

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



ORGANIZACION DEL LOCUS DEL COMPLEJO GH-PL
EN EL MONO ARAÑA (*Ateles geoffroyi*)

POR

Q.C.B. DOLORES CARMEN ESQUIVEL ESCOBEDO

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

Junio de 1999

TM

QH445

E87

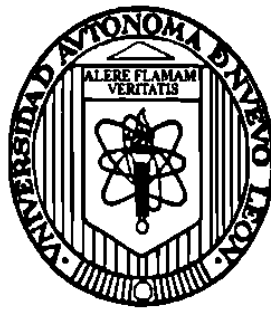
C.1

Q.C.B. DOLORES CARMEN ESQUIVEL ESCOBEDO



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



ORGANIZACION DEL LOCUS DEL COMPLEJO GH-PL EN EL
MONO ARAÑA (*Ateles geoffroyi*)

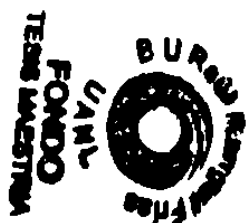
Por

Q.C.B. DOLORES CARMEN ESQUIVEL ESCOBEDO

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

Junio de 1999

TM
94445
E87



**ORGANIZACIÓN DEL LOCUS DEL COMPLEJO GH-PL EN EL MONO ARAÑA
(Ateles geoffroy)**

Aprobación de la Tesis:



DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Presidente



DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Secretario



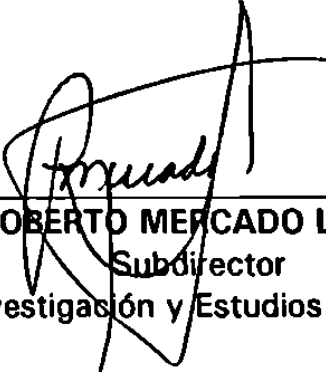
DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
1er. Vocal



DR. JOSÉ MA. VIADER SALVADO
2do. Vocal



DR. VÍCTOR M. RIOJAS VALDEZ
3er. Vocal



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica, bajo la asesoría de la Dra. Agnès Revol de Mendoza y la co-asesoría del Dr. Hugo Barrera Saldaña.

*Audaz es el que prefiere
arriesgarse, antes de morir
en un sillón de seguridad.*

Alfonso Gratty.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de la beca que me permitió realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Barrera y al Departamento de Bioquímica por la oportunidad y el apoyo para cursar el programa de Maestría.

Muy en especial, a la Dra. Agnès por el gran apoyo brindado....., en este mundo no existen palabras suficientes para darle las GRACIAS.

Al biólogo Alexander Zambrano, encargado de la zona de los monos en el bioparque estrella, quién en forma altruista nos brindo su apoyo para obtener la muestra de sangre del mono araña. Sin su ayuda nos hubiera sido más difícil el desarrollo de este trabajo.

Al MVZ. Ramón Belmontes, quien amablemente nos acompañó hasta el bioparque para así lograr extraer la sangre del mono.

A la MC. Irma A. Martínez por la secuenciación; a la MC. Ana Ma. Sifuentes, por su siempre apoyo y comentarios a lo largo de la Tesis; al MC. Claudio Moreno Rocha, por sus sugerencias al final de la Tesis, y a Victor Treviño, por sus comentarios siempre oportunos.

A toda la generación: Sandra, Maribel, Flor, Eddy, Fermín, Mario y Victor, por haber hecho agradable todos los días más difíciles de la maestría.

A toda la ULIEG: Celia, Carmen, Norma, Martín, Pablo, Andrés, Laura G, Alma R, Luis, Rosy R, Don Pancho, Patty, Raquel, Vicky, Edu, Raúl, Sandra V. MUCHAS GRACIAS.

DEDICATORIA

A DIOS

A mi abuela:

A la cual siempre recuerdo con cariño y gran ejemplo a seguir; yo se que desde donde esta me brinda su confianza y apoyo.

A mis Padres:

Por su gran apoyo incondicional que siempre me han brindado, y además por ayudarme a guiar a mis hijas por este sendero de la vida.

A mis hijas PERLITA y SONIA:

Mis dos grandes amores (después de Dios) por los cuales he luchado y seguire luchando.

.....

A quienes nunca pensaron que lo lograría, y gracias a ellos nace cada día el deseo de superación

RESUMEN

Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

Q.C.B. Dolores Carmen Esquivel Escobedo.


Título del Proyecto: ORGANIZACION DEL LOCUS DEL COMPLEJO GH-PL EN EL MONO ARAÑA (*Ateles geoffroyi*).

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

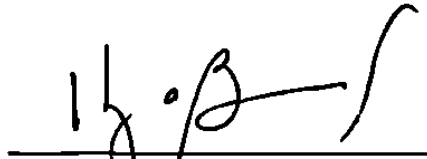
Area de estudio: Biología Molecular.

Objetivo y Método de estudio: La Biología Molecular al aportar herramientas para obtener secuencias de proteínas y de genes, ha permitido estudiar la evolución de éstos, la organización del genoma y la filogenia molecular. Dentro del genoma de los vertebrados, el gen de la hormona del crecimiento (GH) muestra un alto grado de conservación y por ende constituye un buen modelo para este tipo de estudios. En los primates, los genes de la GH y del lactógeno placentario (PL) están estrechamente relacionados, ya que evolucionaron a partir de un gen ancestral, el cual se duplicó hasta formar un complejo de cinco genes en el humano: dos GH y tres PLs. En primates inferiores solo se ha estudiado al Macaco (*Macaca rhesus*), que también posee cinco genes, para el cual aún se desconoce el orden del locus. Para precisar la evolución molecular de este complejo multigénico nos propusimos describir la organización del locus GH en un mono americano: el mono araña (*Ateles geoffroyi*). Aprovechando la conservación de las secuencias nucleotídicas, se propuso obtener por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) los genes, y por PCR-Largo las regiones intergénicas de esta especie. Los productos obtenidos de ambos tipos de PCR, se clonaron y se secuenciaron. Las secuencias se compararon entre sí y con las ya reportadas del humano y macaco.

Contribuciones y Conclusiones: Por PCR se lograron obtener tres genes correspondientes al tipo GH que en base a los valores de similitud obtenidos, se pudo inferir su identidad: maGHA es mucho más parecido a la GH del humano (85%) y del macaco (87%) que los maGHB y C. Por lo tanto, se identificó este primero como un gen GH-N y a los otros dos como genes GH-V. Estos últimos comparten una similitud mayor con maGH-A que con sus homólogos en el humano y macaco. Este resultado se había descrito también para el macaco. Con la utilización del PCR-Largo se lograron obtener cinco regiones intergénicas, las cuales fueron clonadas y parcialmente secuenciadas. La comparación de las regiones promotoras incluidas tanto en las regiones intergénicas como en los genes, permitió proponer dos posibles organizaciones del locus. La utilización de PCR y PCR-Largo para lograr obtener tanto los genes como las regiones intergénicas representa una innovación metodológica que puede aplicarse para el análisis de otros complejos multigénicos.



Dra. Agnès Revol de Mendoza
ASESOR



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
COASESOR

| | |
|--|-----------|
| 3.4.7.1. Construcción del vector recombinante..... | 24 |
| 3.4.7.1.1. Preparación del "Vector T"..... | 25 |
| 3.4.7.1.2. Preparación del "inserto A"..... | 26 |
| 3.4.6.1.3. Ligación para formar el vector recombinante..... | 27 |
| 3.4.7.2. Transformación..... | 27 |
| 3.4.7.3. Caracterización de las clonas recombinantes obtenidas..... | 28 |
| 3.4.7.4. Subclonación de las clonas recombinantes..... | 29 |
| 3.4.7.5. Conservación de las clonas de interés..... | 30 |
| 3.4.8. Determinación y análisis de las secuencias de las clonas recombinantes | 30 |
| 3.4.8.1. Secuenciación cíclica de las clonas recombinantes..... | 30 |
| 3.4.8.2. Iniciadores..... | 30 |
| 3.4.8.3. Comparación de las secuencias génicas..... | 31 |
| 3.4.8.3.1. Análisis comparativo mediante el programa computacional <i>Blast</i> | 31 |
| 3.4.8.3.2. Sitios enzimáticos característicos de cada gen..... | 31 |
| 3.4.8.3.3. Obtención del DNAc y de la secuencia aminoacídica..... | 32 |
| 3.4.9. Reconstrucción de la organización del locus..... | 32 |
| 3.4.9.1. Amplificación de promotores..... | 33 |
| 3.4.9.2. Comparación de los productos amplificados..... | 34 |
| | |
| 4. RESULTADOS..... | 35 |
| | |
| 4.1. Obtención de los genes..... | 35 |
| 4.1.1. Amplificación y caracterización de los genes..... | 35 |
| 4.1.2. Clonación de los genes..... | 36 |
| 4.1.3. Determinación de la secuencia..... | 37 |
| 4.2. Obtención de las regiones intergénicas por PCR-Largo..... | 38 |
| 4.2.1. Amplificación y caracterización de las regiones intergénicas..... | 38 |
| 4.2.2. Clonación de las regiones intergénicas..... | 39 |
| 4.3. Obtención de un nuevo gen..... | 40 |
| 4.4. Organización del locus..... | 41 |
| 4.4.1. Amplificación y caracterización de los promotores..... | 41 |
| 4.4.2. Comparación de las regiones 3' no-traducibles de los genes..... | 42 |
| 4.4.3. Posibles organizaciones del locus GH..... | 43 |
| 4.5. Análisis de las secuencias..... | 44 |
| 4.5.1. Análisis de las secuencias de DNAs..... | 44 |
| 4.5.2. Análisis de las secuencias promotoras..... | 47 |
| | |
| 5. DISCUSION..... | 49 |
| | |
| 6. CONCLUSIONES..... | 55 |
| | |
| 7. REFERENCIAS..... | 56 |

TABLA DE CONTENIDO

| SECCION..... | Página |
|---|---------------|
| 1. INTRODUCCION..... | 1 |
| 1.1. Modelo de estudio: La familia GH-Prl-PL | 2 |
| 1.1.1. Estructura y función de las hormonas de la familia GH-Prl-PL | 2 |
| 1.1.2. Evolución de los miembros de la familia GH-Prl-PL..... | 3 |
| 1.1.3. Evolución molecular del complejo multigénico GH-PL en primates..... | 4 |
| 1.1.4. Hipótesis actuales acerca de la duplicación del gen ancestral de GH..... | 5 |
| 1.2. Evolución paleontológica de los primates | 6 |
| 2. OBJETIVOS..... | 9 |
| 2.1. Objetivo general | 9 |
| 2.2. Objetivos específicos | 9 |
| 3. MATERIALES Y METODOS..... | 10 |
| 3.1. Origen de los reactivos..... | 10 |
| 3.2. Material biológico | 11 |
| 3.3. Equipo | 14 |
| 3.4. Métodos..... | 15 |
| 3.4.1. Estrategia general..... | 15 |
| 3.4.2. Extracción del DNA..... | 16 |
| 3.4.2.1. Obtención de DNA genómico..... | 16 |
| 3.4.2.2. Obtención de DNA plasmídico | 17 |
| 3.4.3. Análisis electroforético del DNA y cuantificación..... | 17 |
| 3.4.3.1. Electroforesis en gel de agarosa..... | 18 |
| 3.4.3.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida..... | 18 |
| 3.4.3.3. Determinación del tamaño de las bandas..... | 18 |
| 3.4.3.4. Cuantificación del DNA..... | 19 |
| 3.4.4. Amplificación de los genes GH-PL. | 19 |
| 3.4.4.1. Iniciadores..... | 20 |
| 3.4.4.2. Optimación de las condiciones de amplificación..... | 21 |
| 3.4.5. Amplificación de las regiones intergénicas. | 22 |
| 3.4.5.1. Iniciadores..... | 23 |
| 3.4.5.2. Condiciones de amplificación por PCR-Largo. | 23 |
| 3.4.6. Caracterización enzimática de los productos amplificados. | 24 |
| 3.4.7. Clonación de los productos amplificados. | 24 |

| | |
|--|-----------|
| APENDICE A: Nomenclatura para los aminoácidos | 60 |
| APENDICE B: Secuencias de los genes obtenidos | 61 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|---------------|
| 1. Evolución de los genes que codifican para GH, PRL y PL, en primates..... | 4 |
| 2. Hipótesis de la duplicación del gen ancestral de las GH | 6 |
| 3. Evolución paleontológica de los primates | 8 |
| 4. Mono araña (<i>Ateles geoffroyi</i>)..... | 13 |
| 5. Estrategia general | 15 |
| 6. Posición de apareamiento de los iniciadores en el PCR para obtener los genes.... | 20 |
| 7. Estrategia para obtener las regiones intergénicas. | 22 |
| 8. Estrategia de clonación | 25 |
| 9. Estrategia de subclonación de los genes | 29 |
| 10. Iniciadores para la secuenciación..... | 31 |
| 11. Estrategia para obtener la organización del locus..... | 33 |
| 12. Amplificación de los genes | 35 |
| 13. Caracterización de la banda amplificada | 36 |
| 14. Diferenciación del inserto de las clonas recombinantes | 37 |
| 15. Amplificación de las regiones intergénicas por PCR-Largo..... | 38 |
| 16. Evidencia de cinco regiones intergénicas | 39 |
| 17. Obtención de un nuevo gen..... | 40 |
| 18. Caracterización enzimática de los promotores | 42 |
| 19. Subconjuntos realizados para armar el locus | 43 |
| 20. Posibles organizaciones del locus GH | 44 |
| 21. Comparación aminoacídica de las GHs del mono araña, humano y macaco | 45 |
| 22. Arbol Filogenético | 46 |
| 23. Comparación de los promotores | 48 |

LISTA DE TABLAS

| | Página |
|--|---------------|
| 1. Taxonomía de los primates | 7 |
| 2. Secuencia de los iniciadores | 11 |
| 3. Preparación del gel de poliacrilamida al 8%..... | 18 |
| 4. Condiciones de amplificación para los dos juegos de iniciadores..... | 21 |
| 5. Condiciones de reacción para el PCR-Largo | 24 |
| 6. Digestión de pBS-SK II con <i>Eco</i> RV..... | 25 |
| 7. Condiciones de reacción para la preparación del Vector T y del inserto A..... | 26 |
| 8. Condiciones de ligación..... | 27 |
| 9. Condiciones de amplificación para los promotores..... | 34 |
| 10. Porcentajes de similitudes de las GHA, GHB y GHC del mono araña | 46 |

NOMENCLATURA

| | |
|------------------------|---|
| A | Nucleótido de adenina |
| aa | Aminoácidos |
| Amp⁺ | Resistencia a ampicilina |
| βgal | β-galactosidasa |
| °C | Grados centígrados |
| C | Nucleótido de citosina |
| Conc | Concentración |
| DNA | Acido desoxirribonucleico |
| DNAc | Acido desoxirribonucleico complementario |
| dNTP | Desoxinucleósido trifosfato |
| EDTA | Acido etilendiaminotetra-acético |
| Fig. | Figura |
| G | Nucleótido de guanina |
| h | Hora |
| HCl | Acido clorhídrico |
| hGH-N | Gen Normal de la Hormona del Crecimiento humano |
| hGH-V | Gen Variante de la Hormona del Crecimiento humano |
| HGH | Hormona del Crecimiento Humano |
| HPL | Hormona del Lactógeno Placentario Humano |
| hPL-1 | Gen 1 de HPL |
| hPL-2 | Gen 2 de HPL |
| hPL-3 | Gen 3 de HPL |
| IPTG | Isopropil-tio-β-D-galactósido |
| kpb | Kilo pares de bases o miles de bases en el DNA |
| kDa | Kilo Daltones |
| logPM | Logaritmo del peso molecular |
| M | Concentración molar |
| mg | Miligramos |
| μg | Microgramos |
| ml | Militros |
| μl | Microlitros |
| μM | Micromolar |
| mM | Milimolar |
| ng | Nanogramos |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida |
| pb | Pares de bases |

| | |
|----------------------|---|
| pH | Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| T | Nucleótido de timidina |
| T_m | Temperatura de fusión |
| U | Unidades enzimáticas |
| UV | Luz Ultravioleta |
| V | Voltios |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido |

CAPITULO I

1. INTRODUCCION

Entender como han aparecido y divergido las especies ha sido uno de los grandes retos científicos de los últimos dos siglos.

Inicialmente las herramientas que se tenían para estudiar la filogenia de los animales eran la Paleontología, la Anatomía, Embriología, Inmunología y Bioquímica comparadas (Novacek, 1992). En estas últimas décadas, el desarrollo explosivo de la Biología Molecular, ha proporcionado cada vez un mayor número de secuencias tanto nucleotídicas como aminoacídicas de una misma proteína en diferentes especies, lo que ha permitido realizar estudios comparativos. Lo que ha dado lugar a una nueva herramienta muy potente, la *Evolución Molecular*, que engloba principalmente dos áreas importantes de estudio: la evolución de las macromoléculas y la filogenia molecular (Li y Graur, 1991).

La evolución de macromoléculas se refiere al estudio de las velocidades y del perfil de los cambios ocurridos en el material genético (secuencias de DNA) y sus productos (proteínas) durante la evolución y a los mecanismos responsables de tales cambios.

La filogenia molecular reconstruye la historia evolutiva de las macromoléculas e infiere sobre la filogenia de los organismos analizando los datos moleculares.

