocaron en un termociclador y el programa que se utilizó fue el siguiente:

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94°C	1.30 min.
Apareamiento	60°C	1.00 min.
Síntesis	72°C	1.00 min.
Desnaturalización	94°C	1.30 min.
Apareamiento	60°C	1.00 min.
Síntesis	72°C	5.00 min.

El programa originalmente consta de 30 ciclos, para este experimento, éstos se redujeron a 20 ciclos para quedar en la fase exponencial.

3.13.2. Amplificación de los cDNA's obtenidos por transfección de las células JEG-3.

Una vez establecidas las condiciones de PCR se procedió a detectar los transcritos de HGH 20K y 22K en las células transfectadas JEG-3 donde normalmente no es posible detectarlos.

Los DNAc's se amplificaron bajo las condiciones de reacción descritas anteriormente. Los productos de amplificación se resolvieron en un gel de Agarosa-Urea al 1.5% y 6M, respectivamente; las muestras de amplificación se desnaturalizaron a 95°C por 10 min. antes de depositarlas en el gel. El gel se corrió en un buffer de citrato de sodio a una concentración de 0.25 mM y la migración se inició a 50 volts durante 15 min., se aumentó después a 80 volts. Una vez el gel corrido a 3/4, éste se tiñó con EtBr y se visualizaron las bandas.

Las bandas son de 720 pb para el producto de amplificación del DNAc de HGH22K y de 690 pb para el de HGH20K.

3.13.3. Análisis densitométrico y estadístico.

Una vez terminada la migración de los geles, éstos fueron teñidos con EtBr y la cuantificación de las banda se realizó en el aparato Gel Doc 1000 de Bio-Rad, el cual posee un transiluminador de UV y un sistema de video para visualizar con una alta resolución este tipo de muestras; además de un software que permite cuantificar y documentar nuestros datos.

Cada una de las bandas de amplificación correspondientes a HGH 20K y 22K fueron analizadas tomando en cuenta su densidad óptica, el análisis estadístico de los datos fue efectuado con el programa computacional *Microsoft Excel 4.0.*, aplicándoles una prueba de *t de Student* para determinar si había diferencias significativas.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Construcción del vector de expresión pAVE-HGH20K/P₅₀₀-hPL4.

4.1.1. Inserción del promotor de hPL-4.

A partir de la ligación del promotor del gen hPL-4 en plásmido pAVE-HGH20K, se obtuvieron 12 clonas, las cuales fueron caracterizadas enzimáticamente con *EcoR* I. Solamente una clona dió el patrón esperado, generando, generando dos fragmentos de 2768 pb y 1788 pb. Este plásmido fue caracterizado más ampliamente con otras enzimas, dando el patrón de restricción correcto para cada una de ellas.

4.1.2. Eliminación del promotor de CMV.

Después de eliminarle a pAVE-HGH20K/CMV/P₅₀₀-hPL4 el promotor de CMV, se obtuvieron 20 clonas de las cuales 4 producían el patrón enzimático correcto de la construcción esperada de pAVE-HGH20K/P₅₀₀-hPL4. Se eligieron dos clonas, las cuales se caracterizaron con varias enzimas, dando el patrón esperado de restricción (Figura 13).

4.2. Mutagénesis sitio dirigida.

Una vez caracterizada e identificada la construcción pAVE-HGH20K/P₅₀₀-hPLA, ésta sirvió como molde para realizar la mutagénesis sitio dirigida. Después de la primera transformación se aislaron dos clonas las cuales fueron caracterizadas con *Mnl* I, determinando que ambas clonas poseían la mezcla de los plásmidos silvestre y mutante.

La digestión con la enzima *Mnl* I (Figura 12) nos permitió diferenciar el mutante el cual presenta una banda de 359 pb que no se encuentra en el plásmido silvestre debido a que la mutación en el sitio de unión a *Sp1* modifica uno de los sitios de reconocimiento de esta enzima.

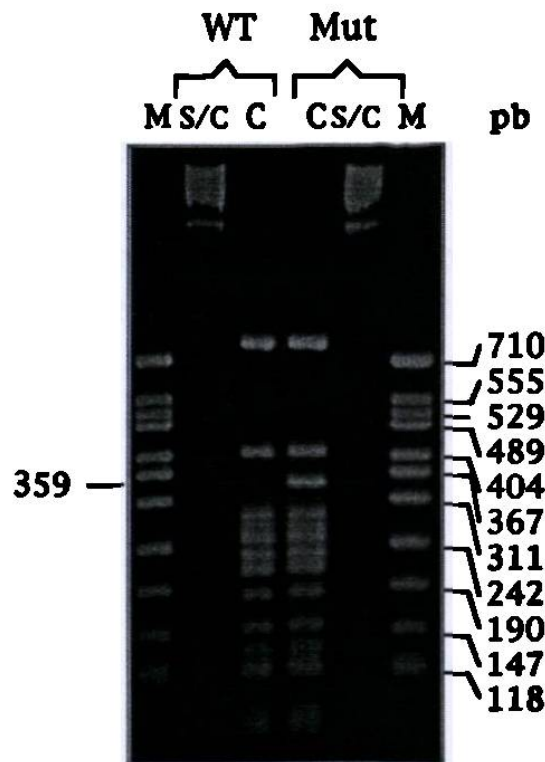


Figura 12. Diferenciación de los plásmidos mutante y silvestre por digestión con *Mnl* I. El plásmido silvestre (WT) y el mutado (Mut) se digirieron con *Mnl* I (carriles C). Se incluyeron plásmidos sin cortar (S/C) y el marcador de peso molecular (M), que corresponde a pP₅₀₀-hPL-4 *Msp* I. Una banda de 359pb se observa unicamente en el plásmido mutagenizado, el gel es de agarosa al 2%.

