

## **CAPÍTULO I**

### **1. INTRODUCCIÓN**

El reciente desarrollo de sistemas de expresión genética regulados por tetraciclina (tet), aunado al avance en el estudio de secuencias reguladoras que dirigen la expresión de un gen determinado, ha aumentado las herramientas disponibles para el control temporal y tisular de genes exógenos en cultivo de células de mamíferos, plantas y animales transgénicos. Una característica esencial de estos sistemas reguladores es su potencial para controlar la actividad de un gen de manera reversible y temporal, por lo que su uso puede facilitar el análisis de genes cuyos productos de expresión no pueden ser tolerados permanentemente o en ciertas etapas claves del desarrollo.

El principio fundamental de estos sistemas es la capacidad de una pequeña molécula (el inductor), que modifica la actividad de un factor de transcripción, el cual regula a través de un promotor heterólogo la expresión de una unidad transcripcional de interés, como lo es en este estudio la del gen hGH-N.

## 1.1 La familia multigénica hGH-hPL

El gen hGH-N pertenece a la familia multigénica hGH-hPL compuesta por cinco genes agrupados en un segmento de DNA de aproximadamente 50 kb, localizado en el brazo largo del cromosoma 17, entre las bandas q22-q24 (Barrera-Saldaña, 1998, Harper y cols., 1982). Estos genes están organizados en dirección 5' a 3' así: hGH-N (N=Normal), hPL1, hPL2, hGH-V (V=Variante) y hPL3, poseen una misma orientación transcripcional y regiones intergénicas de entre 6 a 13 kb (Chen y cols. 1989). Los cinco genes y sus regiones flanqueantes tienen una secuencia nucleotídica altamente conservada, exhibiendo una similitud de >90 % (Nickel y cols. 1996, Barrera-Saldaña, 1998) (ver fig. 1).

A pesar de su alta similitud, la expresión de cada uno de estos genes es tejido específica, mientras que hGH-N es expresado principalmente en somatotrofos de la pituitaria anterior (Nickel y cols. 1991), hPL1, hPL2 hPL3 y hGH-V son expresados en el sinciciotrofoblasto placentario (Cooke y cols., 1987).

Los niveles de expresión son variables para cada gen. El RNAm de hGH-N constituye cerca del 3% del RNA total en la hipófisis (MacLeod y cols., 1992), mientras que los niveles relativos de los RNAm placentarios son del 1% para hPL2, 0.5% para hPL3, 0.01% para hPL1 y 0.001% para hGH-V (Natchigal y cols., 1993).

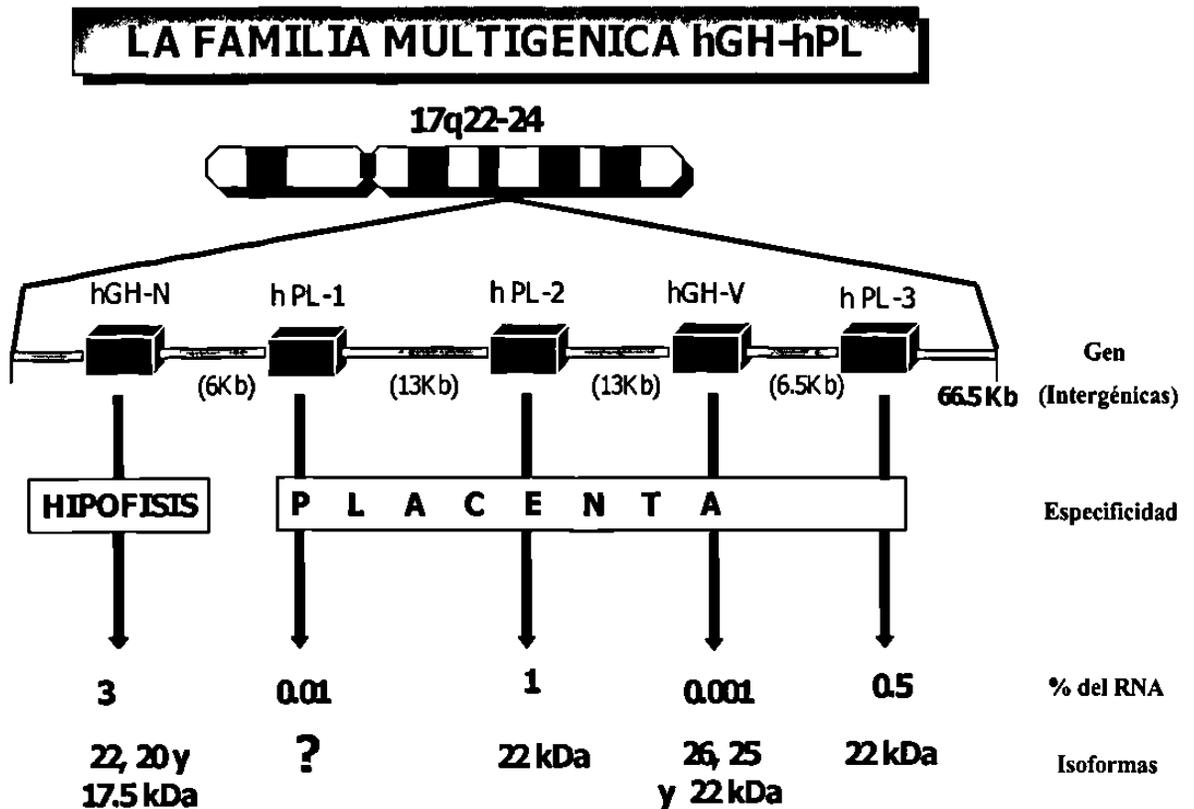


Figura 1. El complejo multigénico hGH-hPL. Se indica su localización en el cromosoma 17, la organización de los genes que lo constituyen (rectángulos oscuros), el tamaño de las regiones intergénicas (paréntesis), el tejido en que se expresan, los niveles de expresión de los transcritos así como las isoformas de las proteínas generadas por cada gen.

### 1.1.2 Características del gen hGH-N y su regulación.

El gen hGH-N tiene 1.65 kb de longitud (Cooke y cols., 1988) y su unidad transcripcional, al igual que la del resto de los genes del complejo hGH-hPL, está constituida por 5 exones (de 71, 161, 120, 165, y 198 pb) separados por 4 intrones (de 260, 209, 92 y 252 pb, respectivamente). Posee en su primer y último exones secuencias no traducibles de 62 y 105 nucleótidos, respectivamente (Chen y cols., 1989, Frankenne y cols., 1990).

Su expresión se lleva a cabo principalmente en los somatotrofos de la pituitaria anterior, aunque también se ha detectado a bajos niveles en diferentes tejidos tales como células hematopoyéticas y linfoides (Paladín y cols., 1982), así como en ovarios (Schwazeler y cols., 1997) y testículos (Untergasser y cols., 1997). La expresión en pituitaria es conferida en parte por el factor transcripcional específico de pituitaria Pit-1 o GHF-1, el cual se une a dos sitios en el promotor, uno proximal (-92 a -65) y uno distal (-130 a -105) (Lemaigre y cols., 1990). Algunos factores de transcripción generales se unen también al promotor de hGH, como Sp1 que lo hace en la región de -131 a -140 adyacente al sitio distal de Pit-1 (Peritz y cols., 1988, Lemaigre y cols., 1989), USF-1 en la posición de -267 pb a -290 pb; mientras que los factores de transcripción NF-1 y AP-2 compiten por el sitio de unión localizado en -267 pb a -290 pb (Courtois y cols. 1990). También se localizan sitios de unión para algunos factores inducibles cuya actividad y concentración es regulable por señales extracelulares. Entre estos factores se encuentran la proteína CREB (regulable por fosforilación tras una cascada de señales inducidas por variaciones intracelulares de AMPc) y los receptores nucleares de hormonas no proteicas, como es el caso de glucocorticoides, T3 y ácido retinoico (Castrillo y cols. 1998)

### **1.1.3 Proteínas derivadas de la expresión del gen hGH-N.**

Por un procesamiento alternativo del transcrito primario del gen hGH-N se generan tres especies de RNA mensajero que codifican para tres isoformas (Wallis 1980, Lecomte y cols., 1987), la principal proteína activa de HGH de 22 kDa constituye entre

un 80 a un 90% de la HGH total, mientras que aproximadamente un 10% corresponde a la isoforma de 20 kDa, la cual posee una delección de 15 aminoácidos con respecto a la de 22 kDa (De Noto y cols., 1981), y una tercera isoforma, de 17.5 kDa, carece de 40 aminoácidos debido a la omisión del exón 3 (Walker y cols., 1986). Además, se han detectado otras formas de HGH como la HGH de 80 kDa generada por la asociación de la HGH de 22 kDa con una proteína de transporte (Chawla y cols., 1983), la HGH de 45 kDa, que es un dímero de la de 22 kDa (Benveniste y cols., 1975) y la HGH de 24 kDa, considerada como una prehormona debido a que conserva el péptido señal (Lewis y cols., 1980).