La evolución molecular complementa los datos obtenidos por las herramientas empleadas anteriormente y ha ayudado a aclarar dudas que se tenían acerca de la clasificación anterior y a confirmar las relaciones filogenéticas (Novacek, 1992).

1.1. Modelo de estudio: La familia GH-Prl-PL

Dentro de las familias multigénicas destaca la familia GH-Prl-PL, de la cual por lo menos dos de sus miembros (GH y Prl) se encuentran presentes en todos los vertebrados, incluyendo los peces más primitivos. Los miembros provienen del mismo ancestro y codifican para: Hormona del Crecimiento (GH), Prolactina (Prl) y Láctogeno Placentario (PL); éstas muestran variables de similitud estructural y funcional (Catt y cols, 1967; Sherwood, 1967; Niall y cols, 1971).

1.1.1 Estructura y función de las hormonas de la familia GH-Prl-PL

Las hormonas del crecimiento de mamíferos son en su forma madura, polipéptidos de 191 aminoácidos (aproximadamente 22 kDa), producidas y secretadas por los somatotrofos de la hipófisis anterior y son responsables de estimular el crecimiento lineal en los animales (Daughaday, 1981).

La GH presenta una gran cantidad de funciones, entre las cuales destacan: la actividad impulsora del crecimiento, la promotora de la síntesis de proteínas, DNA y RNA, los efectos diabetogénicos y las acciones lactogénicas y mamotróficas (Li, 1945; Phillips, 1980 y Edwards, 1988).

En el humano se ha descrito una variante de la hormona de crecimiento (GH-V) que se expresa únicamente en la placenta y podría participar en el crecimiento fetal, estimulando la síntesis del factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I).

La Prolactina (Prl), es una proteína con una masa molecular aproximada de 23 kDa. Es producida y secretada por los lactotrofos de la hipófisis anterior. Interviene en el inicio y mantenimiento de la lactación en los mamíferos. En los roedores, es capaz de mantener el cuerpo lúteo; por eso, para ellos se denomina también hormona luteotrófica. En los peces participa en la osmorregulación (Harper, 1997).

El Lactógeno Placentario (PL) es una proteína que se expresa en la placenta. En los primates no se le ha encontrado una función específica, pero se cree que participa en el transporte de nutrientes hacia el feto (Hill, 1986 y 1988). En los mamíferos no primates se sabe que estimula la lactación (Goffin y cols, 1996).

1.1.2. Evolución de los miembros de la familia GH-PrI-PL

La prolactina y la hormona del crecimiento se encuentran en todos los vertebrados, incluyendo los peces más primitivos. Sin embargo, la actividad biológica del último miembro de la familia (PL) ha sido detectada solamente en **primates, roedores y numerosos artiodáctilos** (Forsyth, 1986).

El análisis de la secuencia de los genes de GHs, PrIs y PLs ha proporcionado una información muy valiosa para reconstruir el proceso evolutivo que dió origen a la familia. El alto grado de similitud (85%) observado en el humano entre las secuencias aminoacídicas de HGH y HPL (Bewley y cols, 1972), y en un grado menor de éstas con la prolactina (35%), (Shome y cols, 1977), se refleja también y aún más a nivel nucleotídico: 95% entre hGH y hPL (Chen y cols, 1989) y 44% entre hGH y hPrI (Hirt y cols, 1987).

Los láctogenos placentarios en los primates se derivaron de la hormona del crecimiento, mientras que en los roedores y rumiantes lo hicieron de la prolactina. (Forsyth, 1994).

Se ha postulado que hace aproximadamente 450 millones de años un gen ancestral se duplicó originando dos ramas (Fig. 1), una para el gen GH y la otra para el gen PrI (Barsh y cols, 1983; Miller y cols, 1983). Ambos genes precursores se segregaron en dos cromosomas diferentes (Owerbach y cols, 1980); por ejemplo en el humano el gen de la PRL se encuentra en el cromosoma 6 y el de la GH en el 17. Una duplicación posterior de la GH en

primates dió origen al lactógeno placentario (Wallis, 1981), mientras que en los órdenes artiodáctilos y roedores fue el gen Prl (Goffin y cols, 1996).

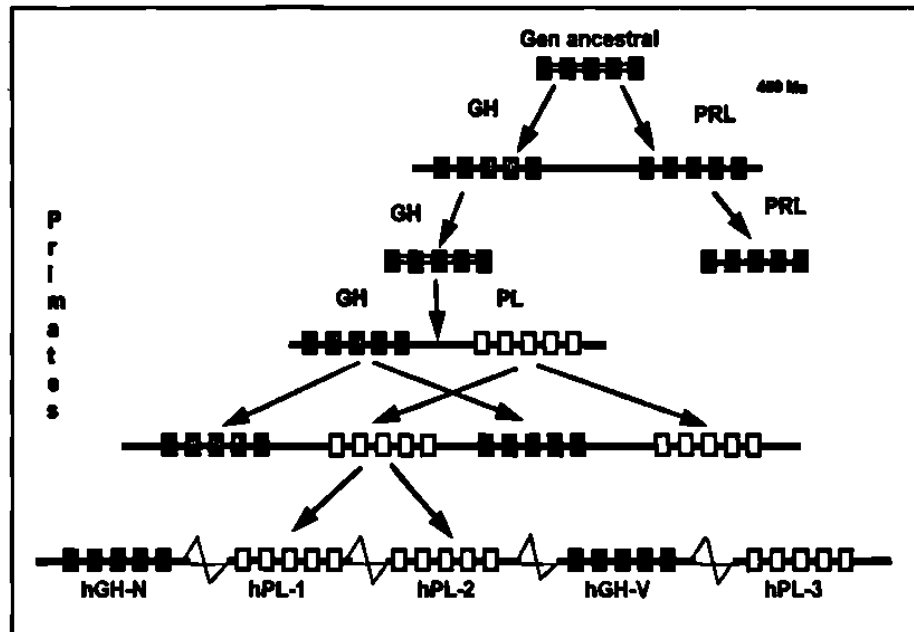


Fig 1. Evolución en los primates de los genes que codifican para GH, PRL y PL. Se ejemplifica la duplicación del gen ancestral y el origen hipotético del locus del complejo multigénico en el humano (Chen, 1989).

1.1.3. Evolución del complejo multigénico GH-PL en primates

El humano ha sido la especie más estudiada de los primates. En ésta, los genes hGH y hPL constituyen un complejo multigénico localizado entre las bandas q22-24 del brazo largo del cromosoma 17 (George y cols, 1981; Harper, 1982). La longitud del locus es de aproximadamente 66 Kpb y su secuencia nucleotídica completa ha sido determinada (Chen y cols, 1989). Los genes del complejo multigénico se encuentran arreglados del extremo 5' al 3' de la siguiente forma: primeramente hGH normal (hGH-N), luego hPL-1, posteriormente hPL-2, al cual le sigue hGH variante (hGH-V) y finalmente hPL-3. Los genes hGH y hPL presentan en su unidad transcripcional una orientación similar y la organización génica es idéntica: cinco exones separados por cuatro intrones en la misma posición. Los genes están separados por regiones intergénicas de 6 a 13 kpb (Chen y cols, 1989).

Los cinco genes del complejo hGH-hPL provienen de la duplicación de un precursor común (parecido a GH), que sucedió hace aproximadamente 15 millones de años (Barsh y cols, 1983; Chen y cols, 1989). Los eventos de recombinación involucraron secuencias repetitivas, que corresponden al 21% del locus. La presencia de homologías internas entre estas hormonas y la abundancia de secuencias de DNA altamente repetitivas a través del locus podría explicar estos eventos recombinantes inusuales (Chen y cols, 1989). Se postula que el complejo multigénico se generó por tres eventos sucesivos de duplicación génica (Fig. 1). En el primero, el precursor dió origen a los dos genes ancestrales de GH y PL. En un segundo evento, la duplicación en tandem de estos dos genes, generando cuatro genes de hGH-N, hPL-2/hPL-1, hGH-V y hPL-3. En el tercero y último, el gen ancestral hPL-2/hPL-1 se duplicó hace aproximadamente 5 millones de años generando los genes hPL-1 y hPL-2 (Walker y cols, 1991).

Existe mayor similitud entre los cinco genes del complejo hGH-hPL, que entre las GH del humano y de cualquiera especie diferente de los primates (Wallis, 1994), esto sería un indicador de que las duplicaciones fueron eventos muy recientes en la escala evolutiva y/o de la ocurrencia de eventos de conversión génica.

Si bien se ha estudiado ampliamente el locus GH-PL en el humano, poco se conoce a la fecha de esta familia en los otros primates. El único mono para el cual se han reportado los cDNAs de esta familia es *Macaca mulatta* (mono del viejo mundo), el cual tiene por lo menos cinco genes, dos derivados de GH y tres de PL (Golos y cols, 1993), cuyo orden en el locus se desconoce hasta la fecha.

1.1.4. Hipótesis acerca de la duplicación de gen ancestral de GH

Las secuencias obtenidas de los genes GH y PL del humano y del macaco, han permitido hacer comparaciones que sugieren que la duplicación del gen ancestral de GH sucedió antes de la divergencia del humano y del macaco (Wallis, 1994); hipótesis que contradice a lo propuesto previamente

(Chen y cols, 1989), donde la duplicación del gen ancestral de GH ocurrió después de que divergieran el humano y los monos (Fig. 2). Ambas hipótesis concuerdan en que hubo tres eventos de duplicación, solo difieren en el tiempo en que estas sucedieron.

Debido a las controversias existentes sobre la duplicación del gen de GH, es importante estudiar un mono que haya divergido antes que el macaco y el humano.

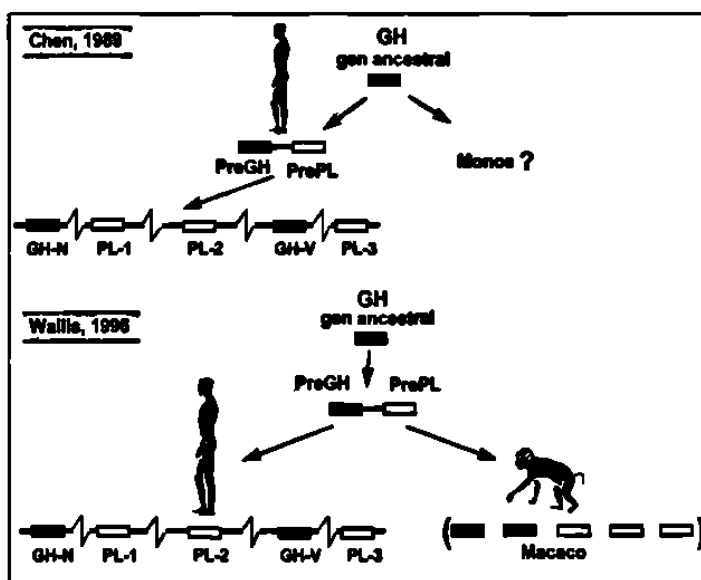


Fig. 2. Hipótesis de la duplicación del gen ancestral de GH. Se muestran en forma esquematizada la hipótesis de Chen y cols y la de Wallis.

1.2. Evolución paleontológica de los primates

En el orden de los primates se distinguen 3 subórdenes (Tabla 1): lemuroidea (lemures), tarsioidea (tarsiers) y antropoidea (monos y hombre).

Tabla 1. Taxonomía de los primates (Colbert, 1961).

| Suborden | Superfamilia | Familia | Ejemplos |
|--------------------|------------------|--|--|
| Lemuroidea | Tupaioidea | | Tupaia, Tana |
| | Lemuroidea | | Lemures |
| | Daubentoniaidea | | Aye-aye de Madagascar |
| | Lorisoidea | | Lemures africanos Loris de la India Galago |
| Tarsioidea | Anaptomorphi-dea | | Fósiles de tarsioidea |
| | Tarsiidae | | Tarsiers del Oriente |
| Antropoidea | Ceboidea | Cebidae | Monos del Nuevo Mundo |
| | | Callithricidae | Mono aullador, araña Mono titi |
| | Cercopithecoidea | Cercopithecidae | Monos del Antiguo Mundo Macacos, Baboo, Mandriles, Papio |
| Hominoidea | Parapithecidae | Parapithecus | |
| | Pongidae | Gibones, Orangután, Pongo pigmaeus, Gorila, Chimpancé | |
| | Hominidae | Hombre | |

Pruebas paleontológicas hacen suponer que a partir de un grupo de insectívora (Fig. 3), semejante a los tupáidos ocurrió en el Paleoceno (65 millones de años) una primera radiación de los primates, representada por tres ramas evolutivas principales: una, los lemures de Madagascar, colocados en el infraorden de Lemuriformes; la segunda, los lemures de Asia y Africa con los cuales se forma el infraorden Loriforme; y en tercer lugar los Tarsiformes. Durante el Eoceno (hace 55 millones de años), se efectuó una segunda radiación de la rama que dió origen a los monos y al hombre. Esta rama se bifurcó en dos, para dar origen a los Monos americanos por un lado, y a los monos del antiguo Mundo y al hombre por el otro (Alvarez, 1977). El macaco pertenece a los monos del viejo mundo y evolutivamente hablando está relativamente cerca del humano.

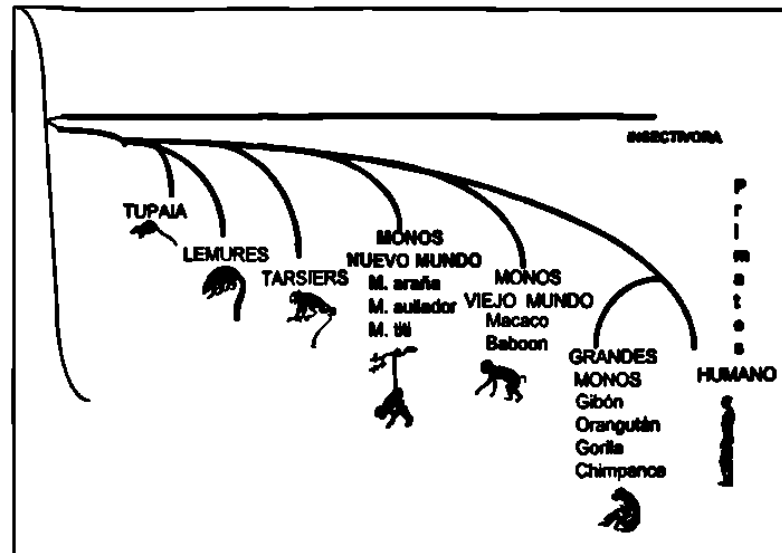


Fig 3. Evolución paleontológica de los primates. Se muestra la evolución de los primates según los datos paleontológicos. A partir de un orden ancestral cercano a los tarsios, divergieron los monos del nuevo mundo, los monos del viejo mundo y finalmente los grandes monos y el humano (Alvarez, 1977).

Debido a las incertidumbres existentes en los eventos de duplicación que generaron el complejo multigénico, el presente trabajo propone estudiar los genes GH, PL en un primate que divergió antes que los monos del viejo mundo, el mono araña (*Ateles geoffroyi*) como modelo de los monos del nuevo mundo.

CAPITULO II

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Describir la organización del locus de la familia GH-PL en el mono araña (*Ateles geoffroyi*).

2.2. Objetivos específicos

- 1) Amplificar por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), los genes de la familia GH-PL del mono araña a partir de DNA genómico.
- 2) Identificar, caracterizar y clonar los productos amplificados.
- 3) Por medio de la técnica de PCR-Largo, obtener la(s) secuencia(s) intergénica(s).
- 4) Secuenciar parcialmente la(s) region(es) intergénica(s) y deducir la organización del locus en esta especie.
- 5) Comparar las secuencias obtenidas con el humano y el macaco, para concluir sobre la evolución de la familia en primates.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

3.1. Origen de los reactivos

Las enzimas de restricción y la DNA ligasa de T₄ fueron adquiridas de Gibco-Bethesda Research Laboratories (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD EUA) y de New England Biolabs (NEB, Beverly, MA, EUA).

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) provinieron de Promega (Madison, WI, EUA). El Kit de PCR-Largo, así como también el Kit de secuenciación fueron adquiridos de Perkin Elmer Cetus (Norwalk, CT, EUA).

El nucleótido radiactivo [³²P]-α dATP se compró a la compañía Amersham, a través de su representante en México (México, D.F.).

La secuencia de los iniciadores que se utilizaron para PCR, PCR-Largo y secuenciación se muestran en la tabla 2. Los iniciadores para PCR y secuenciación, fueron diseñados por MC Claudio Moreno, y sintetizados en el Departamento de Bioquímica. El concepto y aplicación de los iniciadores para PCR-Largo (ITG10 e ITG11) estuvieron a cargo del Dr. Hugo A. Barrera, y el diseño lo realizó el Dr. José Ma. Viader. Los iniciadores m13r y T7 se obtuvieron junto con el Kit de secuenciación (Perkin Elmer Cetus).

Tabla 2. Secuencia de los iniciadores.

| Inicador | Secuencia |
|----------|-------------------------------|
| PM430 | ggggtctcgaggactggctatc |
| 402 | gggcatcctgtggacagctcaccta |
| ITG11 | gactagttcggggagttgggccttgggat |
| ExII | ctgcaccagctggctgctgacac |
| ExIIr | agggtgcagcagccagctggtgcag |
| ExIV | ctgctgctcatccagtcattg |
| ExIVr | cacgactggatgagcagcagcgaga |
| ExVr | gaagcaggagagcagcccgtagtt |
| ITG10 | catggtcgacggcagctgtgggttcta |
| 403 | ccgaattccaggagaggcactgggga |

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

3.2. Material biológico

El Bioparque Estrella facilitó la extracción de sangre venosa periférica de un ejemplar de los monos existentes en cautiverio, de la especie *Ateles geoffroyi*, mono araña (Fig 4). La punción se realizó del antebrazo izquierdo, obteniendo 5 ml de sangre, a la cual de inmediato se le agregó EDTA, como anticoagulante.