4.3. Caracterización de los vectores pAVE-HGH20K/P500-hPL4 silvestre y mutante.

4.3.1. Caracterización enzimática.

Al transformar bacterias *E. coli* DH₅α, con la mezcla de los 2 plásmidos (WT/WT y Mut/Mut), se puede separar cada tipo de plásmido. Las clonas resultantes fueron nuevamente caracterizadas por digestión con *Mnl* I; y se obtuvo aproximadamente una distribución de 1:1 de cada plásmido.

Tanto el plásmido pAVE-HGH20K/P₅₀₀-hPL4 (WT/WT) como el pAVE-HGH20K/P₅₀₀-hPL4*MutSp1* (Mut/Mut) fueron caracterizados con algunas enzimas dando el mismo patrón de restricción (Figura 13), siendo *Mnl* I la única enzima que permite diferenciar ambos plásmidos (Figura 12).

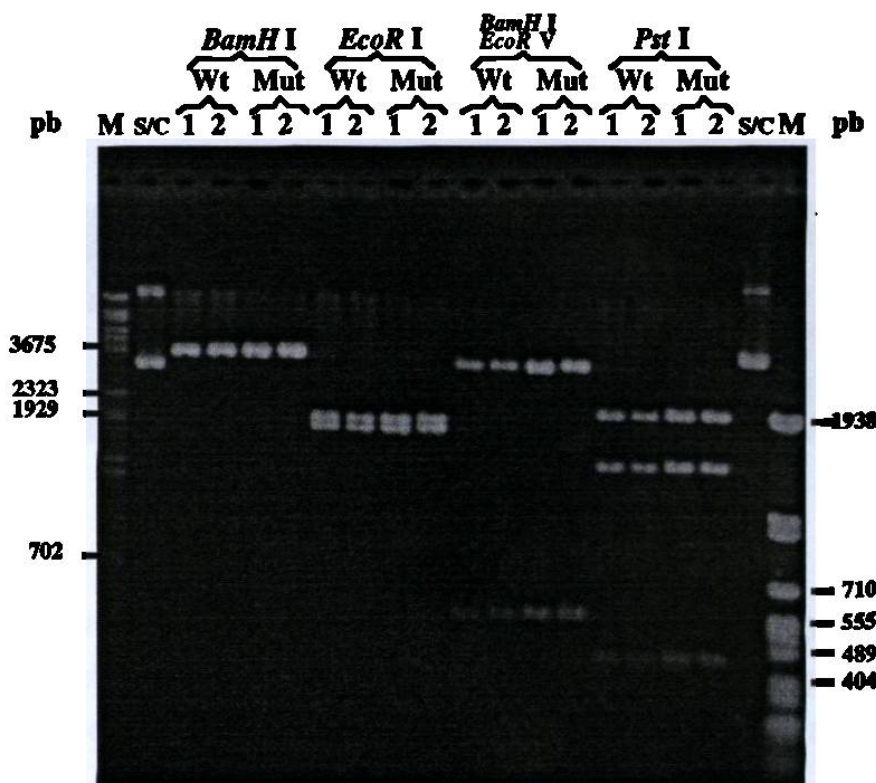


Figura 13. Caracterización enzimática de pAVE-HGH20K/P500-hPL4 silvestre (WT) y mutante (Mut). Los plásmidos fueron digeridos con las enzimas *BamH I* que los lineariza (3690 pb), con *EcoR I* la cual corta en dos sitios (1788 y 1902 pb), con *BamH I/EcoR V* que liberan las 500 pb del promotor de hPL-4 y por último con *Pst I* la cual corta en tres sitios (1981, 1360, 349 pb). S/C plásmidos sin digerir, M marcador de peso molecular pP₅₀₀-hPL4 *Msp I*. El gel es de agarosa al 1%.

4.3.2. Caracterización por secuenciación.

El resultado de la secuenciación de ambos plásmidos (WT/WT y Mut/Mut), permitió confirmar la mutación deseada en el sitio de unión a Sp1 en el promotor del gen hPL4 presente en el plásmido mutado (Figura 14).

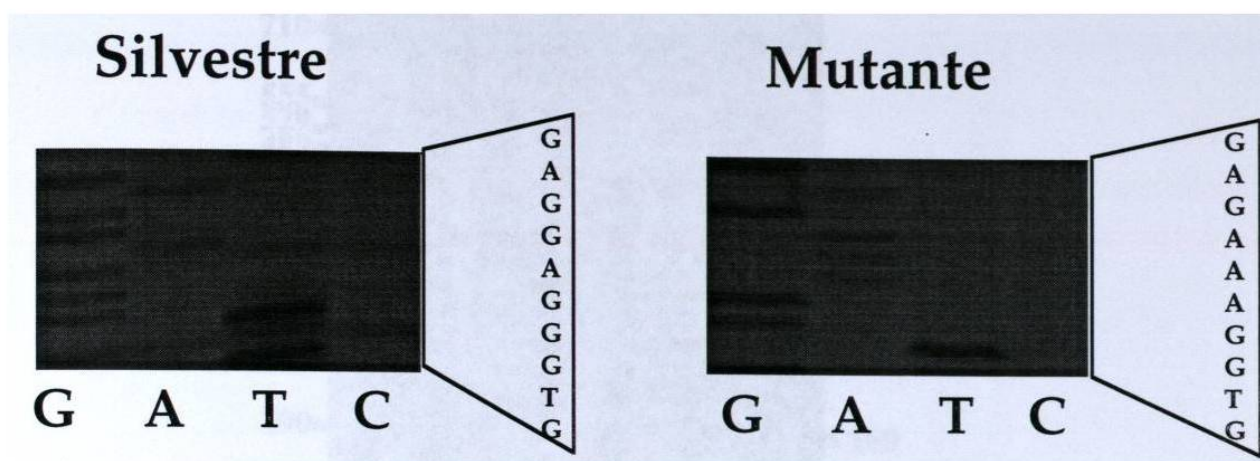


Figura 14. Secuenciación de los promotores silvestre y mutante. La secuencia nucleotídica del sitio de unión a Sp1 es 5'GGGAGG3' en el plásmido silvestre y 5'GGAAAG3' en el plásmido mutante. El gel es de poliacrilamida-urea al 6%.