#### **1.1.4 Estructura y función de la hormona del crecimiento**

La hormona del crecimiento (GH), llamada también somatotropina (SH), es una pequeña molécula proteica de cadena única que contiene 191 aminoácidos (Lewis y cols. 1978) y presenta dos puentes disulfuro en su estructura (Murria y cols., 1997).

De manera general, las GHs están formadas por cuatro hélices antiparalelas en donde uno de los enlaces disulfuro conecta a la hélice 1 con el extremo carboxilo terminal de la proteína y el segundo enlace conecta a la hélice 1 con la 4, lo que da la estructura tridimensional característica de las GHs (Watahiki y cols., 1989).

La proteína posee también un péptido señal o líder de aproximadamente 26 aminoácidos que es utilizado para dirigir el transporte de la pre-hormona a través de la membrana hacia la luz del retículo endoplásmico en donde es removido, generándose la proteína madura funcional (Paladín y cols., 1982).

La HGH es secretada de una manera episódica al torrente sanguíneo y su vida media es de 20 a 30 minutos (Thompson y cols., 1972). Esta hormona está involucrada en procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento y morfogénesis (Goffin y cols., 1996), *in physio* ejerce una amplia variedad de efectos, algunos de ellos indirectos y otros directos (Juárez y cols., 1995). Algunos de los indirectos, como la estimulación del crecimiento y de la proliferación celular están mediados a través de las somatomedinas (Castro, F. y cols., 1999, Rotwein y cols., 1991).

## **1.2 Síntesis de la hormona del crecimiento humano (HGH) en diferentes sistemas de regulación.**

El gen hGH-N ha sido expresado bajo la regulación de diferentes sistemas, como ejemplo se tiene a Goeddel y colaboradores que en 1979 sintetizaron por primera vez la HGHr bajo el control del promotor lac (lactosa) en *Escherichia coli*.

Particularmente, en nuestra Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (U.L.I.E.G) del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N L., se llevó a cabo la producción de HGHr fusionada a la proteína de unión a maltosa (HGH-MBPr). Para ello se construyó el plásmido pMALchGH22K, el cual se introdujo en la cepa TBI de *Escherichia coli*. La biosíntesis fue inducida con un análogo de la lactosa, el IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-Tiogalactósido), que desreprime al promotor tac (promotor híbrido formado por secuencias nucleótídicas del operón del triptófano y de la lactosa) y permite que la transcripción se lleve a cabo (Martínez y cols. 1992).

La HGHr se ha expresado también en levaduras metilotróficas como *Pichia pastoris*. Para esto se construyó el vector de expresión pPIC9hGH22K en donde el “cassette” expresor de la HGH está regulado por el promotor de la alcohol oxidasa, que se enciende en presencia de metanol. La transformación de las células permitió la integración del vector en el genoma de la levadura, la síntesis de la hormona fue inducida adicionando metanol y se logró obtener una concentración de HGHr de 12.3 mg/l a nivel de matraz (Escamilla y cols., 1996).

Adicionalmente se ha logrado la obtención de líneas celulares estables productoras de las isoformas de 20 y 22 kDa de HGH mediante el sistema de amplificación con metotrexate (CHO/MTX/DHFR) con una producción que oscila entre 1-2 µg para HGH 22 kDa y valores 10 veces menores para HGH 20 kDa, con dosis de 250 nM de metotrexate (Ortiz y cols., 1992).

### 1.2.1 Otros sistemas de expresión

Además de los sistemas en los que se ha expresado a la HGH, existen otros cuyo potencial está siendo estudiado; entre éstos se tiene a los sistemas inducibles por iones de metales pesados (Mayo y cols., 1982), hormonas esteroideas (Lee y cols., 1988), proteínas de choque térmico y por antibióticos, destacando entre estos últimos el sistema de expresión regulable por tetraciclina o derivados de la misma (doxiciclina) (Sturtz y cols., 1998). Este sistema existe en dos versiones: el sistema “tet Off” o de apagado y el sistema “tet On” o de encendido (Gossen y cols., 1995).

### **1.3 Características generales de los sistemas inducibles por tetraciclina.**

Estos sistemas deben poseer al menos tres características: 1) selectividad, es decir, que no respondan a activadores endógenos, 2) eficiencia, o que exhiba bajos niveles de expresión basales sin inducción y genere altos niveles de expresión en el estado inducido, el cual pueda ser revertido rápidamente, 3) dependencia por la dosis del inductor, permitiendo así modular los niveles de expresión de un gen en el sistema de expresión (Rossi y cols., 1998, Saez y cols., 1997).

El sistema regulable por tetraciclina está constituido por dos componentes centrales, factores transcripcionales híbridos que interactúan con elementos reguladores *cis* de bacterias y antibióticos que modulan la unión de éstos factores a DNA a dosis bajas no tóxicas (Shocket y cols., 1996). Básicamente este sistema tiene dos modalidades, uno en que la presencia de tetraciclina apaga la expresión del gen de interés llamada “tet Off” y otra en la que el antibiótico enciende la expresión del gen, llamada “tet On”.

#### **1.3.1 Características del sistema “tet Off”**

El sistema “tet Off” construido por Gossen y colaboradores en 1994, está constituido por varios elementos distribuidos en dos plásmidos: uno de éstos integra al gen que codifica para un factor transcripcional híbrido (transactivador tTA) bajo la regulación del promotor del Citomegalovirus humano y el otro contiene al gen de interés a expresar, bajo la regulación de un promotor mínimo del Citomegalovirus humano en

combinación con una secuencia TRE (elemento de respuesta a tetraciclina) (Schultze y cols., 1996). En ausencia de tetraciclina o doxiciclina el sistema está encendido, permitiendo que la transcripción del gen de interés se lleve a cabo y se apaga solamente cuando se adiciona el antibiótico (Gossen y cols., 1994) (ver fig 2).