El vector utilizado para la clonación (pBS-SK II), proporcionado por el laboratorio del Dr. Jean Marc Egly del Instituto de Genética y Biología Molecular y Celular en Estrasburgo, Francia.

La cepa bacteriana XL-1 Blue de *Escherichia coli* empleada en los ensayos de transformación y propagación de los plásmidos recombinantes, proveniente de Gibco-BRL.

El manejo de productos radiológicos se realizó siguiendo los lineamientos de la Comisión Nacional de Salvaguardia.



Fig. 4. Mono araña (*Ateles geoffroyi*). Se muestra una fotografía de la especie estudiada en este trabajo.

3.3. Equipo

Durante este trabajo se utilizaron: un horno de micondas GoldStar modelo MA-857M, microcentrífugas Eppendorf modelos 5402 y 5415, fuentes de poder EC600 (E-C Apparatus Corporation, St. Petersburg, Florida), ISCO494 (ISCO, Nebraska USA) y BRL250 (Gibco-BRL, MD, EUA), un secuenciador automático GX100 (Genomyx, California EUA), una placa agitadora con control de temperatura marca Corning PC320 (N.Y., EUA), un termomixer 5436 (Eppendorf), un baño de agua con agitación G76 (New Brunswick Scientific, Edison N.J., EUA), un baño de agua 188 (Precision, Chicago, EUA). El material y los reactivos se almacenaron en un congelador a -20°C marca American, o en un ultracongelador marca So-Low Environmental Equipment (Cincinnati, Corporation (K.C., Missouri, EUA).

Los termocicladores empleados fueron: MJ Research modelos PT 150 y PT100 (Watertown, Mass., EUA); y Perkin Elmer, modelo 2400.

La balanza analítica fue de la marca OHAUS modelo AP110S, y la balanza granataria digital de la marca Sartorius modelo 1206MP (Göttingen, Germany).

El procesamiento de los datos fue realizado en las computadoras Macintosh modelos LCIII, Classic y PowerPC (Apple Computer, Inc., Cupertino California, EUA). El 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 de *Microsoft Power Point* Versión 3.0 (© 1987-1992 Microsoft Corporation), *Adobe Photoshop Limited Edition* 2.5.1. (© 1989-1993 Adobe Systems Incorporated), *Graphic Converter* 2.2.2. (©1992-1995, Thorsten Lenke) y UMAX Scan (© 1990-1991 UMAX Scanner Driver, Impact Resaerch 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, Plymouth, Mn, EUA), *Clustal* versión 1.5 (Multiple Sequence Alignments) y el *Blast* versión 2.0.

Para la cuantificación del DNA y la determinación de los tamaños se utilizó un aparato para la digitalización de imágenes Gel Doc 1000 de Bio-Rad (Hercules CA).

3.4 Métodos

3.4.1. Estrategia general

Para el desarrollo del presente trabajo se planteó la siguiente estrategia general (Fig. 5):

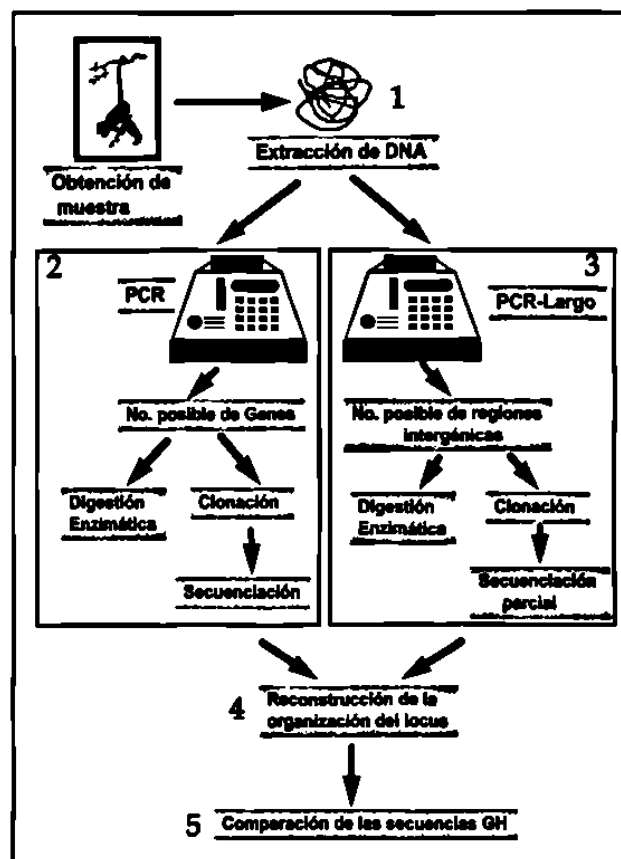


Fig. 5. Estrategia general. Se indican los cinco puntos claves de la estrategia que se utilizó en este trabajo.

Dicha estrategia fue ejecutada a través de la siguiente serie de pasos:

- 1) Extracción de DNA a partir de sangre periférica del mono araña.
- 2) Obtención de los genes del complejo GH-PL por PCR a partir del DNA genómico del mono araña, utilizando iniciadores consenso que flanquean los genes. El número posible de genes se determinó por caracterización de los productos amplificados con endonucleasas de restricción y posteriormente por clonación del mismo. Las clonas recombinantes obtenidas se secuenciaron.
- 3) Las regiones intergénicas del complejo GH-PL se obtuvieron por PCR-Largo a partir del DNA genómico, para deducir el número posible de productos amplificados obtenidos se realizó una caracterización con endonucleasas de restricción y después una clonación.
Posterior a la clonación se realizó una secuenciación de ambos extremos del inserto de cada una de las clonas recombinantes obtenidas.
- 4) La comparación de las secuencias de los extremos tanto de los genes como de las regiones intergénicas permitió deducir la organización del locus GH-PL en el mono araña.
- 5) Comparación de las secuencias de GH.

3.4.2. Extracción del DNA

3.4.2.1. Obtención de DNA genómico

La extracción del DNA genómico se realizó a partir de sangre venosa periférica (5 ml) del mono araña, por la técnica del TSNT (Martínez Soriano, 1993) descrita a continuación.

Los 5 ml de sangre obtenidos se colocaron en un tubo Falcon de 15 ml, y se centrifugaron por 4 min a 2000 rpm, separando así el paquete celular del plasma; este último se eliminó con una micropipeta.

Las células se lisaron con 2 ml de buffer de TSNT (2% tritón 100X, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM EDTA disódico). Los ácidos nucleicos se extrajeron con 5 ml de fenol, 1 ml de cloroformo:alcohol isoamílico (29:1) y 2 ml de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), mezclando por inversión después de agregar cada uno de los reactivos. Posteriormente, el tubo se centrifugó por 20 min a 10,000 rpm.

La fase acuosa se transfirió a un tubo Falcon nuevo de 15 ml, y el DNA se precipitó con 2 volúmenes de etanol al 100% (mezclando por inversión) incubando durante 1 h a -70°C , y finalmente el tubo se centrifugó por 20 min a 10,000 rpm. La pastilla obtenida se lavó con 1 ml de etanol al 70% y el tubo se centrifugó nuevamente. El sobrenadante se eliminó con una micropipeta para en seguida dejar secar al aire la pastilla, ésta se resuspendió finalmente en 200 μl de TE y se conservó a -20°C .

3.4.2.2. Obtención de DNA plasmídico

Las clonas recombinantes obtenidas fueron procesadas para la obtención del DNA plasmídico utilizando la técnica de lisis por ebullición a partir del cultivo (Sambrook y cols, 1989).

3.4.3. Análisis electroforético y cuantificación del DNA

Las muestras de DNA se analizaron por electroforesis en geles de agarosa o de acrilamida dependiendo del tamaño del fragmento y de la resolución requerida.

3.4.3.1. Electroforesis en gel de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon al porcentaje requerido en buffer TBE (Tris-Borato 0.089 M, ácido bórico 0.089 M). Una vez solidificados, se depositaron en una cámara de electroforesis y se cubrieron con el mismo buffer. Las muestras a analizar se depositaron en el gel preparado, se mezclaron con jugo azul 6X (azul de bromofenol al 0.25%, xilencianol al 0.25% y glicerol al 30%), a una relación 5:1 (v/v). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V; concluída ésta, el gel se colocó en una solución de bromuro de etidio a 5µg/ml por 10 min y posteriormente se lavó varias veces con agua para quitar el exceso de bromuro y así proceder a su observación y análisis, utilizando el programa computacional *Molecular Analyst del Gel Doc*.

3.4.3.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Los fragmentos de restricción fueron visualizados en un gel de poliacrilamida al 8% (Tabla 3). Las dimensiones del gel fueron de 14 cm por 17 cm y 1.5 mm de grosor.

Tabla 3. Preparación del gel de Poliacrilamida al 8%.

| Reactivos | |
|--------------------------------------|-------------|
| Conc. Inicial | Conc. final |
| TBE, 20 X | 1 X |
| Acrilamida:Bisacrilamida (29:1), 30% | 8 % |
| Persulfato de amonio, 10 % | 0.1 % |
| TEMED, 100% | 0.1 % |

3.4.3.3 Determinación del tamaño de las bandas

Durante la electroforesis, la distancia que recorren los fragmentos lineales de DNA es proporcional al logaritmo de su tamaño (logPM).

A partir de un marcador, del cual se conoce el tamaño exacto de cada una de sus bandas, se estableció la curva de calibración [distancia = $f(\log PM)$], y se calculó así el tamaño de los fragmentos de interés, utilizando el programa computacional *Molecular Analyst*, del *Gel Doc*.

3.4.3.4. Cuantificación del DNA

Una vez extraído, el DNA se cuantificó por electroforesis y análisis densitométrico de la intensidad de la banda teñida con bromuro de etidio. Al intercalarse entre las bandas del DNA, el bromuro de etidio emite una fluorescencia al ser excitado por la luz UV. La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de bromuro de etidio intercalado, dependiendo así de la cantidad de DNA y de la longitud del fragmento. Utilizando una curva de calibración realizada a partir de concentraciones variables de DNA de λ comercial, se puede determinar la concentración del DNA de la muestra en estudio. Para este caso se hicieron diluciones a partir de un concentrado de 500 ng/ μ l: 1:2 (250 ng/ μ l), 1:4 (125 ng/ μ l), 1:8 (62.5 ng/ μ l), y 1:16 (31.25 ng/ μ l).

3.4.4 Amplificación de los genes GH-PL

Para la obtención y caracterización de los genes del mono araña se siguió la estrategia mostrada en la Fig. 6. Utilizando iniciadores consenso se trató de obtener por PCR tanto la unidad transcripcional como la región promotora de los genes GH-PL en esta nueva especie.

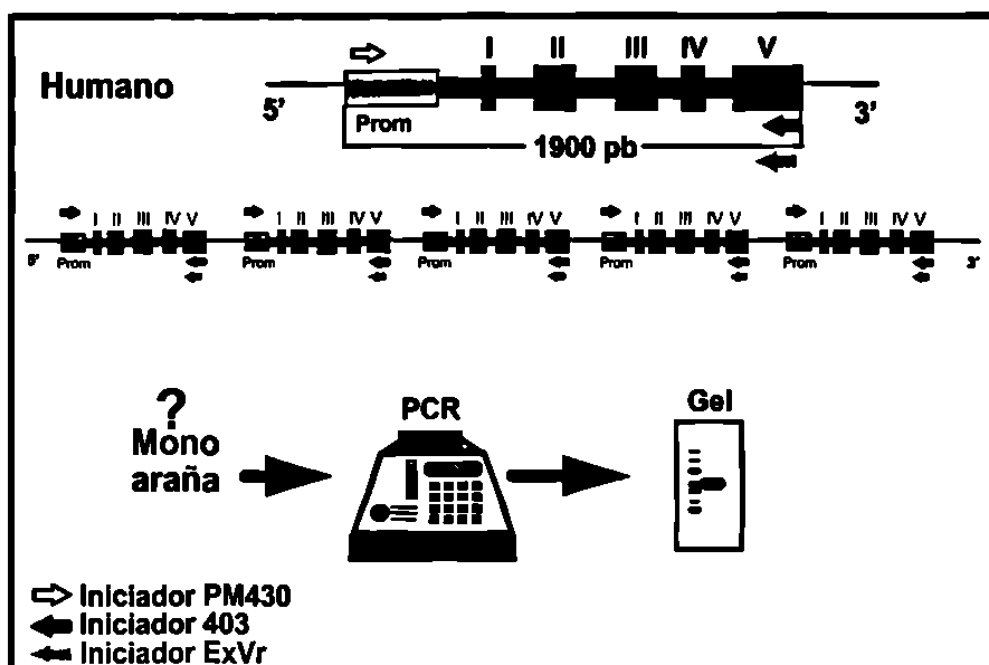


Fig. 6. Posición de apareamiento de los iniciadores utilizados en el PCR para obtener los genes. Se muestran los sitios de apareamiento de los iniciadores PM430, 403 y ExVr en los genes del humano. Estos iniciadores fueron probados con el DNA genómico del mono araña, después de determinar las condiciones de PCR óptimas, la presencia del producto de amplificación se visualizó en gel de agarosa.

3.4.4.1 Iniciadores

En el laboratorio de Biología Molecular de la U.L.I.E.G., ya se tenía un par de iniciadores (PM430 y 403) que permite amplificar los cinco genes del complejo multigénico GH-PL en el humano, generando fragmentos del mismo tamaño (1900 pb), que incluyen 430 pb de la región promotora, la unidad transcripcional y parte de la región 3' no traducible (28 pb después del codón de terminación).

También se requirió utilizar otro iniciador consenso, ExVr, que se aparea en el exón V; éste junto con el PM430, coamplifica a los cinco genes en el humano, generando fragmentos de 1800 pb, que incluyen la región promotora y parte de la unidad transcripcional (hasta 70 pb antes del codón de terminación).

3.4.4.2. Optimización de las condiciones de amplificación

Tomando como base las condiciones de amplificación establecidas para el DNA humano, se modificó tanto la concentración de DNA como de MgCl₂ para determinar las condiciones óptimas del mono araña. En la tabla 4 se resumen las condiciones determinadas de amplificación para los dos juegos de iniciadores utilizados, las reacciones se realizaron a 50 µl. El programa de PCR para las dos amplificaciones (fragmentos de 1900 y 1800 pb) consta de los mismos pasos; difiere solamente en la temperatura de apareamiento: 60°C y 65°C respectivamente. A continuación se describen los pasos del programa de la PCR:

- 1) Desnaturalización inicial: 94°C por 5 min.
- 2) 30 ciclos: 94°C, por 1 min,
 60°C (ó 65°C) por 1 min,
 72°C por 1 min.
- 3) Extensión prolongada: 72°C por 5 min.

En todas las reacciones de amplificación se utilizó el DNA genómico humano como control positivo y además se ensayó un control negativo, en el que se sustituyó el DNA por agua.

Tabla 4. Condiciones de amplificación para los dos juegos de iniciadores.

| Reactivo | Fragmento de 1900 pb | Fragmento de 1800 pb |
|----------------------------|----------------------|----------------------|
| Conc. Inicial | Conc. final | Conc. final |
| Buffer 10 X | 1 X | 1 X |
| Iniciador 403, 5 µM | 0.1 µM | 0.5 µM |
| Iniciador PM430, 5 µM | 0.1 µM | ---- |
| Iniciador ExVr, 5 µM | ---- | 0.5 µM |
| MgCl ₂ , 25 mM | 1.5 mM | 1.5 mM |
| dNTPs, 10 mM | 200 µM | 200 µM |
| Taq DNA Polimerasa, 5 U/µl | 0.05 U/µl | 0.05 U/µl |
| DNA, 100 ng/µl | 2 ng/µl | 2 ng/µl |

Los productos de las amplificaciones fueron analizados en un gel de agarosa al 1%, utilizando como marcador de tamaño el DNA del bacteriófago λ cortado con *Pst* I.

3.4.5. Amplificación de las regiones intergénicas

Para obtener las regiones intergénicas se siguió la estrategia mostrada en la figura 7.