4.4. Efectos de la mutación.

Las sondas para el ensayo se obtuvieron mediante PCR de los plásmidos silvestre y mutante, siendo ambos productos de amplificación de 430 pb (Figura 11). Las sondas se marcaron radiactivamente durante la PCR mediante la incorporación de [^{32}P]- α dATP. Ambas sondas fueron posteriormente digeridas con la enzima de restricción *Nsi* I para obtener un fragmento más pequeño y adecuado (de 261 pb) para nuestros ensayos de retardación en gel (Figura 15). La banda de 261 pb se purificó mediante centrifugación con fibra de vidrio⁴⁶.

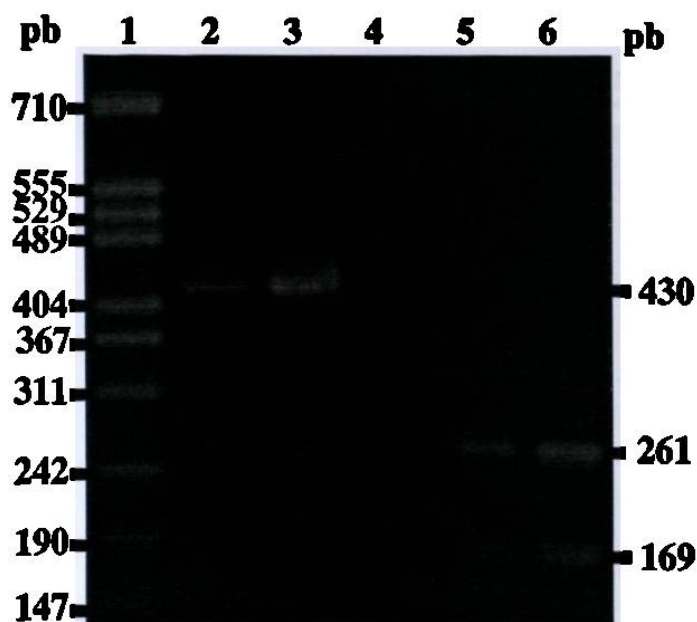


Figura 15. Obtención de la sonda para los ensayos de unión DNA-proteína. En el carril 1 se encuentra un marcador de peso molecular pP₅₀₀-hPL4 *Msp* I; en los carriles 2 y 3 los productos de PCR de 430 pb correspondientes al plásmido silvestre y mutante respectivamente; en el carril 4 el testigo negativo de la amplificación; en el carril 5 y 6 el producto de la digestión del amplicón de 430 pb con *Nsi* I tanto del silvestre como del mutante respectivamente. El gel es de agarosa al 2%.

Las sondas marcadas radiactivamente, obtenidas tanto del plásmido silvestre como del mutante, se incubaron con la proteína Sp1 humana recombinante de origen comercial y fueron separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones nativas. Aquellos fragmentos de DNA que forman complejos con la proteína tienen una movilidad menor en la electroforesis que los fragmentos de DNA libres. Mediante autoradiografía, estos ensayos de retardación en gel evidenciaron la unión de la proteína Sp1 a la sonda conteniendo el sitio natural de unión a este factor transcripcional, más no así la sonda que provino del plásmido con el sitio Sp1 mutado (Figura 16).

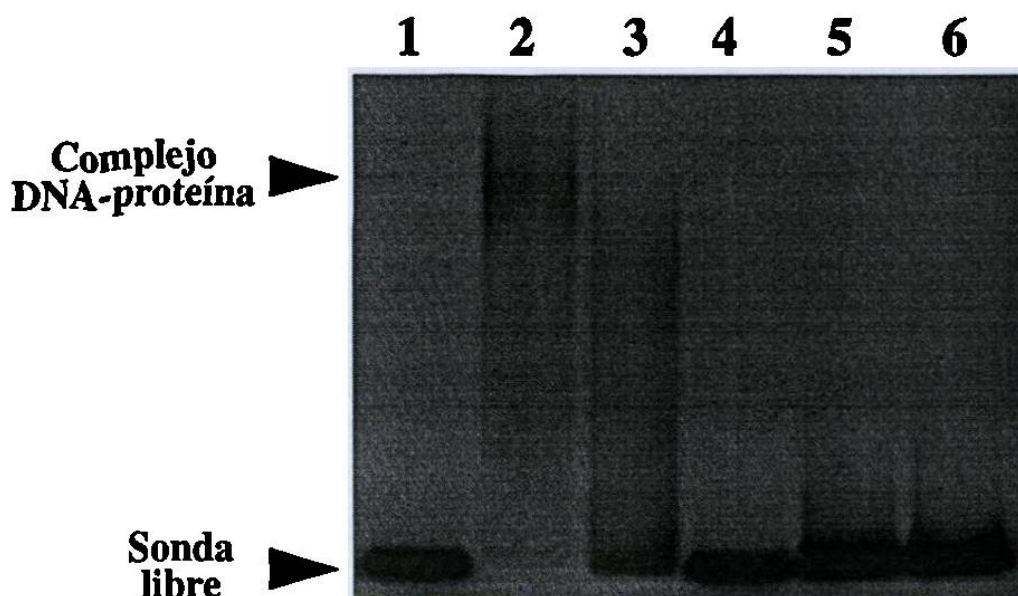


Figura 16. Ensayos de Retardación en Gel. Se muestran en los carriles del 1 al 3 la sonda del plásmido silvestre: libre, incubada con 0.2 U y con 0.1 U de Sp1 respectivamente. En los carriles del 4 al 6 se depositaron la sonda del plásmido mutante: libre, incubada con 0.2 U y con 0.1 U de Sp1.