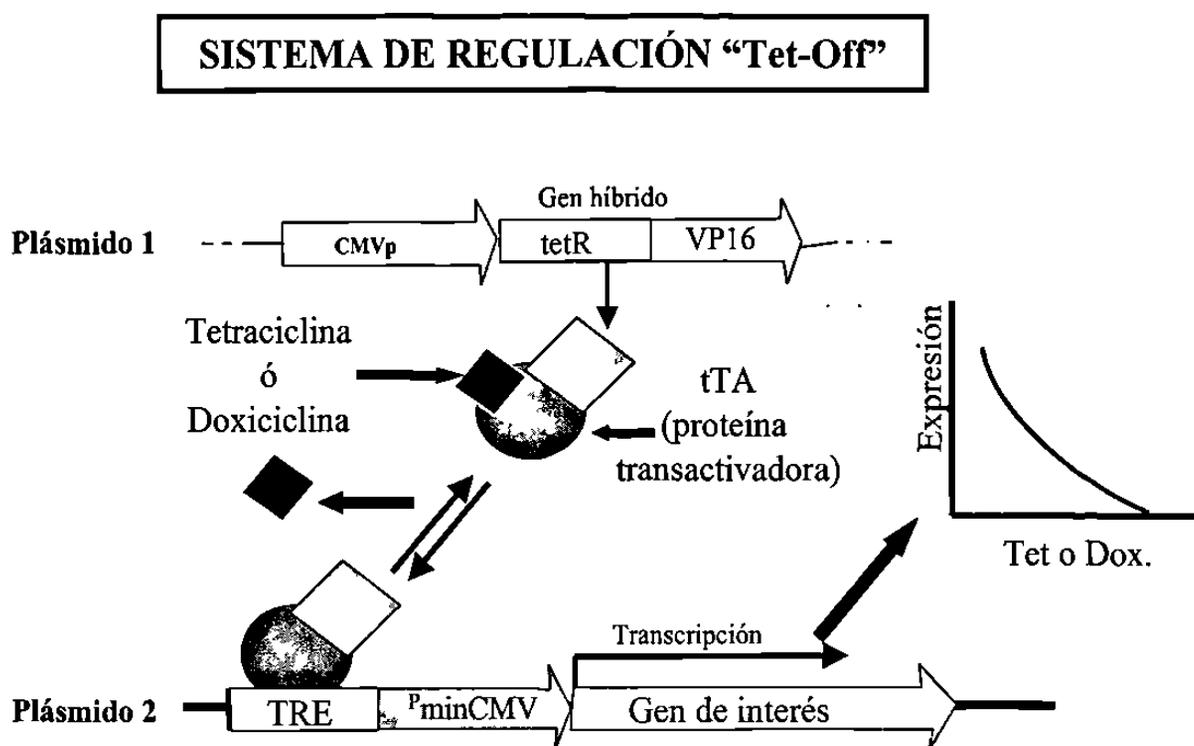


Figura 2. Componentes del sistema de expresión regulado por tetraciclina “tet Off”. El sistema está basado en un factor transcripcional híbrido (transactivador) compuesto por el dominio transactivador de la proteína VP16 del virus del *Herpes simplex* y el dominio de unión a DNA del represor del operón de resistencia a tetraciclina (tetR). Este transactivador es activo en ausencia de tetraciclina, por lo que al unirse a un promotor híbrido formado por una secuencia TRE (Elemento de Respuesta a Tetraciclina) en combinación con el promotor mínimo del Citomegalovirus humano (P<sub>min</sub>CMV), enciende la transcripción del gen de interés.

### 1.3.2 Características del sistema “tet On”.

Recientemente mediante procedimientos de mutagénesis se logró diseñar un sistema inducible por doxiciclina que regula a la inversa del sistema “tet Off”. La

proteína transactivadora (rtTA) depende de doxiciclina para transactivar el gen de interés. Este transactivador presenta un cambio de cuatro aminoácidos en el dominio del represor tet (Glu 71 Lys, Asp 95 Asn, Leu 101 Ser y Gly 102 Asp); ninguno de estos cuatro aminoácidos entran en contacto con el antibiótico tanto en el transactivador de tipo silvestre como en el mutado, pero se cree que están involucrados en el cambio conformacional de la proteína durante la represión o inducción (Gossen y cols., 1995) (ver fig 3).

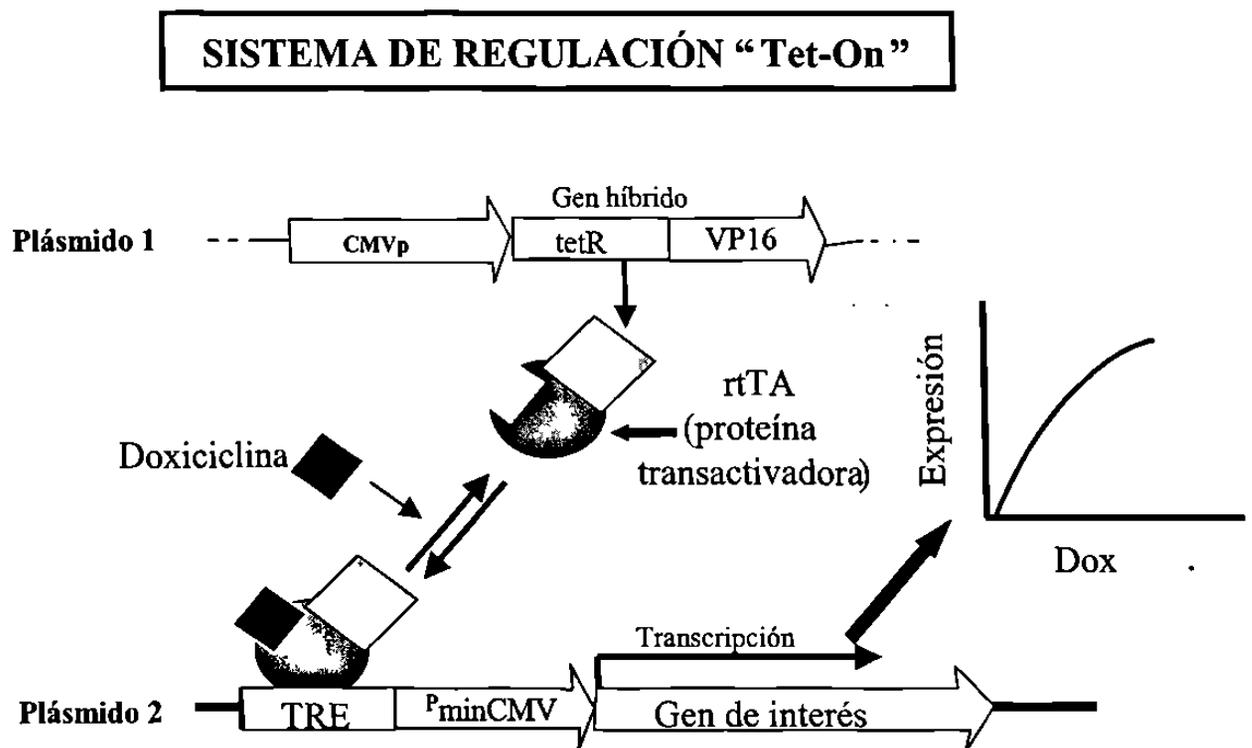


Figura 3. Versión del sistema de expresión regulado por doxiciclina que funciona en sentido inverso con respecto al sistema “tet Off”. Debido al cambio de 4 aminoácidos, la proteína transactivadora se activa cuando se adiciona doxiciclina, encendiendo la transcripción del gen de interés y se apaga cuando se elimina el antibiótico.

### 1.3.3 Estudios de regulación del sistema “tet Off”.

Con la finalidad de generar sistemas de expresión para estudios de regulación genética inducibles con tetraciclina y evitar procesos de transfección de dos plásmidos,

diversos investigadores se han enfocado a establecer líneas celulares como B3.2 derivadas de *Xenopus*, así como humanas (HeLa), que expresan establemente el transactivador tTA (Camacho y cols., 1998).

Aunado a esto se ha probado la especificidad de acción del transactivador en diferentes líneas celulares (HTC de hepatoma de rata, T47D derivada de cáncer de seno humano y SK-N-BE de un neuroblastoma humano) (Magalani y cols., 1995), encontrándose diferencias significativas en la respuesta del sistema de expresión de tetraciclina dependiendo del tipo celular (Howe y cols., 1995).

También se han hecho comparaciones de la actividad basal del promotor mínimo hCMV, en respuesta al transactivador tTA con el gen reportero luciferasa en varias líneas celulares, entre ellas HeLa, BHK (riñón de hámster), Vero y PC12; se observó que el promotor tetO/hCMV IE presentaba niveles de actividad transcripcional basal de hasta 270 veces en células Vero o BHK en comparación a la presentada en células HeLa o PC12 (Ackland-Berlung y cols., 1995).