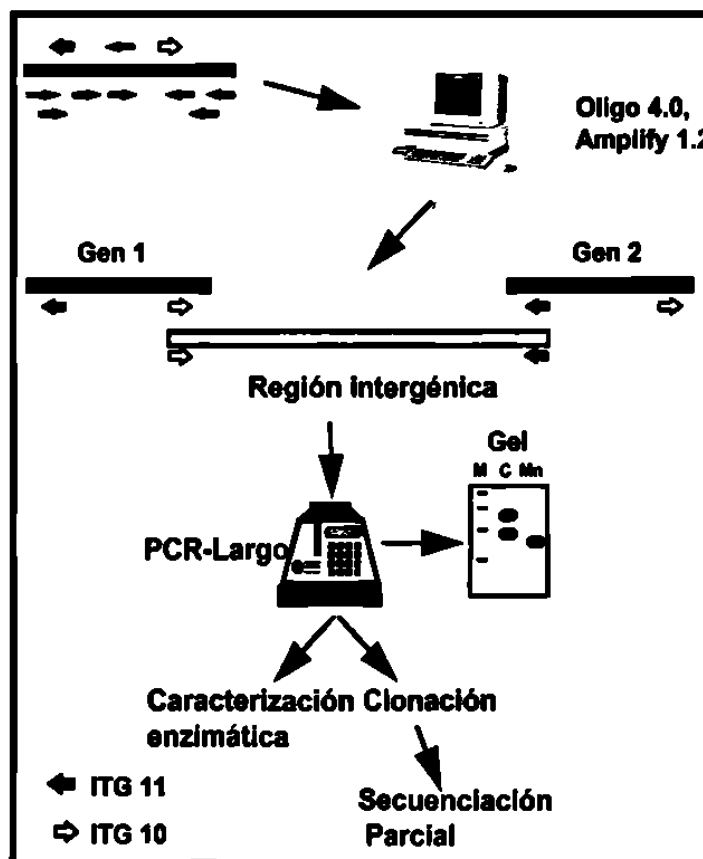


Fig. 7. Estrategia para obtener las regiones intergénicas. Para lograr la amplificación de las regiones intergénicas del complejo GH del mono araña, se escogió el mejor juego de iniciadores mediante programas computacionales. Este permitió, una vez determinadas las condiciones de amplificación óptimas, generar un producto de amplificación, el cual se caracterizó y se clonó. Una secuenciación parcial permitió determinar la secuencia de los extremos de cada clona para compararla a las de los genes.

3.4.5.1. Iniciadores

Se analizaron mediante programas computacionales, Amplify y Oligo, los iniciadores que se tenían disponibles en el Departamento de Bioquímica. Para cada uno de ellos se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: fuerza de apareamiento, estabilidad del apareamiento, T_m , formación de estructuras secundarias y formación de "hairpin". El análisis se hizo utilizando como secuencias blanco los DNAs de los genes GH y PL reportados en primates: humano y macaco. Lo que también se buscaba de los iniciadores, era que éstos se aparearan en los extremos de cada gen, para posteriormente lograr el traslape con cada región intergénica y poder obtener el orden del locus. El juego de iniciadores elegidos (ITG10 y ITG11), originan teóricamente en el humano cuatro fragmentos: dos de 13 Kb, uno de 6.5 Kb y otro de 6 Kb.

3.4.5.2. Condiciones de amplificación por PCR-Largo

Para la estandarización de la reacción a partir del DNA genómico del mono araña, se utilizaron las condiciones de reacción (Tabla 5) y el programa recomendados por el kit de PCR-Largo de Perkin Elmer, a un volumen de reacción de 25 μ l. A continuación se describen los pasos del programa de PCR-Largo:

- 1) Desnaturalización inicial 93°C por 30 seg.
- 2) 16 ciclos: 93°C por 30 seg,
 68°C por 10 min.
- 4) 12 ciclos: 93°C por 30 seg,
 68°C por 10 min, con incrementos de 15 seg en
 cada ciclo.
- 5) Extensión prolongada 72°C por 5 min.

Tabla 5. Condiciones de reacción para el PCR-Largo.

| Reactivos | |
|------------------------------|------------------|
| Conc. inicial | Conc. final |
| Buffer 10 X | 1 X |
| Iniciador ITG10, 5 μ M | 0.4 μ M |
| Iniciador ITG11, 5 μ M | 0.4 μ M |
| Mg(OAc) ₂ , 25 mM | 1.1 mM |
| dNTPs, 10 mM | 200 μ M |
| rTth/Vent, 2 U/ μ l | 0.128 U/ μ l |
| DNA, 100 ng/ μ l | 0.50 ng/ μ l |

3.4.6. Caracterización enzimática de los productos amplificados

Los fragmentos derivados de la amplificación de los genes como de las regiones intergénicas se caracterizaron por digestión enzimática. Se utilizaron diferentes enzimas, como: *Eco* RI, *Hind* III, *Bst*E II, *Msp* I y *Pst* I.

Las condiciones de digestión se establecieron en base a las recomendaciones del proveedor. Las incubaciones se realizaron en la mayoría de los casos a 37°C, por 4 h. Posteriormente, los productos derivados de la digestión de los genes y de las intergénicas se resolvieron en geles de acrilamida al 8% y de agarosa al 0.8%, respectivamente.

3.4.7. Clonación de los productos amplificados

3.4.7.1. Construcción del vector recombinante

La clonación de los productos amplificados, tanto de los genes como de las regiones intergénicas, se realizó en vector T, empleando la estrategia mostrada en la Fig. 8.

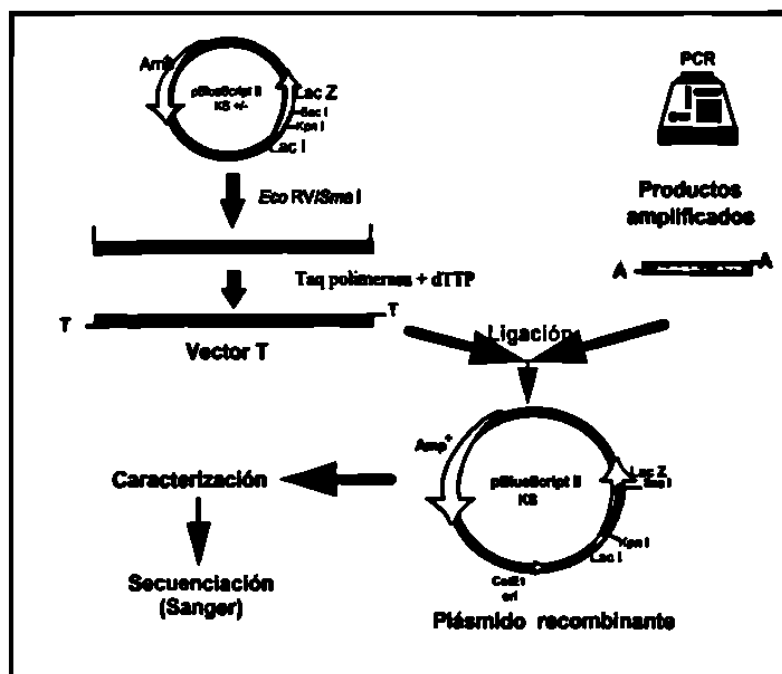


Fig. 8. Estrategia de clonación. Los productos de PCR obtenidos fueron ligados al vector pBS-SK II, formando así lo que es el plásmido recombinante el cual posteriormente fue transformado en células Ca^{++} competentes; luego las clonas recombinantes obtenidas fueron caracterizadas utilizando diferentes enzimas de restricción; finalmente las clonas recombinantes que tuvieron el inserto deseado fueron secuenciadas.

3.4.7.1.1. Preparación del "Vector T"

El vector pBS-SK II sirvió para preparar el vector T (Marchuk, 1990). Este vector circular en su forma nativa se linearizó con la enzima *Eco RV* (Tabla 6), la cual deja extremos romos.

Tabla 6. Digestión de pBS-SK II con *Eco RV*.

| Reactivos | Conc. inicial | Conc. final |
|--------------------------|---------------|-------------|
| Buffer 2 NEB, 10 X | | 1 X |
| BSA, 10 mM | | 0.1 mM |
| <i>Eco RV</i> , 10 U/μl | | 1 U/μl |
| DNA pBS-SK II, 300 ng/μl | | 50 ng/μl |

Volumen final de 50 μl.

La reacción se incubó durante 4 h a 37°C y la digestión total se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Aprovechando la actividad de transferasa terminal de la Taq polimerasa, se agregó una T en cada extremo 3' del fragmento, utilizando las condiciones de reacción descritas en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de reacción para la preparación del Vector T y del inserto A.

| | Vector T | Inserto A |
|---------------------------|-------------|-------------|
| Reactivos | | |
| Conc. inicial | Conc. Final | Conc. final |
| Buffer de Taq, 10 X | 1 X | 1 X |
| dTTP, 10 mM | 2 mM | --- |
| dATP, 10 mM | --- | 2 mM |
| MgCl ₂ , 25 mM | 1.5 mM | 1.5 mM |
| DNA, 50 ng/μl | 10 ng/μl | --- |
| DNA, P.A, 50 ng/μl | --- | 20 ng/μl |
| Taq DNA pol, 5 U/μl | 0.125 U/μl | 0.125 U/μl |

Volumen final de 50 μl.

Se agregó una gota de aceite a cada tubo y se incubó por 2 h a 72°C en un MiniCycler (MJ Research). Una vez terminada la incubación, la fase acuosa se pasó a un tubo nuevo, y se realizó una extracción con medio volumen de fenol y medio volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Después de la centrifugación se recuperó la fase acuosa de la cual se precipitó el DNA con 0.1 V de acetato de sodio 3.0 M, pH 5.2 y 2 V de etanol al 100%. La pastilla colectada por una segunda centrifugación se lavó con etanol al 70%, y finalmente el DNA se resuspendió en 5 μl de H₂O ultrapura.

3.4.7.1.2. Preparación del "inserto A"

A la par se preparó también el inserto A. Durante la PCR la Taq polimerasa adiciona adenilato en los extremo 3', pero para asegurarse de

que la mayor parte del producto amplificado tenga este nucleótido adicionado, lo que hicimos fue forzar su adición, preparando un inserto A bajo las mismas condiciones que el vector T, pero utilizando como sustrato al dATP (Tabla 7).

3.4.6.1.3. Ligación para formar el vector recombinante

Una vez obtenido tanto el vector T a utilizar como los insertos A, se procedió a la ligación (Tabla 8), para posteriormente formar el vector recombinante.

Tabla 8. Condiciones de ligación.

| Reactivos | |
|----------------------------|----------------|
| Conc. Inicial | Conc. Final |
| Buffer, 5 X | 1 X |
| ATP, 10 mM | 1 mM |
| T4 DNA Ligasa 1 U/ μ l | 0.1 U/ μ l |
| Vector T | 10 ng/ μ l |
| Inserto A | 20 ng/ μ l |

Volumen final de 20 μ l.

La incubación se realizó a 16°C durante toda la noche. Posteriormente se precipitó toda la ligación con 0.1 volumen de acetato de sodio 3.0 M (pH 5.2) y 2 V de etanol al 100%, la pastilla se lavó con etanol al 70%, y finalmente se resuspendió en 5 μ l de H₂O ultrapura estéril.

3.4.7.2. Transformación

Una vez realizada la ligación se procedió a la transformación en la cepa XL-1 Blue de *E. coli*, utilizando la técnica de bacterias Ca⁺⁺ competentes (Sambrook y cols, 1989).

3.4.7.3. Caracterización de las clonas recombinantes obtenidas

Las bacterias que recibieron un vector recombinante (con algún inserto) se seleccionaron por su fenotipo Amp^+ , βgal^- , desarrollando una coloración blanca en presencia de IPTG y X-Gal (Sambrook y cols, 1989). Estas colonias se recuperaron, y se pusieron a crecer para extraer de cada una de ellas el DNA plasmídico.

Una primera selección rápida de las clonas recombinantes se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, comparando la migración del DNA y la del control correspondiente al plásmido pBS-SK II. Solamente las clonas cuyo DNA plasmídico presentó una migración más lenta fueron seleccionadas para posteriores caracterizaciones.

Las clonas seleccionadas se caracterizaron preliminarmente con las enzimas *Kpn* I y *Sac* I, que tienen un sitio de corte único dentro de la secuencia de policlonación, y que flanquean el inserto. Esta primera caracterización permitió estimar el tamaño del inserto (1900 y 1741 pb). Después, las clonas que tuvieran el tamaño esperado se caracterizaron con diferentes enzimas de restricción: *Eco* RI y *Bam* HI. Para el inserto de 3800 se caracterizaron directamente con las enzimas *Eco* RI, *Hind* III y *Dra* I, que presentan sitios de corte únicos dentro de la secuencia de policlonación.

Finalmente, el inserto de cada clona se reamplificó utilizando el mismo juego de iniciadores que lo generó para caracterizarlo más ampliamente, y eliminar así la interferencia del vector.

Las digestiones se realizaron siguiendo las recomendaciones del proveedor, e incubando a 37°C toda la noche. Los fragmentos fueron analizados en geles de agarosa al 0.8% y al 1.0%.

3.4.7.4. Subclonación de las clonas recombinantes

Se realizó una subclonación de cada una de las clonas de los genes para lograr la secuencia completa (Fig.9).

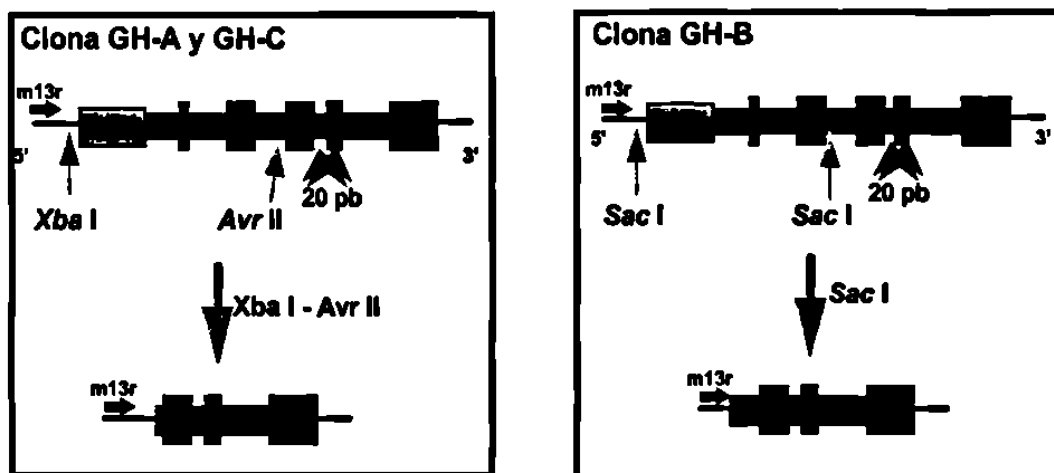


Fig. 9. Estrategia para la subclonación de los genes. Se muestran los sitios de las enzimas de restricción utilizadas en cada uno de los genes para así lograr la subclonación.

Para llevar a cabo la subclonación de los genes GH-A y GH-C (Fig. 9-A), se utilizó una doble digestión con las enzimas *Xba I* y *Avr II*, que cortan una sola vez dentro de la secuencia de policlonación del vector y del inserto, respectivamente. La doble digestión con estas enzimas elimina un fragmento de aproximadamente 1000 pb correspondiente a la región 5' del gen.

Para realizar la subclonación del gen GH-B (Fig. 9-B), el cual no tiene sitio de corte *Avr II*, se utilizó *Sac I*, la cual presenta un sitio único tanto en la región de policlonación del vector como en el inserto. De tal forma que al digerirlo con esta enzima se genera un fragmento de 900 pb; y al realizar una religación se pierde este fragmento.

Las condiciones de digestión y ligación para ambas subclonaciones fueron las establecidas por el proveedor.

Una vez realizadas las digestiones y ligaciones de ambos genes, se procedió a la transformación y posterior caracterización de las subclonas

recombinantes, las cuales se analizaron utilizando a *Sac* I, para ambos tipos de subclonaciones. Posteriormente esas subclonas seleccionadas se secuenciaron utilizando al iniciador M13r, el cual se aparea en la región del vector hacia el extremo 5' del inserto.

3.4.7.5. Conservación de las clonas de interés

Las clonas de interés fueron almacenadas a -70°C, con 30% de glicerol (Sambrook y cols, 1989).

3.4.8. Determinación y análisis de las secuencias de las clonas recombinantes

3.4.8.1. Secuenciación cíclica de las clonas recombinantes

La técnica utilizada para la secuenciación es una adaptación de la descrita por Sanger y cols en 1977. La secuenciación enzimática se realizó siguiendo las especificaciones del Kit AmpliCycle (Perkin Elmer). Los fragmentos sintetizados se marcaron al incorporar $P^{32}\text{-}\alpha\text{-dATP}$ y se resolvieron en un gel de electroforesis de acrilamida 6% - urea 50%. La lectura de la secuencia se realizó sobre la autorradiografía.

3.4.8.2. Iniciadores

Para determinar la secuencia nucleotídica de cada una de las clonas recombinantes de los genes y de las regiones intergénicas, se utilizaron iniciadores que se aparean tanto en el vector (M13 y T7) como en el propio inserto (Fig 10).

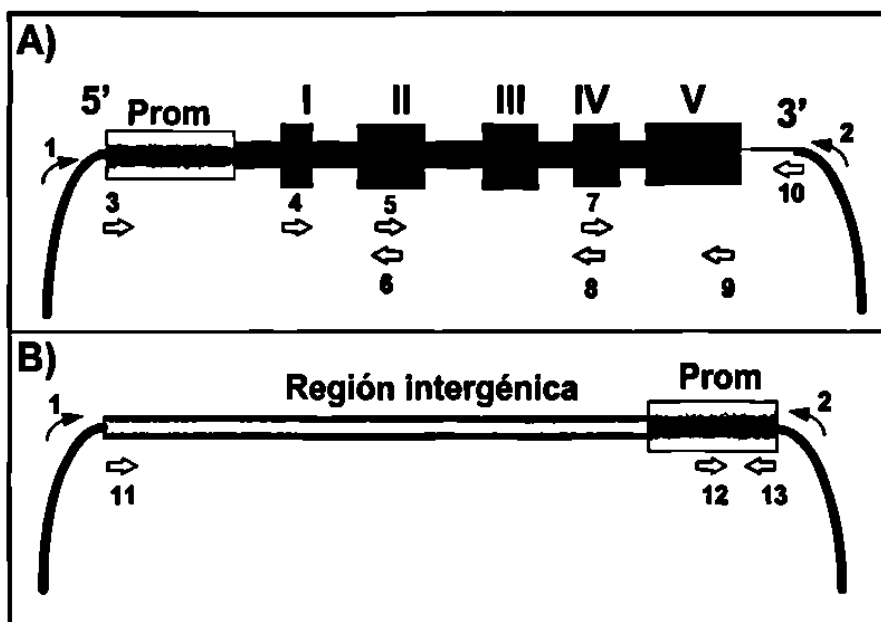


Fig. 10-. Iniciadores para la secuenciación. A. Se muestra la posición de los iniciadores utilizados para los genes: 1) m13r, 2) T7, 3) PM430, 4) 402, 5) ExII, 6) ExIIr, 7) ExIV, 8) ExIVr, 9) ExV y 10) 403. **B.** Se muestra la posición de los iniciadores utilizados para las regiones intergénicas: 1) m13r, 2) T7, 11) ITG10, 12) PM430, y 13) ITG11.