4.5. Comparación del potencial transcripcional de los promotores silvestres y mutantes.

4.5.1. PCR competitivo.

Para determinar si nuestros ensayos de PCR estaban en la fase logarítmica y no había saturación de producto amplificado, se realizaron ensayos de PCR de 20 ciclos utilizando el DNA de los plásmidos pAVE-HGH20K y pAVE-HGH22K; variando la concentración del primero que fue el gen reportero y manteniendo constante la concentración del segundo que fue el control interno. Al amplificar los plásmidos con los mismos iniciadores 402/403 se obtuvieron bandas de tamaño diferente: 740pb para HGH-22K y 695pb para HGH-20K. La intensidad de las bandas obtenidas se analizaron por densitometría y los datos se evaluaron graficando intensidad relativa de la 20K/22K contra la concentración

relativa de la 20K/22K. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.99; indicándonos que estábamos en fase lineal y por lo tanto el ensayo era cuantitativo. En la figura 17 se muestra el resultado del mismo.

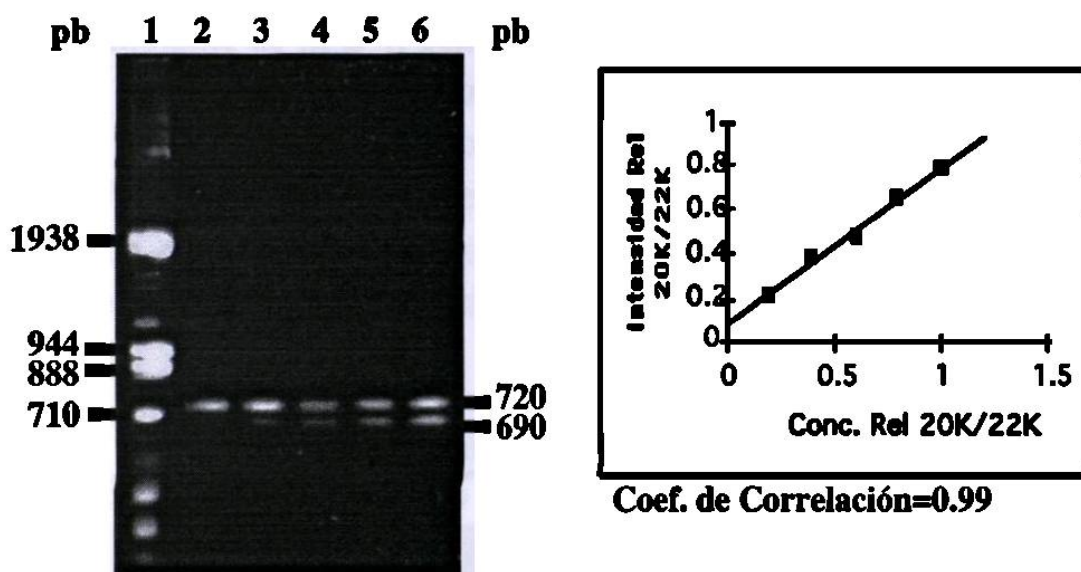


Figura 17. Curva de calibración mediante PCR competitivo. a) En el carril 1 tenemos un marcador de peso molecular; en los carriles del 2 al 6 las amplificaciones del DNAC de HGH 20K con (2, 4, 6, 8 y 10 ng respectivamente), y del DNAC de HGH 22K, el cual se mantuvo constante en 10 ng en todos los ensayos.

b) Gráfica de los datos obtenidos por densitometría.

4.5.2. Amplificaciones de los DNAs complementarios de las células JEG-3 cotransfectadas.

Una vez determinadas las condiciones del PCR cuantitativo, se procedió a realizar las amplificaciones de los DNAs generados por transcripción reversa del RNA total extraído de las células transfectadas con los plásmidos recombinantes. Los resultados se muestran en la figura 18.

Los controles utilizados en este tipo de ensayos, fueron los mismos plásmidos pAVE-HGH20K y pAVE-HGH22K y por lo tanto dan

teóricamente señales similares; adicionalmente, se transfectó el plásmido pCMVcat con el pAVE-HGH22K.

Se apreció a simple vista (Figura 18) una disminución de la banda correspondiente al producto amplificado derivado del DNAc de la HGH20K en las transfecciones realizadas con los plásmidos conteniendo el promotor mutante de hPL-4, con respecto a la intensidad de las bandas de HGH20K en los plásmidos con el promotor silvestre de hPL-4. Sin embargo, en el carril correspondiente a la co-transfección de CMV-20K/CMV-22K las bandas se ven con una intensidad similar; y en la co-transfección con CAT la intensidad de la banda correspondiente a 22K es más fuerte de bido a que no existe competición por los iniciadores.