Ya que las propiedades reguladoras del sistema de expresión modulado por doxiciclina dependen críticamente de la línea celular y del promotor mínimo usado para la expresión, la explotación completa del sistema, ocasionalmente requiere modificaciones de elementos individuales como por ejemplo la expresión de señales para el transactivador, la naturaleza de su dominio de activación y las secuencias utilizadas en el promotor mínimo (Gossen y cols., 1995).

### **1.3.3.1 Expresión de proteínas de interés bajo la regulación del sistema “tet Off”**

Entre algunas proteínas expresadas bajo el control del sistema inducible con tetraciclina están los factores de transcripción basal humanos TBP, TAF<sub>1155</sub> y la subunidad p62 de TFIID en clonas derivadas de la línea celular HeLa (Yuang y cols., 1996), adicionalmente, el receptor D3 de la dopamina y el del glutamato (GluR6) se han expresado en células GH3 y HEK 293, respectivamente (Howe y cols., 1995); todas ellas produciendo constitutivamente el transactivador tTA.

Además, se han generado ratones transgénicos que expresan el transactivador tTA, el cual a su vez regula la expresión de genes tales como el gen *Id1* implicado en el control de la diferenciación del músculo cardíaco (ratones tet-*Id1*) (Fishman y cols., 1994) y el gen reportero de la luciferasa (Furth y cols., 1994).

Recientemente se ha expresado el gen de la hormona del crecimiento humano (hGH-N) con este sistema, en donde se han reportado niveles de expresión de HGH de aproximadamente 100 ng/ml por 24 h en ausencia de tetraciclina, los cuales se disminuyen a 0.0 ng/ml de acuerdo al límite de detección del método utilizado (kit de ELISA, GIBCO-BRL) cuando se adiciona tetraciclina a una concentración de 0.1 µg/ml (Sturtz y cols 1998).

### **1.3.3.2 Estudios de expresión realizados con el sistema “tet On”**

Entre algunos estudios genéticos en los que se ha utilizado el sistema “tet On”, se tiene la expresión del gen de luciferasa en una línea celular de HeLa que expresa

establemente al transactivador rtTA. Para esto fue transfectado el plásmido pUCHC13-3 y utilizando diferentes dosis de doxiciclina, se determinó que concentraciones de 1000 ng/ml y 20 h de inducción, fueron suficientes para que el sistema llegara a un nivel de saturación (Gossen y col., 1995). Este sistema también se ha utilizado en la expresión del gen de la proteína verde fluorescente en oligodendrocitos de rata, en donde el gen que codifica para el transactivador rtTA fue puesto bajo la regulación del promotor del gen de la proteína básica de la mielina con la finalidad de obtener expresión tejido específica (Huang y cols., 1999).

Dadas las ventajas que representa para nuestra línea de investigación contar con un sistema inducible que regule la expresión del gen hGH-N, tanto *in vivo* como *in vitro*, nos propusimos utilizar el sistema “tet On” para expresar el gen hGH-N en cultivo de células derivadas de hipófisis. Seleccionamos el sistema “tet On” ya que no es necesario que el sistema tenga antibiótico permanentemente, permitiéndonos así modular los niveles de expresión de HGH en el medio de cultivo con la adición o eliminación de la doxiciclina.

A la fecha hay reportes de la expresión del gen hGH-N en el sistema “tet Off” (Sturtz y cols., 1998) pero no los hay en el sistema “tet On”, por lo que los resultados derivados de este trabajo son los primeros en obtenerse bajo este sistema.

establemente al transactivador rtTA. Para esto fue transfectado el plásmido pUCHC13-3 y utilizando diferentes dosis de doxiciclina, se determinó que concentraciones de 1000 ng/ml y 20 h de inducción, fueron suficientes para que el sistema llegara a un nivel de saturación (Gossen y col., 1995). Este sistema también se ha utilizado en la expresión del gen de la proteína verde fluorescente en oligodendrocitos de rata, en donde el gen que codifica para el transactivador rtTA fue puesto bajo la regulación del promotor del gen de la proteína básica de la mielina con la finalidad de obtener expresión tejido específica (Huang y cols., 1999).

Dadas las ventajas que representa para nuestra línea de investigación contar con un sistema inducible que regule la expresión del gen hGH-N, tanto *in vivo* como *in vitro*, nos propusimos utilizar el sistema “tet On” para expresar el gen hGH-N en cultivo de células derivadas de hipófisis. Seleccionamos el sistema “tet On” ya que no es necesario que el sistema tenga antibiótico permanentemente, permitiéndonos así modular los niveles de expresión de HGH en el medio de cultivo con la adición o eliminación de la doxiciclina.

A la fecha hay reportes de la expresión del gen hGH-N en el sistema “tet Off” (Sturtz y cols., 1998) pero no los hay en el sistema “tet On”, por lo que los resultados derivados de este trabajo son los primeros en obtenerse bajo este sistema.

#### **1.4 Justificación:**

La expresión del gen hGH-N mediante un sistema regulable con doxiciclina, en células de hipófisis, permitió obtener un modelo de estudio para la expresión tanto espacial como temporal de genes heterólogos.

## **CAPÍTULO II**

### **OBJETIVOS**

#### **2.1 Objetivo general**

Estudiar la expresión del gen de la hormona del crecimiento humano (hGH-N) en un sistema "tet On".

#### **2.2 Objetivos específicos**

- 1.-Construir un vector que incluya la unidad transcripcional del gen de la hormona del crecimiento (hGH-N) bajo el efecto de secuencias regulables por el inductor doxiciclina.
- 2.-Integrar en un vector las unidades transcripcionales de los genes de la hormona del crecimiento y de la proteína transactivadora bajo la influencia de un promotor bidireccional regulado por doxiciclina (sistema "tet On" monoplasmídico).

- 3.-Introducir por transfección el recombinante obtenido, en una línea celular derivada de hipófisis de rata.
  
- 4.-Determinar los niveles de expresión del gen de la hormona del crecimiento por ELISA en función de la concentración del inductor en el medio de cultivo.
  
- 5.-Evaluar las diferencias en la expresión de HGH cuando se cotransfectan los vectores que incluyen las unidades transcripcionales del gen hGH y transactivador respectivamente (sistema “tet On” biplasmídico), versus la transfección del vector que incluye a ambas secuencias (sistema “tet On” monoplasmídico).

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Origen de los reactivos

Los siguientes reactivos y materiales fueron adquiridos de las casas comerciales que se mencionan a continuación:

- Las endonucleasas de restricción de New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, EUA) y Gibco-BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, EUA). Se utilizaron en cada caso las condiciones recomendadas por el fabricante.
- Las cajas de plástico para cultivo celular de Falcon (Lincon Park, NJ, EUA).
- El suero bovino de Hyclone, Inc. (Logan UT, EUA)
- La tripsina de DIFCO Laboratories (Detroit, MI, EUA).
- Fenol, DNAsa, Etanol, Isopropanol, así como la mayoría de los reactivos inorgánicos de SIGMA-Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
- Cloroformo de MERCK<sup>R</sup> (EM SCIENC, Gibbstown, NJ, EUA).
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml. de CELL Associates, Inc (Houston TX.)
- Tubos Eppendorf de 0.5, 1.5 y 2.0 ml. así como puntillas de BIOMOL, SA de CV, Mex.

- Medio DMEM, OPTIMEM Liofectamina y reactivo plus de Gibco-BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, EUA)
- Kit de ELISA para HGH (Cat. # 1585878) y CPRG (Rojo de Clorofenol B-D-Galactopiranosido) de Boehringer-Mannheim (GmbH, Germany)

### **3.2 Origen del material biológico:**

- La línea celular GC derivada de pituitaria de rata y el plásmido pBI-EGFP en el cual se subclonó la unidad transcripcional del gen hGH-N fueron donados por el Dr. José Luis Castrillo del Centro Universitario "Severo Ochoa" de Madrid España.
- La cepas bacterianas TOP 10 F ' y XL1-Blue fueron obtenidas del cepario del Departamento de Bioquímica en la ULIEG.
- El plásmido pBS-hGH-N del cual se obtuvo la unidad transcripcional del gen hGH-N fue obtenido de la plasmidoteca de la ULIEG.
- Los plásmidos pBIG2i-rtTA y pBIG3i-rtTA, los cuales contienen la unidad transcripcional de la proteína transactivadora (rtTA) fueron donados por el Dr. Craig A. Strathdee, del Instituto de Investigación John P. Robarts, London, Ontario, Canadá.