3.4.8.3. Comparación de las secuencias génicas

3.4.8.3.1. Análisis comparativo mediante el programa computacional Blast

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas de los tres genes del mono araña, se compararon con las secuencias reportadas en los bancos de datos (GeneBank) mediante el programa Blast.

3.4.8.3.2. Sitios enzimáticos característicos de cada gen

De las secuencias nucleotídicas obtenidas de los genes, se realizó un mapeo enzimático mediante el programa computacional DNA Strider, para encontrar sitios enzimáticos que diferenciaron a los tres genes

obtenidos del mono araña y además sitios enzimáticos característicos del complejo multigénico.

3.4.8.3.3. Obtención del DNAC y de la secuencia aminoacídica

Las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de los genes se alinearon mediante el programa *Clustal V* con las secuencias de hGH-N y hGH-V. De esta comparación se pudo deducir la localización de los exones e intrones, y así obtener las secuencias respectivas del DNAC, mediante el programa computacional *DNA Strider*.

Las secuencias aminoacídicas obtenidas para el mono araña se compararon con las proteínas GH y PL del humano y del macaco, mediante el programa *Clustal V*. De estas comparaciones se dedujo un árbol filogenético.

3.4.9. Reconstrucción de la organización del locus

Para comprobar que los genes y las regiones intergénicas pertenecían al mismo locus y que fueran relacionados, se siguió la estrategia indicada en la fig 11. Llevándose a cabo una amplificación de los promotores a partir de los genes y de las regiones intergénicas y además una comparación de las secuencias nucleotídicas de los extremos.

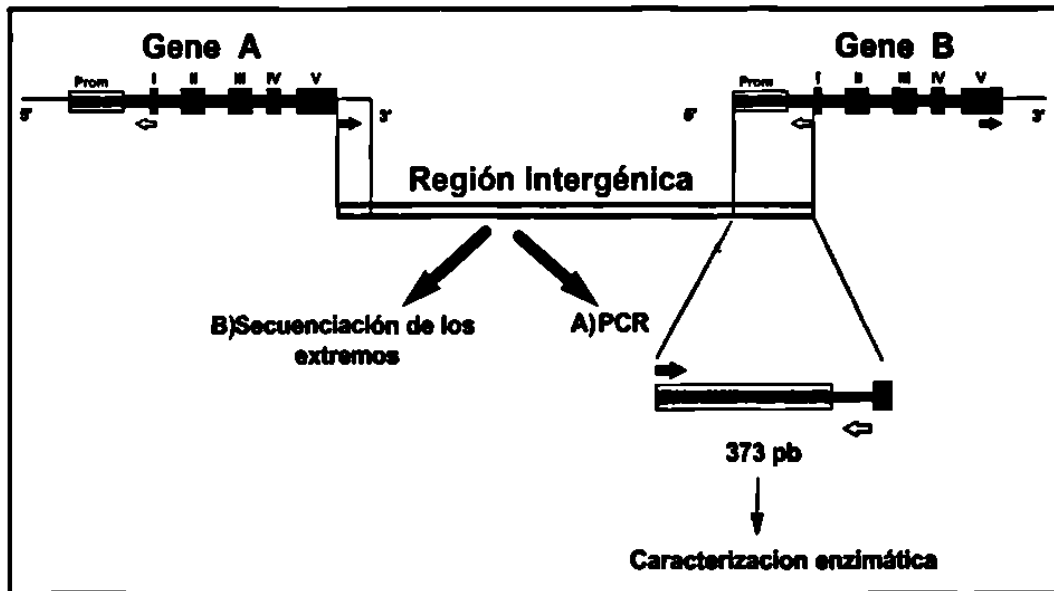


Fig.11. Estrategia para obtener la organización del locus. Se muestra el traslape de la región intergénica con los genes para así lograr la organización del locus del complejo multigénico GH-PL del mono araña.

3.4.9.1. Amplificación de promotores

Finalmente, a las clonas seleccionadas tanto de las regiones intergénicas como de los genes, se les realizó una amplificación solamente de la región promotora (Fig 11), utilizando como iniciadores al PM430 y ITG11. El iniciador PM430 se aparea a 430 pb del inicio de la unidad transcripcional y el ITG11 (3') se aparea al inicio de la unidad transcripcional, originando así un fragmento de 373 pb.

Las condiciones de amplificación establecidas se muestran en la tabla 9. El programa de amplificación se describe a continuación:

- 6) Desnaturalización inicial: 94°C por 5 min.
- 2) 30 ciclos:
 - 94°C por 1 min,
 - 62°C por 1 min,
 - 72°C por 1 min
- 6) Extensión prolongada: 72°C por 5 min.

Tabla 9. Condiciones de amplificación para los promotores.

| Reactivos | |
|----------------------------------|--------------------|
| Conc. Inicial | Conc. Final |
| Buffer 10 X | 1 X |
| Iniciador PM430, 5 μ M | 0.5 μ M |
| Iniciador ITG11, 5 μ M | 0.5 μ M |
| MgCl ₂ , 25 mM | 1.5 mM |
| dNTPs, 10 mM | 200 μ M |
| Taq DNA Polimerasa, 5 U/ μ l | 0.05 U |
| DNA, plasmídico 10ng/ μ l | 0.2 ng/ μ l |

Volumen final de 50 μ l.

3.4.9.2. Comparación de los productos amplificados

A estos productos amplificados se les realizó una caracterización enzimática utilizando *Ava* II, *Rsa* I, *Apa* LI, *Bgl* I, y *Msp* I (estas enzimas fueron escogidas en base a enzimas características de los promotores del complejo GH-PL en el humano). Las condiciones de digestión fueron las recomendadas por el proveedor.

La incubación de cada una de las enzimas se realizó a 37°C por 4 h, posteriormente se analizaron en un gel de agarosa al 2.5%, siendo éste teñido con bromuro de etidio y visualizado en el *Gel Doc*, para obtener el tamaño de cada uno de los fragmentos resultantes en cada digestión.

La comparación de los mapas de restricción obtenidos permitió relacionar las regiones intergénicas con los genes y así proponer una posible organización del locus GH.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Obtención de los genes

4.1.1. Amplificación y caracterización de los genes

Con la utilización de los iniciadores PM430 y 403 se estandarizó la PCR a partir del DNA genómico del mono araña, originando una banda única del mismo tamaño que en el humano (1930 pb), pero de menor intensidad (Fig. 12).

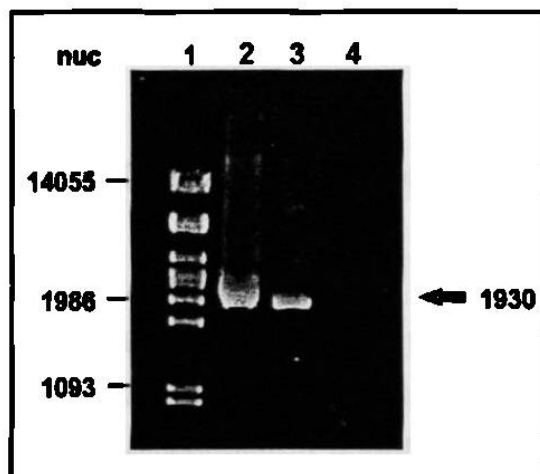


Fig. 12. Amplificación de los genes. La PCR se realizó utilizando un juego de iniciadores consenso a partir de DNA genómico. El producto amplificado se visualizó utilizando un gel de agarosa al 1.0 %. Carril 2 amplificación del DNA genómico del humano (control positivo), carril 3 amplificación del DNA genómico del mono araña, carril 4 testigo negativo. Carril 1 marcador de peso molecular λ cortado con *Pst* I.

La caracterización enzimática del producto de 1930 pb indicó que correspondía a la amplificación de dos genes, los cuales se podían distinguir por

la presencia diferencial de los sitios enzimáticos *Eco* RI y *Pst* I, mientras que otras enzimas como *Bam* HI y *Msp* I, presentaban el mismo patrón (Fig. 13).

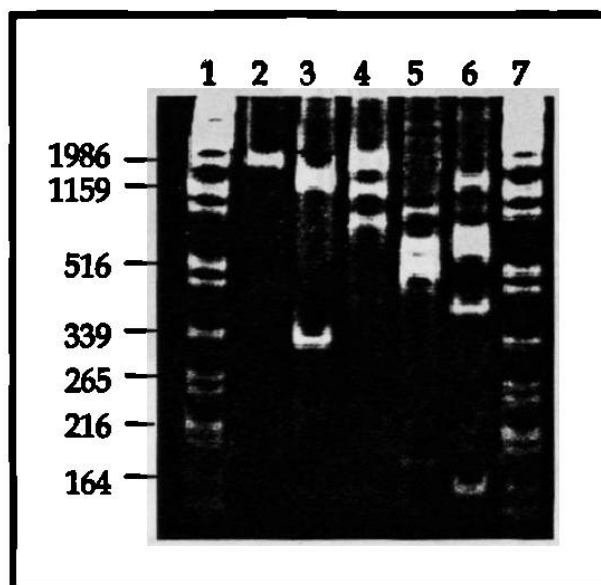


Fig. 13. Caracterización de la banda amplificada. El producto amplificado se digirió con diferentes enzimas de restricción. Los productos generados se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10%. Carril 2 producto amplificado sin digerir, carriles 3 al 6, digestión con *Bam* HI, *Eco* RI, *Msp* I y *Pst* I respectivamente. En los carriles 1 y 7: marcador de peso molecular (λ cortado con *Pst* I).

4.1.2. Clonación de los genes

Los productos amplificados de 1930 pb fueron clonados en pBS. Las clonas recombinantes se seleccionaron en un primer paso por el tamaño del inserto. En un segundo paso se determinó la orientación del inserto al digerirlas con *Bam* HI, y finalmente se distinguieron cortando con *Eco* RI. En paralelo, el inserto de las clonas recombinantes se amplificó utilizando los mismos iniciadores y el producto se caracterizó con las enzimas *Eco* RI y *Alu* I (Fig. 14). Los resultados indicaron claramente que se tenían dos tipos de clonas, que correspondían a los dos genes detectados en el producto amplificado de 1930 pb. Se obtuvieron 10 clonas del tipo A (sin *Eco* RI) y tres del tipo B (con *Eco* RI), con el inserto en ambas orientaciones.

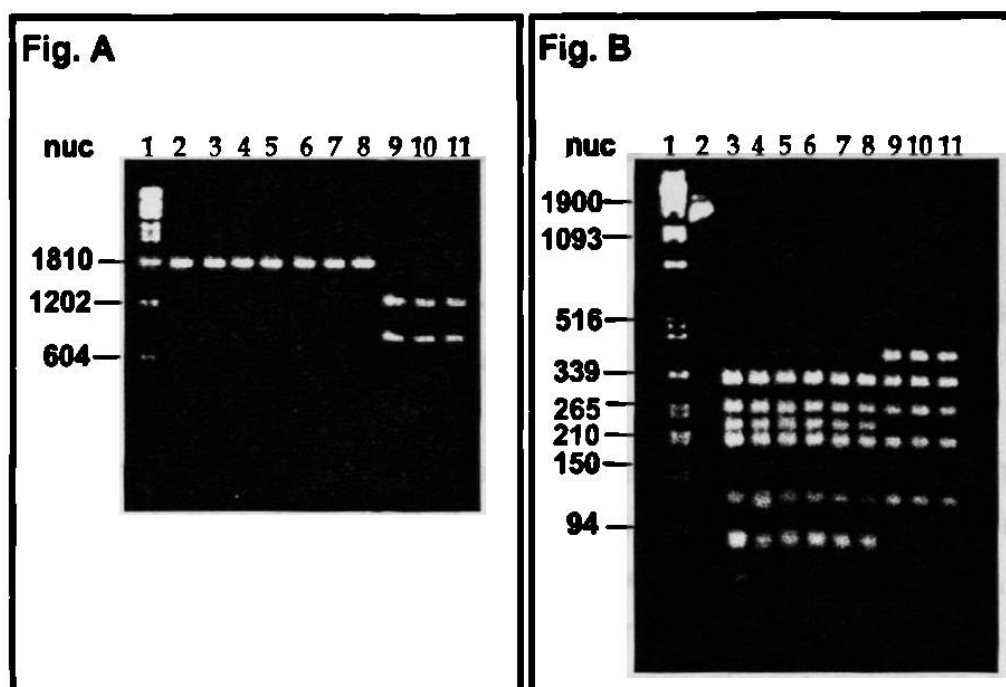


Fig. 14. Diferenciación del inserto de las clonas recombinantes. Se muestran las clonas que fueron amplificadas y caracterizadas por digestión con las enzimas *Eco* RI (Fig. A) y *Afu* I (Fig. B). Los productos generados fueron resueltos en geles de agarosa al 1.0% y 2.5%, respectivamente. Carril 2 producto sin digerir; carriles 3 al 11, digestión de las clonas; carril 1 marcador λ cortado con *Pst* I para la fig A y para la fig B un cósmido recombinado cortado con *Bam* HI y *Eco* RI.

4.1.3. Determinación de la secuencia

Se seleccionaron tres clonas de cada grupo, las cuales fueron secuenciadas con una serie de iniciadores consenso, con éstos no se logró obtener la secuencia completa, faltando 20 pb ubicados al final del tercer intrón y el inicio del cuarto exón de los dos genes, por lo que se recurrió a la subclonación. Esta se realizó siguiendo la metodología descrita en materiales y métodos. La secuenciación de las subclonas respectivas, a partir del iniciador m13 reverso del vector permitió completar la secuencia. Una vez obtenidas las secuencias completas, se hizo una comparación mediante el servicio *Blast*, indicando que éstas correspondían al tipo GH.

4.2. Obtención de las regiones intergénicas por PCR-Largo

4.2.1. Amplificación y caracterización de las regiones intergénicas

A partir del DNA genómico del mono araña y con la utilización de un segundo juego de iniciadores (ITG10 y ITG11) se estandarizó el PCR-Largo (Fig 15). Para el caso del humano (control positivo) se obtuvieron dos bandas, una de 13184 pb, la cual incluye dos regiones intergénicas y una de 6500 pb, la cual involucra también dos regiones intergénicas; y para el caso del mono araña se obtuvo una banda única de 3842 pb (Fig. 15).

El producto amplificado fue caracterizado utilizando diferentes enzimas, con las cuales únicamente se logró predecir que había por lo menos tres regiones intergénicas.

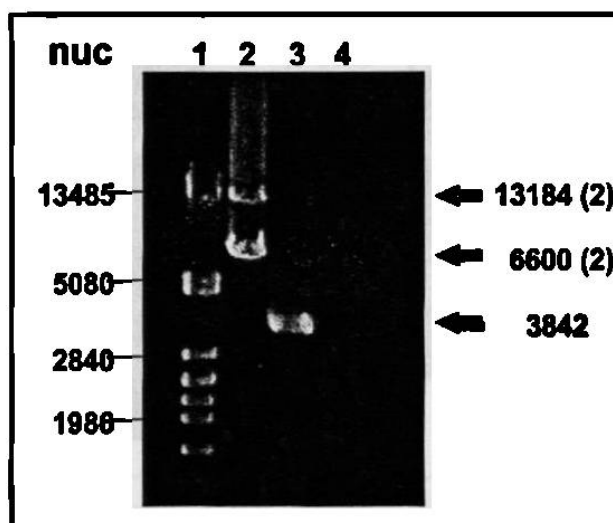


Fig. 15. Amplificación de las regiones intergénicas por PCR-Largo. Se muestran las amplificaciones realizadas a partir del DNA genómico del humano y mono araña por PCR-Largo. Resolviendo las bandas obtenidas en un gel de agarosa al 0.8%. H, humano; Ma, mono araña; T(-), testigo negativo; M, marcador (λ Pst I).

4.2.2. Clonación de las regiones intergénicas

El producto amplificado con los iniciadores intergénicos también fue clonado, y las clonas recombinantes obtenidas fueron caracterizadas para corroborar el tamaño del inserto. A las seleccionadas se les reamplificó por PCR-Largo sus insertos, y éstos fueron caracterizados con *Eco* RI y *Dra* I (Fig 16).

Con las digestiones de *Eco* RI se obtuvieron tres patrones diferentes de restricción, los cuales están representados en el producto amplificado directamente del DNA genómico: el primero sin sitio de corte (X), el segundo liberando una banda de 3162 pb (V,Y,Z) y el último dando una banda de 2640 pb (W). Tres clonas mostraron el mismo patrón de digestión con *Eco* RI, sin embargo, al cortar con *Dra* I los fragmentos fueron diferentes y estas diferencias se pudieron también observar al digerir el producto derivado del DNA genómico. Con estos resultados evidenciamos que hay cinco regiones intergénicas representadas en el genómico, lo cual indica que hay por lo menos seis genes.