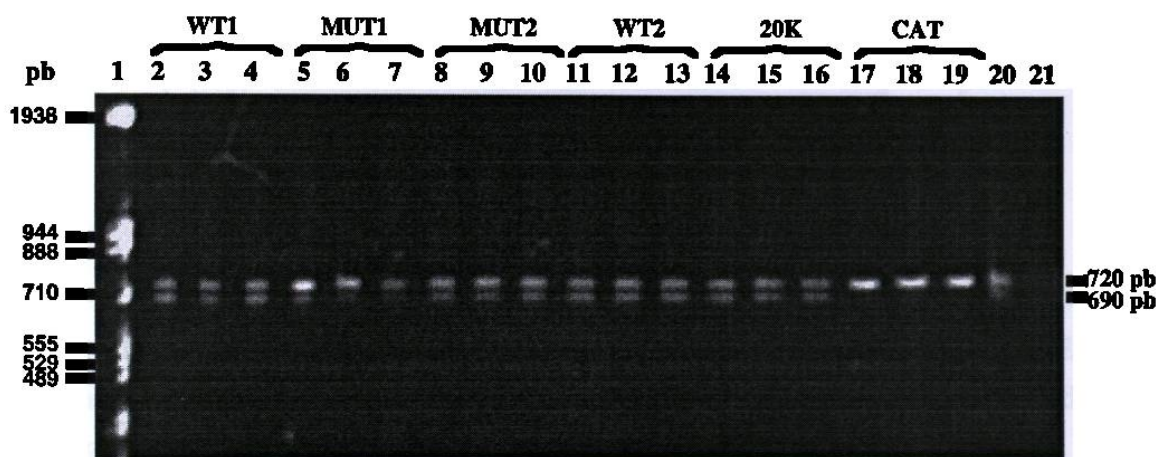
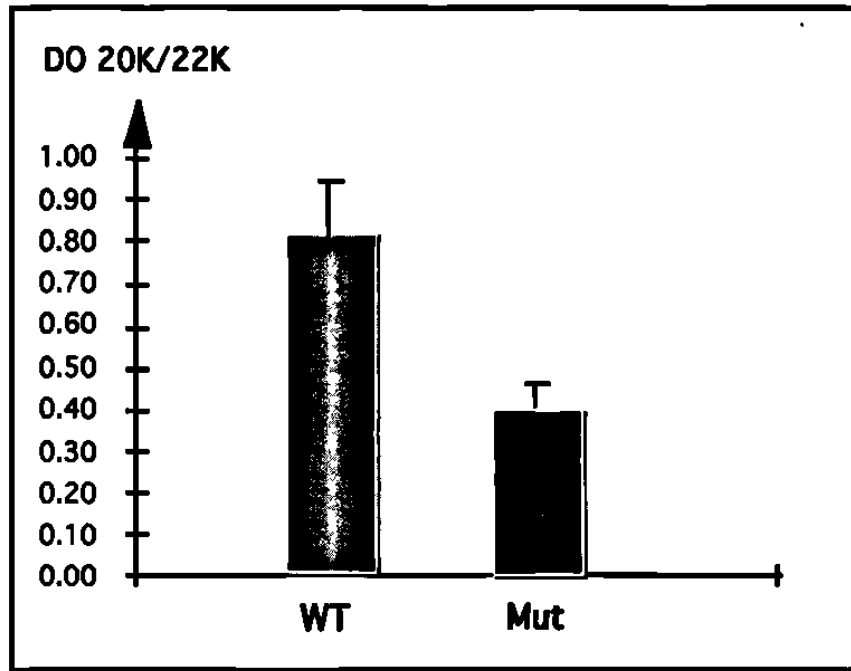


Figura 18. RT-PCR de las células JEG-3 transfectadas con los plásmidos recombinantes. En el carril 1 el marcador de peso molecular; en los carriles 2, 3 y 4 cotransfección con la clona 1 del plásmido silvestre; en los carriles 5, 6 y 7 cotransfección con la clona 1 del plásmido mutante; en los carriles 8, 9 y 10 cotransfección con la clona 2 del plásmido mutante; en los carriles 11, 12 y 13 cotransfección con la clona 2 del plásmido silvestre; en los carriles 14, 15 y 16 cotransfección con el plásmido pAVE-HGH 20K; en los carriles 17, 18 y 19 cotransfección con el plásmido pCMVcat; en el carril 20 el testigo positivo de la PCR y en el carril 21 el testigo negativo de la PCR.

El gel anterior se sometió a un análisis densitométrico de la intensidad de cada una de las bandas en el aparato GelDoc de BioRad. Se obtuvo la densidad óptica de las bandas de 720 pb (22K) y 690 pb (20K)

en cada ensayo, los datos se graficaron en función de la densidad óptica de 20K entre la densidad óptica de la 22K (Figura 19).



P < 0.05

Figura 19. Análisis de los ensayos de expresión en células JEG-3. En la gráfica podemos observar una disminución evidente y significativa ($p < 0.05$) de la expresión de un 50% en el mutante con respecto al silvestre.

Los datos transformados se analizaron estadísticamente aplicando una prueba *t de Student* y el valor de la *t* calculada fue de 3.938, que es mayor al valor de la *t* crítica 2.306 calculado para $p < 0.05$; ésto indica que existen diferencias significativas entre la expresión de ambas construcciones (silvestre y mutante). El potencial transcripcional del promotor de hPL4 intacto es el doble del potencial del promotor mutado en el sitio de unión a Sp1.

CAPITULO V

DISCUSION

Este estudio fue realizado para dilucidar la participación del factor transcripcional Sp1 en la regulación del gen hPL-4, en un sistema derivado de células placentarias.

En los promotores de los genes del complejo multigénico hGH-hPL se presenta la secuencia GGGAGG la cual es una variante del sitio canónico GGGCGG del factor transcripcional Sp1²⁰.

Una estrategia para evaluar la participación de un factor transcripcional en la regulación de un gen consiste en la eliminación de este sitio por delección o mutagénesis sitio dirigida. Esta segunda opción ofrece la ventaja de preservar la organización espacial del promotor.

Dado que la mutagénesis sitio dirigida es una herramienta de gran utilidad en los estudios de regulación y expresión genética, que permite determinar exactamente el papel que juega una secuencia en la regulación de un gen, para este trabajo se decidió emplearla para cambiar dos bases del sitio de unión de Sp1 (GGGAGG por GGAAAG) dentro del promotor del gen hPL-4, sin alterar el resto de las 500 pb del promotor. Se propuso introducir dos cambios en el sitio de unión a Sp1, para impedir la unión del factor al promotor del gen hPL4.

