

21

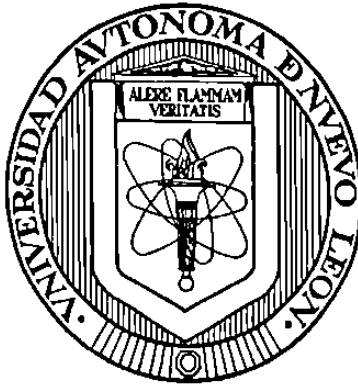
TITULO: " EXPRESION DEL GEN DE LA  
HORMONA DEL CRECIMIENTO (hGH-N) -  
BAJO EL CONTROL DE UN PROMOTOR IN-  
DUCIBLE CON DOXICICLINA, EN CELU-  
LAS HIPOFISIARIAS".  
Biol. Hipolito Castillo Ureta.

TM  
QP572  
.G75  
C3  
2000  
c.1



1080095020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA



" EXPRESIÓN DEL GEN DE LA HORMONA DEL  
CRECIMIENTO (hGH-N) BAJO EL CONTROL DE UN  
PROMOTOR INDUCIBLE CON DOXICICLINA, EN CÉLULAS  
HIPOFISIARIAS"

Por

**BIOL. HIPÓLITO CASTILLO URETA**

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

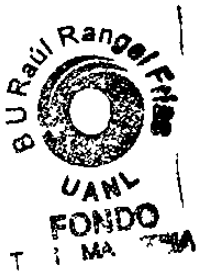
Noviembre, 2000

4 572

. 77<sup>c</sup>

C3

000



**EXPRESIÓN DEL GEN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO (hGH-N) BAJO EL CONTROL DE UN PROMOTOR INDUCIBLE CON DOXICICLINA, EN CÉLULAS HIPOFISIARIAS**

**Aprobación de la Tesis:**



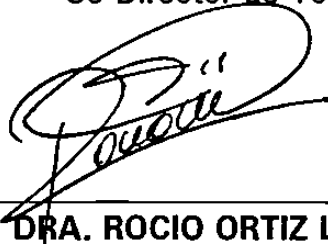
---

**DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRIGUEZ**  
Director de Tesis



---

**DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA**  
Co-Director de Tesis



---

**DRA. ROCIO ORTIZ LOPEZ**



---

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

*El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biología Celular, de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, del Departamento de Bioquímica de esta Facultad, bajo la dirección de la Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez y la co-dirección del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.*

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez, por la confianza y el apoyo que me brindó.**

**Al Dr. Hugo Barrera-Saldaña por darme la oportunidad de incursionar en el área de la Biología Molecular.**

**Al M.C. Martín Canizales Espinosa, por su valiosa ayuda en la realización del trabajo experimental “GRACIAS”.**

**A la Dra. Roció Ortiz López por sus sugerencias en la elaboración de este manuscrito.**

**A los que coincidimos en el Laboratorio de Biología Celular: Norma, Clarisa, Virgilio, Martha. Gracias por departir conmigo momentos gratos.**

**A la “Generación de los 12” por la amistad que me brindaron durante estos dos años**

**De manera a general, a todo el personal de la ULIEG que de alguna u otra manera estuvo involucrado en el trabajo experimental de mi tesis.**

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado.**

## **DEDICATORIAS**

**A mis padres, Sres. Carmelo Castillo Medina y Josefa Ureta Montoya,  
Nunca e olvidado aquellas palabras que hicieron que continuará  
con mi carrera profesional “Tu sabes lo que haces”.**