### **3.3 Equipo:**

Entre el equipo utilizado se encuentra un horno de microondas Goldstar modelo MA-857M, Microcentrifugas Eppendorf modelos 5402 y 5415, una fuente de poder Gibco BRL, modelo 250, una campana de flujo laminar marca Labconco Corporation (Kansas, City, MO, EUA). Una balanza digital Sartorius modelo 1206 MP, (Camibh

Göttingen, Alemania), una balanza analítica OHAUS modelo AP1105 (Florham Park, Suiza), micropipetas de Gilson de Raining Instruments Co, Inc (Emeryville, CA, EUA), un agitador G10 marca New Bussines Scientific Co., Inc. (Edison, NJ, EUA), jeringas y agujas Becton Dickinson & Co. (Rutherford, NJ, EUA), láminas de bisturí Becton Dickinson (Juiz de la Fiora, MG, Brasil), un potenciómetro Beckman  $\Phi$  320, un equipo de video-computadora marca BioRad, modelo GelDoc 1000 (Hércules, CA, EUA), un microscopio invertido marca Karl Zeiss, ultracentrífuga TLX 120 de Beckman Instruments, Inc.

El procesamiento de datos se realizó en computadoras marca Macintosh modelo Cassic II y COMPAQ, PRESARIO, MV500. Se empleó el procesador de textos Microsoft Word versión 1997, procesadores de gráficos Microsoft Power Point versión 1997 Adobe Photoshop Limited Edition 2.5.1(1989-1993 Adobe Systems Inc.) y Molecular Analyst versión 1.5 de Biorad Laboratories (Hércules, CA, EUA)

En la realización de los análisis de secuencias genéticas se usó el programa DNA Strider <sup>TM</sup> 1.1(©Ch Marck and CEA, 1989, Service de Biochimie-Départament de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-Francia). Para la búsqueda de información se empleó el servicio vía internet.

### 3.4 Métodos

Este trabajo se realizó en dos etapas que se describen a continuación: 1) Construcción y caracterización de los recombinantes requeridos para este estudio y 2) Análisis de la expresión de los mismos en un modelo de cultivo celular *in vitro*.

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados se llevó a cabo la estrategia general mostrada en la figura 4 en la que resaltan los siguientes puntos:

- 1.-Obtención de la unidad transcripcional del gen hGH-N a partir del vector de expresión pBShGH-N mediante digestión con endonucleasas de restricción.
- 2.-Introducción de la unidad transcripcional del gen hGH-N en el vector pBI-EGFP bajo el control de un promotor bidireccional regulable por doxiciclina.
- 3.-Construcción del vector con los genes del transactivador y hGH bajo el control del promotor bidireccional regulable por doxiciclina.
- 4.-Obtención y caracterización de clonas transformadas con los vectores pBI-EGFP-hGHN y pBIG3i-rtTA-hGHN.
- 5.-Obtención de DNA de alta calidad y cantidad para los ensayos de expresión.
- 6.-Transfección de la línea celular GC (derivada de hipófisis de rata) con los vectores pBI-EGFP-hGHN y pBIG3i-rtTA-hGHN por lipofección.
- 7.-Análisis de la expresión de HGh mediante ELISA.
- 8.-Determinación de la eficiencia de transfección por actividad de  $\beta$ -Galactosidasa.

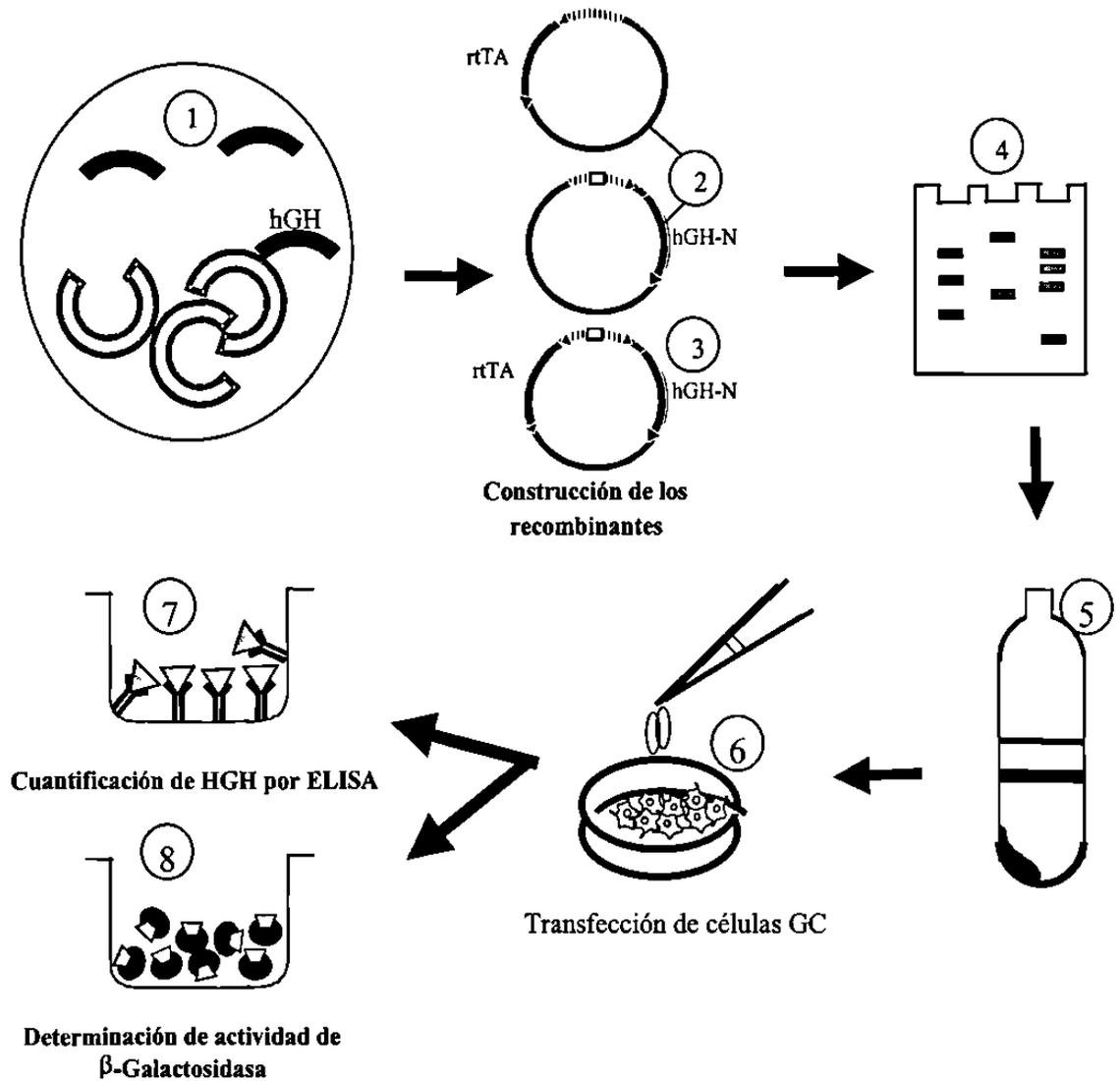


Figura 4. Estrategia general del proyecto. Los números indican cada uno de los puntos descritos anteriormente.

### 3.4.1 Subclonación de la unidad transcripcional del gen hGH-N en los vectores de expresión pBI-EGFP y pBIG3i-rtTA.

La unidad transcripcional del gen hGH-N fué obtenida del vector de expresión para células eucariotas pBShGH-N, construído anteriormente en el laboratorio.