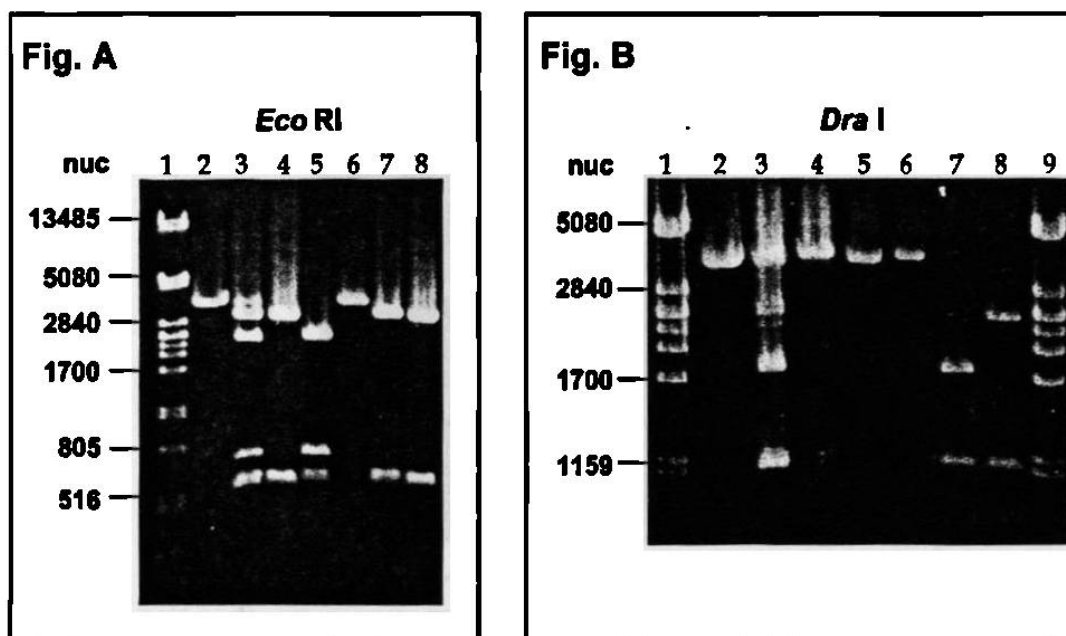


Fig 16. Evidencia de cinco regiones intergénicas. Las clonas fueron amplificadas por PCR-Largo, cuyos productos fueron diferenciados con las enzimas *Eco* RI (Fig. A) y *Dra* I (Fig. B). Los fragmentos se resolvieron utilizando un gel de agarosa al 0.8%. Carril 2 producto sin digerir, carril 3, amplificación directo del genómico; carriles 4 al 8, clonas digeridas (V, W, X, Y y Z). En los carriles 1 y 9 el marcador es DNA del bacteriófago λ cortado con *Pst* I).

4.3. Obtención de un nuevo gen

Para tratar de obtener por amplificación los genes faltantes, se cambió el juego de iniciadores, substituyendo el 3' por uno diseñado sobre una región muy conservada del exón V. El producto amplificado con este nuevo juego fue de 1741 pb a partir del DNA genómico del mono araña (Fig. 17).

La banda amplificada se clonó utilizando la misma estrategia del vector T. De las clonas recombinantes obtenidas solamente una correspondió a un nuevo gen (C) y las otras fueron idénticas al gen A.

Esta clona fue secuenciada; y para obtener la secuencia completa también fue subclonada, una vez obtenida ésta, se comparó mediante el programa *Blast* con las secuencias reportadas en los bancos de datos (Gen Bank). El resultado fue que correspondía también a un tipo GH.

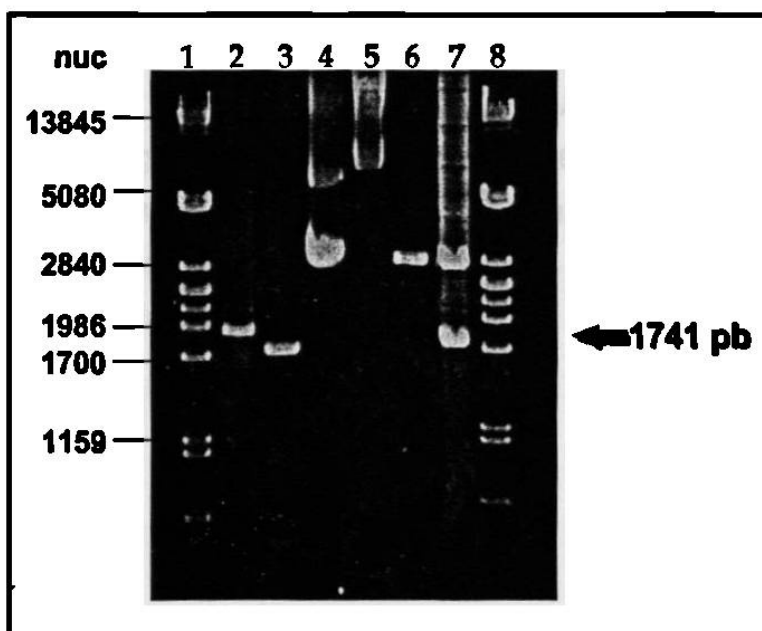


Fig. 17. Obtención de un nuevo gen. Se muestran las amplificaciones directamente del genómico y además la única clona obtenida para el gen C. Las bandas se resolvieron utilizando un gel de agarosa al 1.0%. Carril 2 amplificación de 1930 pb, carril 3 amplificación de 1741 pb, carril 4 plásmido sin digerir, carril 5 clona sin digerir, carril 6 plásmido linearizado, carril 7 la clona liberando el inserto de 1741 pb. Carriles 1 y 8, marcador de DNA del bacteriófago λ cortado con *Pst* I).

4.4. Organización del locus

Para investigar la organización del locus GH en el mono araña se compararon las porciones de las regiones intergénicas y de los genes que se traslapaban.

4.4.1. Amplificación y caracterización de los promotores

Se realizó un PCR para la región promotora de cada gen clonado y de cada una de las regiones intergénicas también clonadas. El producto de 373 pb posteriormente se caracterizó con diferentes enzimas: *Rsa* I, *Ava* II y *Apa* LI, para tratar de encontrar patrones similares entre el promotor derivado de una clona génica y el derivado de una intergénica. Al cortar cada promotor con *Rsa* I, se obtuvo un patrón de restricción diferente para cada gen (Fig. 18). Al comparar éstos con los obtenidos a partir de las regiones intergénicas, se observó que ninguna correspondía al patrón obtenido con el gen A; el patrón derivado del gen C es idéntico al de la región intergénica V, y el del gen B es compatible con el de tres regiones intergénicas X, Y, y Z. Análisis adicionales con otras enzimas (*Ava* II y *Apa* LI) confirmaron los resultados obtenidos y permitieron relacionar el promotor del gen B con la intergénica Y.

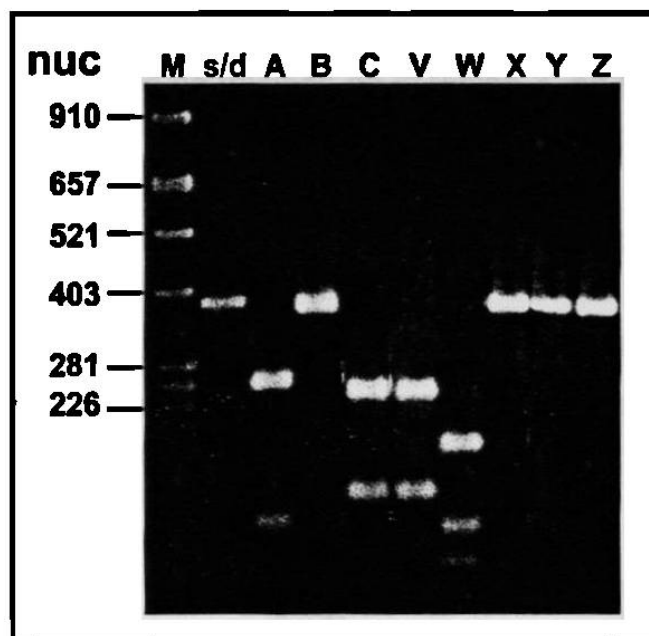


Fig. 18. Caracterización enzimática de los promotores. Las clonas fueron amplificadas con los iniciadores PM430 y ITG11, para obtener la región promotora de 373 pb, cada producto se caracterizó con *Rsa* I. Los fragmentos generados se resolvieron en un gel de agarosa al 2.5%. Carril s/d producto amplificado sin digerir, carriles A, B y C las clonas de los genes digeridas, los carriles V, W, X, Y, y Z clonas de las regiones intergénicas digeridas. Carril M marcador pBR cortado con *Alu* I.

Estas correlaciones se confirmaron con la comparación de las secuencias nucleotídicas de estas regiones promotoras derivadas tanto de los genes como de las regiones intergénicas.

4.4.2. Comparación de las regiones 3' no-traducibles de los genes

La comparación de las regiones 3' de los genes fue más difícil, realizándose a partir de las secuencias de los extremos de las clonas. Sin embargo, el traslape entre los genes y las regiones intergénicas es solamente de 27 pb.

Aún así, se logró correlacionar el extremo 3' del gen A con la región intergénica Z, y el 3' del gen B con la región intergénica X.

El gen C se obtuvo con un iniciador 3' que se aparea dentro del exón V₁ por lo cual no hay posibilidad de traslape de la región 3' no traducible.

4.4.3. Posibles organizaciones del locus GH

El análisis tanto de las regiones promotoras como de los extremos 3' no traducibles permitió correlacionar los genes y las regiones intergénicas obteniendo así tres subconjuntos (Fig 19).

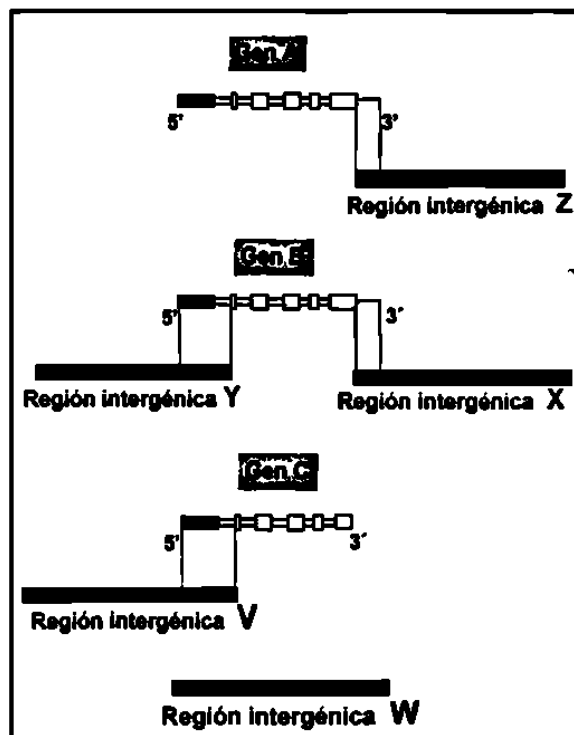


Fig. 19. Subconjuntos realizados para armar el locus. Se ilustra el traslape del gen A con la intergénica Z; el traslape del gen B en ambos extremos, en el 5' con la intergénica Y y por el 3' con la X; el traslape del gen C en su extremo 5' con la intergénica V, y la región intergénica W posiblemente se traslape con el extremo 3' del gen C.

La reconstitución de los seis genes y cinco intergénicas del locus GH se basó en los tres subconjuntos obtenidos y tomando al gen A como el primero, ya que no se encontró una región promotora que le correspondiera en las secuencias intergénicas.

De esta manera, tuvimos dos posible organizaciones (Fig. 20) en la primera el orden de los genes es GH-A/X₁/GH-B/X₂/GH-C/X₃, y en la segunda se cambian de posición los bloques correspondientes a los genes B y C.

Los genes X corresponderían a los tres genes que no se lograron amplificar con los iniciadores utilizados.

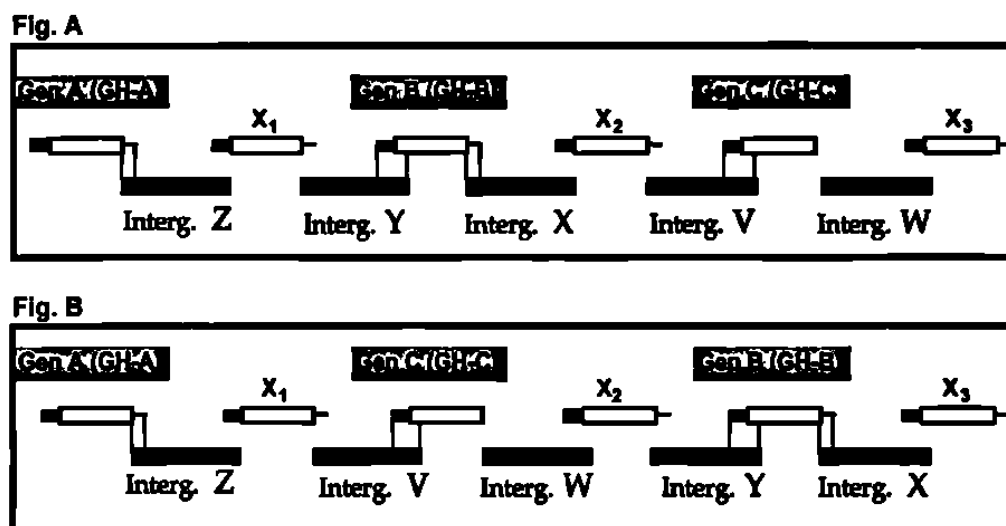


Fig. 20. Posibles organizaciones del locus GH. Se muestra que el gen A en ambas organizaciones es el primer gen del locus. La diferencia entre las dos, es la posición de los bloques GH-B y GH-C, tomando en cuenta que los genes X fueron los que no se lograron obtener.

4.5. Análisis de las secuencias

4.5.1. Análisis de las secuencias de DNAs

Se realizó una comparación entre las secuencias de cDNAs de las GHs obtenidas para el mono araña, y las reportadas para el humano y macaco, mediante el programa *Clustal*. En la fig. 21 se muestra el alineamiento correspondiente a esta comparación, señalando la secuencia señal y posteriormente la secuencia de la proteína madura, en esta última hay cuatro aminoácidos que hacen la diferencia entre GH y PL, tanto del humano como del macaco; los genes obtenidos del mono araña presentan los aminoácidos característicos de GH, corroborando lo obtenido por el *Blast*.

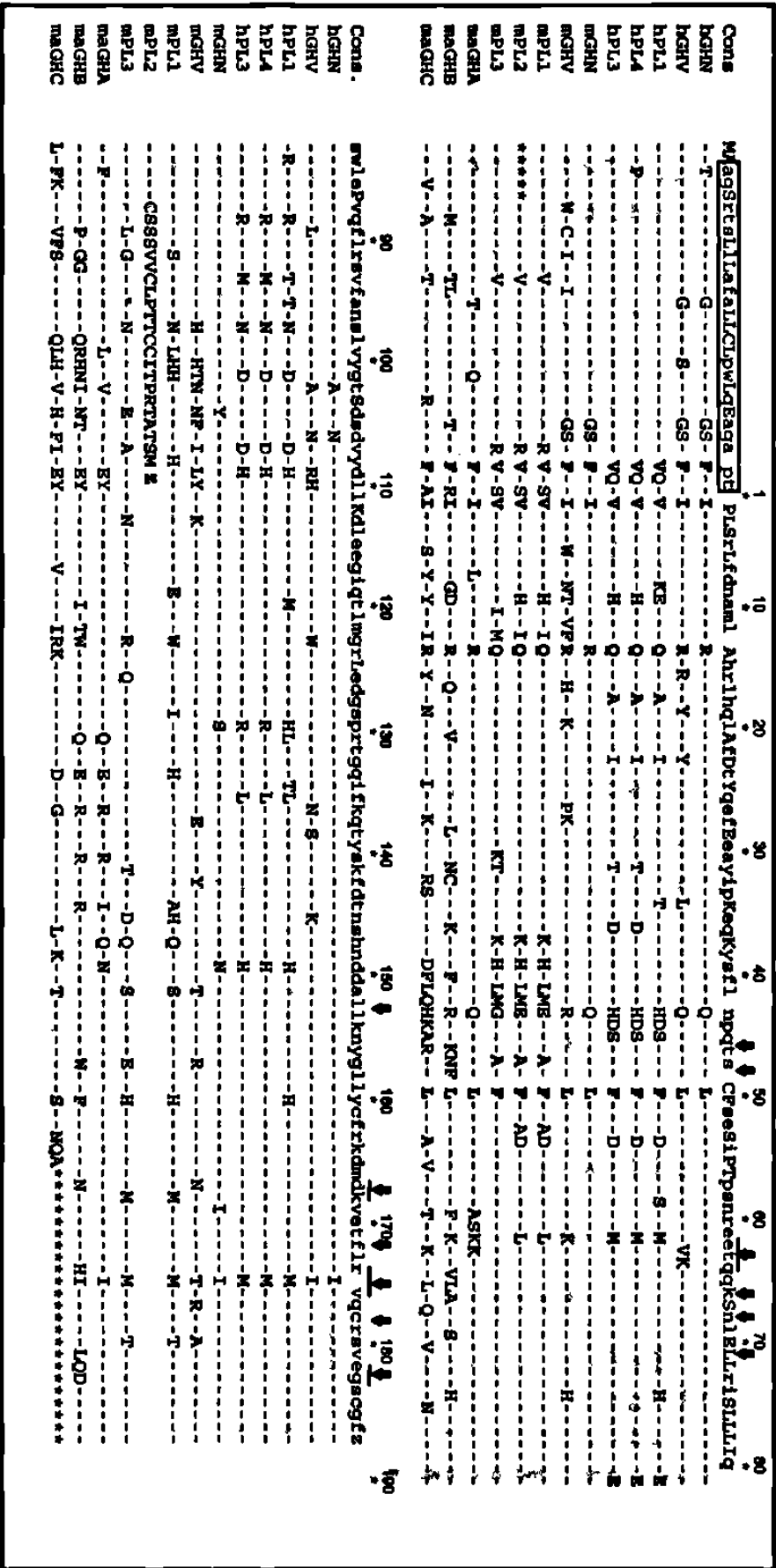


Fig 21. Comparaciones aminoacídicas entre las GHs y PLs del humano, macaco y mono araña.