**A toda mi familia, con quienes he compartido momentos  
muy gratos**

**A mi Morena y a Jairo Said, ambos son una ilusión  
y un motivo para seguir adelante.**



## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
I	INTRODUCCIÓN.....1
1.1	La familia multigénica hGH-hPL.....2
1.1.1	Características del gen hGH-N y su regulación.....3
1.1.2	Proteínas derivadas de la expresión del gen hGH-N.....4
1.1.3	Estructura y función de la hormona del crecimiento (HGH).....5
1.2	Síntesis de la hormona del crecimiento humano (HGH) en diferentes sistemas de regulación.....6
1.2.1	Otros sistemas de expresión.....7
1.3	Características generales de los sistemas inducibles por tetraciclina.....8
1.3.1	Características del sistema “tet Off”.....8
1.3.2	Características del sistema “tet On”.....9
1.3.3	Estudios de regulación del sistema “tet Off”.....10
1.3.3.1	Expresión de proteínas de interés bajo la regulación del sistema “tet Off”.....12
1.3.3.2	Estudios de expresión realizados con el sistema “tet On”...12
1.4	Justificación.....14
II	OBJETIVOS.....15
2.1	Objetivo general.....15
2.2	Objetivos específicos.....15
III	MATERIALES Y MÉTODOS.....17
3.1	Origen de los reactivos.....17
3.2	Origen del material biológico.....18
3.3	Equipo.....18
3.4	Métodos.....19
3.4.1	Subclonación del gen hGH-N en los vectores de expresión pBI-EGFP y pBIG3i-rtTA.....21
3.4.1.1	Eliminación del promotor natural de 500 pb y obtención de la unidad transcripcional de hGH-N.a partir del vector pBShGH-N.....22
3.4.1.1.1	Purificación del vector pBShGH-N por el método de fibra de vidrio.....23
3.4.1.1.2	Ligación del vector pBShGH-N.....24
3.4.1.1.3	Caracterización de la clona pBShGH-N(pro-).....25
3.4.1.1.4	Liberación de la unidad transcripcional del gen hGH-N.....26

3.4.1.2	Construcción del recombinante pBI-EGFP-hGH-N.....	27
3.4.1.2.1	Digestión y ligación del vector de expresión pBI-EGFP.....	27
3.4.1.2.2	Caracterización de las clonas pBI-EGFP-hGH-N.....	28
3.4.1.2.3	Reinserción del promotor bidireccional regulable por doxiciclina.....	29
3.4.1.3	Construcción del recombinante pBIG3i-rtTA-hGH-N.....	30
3.4.1.3.1	Digestión preparativa del vector de expresión pBIG3i-rtTA.....	31
3.4.2	Propagación a gran escala de los recombinantes pBI-EGFP-hGH-N(pro+) y pBIG3i-rtTA-hGH-N.....	32
3.4.2.1	Purificación de los recombinantes por el método de gradiente en CsCl.....	34
3.4.2.2	Diálisis.....	35
3.4.2.3	Cuantificación del DNA plasmídico.....	35
3.4.3	Estudios de expresión del gen hGH-N.....	36
3.4.3.1	Condiciones del cultivo celular.....	36
3.4.3.2	Mantenimiento del cultivo celular.....	37
3.4.3.3	Transfección de los recombinantes pBI-EGFP-hGH-N y pBIG3i-rtTA-hGH-N.....	37
3.4.3.4	Inducción de la expresión.....	39
3.4.3.5	Cuantificación y normalización de la actividad de $\beta$ -Galactosidasa.....	39
3.4.3.5.1	Cuantificación de proteínas por la técnica de Bradford.....	40
3.4.3.6	Cuantificación de los niveles de expresión de HGh.....	41
IV	RESULTADOS.....	43
4.1	Subclonación de la unidad transcripcional del gen hGH-N en el vector de expresión pBI-EGFP.....	43
4.1.1	Caracterización de los vectores pBI-EGFP y pBShGH-N.....	43
4.1.2	Eliminación del promotor del gen hGH-N en el vector pBShGH-N.....	45
4.1.3	Liberación de la unidad transcripcional del gen hGH-N.....	46
4.1.4	Digestión preparativa del vector de expresión pBI-EGFP.....	47
4.1.4	Ligación de la unidad transcripcional de hGH-N y el vector pBI-EGFP.....	48
4.1.6	Caracterización de clonas pBI-EGFP-hGH-N.....	49
4.1.7	Reinserción del promotor bidireccional regulable por doxiciclina en clonas pBI-EGFP-hGH-N(pro-).....	50
4.2	Construcción del recombinante pBIG3i-rtTA-hGH-N (sistema "tet On" monoplasmídico).....	51
4.2.1	Caracterización del vector de expresión pBIG3i-rtTA.....	52
4.2.2	Obtención de la unidad transcripcional de hGH-N y digestión preparativa del vector pBIG3i-rtTA.....	53