### 3.4.1.1 Eliminación del promotor de 511 pb y obtención del gen hGH-N a partir del vector pBShGH-N.

Basado en el análisis de restricción de la secuencia correspondiente a este vector, generado en el programa DNA Strider 1.1, se identificaron sitios de restricción únicos para las enzimas *Apa I*, *Sac II*, *EcoRV* y dos sitios para la enzima *BamHI* los cuales flanquean a la unidad transcripcional en conjunto con su promotor natural de 511 pb (ver fig. 5).

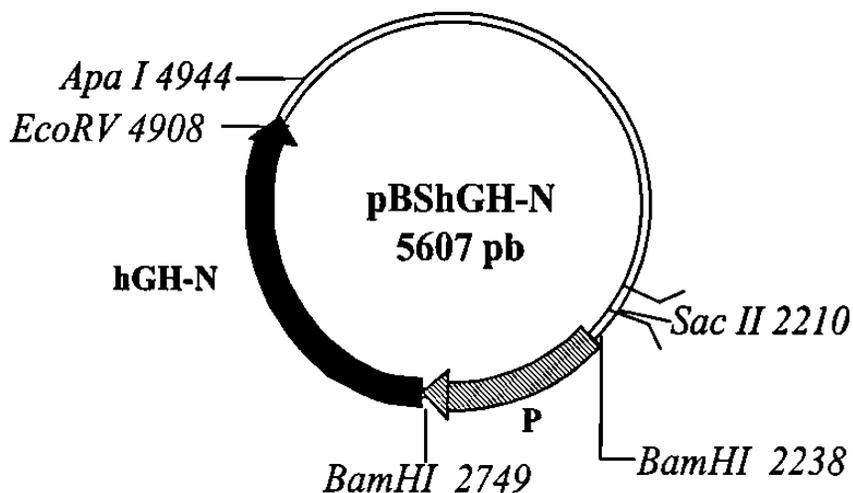


Figura 5. Esquema del vector pBShGH-N con la ubicación de los diferentes sitios de restricción para las enzimas *Apa I*, *Sac II*, *EcoRV* y *BamHI*. P (promotor), hGH-N (Unidad transcripcional del gen hGH-N).

Para obtener la unidad transcripcional del gen hGH-N fué necesario eliminar el promotor natural de 511 pb del gen hGH-N, lo que se realizó mediante una digestión preparativa del vector pBShGH-N con la enzima *BamHI*. La mezcla de reacción se muestra en la tabla I.

Tabla 1. Digestión preparativa del plásmido pBShGH-N con la enzima *Bam*HI

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
PBShGH-N ( $\sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	3.0
Buffer NEB #3 (10X)	6.0
BSA (100X)	3.0
BamHI (10 U/ $\mu$ l)	3.0
Agua MilliQ	45.0

La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 12 h con la finalidad de obtener una digestión enzimática total. Para corroborar el corte de la enzima se sometieron 3  $\mu$ l de la mezcla de reacción a corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% y posteriormente se analizó en el sistema GelDoc BIORAD.

**3.4.1.1.1 Purificación del vector pBShGH-N por el método de fibra de vidrio.** Los productos de la digestión se separaron en un gel preparativo de agarosa al 1%, utilizando para ello 50  $\mu$ l del DNA digerido (aprox. 2.5  $\mu$ g de DNA). La muestra se resolvió por electroforesis con buffer TBE a voltaje constante de 100 V. Una vez que el colorante (xilencianol) migró 3/4 partes del largo total del gel, se detuvo la electroforesis, se transfirió con cuidado el gel a un recipiente con solución de bromuro de etidio a una concentración de 2  $\mu$ g/ml por un tiempo de 5 min.

Una vez identificada la banda que correspondía al vector, mediante el sistema de análisis GelDoc se cortó con una hoja de bisturí, el fragmento de agarosa se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml para su posterior purificación por el método de fibra de vidrio, el cual se describe a continuación:

A un tubo Eppendorf de 0.5 ml se le realizó un orificio pequeño en su parte inferior mediante el empleo de una aguja, posteriormente se introdujo fibra de vidrio

siliconizada empaquetando una cuarta parte del interior del tubo. El fragmento de agarosa obtenido, fue cortado en pequeños trozos (grosor de 1-2 mm) y se colocó dentro del tubo. El tubo de 0.5 ml se puso dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se sometió a centrifugación por 10 min a una velocidad de 14,000 rpm. Se obtuvo el complejo DNA-agarosa contenido en el tubo de 1.5 ml y se realizó una extracción con medio volumen de Fenol-Sevag. La mezcla se agitó fuertemente por inversión, se obtuvo el sobrenadante (fase superior) y se le adicionaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto y un 10% de Acetato de Sodio 3M con la finalidad de aumentar la precipitación del DNA.

El tubo se incubó a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 3 h, los flóculos formados (DNA plasmídico) se empastillaron por centrifugación a 14,000 rpm por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se desechó el alcohol y se lavó la pastilla con una solución de etanol al 70% y se centrifugó de nuevo bajo las condiciones ya descritas.

La pastilla obtenida se secó en un evaporador centrífugo (SAVANT) por 1h y se resuspendió en 20  $\mu\text{l}$  de solución TE (Tris-EDTA pH 8). Se evaluó su pureza y calidad por absorción de luz UV a una longitud de onda de 260 y 280 nm.

**3.4.1.1.2 Ligación del vector pBShGH-N.** Se montó una reacción de ligación con el DNA purificado (ver tabla 2) y se incubó a  $16^{\circ}\text{C}$  por 12 h. Para corroborar la ligación del vector pBShGH-N(pro-) se sometieron 5  $\mu\text{l}$  de la reacción a corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1%. Terminado el tiempo de corrimiento, el gel se tiñó en solución de bromuro de etidio y se visualizó en el sistema de análisis GelDoc.

Tabla 2. Condiciones de ligación del vector pBShGH-N previamente digerido con la enzima *Bam*HI.

Reactivos	Volúmenes de reacción (μl)
Vector pBShGH-N ( <i>Bam</i> HI) (~586 ng)	5.0
Buffer para ligasa 5X	2.0
T4 DNA Ligasa NEB (1 U/μl)	2.0
Agua MilliQ	11.0

El producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias *E coli* XL1-Blue, las clonas candidatas fueron propagadas a pequeña escala con la finalidad de obtener suficiente DNA plasmídico para llevar a cabo su caracterización.

**3.4.1.1.3 Caracterización de la clona pBShGH-N(pro-).** Se llevó a cabo la caracterización de las clonas pBShGH-N(pro-) al digerirlas con la enzima *Bam*HI que tiene un sitio único de restricción, lo que permitió visualizar mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% la linearización y por lo tanto la identificación de las clonas positivas (ver fig. 6).

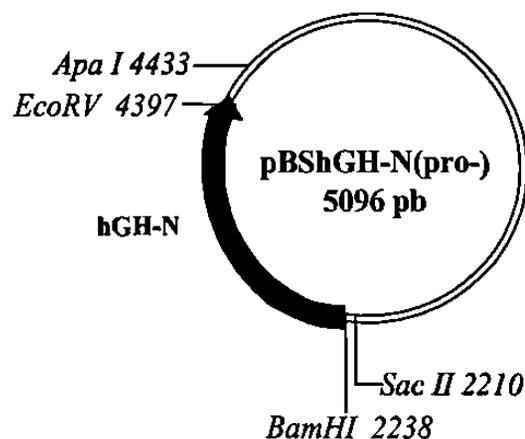


Figura 6. Mapa de restricción de la clona pBShGH(pro-). La eliminación del promotor de 511 pb con la enzima *Bam*HI permite ganar el sitio de restricción para la enzima *Sac* II y a la vez se obtiene un sitio único para la enzima *Bam*HI.