En un rectángulo se indica el péptido señal. Dentro de la proteína madura hay cuatro aminoácidos que hacen la diferencia entre GH y PL: el primer aminoácido para GH es fenilalanina (F) y para PL es valina (V); el aminoácido 4 para GH es isoleucina (I) y para PL es valina (V); el aminoácido 16 para GH es (R) y para PL es (Q); el aminoácido 52 para GH es leucina (L) y para PL es fenilalanina (F). Los genes obtenidos del mono araña presentan los aminoácidos característicos de GH. Las flechas indican los sitios de unión del receptor a la proteína.

En la tabla 10, se muestra el porcentaje de similitud de los aminoácidos de las GHs del mono araña frente a las GHs del humano y macaco.

Tabla 10. Porcentajes de similitudes de las hormonas GH-A, B y C del mono araña, con respecto a las GHs del humano y macaco.

| Hormona | HGH-N % | HGH-V % | MGH-N % | MGH-V % | MaGH-A % | MaGH-B % | MaGH-C % |
|---------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| HGH-N | 100 | 92 | 91 | 80 | 85 | 74 | 67 |
| HGH-V | 92 | 100 | 86 | 75 | 81 | 71 | 65 |
| MGH-N | 91 | 86 | 100 | 74 | 87 | 74 | 67 |
| MGH-V | 80 | 75 | 74 | 100 | 73 | 70 | 62 |
| MaGH-A | 85 | 81 | 87 | 73 | 100 | 75 | 68 |
| MaGH-B | 74 | 71 | 74 | 70 | 75 | 100 | 61 |
| MaGH-C | 67 | 65 | 67 | 62 | 68 | 61 | 100 |

De la comparación se hizo también un árbol filogenético (Fig 22), tomando como una especie fuera de grupo la secuencia del DNAc de GH del pollo. Se puede observar que las GHs del mono araña divergieron a partir del ancestro de los genes GH (N y V), tanto del humano como del macaco, y que éstos se duplicaron de forma independiente una vez que divergieron el macaco y el humano.

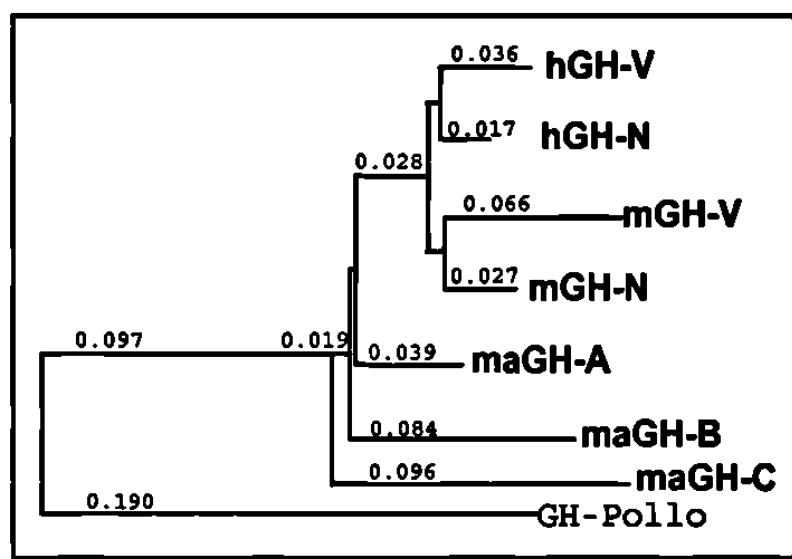


Fig. 22. Arbol Filogenético.

4.5.2. Análisis de las secuencias promotoras

Se realizó una comparación de 101 pb (-131/-30) de la región promotora situadas antes de la caja TATA tanto del humano como del macaco, y las obtenidas del mono araña. Estas últimas incluyen los promotores de los genes clonados y los de las regiones intergénicas clonadas que no tienen traslape. Esta comparación se hizo con la ayuda del programa computacional *Clustal V*. En la fig. 23 se muestran estos resultados, en donde se indican los sitios de unión a factores transcripcionales descritos por hGH-N. Se pueden observar variaciones importantes, por ejemplo en los sitios de unión proximal de Pit y Sp1, mientras que otros como el sitio distal del primero quedan muy conservados.

CAPITULO V

DISCUSION

La familia multigénica GH-PL constituye un modelo interesante para estudiar la evolución relativamente reciente de sus miembros y del gen ancestral de GH en primates.

Dos GHs y tres PLs integran el complejo multigénico, en las dos especies de primates que han sido estudiadas hasta la fecha. En el humano, ya se conoce la organización del locus, siendo ésta: hGHN, hPL1, hPL2, hGHV y hPL3 (Chen y cols, 1989); mientras que en el macaco (Golos y cols, 1993) únicamente se sabe la composición del locus, siendo su organización aún desconocida. En este trabajo nos abocamos a estudiar tanto la composición, como la organización del locus GH-PL en un mono del nuevo mundo.

De las metodologías tradicionalmente utilizadas para obtener genes, destacan el tamizaje de bibliotecas, y la amplificación del gen por PCR. La segunda requiere conocer las secuencias de interés en especies cercanas para poder diseñar un juego de iniciadores específicos. En este trabajo se escogió esta segunda alternativa para obtener los genes GH-PL del mono araña, ya que se conoce la secuencia de los genes del humano y los DNAs del macaco. El diseño de los iniciadores para obtener los genes se realizó antes de iniciar este tesis con finalidades completamente diferentes a las que se propusieron en este trabajo, habiendose hecho en base a secuencias consenso de los genes del humano.

Utilizando dos juegos de iniciadores consenso se lograron amplificar tres genes del mono araña, los productos amplificados fueron clonados y secuenciados.

1. Obtención de los genes GHs del mono araña y comparación.

Dos de los genes se obtuvieron con un iniciador 5' diseñado en la región promotora (a 430 pb del sitio de iniciación de la transcripción) y un 3' que se aparea aproximadamente a 33 pb antes de la señal de poli adenilación.

El tercero se amplificó utilizando el mismo iniciador 5' pero un iniciador 3' que se aparea en una región muy conservada del quinto exón y por lo tanto, su secuencia nucleotídica no es completa, faltando alrededor de 191 pb.

El análisis de las secuencias de los tres genes indica que son del tipo GH, uno siendo más parecido a hGH-N y mGH-N (maGH-A) que los otros.

En base a los valores de similitud obtenidos, se puede inferir sobre la identificación de los genes. maGHA es mucho más parecido a la GH del humano (85%) y del macaco (87%), que los maGHB y C. Por lo tanto, se identificó este primero como un gen GH-N y a los otros dos como genes GH-V. Estos últimos comparten más similitud con maGH-A que con sus homólogos en el humano y macaco. Este resultado se había encontrado también para el macaco.

El grado de similitud entre las GHs del mono araña varía entre un 74% y un 61%, siendo maGH-C la más diferente; esta diferencia se observa también entre las dos GHs del macaco (similitud del 74%), pero no en las del humano (similitud del 92%). Estos resultados podrían sugerir que: 1) los eventos de duplicación que generaron las GH-B y GH-C del mono araña y la GH-V del macaco fueron anteriores al que

generó GH-V en el humano, y/o 2) que la fuerza de selección que se ejerció sobre estos genes no fue la misma.

Del análisis realizado a partir de las secuencias aminoacídicas de las GHs obtenidas del mono araña, se observó que tienen los dos puentes disulfuros en la misma posición (aa 53 y 182) que las GHs y PLs del humano y macaco.

La comparación realizada con la maGHA con respecto a la HGH-N, nuestra que presenta 14 cambios aminoacídicos de los cuales 11 son no sinónimos y de éstos, dos son sitios importantes, en la región de unión al receptor de GH.

Los resultados obtenidos de la comparación de las maGH-B y C con respecto a las GHs, se observa que la GH-C es la que presenta mayor número de cambios no sinónimos, lo cual indica que muy probablemente el receptor de GH no se une a ésta, pero sí pudiera unirse a las proteínas GH-A y GH-B.

2. Organización del locus.

Las regiones intergénicas fueron obtenidas utilizando el PCR-Largo, para posteriormente intentar determinar la organización del locus. La combinación de PCR y PCR-Largo para lograr el orden del locus no había sido reportada, siendo ésta una innovación metodológica aportada por este trabajo.

El diseño previo de los iniciadores para obtener las regiones intergénicas fueron en base a las secuencias conocidas en el humano. Estos no habían sido probados en otras especies de monos, siendo el mono araña la primera en que se utilizaron. Se obtuvo una coamplificación de cinco regiones intergénicas, lo cual indica seis genes. Sin embargo, solo se logró amplificar por PCR tres genes de los seis presentes en el complejo multigénico, indicando que el resto de los genes debe diferir en las secuencias de apareamiento de los iniciadores

(se han encontrado variaciones en la región 3' de los genes X, que podrían explicar que el iniciador no pueda aparearse de manera eficaz).

La caracterización enzimática y la secuenciación de los extremos de las regiones intergénicas permitieron ordenar los diferentes genes utilizando como base la organización del locus humano. Igual que en este último, el primer gen (que no tiene la contraparte de su promotor en una región intergénica) es maGHA que corresponde al gen de GH hipofisaria.

Se ha observado que a lo largo de la evolución de este complejo el orden que se conserva es primero una GH y luego un PL, en base a esto se plantearon las dos organizaciones para el locus del complejo multigénico del mono araña, variando las posiciones del bloque GHB y GHC, y permaneciendo constante en ambas la posición el primer gen (GHA); estas dos organizaciones presentan una diferencia con respecto a la del humano ya que en éste hay dos PLs contiguos (PL1 y PL2) y en el mono araña aparentemente no existe esta estructura.

Con el conjunto de resultados obtenidos en este trabajo se plantearon dos propuestas acerca de la duplicación del gen ancestral de las GHs. La primera sería que el gen ancestral se duplicó a preGH y prePL antes de que divergieran los monos del nuevo mundo (seis genes), los monos del viejo mundo (cinco genes) y el humano (cinco genes), y que posteriormente evolucionaron en forma independiente en cada especie; esta propuesta es apoyada por el resultado del árbol filogenético, pero lo que es difícil de explicar es cómo a partir de dos especies se fue expandiendo el locus en diversas especies. La segunda propuesta, indica que la primera y la segunda duplicación ocurrieron antes de que divergieran los monos del nuevo mundo, los monos del viejo mundo y el humano, y que a partir de aquí cada uno evolucionó en forma independiente en cada especie. Esta propuesta sería la más aceptada pero en este caso las GHN y GHV de estas especies deberían tener el mismo ancestro, y los resultados obtenidos del árbol filogenético no lo demuestran.

3. Evolución de los promotores

El obtener las secuencias de las regiones promotoras de los genes del complejo GH del mono araña permitió inferir sobre la evolución de la regulación de la expresión de los miembros de esta familia génica. En el promotor del gen hGH-N se han descrito varias secuencias de unión a factores transcripcionales, que juegan un papel importante en la regulación de este gen. Entre éstos se pueden mencionar al factor Pit-1 que se une a dos regiones, una proximal (a -80 pb) y la otra distal (a -120 pb), el factor ubicuo Sp1 que se une justo atrás del sitio distal de Pit-1 con el cual compite para unirse, y el factor de la caja Z, entre otros.

En el análisis realizado a las regiones promotoras se encontraron variaciones importantes en los sitios de unión de algunos factores transcripcionales. Para el sitio de unión de Sp1 (GGGAGG), tenemos que esta conservado tanto en el humano como en el macaco, pero existen variaciones importantes en las secuencias promotoras del mono araña (GAGAGG y GGAAGG), indicando que este sitio de unión se adquirió durante la evolución de los propios primates.

En un trabajo desarrollado anteriormente en el laboratorio de Biología Molecular (Barboza, 1998) en donde se modificó el sitio de unión a Sp1, GGAAAG, dentro de la región promotora del gen hPL-4 sin alterar el resto de los 500 pb del promotor, esta modificación impidió la unión de la proteína purificada. Otros reportes indican que las G son importantes para la unión de la proteína. Esto nos hace inferir que el factor Sp1 no se puede unir a los promotores de los genes del mono araña, y por lo tanto la importancia de Sp1 se adquirió en los primates del viejo mundo.

Existen reportes de la regulación de la expresión de GH en ratas, en donde se indican que los sitios de unión de Pit tanto proximal como distal son importantes para esta especie. Sin embargo, en el humano existen evidencias de que es más importante para la regulación, la unión de Pit a su sitio distal que a su sitio Pit proximal. Con los

resultados obtenidos en este trabajo demuestran que esta preferencia se estableció desde la aparición del mono araña, ya que la secuencia del sitio distal está conservada mientras que la del proximal no permanece conservada.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

1.- Utilizando iniciadores consenso se lograron amplificar tres genes del complejo GH-PL del mono araña, éstos fueron clonados y secuenciados totalmente, los tres correspondiendo a GH o "GH-like".

2.- Utilizando un segundo juego de iniciadores se lograron amplificar las regiones intergénicas del complejo GH-PL del mono araña. Los patrones de restricción demostraron que cinco regiones intergénicas se coamplificaron originando un producto del mismo tamaño. Este resultado se corroboró por clonación.

3.- La presencia de cinco regiones intergénicas implica la existencia de seis genes de los cuales tres se amplificaron, y los otros tres no se lograron obtener por PCR, debido a que existen variaciones importantes en las regiones de apareamiento de los iniciadores.

4.- El análisis de los promotores, tanto de las regiones intergénicas como de los genes clonados, permitió inferir las posibles organizaciones del locus.

5.- El análisis de los promotores reveló variaciones nucleotídicas importantes, tanto en el sitio proximal de unión de Pit como en el del factor Sp1. Sin embargo, el sitio distal de unión de Pit permanece conservado. Estos resultados permitieron inferir sobre la importancia de estos factores en la regulación de GH, a lo largo de la evolución.

CAPITULO VII

REFERENCIAS

Alvaréz, José; "Los Cordados: Origen, evolución y hábitos de los vertebrados". Editorial Continental. 1977.

Barsh, G.S.; Seeburgh, P.H.; Gelinas R.E. " The human growth hormone gene family: structure and evolution of the chromosomal locus". Nucleic Acids res, 11:3939, 1983.

Bewley, T.A.; Dixon, J.S.; Li, C.H. "Sequence comparison of human pituitary growth hormone, human chorionic somatomammotropin, and ovine pituitary growth and lactogenic hormones". Int. J. Peptide Protein Res. 4:281, 1972.

Catt, K.J.; Moffat, B. y Niall, H.D. "Human growth hormone and placental lactogen: structural similarity. Science 157:321, 1967.

Colbert, E.H. "Evolution of the vertebrates", Science Editons, New York, 1961.

Chen, E.Y.; Liao Y.C.; Smith, D.H.; Barrera-Saldaña, H.A.; Gelinas R.E.; Seeburgh, P.H. "The human growth hormone locus nucleotide sequence, biology, evolution". Genomics, 4:479, 1989.

Daughaday, W.H. "Growth hormones and somatomedins, In Daughaday, W.H. (Ed), Endocrine Control of Growth, Elsevier, New York, NY. 1-24,1981.

Edwards III, C.K.; Ghiasuddin, S.M.; Schepper, J.M., Yunger, L.M y Kelley, K.W. "A new defined property of somatotropin: Priming of

Macrophages for production of superoxide anion". *Science*, 239: 769-771,1988.

Forsyth, I.A. "Comparative aspects of placental lactogens: structure and function" *Exp. Clin. Endocrinol.* 102:244-251, 1994.

Forsyth, I.A. "Variation among species in the endocrine control of mammary growth and function: The roles of Prolactin, Growth Hormone, and Placental Lactogen". *J. Dairy. Sci.* 69:886-903, 1986.

George, D.L. Phillips, J.A. III Franke, U. and Seeburg, P.H. "The genes for growth hormone arm of human and chorionic somatomammotropin are on the long arm of the human chromosome 17 in region q21-qter". *Hum. Genet.*, 57:138-141.

Goffin, V.; Shiverick K.T.; Kelly, P.A.; Martial, J.A. "Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals". *Endocrine Reviews.*, 17:385-410, 1996.