Se han descrito varias técnicas para realizar mutagénesis sitio dirigida. Clásicamente se utilizan dos oligonucleótidos⁴⁸, el primero corresponde al mutagénico que introduce la mutación deseada y el segundo de selección altera un sitio de restricción único en el vector, substituyéndolo por otro nuevo. Estos iniciadores una vez apareados al plásmido desnaturalizado, permiten la síntesis de una hebra complementaria. Un tratamiento con la enzima *Dpn* I nos permite diferenciar las hebras metiladas de las que aún no lo son, y así eliminar la mayor parte del plásmido silvestre. Los plásmidos híbridos WT/Mut son introducidos en la cepa *mutS*, la cual es defectuosa en aceptar

desapareamientos en sus moléculas de DNA. Una segunda transformación nos permite separar ambas poblaciones WT/WT y Mut/Mut.

La desventaja de usar estos dos oligos reside en la dificultad de diseñar un primer de selección, ya que no siempre que se detecta el marcador de selección, tenemos la seguridad de que éste también presente la mutación deseada; debido a que el apareamiento de ambos oligonucleótidos se puede dar en forma desigual.

Nosotros propusimos en este trabajo, una variante de la técnica mediante el uso de un solo oligonucleótido, el cual además de introducir la mutación deseada, nos sirve al mismo tiempo de marcador de selección al originar la pérdida de un sitio de restricción.

La mutación introducida en el plásmido pAVE-HGH20K/P₅₀₀-hPL4 en sólo dos bases nucleotídicas del sitio de unión al factor transcripcional Sp1 realmente impidió la unión de este factor a su sitio blanco.

Anteriormente, se utilizaba CAT como gen reportero en los ensayos de transfección para medir la eficiencia de ésta, sin embargo, no proporcionaba datos confiables de la expresión del promotor blanco, por ser solo un ensayo cualitativo. Nosotros por lo tanto propusimos el uso de la pareja de los DNAc's de HGH20K y 22K como genes reporteros en estos ensayos, ya que nos permiten monitorear el proceso completo desde la extracción del RNA total, así como la eficiencia de transfección. Además, ambos DNacs se amplifican con el mismo par de iniciadores, por lo que un RT-PCR competitivo, como el empleado en este trabajo, permite hacer un análisis semi-cuantitativo de las expresiones de cada una de las construcciones recombinantes.

Lo anterior quedo de manifiesto al realizar la curva de competición, la cual arrojó una correlación de 0.99, indicándonos que el DNAc de la HGH22K es un excelente competidor natural y que cualquier valor entre los puntos de la curva puede ser interpolado confiablemente.

Sin embargo, los vectores se podrían todavía mejorar introduciendo un intrón dentro del DNA reportero, para evitar riesgos de confusión entre los productos de PCR derivados del plásmido y de los RNAs.

Estudios previos indicaron que Sp1 juega un papel importante en la regulación de los genes de hPLs. Fitzpatrick y cols realizaron deleciones a lo largo del promotor de hPL-3 para buscar las secuencias involucradas en la regulación de su expresión, introduciéndolo en células derivadas de

coriocarcinoma humano (JEG-3). Ellos encontraron que al deletar una región del promotor entre -142 pb y -129 pb del sitio de iniciación de la transcripción, la expresión de un gen reportero disminuía a un 82% en comparación con las -1200 pb promotor (100%). Esta región deletada incluye el sitio de unión al factor transcripcional Sp1^{12,15}.

Recientemente, Jiang y cols analizaron la importancia de Sp1 en la regulación de hPL, ellos utilizaron las 500 pb del promotor de hPL-4, encontrando que al cambiar la cuarta base de A (en los promotores de los hPL's) por una C (del sitio canónico de Sp1), la expresión de un gen reportero aumentaba 1.6 veces; sin embargo, al deletar 3 bases del sitio de unión a Sp1 la expresión del gen reportero disminuía a un 75%, comparado con las 500 pb (100%) intactas³⁵.

Los experimentos realizados hasta el momento no explican realmente el papel de Sp1 en los promotores de los genes de hPLs, debido a que los ensayos de delección utilizados en los estudios mencionados con anterioridad, no solo involucran a la secuencia de unión a Sp1 sino otras secuencias río arriba del promotor que pudieron influir en la disminución de la expresión del gen reportero observada. Además, estas delecciones afectan tanto el espacio que ocupa el sitio de Sp1 como la distancia relativa de este sitio con los otros involucrados en el promotor, con lo cual los resultados podrían ser debidos a esta alteración espacial.

En cambio si solo se alteran unas bases de la secuencia de reconocimiento de Sp1, los resultados se atribuyen directamente a este hecho, quedando descartada la alteración de los patrones de espacio y distancia que son cruciales en los promotores.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos de los experimentos realizados en el presente trabajo podemos concluir lo siguiente:

1. Logramos establecer una mejora a la metodología de mutagénesis sitio dirigida con un sólo oligonucleótido (mutagénico) y la utilización de la enzima *Dpn I* (para seleccionar los plásmidos que tengan una cadena neo-sintetizada). Esta estrategia nos permitió obtener una versión del promotor del gen hPL-4 mutada específicamente en el sitio de unión de Sp1.
2. Ensayos de unión con la proteína purificada comprobaron que el cambio de GGGAGG a GGAAAAG impedía la unión del factor transcripcional Sp1 en la versión mutada del promotor del gen hPL-4.
3. Al utilizar las dos versiones del DNAc de HGH como genes reporteros resultó muy conveniente. Mientras el DNAc de la HGH de 20K fungió como gen reportero de los promotore en estudio (hPL4 WT y Mut), el de la isoforma de 22K, bajo el control de un promotor viral, sirvió como testigo de todo el proceso. Ambos son amplificados por el juego de iniciadores consenso 402/403, dando dos bandas de diferente tamaño que no se pueden confundir con la amplificación del DNA genómico (bandas de mayor tamaño) y bajo las condiciones de trabajo que manejamos no hay interferencia de los posibles RNAs de hPLs presentes

en las células JEG-3 de origen placentario, ya que éstos no se detectaron en los controles.

4. Se demostró que la utilización como control de transfección del plásmido pAVE-HGH22K también representa una excelente alternativa al vector CAT, ya que contribuye también como un control interno para los genes del complejo hGH-hPL en un ensayo de RT-PCR competitivo, haciendo cuantificable la transcripción.