**3.4.1.1.4 Liberación de la unidad transcripcional del gen hGH-N.** Para obtener la unidad transcripcional del gen hGH-N a partir de una de las clonas pBShGH-N(pro-), se montaron por separado dos reacciones de digestión, en una de ellas se utilizó a las enzimas *Apa I-Sac II* y en la otra a las enzimas *BamHI-EcoRV* bajo condiciones de 37°C y 12 h de incubación (ver tablas 3 y 4). Estos mismos sitios de restricción permitieron subclonarla en el vector de expresión pBI-EGFP y pBIG3i-rfTA, respectivamente, quedando bajo la regulación de un promotor inducible por doxiciclina.

Tabla 3. Condiciones de la reacción de digestión de la clona pBShGH-N(pro-) con las enzimas *Apa I-Sac II*.

Reactivo	Volumen de reacción (μl)
Clona pBShGH-N(pro) (~1 μg/μl)	3.0
Buffer NEB #4 (10 X)	6.0
BSA (100 X)	3.0
Enzima <i>Apa I</i> (10 U/μl)	3.0
Enzima <i>Sac II</i> (10 U/μl)	3.0
Agua MilliQ	42.0

NOTA: primero se digirió con *Apa I* a 25°C y después se adicionó *Sac II*, la reacción se llevó a cabo a 37°C.

Tabla 4. Condiciones de la reacción de digestión de la clona pBShGH-N(pro-) con las enzimas *BamHI-EcoRV*.

Reactivo	Volumen de reacción (μl)
Clona pBShGH-N(pro) (~1 μg/μl)	3.0
Buffer NEB #3 (10 X)	6.0
BSA NEB (100 X)	3.0
Enzima <i>BamHI</i> (10 U/μl)	3.0
Enzima <i>EcoRV</i> (10 U/μl)	3.0
Agua MilliQ	42.0

Los productos de la digestión fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizados en el Gel-Doc, el tamaño del fragmento esperado fue corroborado mediante un marcador de alto peso molecular (DNA λ digerido con la enzima *Pst I*).

### 3.4.1.2 Construcción del recombinante pBI-EGFP-hGH-N

La estrategia de subclonación se llevó a cabo en tres etapas debido a la presencia de tres sitios de restricción para la endonucleasa *Sac* II en el vector de expresión pBI-EGFP, dos sitios que flanquean al promotor bidireccional de tetraciclina y un tercer sitio ubicado en el sitio múltiple de clonación en el extremo 5' de la unidad transcripcional de la proteína verde fluorescente (ver fig. 7).

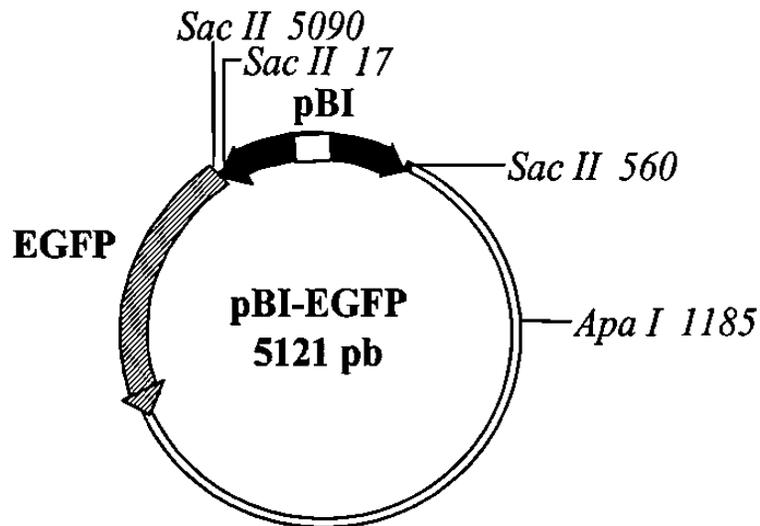


Figura 7. Mapa de restricción del vector de expresión pBI-EGFP. En este se muestran los sitios de restricción de interés (*Sac* II y *Apa* I).

**3.4.1.2.1 Digestión y ligación del vector de expresión pBI-EGFP.** En esta etapa fue digerido el vector pBI-EGFP parcialmente con las enzimas *Sac* II+*Apa* I, buscando no afectar el promotor bidireccional (ver fig. 7). Una vez digerido bajo las mismas condiciones indicadas en la tabla 3, purificado y cuantificado, se puso en contacto mediante una reacción de ligación (ver tabla 5) con la unidad transcripcional del gen

hGH-N, previamente obtenida a partir de la clona pBShGH-N(pro-) con las enzimas *Sac* II+*Apa* I.

Tabla 5. Condiciones de la reacción de ligación del vector pBI-EGFP y el inserto de hGH-N previamente digeridos con las enzimas *Sac* II y *Apa* I.

Reactivos	Volumen de reacción (μl)
Inserto (gen hGH-N) <i>Sac</i> II- <i>Apa</i> I (~541 ng)	7.0
Vector - <i>Sac</i> II- <i>Apa</i> I (~659 ng)	3.0
Buffer para ligasa (5X)	2.0
T4 DNA Ligasa (1 U/μl)	2.0
Agua MilliQ	6.0

**3.4.1.2.2 Caracterización de las clonas pBI-EGFP-hGH-N.** Los productos de la ligación fueron utilizados para transformar bacterias  $Ca^{++}$  competentes (cepa XL1-Blue). Las clonas obtenidas fueron propagadas a pequeña escala y se caracterizaron con las enzimas de restricción *Eco*RI+*Bam*HI y *Xba* I+*Pst* I para corroborar la presencia del inserto. Se obtuvieron clonas que presentaban el inserto correspondiente a la unidad transcripcional del hGH pero no presentaban el promotor bidireccional (ver fig. 8), por lo que se procedió a reinsertarlo.

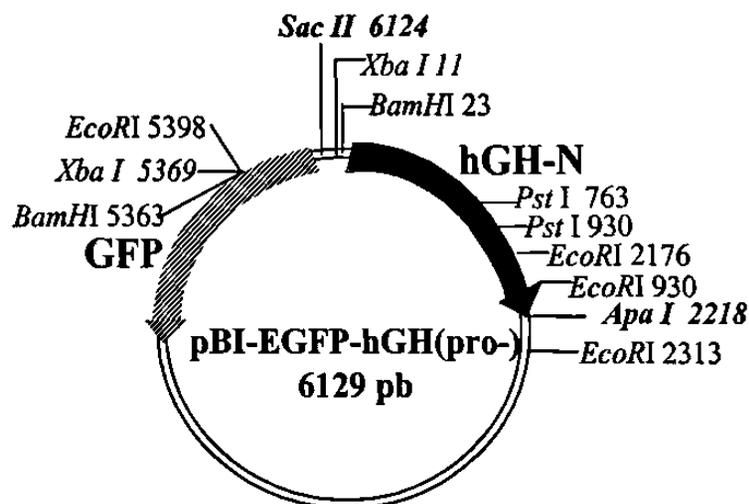


Figura 8. Esquema de la clona pBI-EGFP-hGH-N(pro-). Las clonas contienen a la unidad transcripcional del gen hGH-N pero pierden el promotor bidireccional de tal manera que se obtienen clonas que presentan un sitio de restricción para la enzima *Sac* II.

**3.4.1.2.3 Reinserción del promotor regulable por tetraciclina.** Para reinsertar el promotor se digirió el vector pBI-EGFP con *Sac* II para liberar una banda de 543 pb que corresponde al promotor. En paralelo con esto fue digerida en otro tubo la clona pBI-EGFP-hGH-N(pro-) con la misma enzima (ver tabla 6).

Tabla 6. Condiciones de la reacción de digestión de la clona pBShGH-N(pro-) y del vector pBI-EGFP por separado con la enzima *Sac* II.

Reactivo	Volumen de reacción (μl)
Vector pBI-EGFP (~1 μg/μl) ó Clona pBI-EGFP-hGH-N(pro-)(~1μg/μl)	3.0
Buffer 4 (10 X)	6.0
BSA (100 X)	3.0
Enzima <i>Sac</i> II (10 U/μl)	3.0
Agua MilliQ	45.0

Tanto la banda que corresponde al vector linearizado, como el fragmento de 543 pb una vez purificados, se sometieron a una reacción de ligación, (ver tabla 7).