Golos, T.G.; Durning, M.; Fisher, J.M.; Folwer, P.D.; "Cloning of four GH/chorionic somatomammotropin-related cDNAs differentially expressed during pregnancy in the rhesus monkey placenta". *Endocrinology*, 133:1744-1752, 1993.

Harper, M.E.; Barrera- Saldaña,H.A.; Saunders, G.F. "Chromosomal localization of the human placental lactogen-growth hormone gene cluster to 17q22-24". *Am. J. Hum. Genet.*, 34:227-234, 1982.

Hill, D.J., Crace, C.J.; Strain, A.J.; Milnes, R.D.G. "Regulation of aminoacid uptake and deoxiribonucleic acid synthesis in isolated human fetal fibroblasts and myoblasts: Effect of human placental lactogen, somatomedin-C, multiplication stimulating activity and insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 62:753-760,1986.

Hill, D.J.; Freemark, Strain, A.J.; Handwerger, S. y Milnes, R.D.G. "Placental lactogen and growth hormone receptors in human fetal tissues: relationship to fetal plasma human placental lactogen concentration and fetal growth". *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 66:1283-1290,1988.

Li, C.H. Evans, H.M.; simpson, M.E. "Isolation and properties of the anterior hypophysial growth hormone". *J. Biol. Chem.*, 159:353-366,1945.

Li, W.H; Graur, D. "Fundamentals of Molecular Evolution". Sinauer Associates, Inc.,1991.

Marchuk, D.; Drumm, M.; Saulino, A.; Collins, F.S. "Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmofied PCR products". *Nuceic Acids Res*, 19:1154, 1990.

Martínez Soriano, J.P.; Cab Barrera, E.L.; Tamez González, R.; Leal Klevezas, D.S. "Dettección de *Brucella abortus* por medio de la reacción en cadena de la polimersa". *Bioquimia*, 18: 10-16. 1993.

Miller, W.L.; Eberhardt N.L. "Strucuture and evolution of the growth hormone gene family". *Endocr. Rev*, 4:97, 1983.

Murray, R.K.; Mayes P.A.; Granner, D.K. y Rodwell, V.W. "Bioquímica de Harper". Ed. manual moderno., 1997.

Niall, H.D.; Hogan, M.L.; Sauer, R.; Rosenblum, I.Y. y Greenwood, F.C. "Sequences of pituitary and placental lactogen and growth hromones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication". *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 68:866-869, 1971.

Novacek, M.J. "Mammalian phylogeny: shaking the tree". *Nature*, 356:121-125,1992.

Owerbach, D.; Rutter W.; Martial, J.; Baxter J. "Genes for growth hormone, chorionic somatomammotropin, and growth hormone-like genes on chromosome 17 in humans". *Science*, 209:289, 1980.

Phillips, L.S.; Vassilopoulou-Sellin, R., Somatomedins, N. *Englan. J. Med.*, 302:438-446,1988.

Sambrook J.; Maniatis, T.; Fritch, E.F. "Molecular cloning, A laboratory manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.

Sherwood, L.M. "Similarities in the chemical structure of human placental lactogen and pituitary growth hormone". *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 58:2307-2314, 1967.

Shome. B.; Prlow A.F. "Human pituitary prolactin (hPRL): the entire linear amino acid sequence". *J. Clin Endocrinol. Metab.* 45:1112, 1977.

Walker, W.H.; Fitzpatrick, S.L.; Barrera-Saldaña, H.A.; Reséndes-Pérez, D.; Saundesr, G.F. " The human placental lactogen genes: Structure, funtion, evolution and transcripational regulation". *Endocrin. Rew.*, 12:316-328.

Wallis, M. "The molecular evolution of pituitary growth hormone prolactin and lactogen placental: A protein family showing variable rates of evolution". *J. Mol. Evol.*, 17:10-18, 1981.

Wallis, M. "Variable evolutionary rates in the molecular evolution of mammalian growth hormones". *J. Mol. Evol.*, 38:619-627, 1994.

APENDICE A**NOMENCLATURA PARA LOS AMINOACIDOS**

| | |
|----------|----------------------|
| A | Alanina |
| R | Arginina |
| N | Asparagina |
| D | Ac. Aspártico |
| C | Cisteína |
| Q | Glutamina |
| E | Ac. Glutámico |
| G | Glicina |
| H | Histidina |
| I | Isoleucina |
| L | Leucina |
| K | Lisina |
| M | Metionina |
| F | Fenilalanina |
| P | Prolina |
| S | Serina |
| T | Treonina |
| W | Triptofano |
| Y | Tirosina |
| V | Valina |

APENDICE B

Secuencia nucleotídica de los genes obtenidos

1. Gen maGH-B

1 GGGGTCTCGAGGACTGGCTATCCTGACATCCTTTCTGCCTTCAGGTTGGCCACCATGGC
 61 ATGCTGCCAGAGGACACCCACCTGCCCTCAAGGAGAGGCCAGGATGGGTGGTGCCTCTG
 121 GCTGACACTCTATGCACAACCTCATAGCGCTGGGAAAGATGACAAGCCAGGGGCATGAC
 181 ACCAGCATGTGTGAGAGAAGCTTCTAAATTATCCATTAGCACAGGCACGTGAGTGGTCCC
 241 CATGCATAAATGTACAAAGAAAACAGTTAGGGGCAAGTAGGGAGAGAGAAGGAGCCAGAGT
 301 ATAAAAGGGCCCACGAGAGACCAGCTCCAGGATCCCAAGGCCCAACTCCCCAAACCACCT
 361 GGAGTCCTGTGGACAGCTCACCTAGCTGCAATGGCTGCAGGTAAGGGTCCCTAAAATCCC
 421 TTTTGGCATTATAAGTCTCTGAGGGGAGAGGCGGTGTCTGTAGATGGGACGGGGGGACTA
 481 ACCCTCAGGTTTCGGGCTTCTGAATGTGGGTATCGCCATCTAAGCCAATCTCAGAATGTT
 541 CCTCATCCCAGAGAGATAATAATAAAAAAAAAAAAAATCCAGCCCCTGAGCAAGAGCACTGG
 601 TCTCTTGCTCTCCAGCTCCCTCCCTCCCTCCCGTTTCTCCCCAGGCTCCCGGACATCC
 661 CTGCTCCTGGCTTTACCCCTGCTCTGCCTGCCCCAGCTTCAAGAGGCTGGTGCCTTCCCA
 721 ACAATTCCTTATCCAGGCTTTTGGACAATGCTATGCTCCGCGCCCATCGCTGCACCAG
 781 CTGGCCTTTGACACCTACCAGGAGTTCGTAAGCTCTTGGGGAATGGGTGCCCATCAGGGG
 841 TGGCAGGAAGGAGTGACTTTCCCTGCTGGGAAGTAATGGGAGGAGACGAAGGAGCTCAG
 901 GGTGTTTTCAGAAGCAAAGATGCAGACAGATGAGCACAGGCCGAGAGAGGTCCCAGAAAA
 961 GTAAGTGGGAGCTGGTCACCAGCATAGACCTTGGTGGGCGGTCTTCTCTCTAGGAAGAAG
 1021 CCTATATCCCGAAGGAACAGAAGTATTCCTTCTGCAGAACCCCCAGACCTCCCTCTGCT
 1081 TCTCAGAGTCTATCCCGACACCCGCCAGCAAAAAGGAAACTCAGCAGAAATCCGTGAGTG
 1141 CCCCCTGTCCGCAGGCAGGGATGGGGGAGGCCTGTGGTCAAAGCCCCCAGGCAGCACACC
 1201 CACTGCCGGTCTTCCCTGCAGAACCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTTATCC
 1261 AGTCCTGGTTCGAGCCTGTGCAGTTCCTCAGGAGTGTCTTCGCCAACAGCCTATTGTATG
 1321 GCGTCTCAGACAGCGATGTCTACGAGTACCTGAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACTC
 1381 TGATGGGGGTGAGGGTGGCACCAGAGTCCCAATCCTGGGGCCCCACTGGCTTCCAGAG
 1441 CTGGGGGAAAGAAACACTGCTGTTCTCTTTTCAGCAGTCAGGCCCTGACCCAAGAGAACT

1501 CAGCTTATTCTTCATTTCCACTCGTGAATCCTCCAGGCCTTCTCTACACCTTAGAGAGA
 1561 AGAGGGAAAATGAATGAATGAGAGAGGGAGGGAAACAGTGTCCAAGCACTTGGCCTCTCCT
 1621 TCTCTTCTTCACTTTGCGAGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCAGACTGGGGAGATCTTCA
 1681 GGCAGACCTACAGGAAGTTTGACATAAACTCGCAAAACAATGACGCATTGCTCAAGAACT
 1741 ACGGGCTGCTCTACTGCTTCCGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACGTTCTTGGCATTG
 1801 TGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGCTGCCGGGTGGCATTCTGTGA
 1861 CCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGAATTC

2. Gen maGH-B

1 GGGGTCTCGAGGACTGGCTATCCTGACATCCTTTCCTGCCTTCAGGTTGGCCACCATGGC
 61 ATGCTGCCAGAGGACACCCACCTGCCCTTAAAGAGAGGCCAGGATGGGTGGTGCCTCTG
 121 GCTGACACTCTATGCACAACCCTCGGAGCGCTGGGAAAGATGACAAGCCAGGGGGCATGA
 181 TACCAGCATGTGTGAGAGAAGCTTCTAAATTATCCACTAGCACAGGCACGTCAGTGGCCC
 241 CCGTTGCATGAACGTGCATAGAAACAGGTGGGGGCCAGCAGGCAGAGAGAAGGGGCAAGG
 301 GTATAAAAGGGCCACGAGAGACCAGCTCCAGGATCCCAAGGCCCAACTCCACAAACCAC
 361 TGAGAGTCTGTGGACAGCTCACCTAGCTGCAATGGCTGCAGTTAAGCGCCCCATAAATC
 421 CCTATGAGCAGGATGTGTCTGGAGGGGAGAGGCGGTGTCCTGTAGATGGGACGGGGGCAC
 481 TAACGCTCAGGTTTGGGGCTTCTGGATGTGAGCATCACCATCTAAGCCAGATATTCCGGC
 541 CTATCTCAGAATGTTCTGATCCCTGGAGGGAGACTAAAAAATAGCCCGTCGAGCAAGA
 601 GCACTGGCCTCTTGCTCTCCGGCTCACTCCCTTCTCCTACGGTATCTCCCCAGGCTCCCG
 661 GATGTCCCTGCTCCTGACTCTTGCCCTGCTCTGCCTGCCCTGGCTTCAAGAGACTGGTGC
 721 CTTTCCAAGAATTCCTTATCCAGGCTTTTTGGTGACGCTATGCTCCGTGCCCATCAGCT
 781 GCACCAGGTGGCCTTTGACACCTACCAGGAGTTGGTAAGTCTTGGGGAATGGGTGCCATC
 841 AGGGGTGGCAGGAAGGTTGACTTTCCCTGCTGGGAAGTAATGGGAGGAGAGCAAGGAG
 901 CTCAGGGTTGTTTTCTGAAGTGAAGAAGCAGGCCGATGATCATATGCTGAGTGAGGTCCC
 961 AGAAAAGTAAGAATGGGAGCTGGTCCCCAGCATAGACCTTGATGGGTGGTCTTCTGCTA
 1021 GGAAGAAAATTTGATCCCGAAGAAAAGAGATTTTCTTCTGCGTAACCCCAAGAACTT
 1081 CCTCTGCTTCTCAGAGTCTATCCCGACACCCCTCAACAAGGAGGAAGTGTCTGGCAAAATC
 1141 CGTGAGTGGCCGCCCTCTCCCCAGGCAGGCATGGGGAGGCCTGTGGTCAGAGCCCCCGGG
 1201 CAGCACACCCACTGCCAGTCTTCCCCTCGAGAGCCTAGAGCTGCTCCACATCTCCCTGC
 1261 TGCTCATCCAGTCCCTGGCTCGAACCCGTGCAACCCCTCGGCGGTGTCTTTGCCAACAGCC
 1321 AACGGCATAACATCTCAAACACCGATGTCTACGAGTACCTGAAGGACCTAGAGGAAGGCA
 1381 TCCAAATTCTGACGTGGGTGAGGGTGGCGCCAGCGGTCTCCAATCTGGGGCCCCACTGG

1441 CTTCCAGAGCTGGGGGAAAGAAACACTGCTGCTCTCTTTTFFAGCAGTCAGGCCCTGACCC
 1501 AGAGAACTCAGCTTATTCTATCATTTCCACTCATGAATCCTCCAGGAATTTCTCTATGTC
 1561 CTGGAGGGCAGGGAAACAAAAGAATGAATGAGAGAGGGAGGGAACAGTGTCCAAGCACTTG
 1621 GCCTCTCCTTCTCTTCTTTTCATTTTGCAGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCAGACTGGGG
 1681 AGATCTTCAGGCAGACCTACAGGAAGTTTGA CAGAACTCACACAACGATGACGCACTGC
 1741 TCAAGAACTACTGGCTGCTCTTCTGCTTCCGGAAGGACATGAACAAGGTCGAGACATTCC
 1801 TGCACATTGTGCAGTGCCGCTCTCTGCAGGACAGCTGTGGCTTCTAGCTGCCGGGTGGCA
 1861 TCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGAATTC

3. Gen maGH-C

1 GGGGTCTCGAGGACTGGCTATCCTGACATCCTTTCTGCCTTCAGGTTGGCCACCATGAC
 61 ATGCTGCCAGAGGGCACCCACCTGCCCTAAAAGAGAGGCCAGGATGGGTGGTGCCTCTG
 121 GCTGACTCTCTGTGTACAACCTCACAGCGCTGGTGACGGTGTAAAGGGAAAATGACAA
 181 GCCAGGGGGCATGATACCAGCATGTGTGGAAGAAGCTTCTAAATTATCCACTAGCACAGG
 241 CATGTCCGTGACCCCTCCCTTGCCCAAACATACATAGAAACAGGTGGGGACCAGCAGGGAG
 301 AGAGAAGGGGACAGGGTATAAAAAGGGCCCATGAGAGACCAGCTCCAGGATCCCAAGGCC
 361 AACTCCCCAAACCAGTAAGAGTCCTGTGGACAGCTCACCTAGCTGCAATGGCTGCAGGTA
 421 AGGGTCCCTAAAATCCCTTTAGCATTATATGTCTGAGGGGAGAGGCGGTGCCCTGTAG
 481 ATGGGATGGGGGCACTAATCCTCTGAATGTGGGTATTGCCATCTAAGCCAGATATTTGG
 541 CCATTCTCAGAATGTTCTGGTCCCTGGAGGGAGAGACAAAAAAGAAATAGCCCCTGAGC
 601 AAGAGCACTGACCTCTTGCTCTCCGGCTCCCTCCCACGCCCTCTGGTTTCTCCCTAGTCT
 661 CCCGGGCATCCCTGCTCCTGACTTTTCGCCCTGCTCTGCCTGCCCTGGCTTCGGGAGGCTG
 721 GTGCCTTCCCAGCAATTCCTTATCCTCGCTTTACGACTATGCTATGATCCGCGCCTATC
 781 GCCTGAACCAGCTGGCCTTTGACATCTACCAGAAGTTTGTAAAGCTCTTGAGGAATGGATG
 841 CATGTCAGGGTTGGCAGGAAGGGGTGACTTTGCCTTGCTGGGAAGTAACGGGAGGAGACG
 901 AAGAACGTCAGGATTGTTGCTGAATTGAAGATGCAGGCAGATGAGCATACTGAGTGA
 961 GGTCCAGAAAAGGAACATGGGAGCTGGTCACCAGCATAGATACTGATGGGCAGTCCTTCT
 1021 CCTAGGAAGAAGCTCGTAGCCCCGAAGGAACAGAAGGATTTCTTGCAGCATAAAGCCAGGA
 1081 CCTCCCTTTGCTTCTCAGCGTCTGTCCCAACCCCCTAACAGAAAGGAAACTCTGCAGC
 1141 AATCTGTGAGTGGCCACCCTCTCTACCAGGCAGGGATGGGGGAGGCCTGTGGTCAGAGTC
 1201 CCTGGGCAGCACCCCCTGCGGTCTTCCCCTGCAGAACGTAGAGCTGCTCCGCAACT
 1261 CCCTGCTGCTCATCCAGTTGTGGTTCAAGCCCGTGCAGGCTTTCAGCAGTGTCTTTGCCA
 1321 ACAGCCAACTGCATGGTGTCTCACACAGCTTCATCTATGAGTACCTGAAGGACCTAGAGG
 1381 AAGTCATCCAAACTCTGATCAGGGTGAGGGTGGCACCCAGAGGTCCCCAATCCTGGGGCCC

1441 CACTGGCTTCAAGGGCTGGGAGAAAGAAACACTGCTGCTCTCTTTTTAGCAGCTCAGGCC
1501 CTGATCCAAGAGACCTCAGCTTATTCTTCATTTCCACTCGTGAATCCTCCAGGCCTTTCT
1561 CTACACCATGGAGCCTTGGAGAAGAGGGAGGAAAAAGAATGAGTGAGAGAGGGAGGGAAC
1621 AGTGTCCAAGCATTGGCCTCTCCTTCTCTTCCTTCACTTTGCAGAAGTTGGAAGATGGCA
1681 GCCCCCGGACTGGGGACATCTTCGGGCAGACCTACAGCAAGTTTGACACAAACTTGCACA
1741 AGGATGACACACTGCTCAAGAACTACGGGCTGCTCTCCTGCTTCAATCAAGCTT