4.2.3	Ligación de la unidad transcripcional del gen hGH-N en el vector pBIG3i-rtTA.y transformación de E coli (cepa TOP10F').....	54
4.2.4	Caracterización de clonas pBIG3i-rtTA-hGH-N.....	54
4.3	Propagación a gran escala y cuantificación de los recombinantes pBI-EGFP-hGH-N y pBIG3i-rtTA-hGH-N.....	55
4.4	Expresión de HGH y $\beta$ -Galactosidasa en células GC .....	56
V	DISCUSIÓN.....	59
VI	CONCLUSIONES.....	63
	REFERENCIAS.....	64

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Digestión preparativa del vector pBShGH-N.....	23
2. Condiciones de ligación del vector pBShGH-N.....	25
3. Condiciones de digestión de la clona pBShGH-N (pro-) con las enzimas <i>Apa I-Sac II</i> .....	26
4. Condiciones de digestión de la clona pBShGH-N (pro-) con las enzimas <i>BamHI-EcoRV</i> .....	26
5. Condiciones de ligación del vector pBI-EGFP y de la unidad transcripcional de hGH-N.....	28
6. Digestión del vector pBI-EGFP y de la clona pBShGH-N(pro-) con <i>Sac II</i> .....	29
7. Ligación del vector pBI-EGFP-hGHN(pro-) y el promotor bidireccional de tetraciclina.....	29
8. Condiciones de digestión del vector pBIG3i-rtTA con <i>BamHI-EcoRV</i> .....	31
9. Ligación del vector pBIG3i-rtTA y la unidad transcripcional de hGH-N.....	31
10. Preparación de la curva de calibración para Cuantificación de HGH por ELISA.....	41
11. Cuantificación de los recombinantes.....	56
12. Actividad de $\beta$ -Galactosidasa y concentración de HGH.....	57
13. Actividad de $\beta$ -Galactosidasa y niveles de expresión de HGH basales.....	57
14. Actividad de $\beta$ -Galactosidasa y niveles de expresión de HGH obtenida con pAVEhGHN.....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación esquemática del complejo multigénico hGH-hPL.....	3
2. Esquema del sistema “tet Off” .....	9
3. Esquema del sistema “tet On” .....	10
4. Estrategia general.....	21
5. Mapa de restricción del vector pBShGH-N.....	22
6. Mapa de restricción de la clona pBShGH-N(pro-).....	25
7. Mapa de restricción del vector pBI-EGFP.....	27
8. Mapa de restricción de la clona pBI-EGFP-hGH(pro-).....	28
9. Mapa de restricción de la clona pBI-EGFP-hGH(pro+).....	30
10. Mapa de restricción del vector pBIG3i-rtTA.....	30
11. Mapa de restricción de la clona pBIG3i-rtTA-hGH-N.....	32
12. Caracterización de los vectores pBI-EGFP y pBShGH-N.....	44
13. Eliminación del promotor de 511 pb del gen hGH-N a partir del vector pBShGH-N.....	45
14. Caracterización de clonas pBShGH-N(pro-).....	46
15. Obtención de la unidad transcripcional del gen hGH-N.....	47
16. Digestión preparativa del vector pBI-EGFP.....	48
17. Ligación de la unidad transcripcional de hGH-N y del vector pBI-EGFP.....	48
18. Caracterización de clonas pBI-EGFP-hGH-N.....	49

19.	Digestión del vector pBI-EGFP y la clona pBI-EGFP-hGHN(pro-)	50
20.	Caracterización de clonas pBI-EGFP-hGHN(pro+)	51
21.	Caracterización del vector pBIG3i-rtTA	52
22.	Digestión preparativa del vector pBIG3i-rtTA y la clona pBShGH-N(pro-)	53
23.	Caracterización de clonas pBIG3i-rtTA-hGH-N	55