5. Los experimentos realizados permitieron comparar el potencial transcripcional de las dos versiones (mutada y silvestre) del promotor de hPL4 y se concluyó que la mutación en el sitio de unión a Sp1 redujó en un 50% la transcripción bajo el promotor de hPL-4 en células JEG-3.

CAPITULO VII

REFERENCIAS

1. Tjian R., Maniatis, T. (1994) Transcriptional activation: A complex puzzle with few easy pieces. *Cell*. 77:5-8.
2. Benjamin L. (1994) *Genes V*. Oxford University Press. N.Y.
3. Tjian R. (1995) Molecular machines that control genes. *Sci. Am.* February 38-45.
4. Miyamoto, N.G., Moncollin, V., Egly, J.M., Chambon, P. (1985) Specific interaction between a transcription factor and the upstream element of the adenovirus-2 major late promoter. *EMBO J.* 4:3563-3570.
5. Chen, E.Y., Liao, Y.C., Smith, D.H., Barrera-Saldaña, H.A., Gelinas, R.E., Seeburg, P.H. (1989) The human growth hormone locus: Nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics*. 4:479-497.
6. Selvayanagam, C.S., Tsai, S.Y., Selvayanagam, P., Tsai, M.J. (1984) Multiple origins of transcription for the human placental lactogen genes. *J. Biol. Chem.* 259:14642-14646.
7. Cooke, N.E., Ray, J., Emery, J.G., Liebhaber, A. (1988) Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placental predict the expression of novel growth hormone proteins. *J. Biol. Chem.* 263:9001-9006.
8. Barrera-Saldaña, H.A., Seeburg, P.H., Saunders, G.F. (1983) Two structurally different genes produce the same secreted human placental lactogen hormone. *J. Biol. Chem.* 258:3787-3793.
9. Barrera-Saldaña, H.A., Robberson, D.L., Saunders, G.F. (1982) Transcriptional products of the human placental lactogen gene. *J. Biol. Chem.* 257:12399-12404.
10. Handwerger, S. (1991) Clinical counterpoint: The physiology of the placental lactogen in human pregnancy. *Endocr. Rev.* 12:329-336.
11. Walker, W.H., Fitzpatrick, S.L., Barrera-Saldaña, H.A., Reséndez-Pérez, D., Saunders, G.F. (1991) The human placental lactogen

- genes: Structure, function, evolution and the transcriptional regulation. *Endocrinol.* 12:316-328.
12. Fitzpatrick, S.L., Walker, W.H., Saunders, G.F. (1990) DNA sequences involved in the transcriptional activation of the human placental lactogen gene. *Mol. Endocrinol.* 4:1815-1826.
 13. MacLeod, J.N., Lee, A.K., Liebhaber, S.A., Cooke, N.E. (1992) Developmental control and alternative splicing of the placentally expressed transcripts from the human growth hormone gene cluster. *J. Biol. Chem.* 267:14219-14226.
 14. Wursel, J.M., Parks, J.S., Herd, J.E., Nielsen, P.V. (1992) A gene deletion is responsible for absence of human chorionic somatomammotropin. *DNA.* 1:251.
 15. Fitzpatrick, S.L. (1989) Analysis of the human placental lactogen gene promoter. PhD. Tesis, Universidad de Texas, Centro de las Ciencias de la Salud en Houston.
 16. Martínez-Rodríguez, H.G., Guerra-Rodríguez, N.E., Iturbe-Cantú, M.A., Martínez-Torres, A., Barrera-Saldaña, H.A. (1997) Expression of the human placental lactogen and variant growth hormone genes in placentas. *Archives Med. Res.* 28:507-512.
 17. Misra-Press, A., Cooke, N.E., Liebhaber, S.A. (1994) Complex alternative splicing inactivates the chorionic somatomammotropin-like (hCS-L) gene. *J. Biol. Chem.* 269:23220-23229.
 18. Reséndez-Pérez, D., Ramírez-Solis, R., Varela-Echavarría, A., Martínez-Rodríguez, H.G., Barrera-Saldaña, H.A. (1990) Coding potential of transfected human placental lactogen genes. *Nucleic Acids. Res.* 18:4665-4670.
 19. Jaquemin, P., Oury, C., Morin, A., Belayew, A., Martial, J.A., (1994) Characterization of a single strong tissue-specific enhancer downstream from the three human genes encoding placental lactogen. *Mol. Cell. Biol.* 14:93-103.
 20. Tansey, W.P., Catanzaro, D.F., (1991) Sp1 and the thyroid hormone receptor differentially activate expression of human growth hormone and chorionic somatomammotropin genes. *J. Biol. Chem.* 266:9805-9813.
 21. Peritz, N.L., Fodor, E.J.B., Silversides, D.W., Cattini, P.A., Baxter, J.D., Eberhardt, N.L. (1988) The human growth hormone gene