## NOMENCLATURA

l	Litros
ng	Nanogramo
µg	Microgramo
pBI	Promotor bidireccional
hGH-N	Gen de la hormona del crecimiento humano
HGH	Hormona del crecimiento humano
TE	Tris-EDTA
M	Molar
h	Hora
°C	Grados centígrados
UV	Ultravioleta
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
U	Unidades
mM	Milimolar
pg	Picogramo
TK	Timidina cinasa
BSA	Albúmina sérica bovina
LB	Medio de Luria Bertani
min	Minuto
g	Gramo

ml	Mililitro
pH	Potencial de Hidrógeno
DMEM	Medio mínimo esencial de Dulbecco's
OPTI-MEM	Medio mínimo esencial - optimo
tet	Tetraciclina
GHF-1	Factor de la hormona del crecimiento 1
hPL	Gen de la hormona del lactógeno placentario humano
hGH-V	Variante del gen de la hormona del crecimiento humano
kDa	Kilodaltons
kb	Kilobases
MBPr	Proteína recombinante de unión a maltosa
lac	Lactosa
IPTG	Isopropil-B-D-Tiogalactósido
MTX	Metotrexate
DHFR	Dihidrofolato reductasa
nM	Nanomoles
tTA	Transactivador de tetraciclina
rtTA	Transactivador reverso de tetraciclina
pb	Pares de bases
TetR	Represor de tetraciclina
HCMV	Citomegalovirus humano
TRE	Elemento de respuesta a tetraciclina
C/EBP $\beta$	Proteína $\beta$ de unión a enhancer/CCAAT



Sp1	Proteína específica 1
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
TAFII55	Factor de 55 kDa de la polimerasa II, asociado a TBP.
TFIIH	Factor de transcripción H de la polimerasa II.
mg	Miligramos
rlu	Unidades relativas de luz.

## RESUMEN

Biol. Hipólito Castillo Ureta

Fecha de Graduación: Noviembre, 2000

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina  
Departamento de Bioquímica

Título del estudio:

**EXPRESIÓN DEL GEN DE LA HORMONA DEL  
CRECIMIENTO (hGH-N) BAJO EL CONTROL  
DE UN PROMOTOR INDUCIBLE CON  
DOXICICLINA EN CÉLULAS HIPOFISIARIAS.**

Número de páginas: 70


Candidato al grado de Maestría en Ciencias con  
Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería  
Genética.


Área de estudio: Biología Molecular

**Propósito y método del estudio:** El gen hGH-N es uno de los miembros mejor caracterizado de una familia de cinco genes conocida como hGH-hPL. Estos genes comparten una similitud de secuencia de aproximadamente un 95%. La HGH se ha producido utilizando diferentes sistemas de expresión basados en bacterias, levaduras o células de mamíferos en cultivo. Todos ellos con la finalidad de producir la proteína a gran escala, pero aun no se ha utilizado un sistema que permita modular finamente su expresión con la finalidad de estudiar su mecanismo de acción en los procesos celulares.

En este trabajo se adaptó un sistema de expresión de HGH, conocido como "tet On" que se enciende o se apaga en presencia de doxíciclina. Se analizaron dos versiones de éste sistema, la versión "tet On" biplasmídica así como una versión monoplasmídica. Ambas versiones se transfectaron en células GC (derivadas de hipófisis de rata) y se indujeron con dosis crecientes de doxíciclina. La concentración de HGH producida se determinó por ELISA.

**Contribuciones y conclusiones:** Se estableció un sistema de expresión de HGH regulable por doxíciclina. Utilizando la dosis máxima de inducción (1000 ng/ml) se logró obtener una concentración de HGH que excede hasta en 7 veces (250 ng/ml) con relación al estado no inducido. Estos valores se incrementaron significativamente conforme se aumentó la dosis del antibiótico. Cuando se compararon las dos versiones del sistema se obtuvieron valores de HGH similares, sin apreciar diferencias significativas. No obstante, la generación de un sistema "tet On" integrado en un solo plásmido facilitó los ensayos de expresión.

  
Dra. Herminia Martínez Rodríguez  
DIRECTOR

  
Dr. Hugo A. Barrera Saldaña  
CO-DIRECTOR