- contains both positive and negative control elements. *J. Biol. Chem.* 263:5005.
22. Courtois, S.J., Lafontaine, D.A., Lemaigre, F.P., Durviaux, S.M., Rousseau, G.G. (1989) Nuclear factor-1 and activator protein-2 bind in a mutually exclusive way to overlapping promoter sequences and *trans*-activate the human growth hormone gene. *Nucleic Acids Res.* 18:57-64.
 23. Lemaigre, F.P., Courtois, S.J., Lafontaine, D.A., Rousseau, G.G. (1990) Evidence that the upstream stimulatory factor and Sp1 transcription factor bind *in vitro* to the promoter of the human growth hormone gene. *Eur. J. Biochem.* 188:555-561.
 24. Lemaigre, F.P., Lafontaine, D.A., Courtois, S.J., Durviaux, S.M., Rousseau, G.G. (1990) Sp1 can displace GHF-1 from its distal binding site and stimulate transcription from the growth hormone gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* 10:1811-1814.
 25. Bodner, M, Karin, M. (1987) A pituitary-specific *trans*-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cell. *Cell.* 50:267-275.
 26. Bodner, M, Castrillo, J.L., Castrillo, J.L., Theill, L.E., Deerinck, T., Ellisman, M., Karin, M. (1988) The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is homeobox-containing protein. *Cell.* 55:505-518.
 27. Natchigal, M.W., Nickel, B.E., Klassen, M.E., Zhang, W., Eberhardt, N.L., Cattini, P.A. Human chorionic somatomammotropin and the growth hormone gene expression in the pituitary tumour cell is dependent on proximal promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 17.
 28. Stephanou, A., Handwerger, S. (1994) Interleukin-6 stimulates placental lactogen expression by human trophoblast cell. *Endocrinol.* 135:719-723.
 29. Stephanou, A., Sarlis, N.J., Richards, R. Handwerger, S. (1994) Expression of retinoic acid receptor subtypes and cellular retinoic acid binding protein-II mRNAs during differentiation of human trophoblast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202:772-780.
 30. Stephanou, A., Ross, R., Handwerger, S. (1994) Regulation of human placental lactogen expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinol.* 135:2651-2656.

31. Stephanou, A., Handwerger, S. (1995) Retinoic acid and thyroid hormone regulate placental lactogen expression in human trophoblast cells. *Endocrinol.* 136:933-939.
32. Stephanou, A., Handwerger, S. (1995) The nuclear factor NF-IL6 activates human placental lactogen gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206:215-222.
33. Stephanou, A., Handwerger, S. (1995) identification of a composite steroid hormone response element on the human placental lactogen promoter. *Mol. Endocrinol.* 112:123-129.
34. García-Villalba, P. Jimenez-Lara, A.M., Aranda, A. (1996) Vitamin D interferes with transactivation of the growth hormone gene by thyroid hormone and retinoic acid. *Mol. Cell. Biol.* 16:318-327.
35. Jiang, S.W., Shepard, A.R., Eberhardt, N.L. (1995) An initiator element is required for maximal human chorionic somatomammotropin gene promoter and enhancer function. *J. Biol. Chem.* 270: 3683-3692.
36. Faber, P.W., Van Rooij, H.C.J., Schipper, H.J., Brinkmann, A.O., Trapman, J. (1993) Two different, overlapping pathways of transcription initiation are active on the TATA-less human androgen receptor promoter. *J. Biol. Chem.* 268:9296-9301.
37. Sadasivan, E. Cedeno, M.M., Rothenberg, S.P. (1994) Characterization of the gene encoding of folate-binding protein expressed in the human placenta. *J. Biol. Chem.* 269:4725-4735.
38. Lytras, A., Cattini, P.A. (1994) Human chorionic somatomammotropin gene enhancer activity is dependent on the blockade of a repressor mechanism. *Mol. Endocrinol.* 8:478-490.
39. Jiang, S.W., Eberhard, N.L. (1996) TEF-1 Transrepression in BeWo cells is mediated through interactions with the TATA-binding protein, TBP. *J. Biol. Chem.* 271:9510-9518.
40. Dynan, W.S., Tjian, R. (1983) The promoter-specific transcription factor Sp1 bind to upstream sequences in the SV-40 early promoter. *Cell.* 35:79-87.
41. Jaquemin, P., Oury, C., Belayew, A., Martial, J.A. (1994) A TEF-1 binding motif that interacts with a placental protein is important for transcription activity of the hCS-B enhancer. *DNA Cell. Biol.* 13:1037-1045.

42. Xiao, J.H., Davidson, I., Mathes, R., Garnier, J.M., Chambon, P. (1991) Cloning, expression, and transcriptional properties of the human placental lactogen gene in enhancer factor TEF-1. *Cell*. 65:551-558.
43. Alvidrez-Quihui, L.E. (1990) Subclonación y expresión transitoria de los DNAs complementarios de las hormonas del crecimiento humana y bovina. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias Biológicas, UANL.
44. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1992) Short Protocols in Molecular Biology, 2nd Ed. A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology.
45. Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E.F. Molecular cloning, A laboratory manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
46. Zavala-Díz de la Serna, F.J. (1995) Clonación molecular de un fragmento de DNA genómico candidato a ser el gen de la hormona de crecimiento del tlacuache (*Didelphis marsupialis L*), un marsupial americano. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias Biológicas, UANL.
47. Godoni, D, Kadonaga, J.T., Barrera-Saldaña, H.A., Takahashi, K., Chambon, P., Tjian, R. (1985) Bidirectional SV40 transcription mediated by tandem Sp1 binding interactions. *Science*. 230:511-517.
48. Clontech. (1993) Transformer™ site-directed mutagenesis Kit.
49. Life-Technologies. LipofectAMINE™ Reagent. Información técnica.
50. Canizales-Espinoza, M. (1996) Estudio comparativo de los promotores de genes del complejo hGH-hPL que se expresan en placenta. Tesis de Maestría. Fac. de Medicina, UANL.
51. Deng, W.P., Nickoloff, J.A. (1992) Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem*. 200:81-88.
52. Ogretmen, B., Safa, A.R. (1995) Mini-Preparation of Total RNA for RT-PCR from Cultured Human Cells. *BioTechniques*. 19:374-376.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

María del Carmen Barboza Cerda.

**Candidato para el Grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética.**

Tesis:

**PARTICIPACIÓN DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL SP1 EN
LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN hPL-4.**

Campo de Estudio: Ciencias Básicas.

Biografía:

Datos Personales: Nacimiento en Monterrey, Nuevo León el 28 de Febrero de 1970, hija de Esteban Barboza Barboza y María del Carmen Cerda Torres.

Educación: Licenciatura en Químico Clínico Biólogo por la Universidad Autónoma de Nuevo León. Titulación en 1993.