Tabla 7. Condiciones de ligación del promotor bidireccional y clona pBI-EGFP-hGHN(pro-) previamente digeridos con la enzima *Sac* II.

Reactivos	Volúmenes de reacción (μl)
Inserto de 543 pb (promotor) (326 ng)	7.0
Clona pBI-EGFP-hGHN(pro-) (648 ng)	3.0
Buffer para ligasa 10X	2.0
Ligasa	2.0
Agua MilliQ	6.0

Con los productos de la ligación se realizó la transformación de bacterias. Las clonas pBI-EGFP-hGHN(pro+) obtenidas a partir de la minipreparación del DNA plasmídico, fueron caracterizadas con las enzimas *Eco*RI+*Bam*HI y *Xba* I+*Pst* I (ver fig. 9).

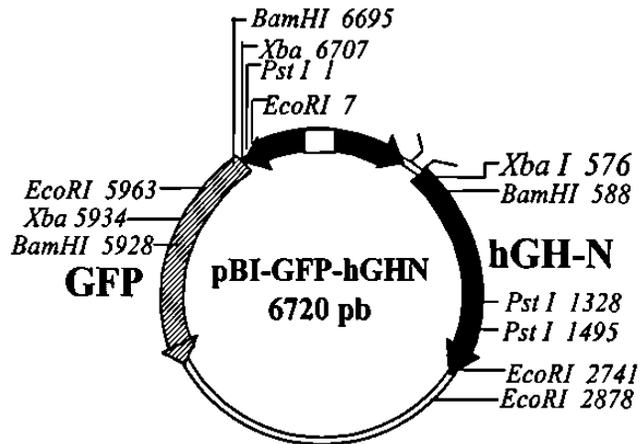


Figura 9. Mapa de restricción de la clona pBI-EGFP-hGH-N (pro+). En este se indica la ubicación de los sitios de las enzimas con que fue caracterizada.

### 3.4.1.3 Construcción del recombinante pBG3i-rtTA-hGH-N

El vector pBIG3i-rtTA contiene un promotor bidireccional formado por un promotor mínimo del Citomegalovirus humano, siete secuencias en tandem del operador tet y el promotor de TK (Timidina cinasa). Este último regula la expresión del gen que codifica para la proteína transactivadora (rtTA) (ver fig. 10). La subclonación de la unidad transcripcional del gen hGH-N dentro de este vector de expresión nos permitió obtener un sistema “tet On” monoplasmídico.

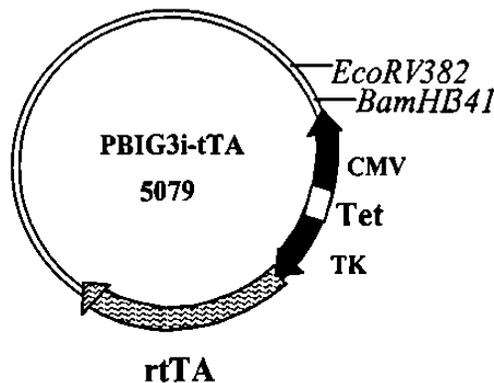


Figura 10. Esquema del vector de expresión pBIG3i-rtTA. La digestión de este vector con las enzimas *EcoRV* y *BamHI* permite ubicar a la unidad transcripcional de hGH-N bajo la regulación del promotor bidireccional.

**3.4.1.3.1. Digestión preparativa del vector de expresión pBIG3i-rtTA.** Se realizó una digestión preparativa del vector pBIG3i-rtTA con las enzimas de restricción *Bam*HI+*Eco*RV (ver tabla 8). Ya purificado y cuantificado se montó una reacción de ligación en la que se puso en contacto con el producto de la digestión de la clona pBShGH-N(pro-), obtenido previamente con las mismas enzimas y que corresponde a la unidad transcripcional del gen hGH-N (ver tabla 4). La reacción se incubó a 16°C por 16 h (ver tabla 9).

Tabla 8. Condiciones de la reacción de digestión del vector de expresión pBIG3i-rtTA con las enzimas *Bam*HI+*Eco*RV.

Reactivo	Volumen de reacción (μl)
PBI3i-rtTA (~1μg/μl)	3.0
Buffer 3 (10X)	6.0
BSA (100 X)	3.0
Enzima <i>Bam</i> HI (10 U/μl)	3.0
Enzima <i>Eco</i> RV(10 U/μl)	3.0
Agua MilliQ	42.0

Tabla 9. Condiciones de la reacción de ligación del vector pBIG3i-rtTA y el inserto de hGH-N previamente digeridos con las enzimas *Bam*HI +*Eco*RV

Reactivos	Volúmenes de reacción (μl)
Inserto (hGH-N) <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RV (532 ng)	5.0
Vector pBIG3i-rtTA ( <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RV) (672 ng)	3.0
Buffer para ligasa 5X	2.0
T4 DNA Ligasa (1 U/μl)	2.0
AguaMilliQ	8.0

De la mezcla de ligación se tomó una cuarta parte (5 μl) para la transformación de bacterias (cepa TOP 10F'). A partir de las colonias obtenidas se preparó DNA plasmídico a miniescala, de acuerdo al método de Sambrock y cols., 1989. Las clonas pBIG3i-rtTA-hGH-N fueron caracterizadas con las enzimas *Bam*HI+*Eco*RV y *Xho* I, que flanquean al inserto (hGH-N) (ver fig. 11)

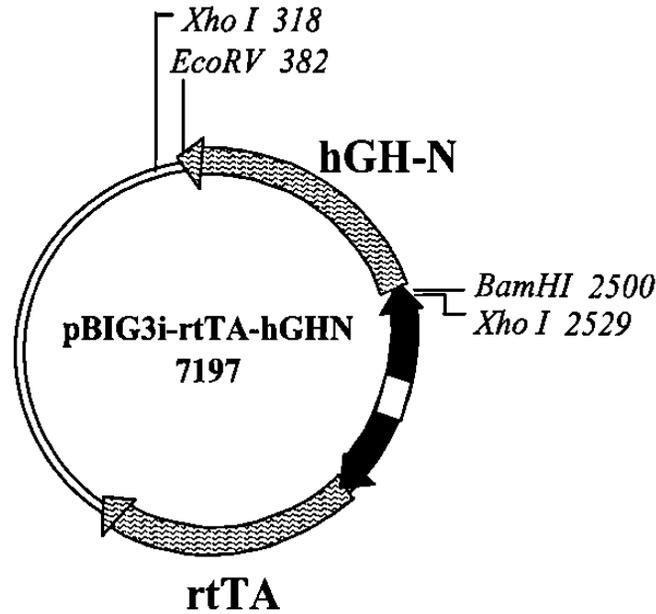


Figura 11. Esquema de la clona pBIG3i-rtTA-hGH-N y ubicación de los sitios de restricción para enzimas diagnósticas.

### 3.4.2 Propagación a gran escala de los recombinantes pBI-EGFP-hGH-N(pro+) y pBIG3i-rtTA-hGH-N.:

Para obtener DNA plasmídico de alta calidad para ensayos de transfección en cultivo celulares, se crecieron a gran escala los recombinantes pBI-EGFP-hGH-N y pBIG3i-rtTA-hGH-N, mediante el método de lisis alcalina y de acuerdo a las indicaciones de Sambrock y cols., 1989. El procedimiento se describe a continuación:

En dos matraces de 250 ml que contenían 20 ml de medio de cultivo LB + antibiótico se inocularon por separado las cepas bacterianas que portaban los recombinantes pBI-EGFP-hGH-N y pBIG3i-rtTA-hGH-N. Se colocaron en una incubadora bajo condiciones de 37°C por 12 h y a 250 rpm hasta alcanzar la fase logarítmica (densidad óptica aproximada de 0.6). El contenido del matraz pequeño (250

ml) se vació a un matraz de 2 l que contenía 800 ml de medio LB y 4  $\mu$ l/ml del antibiótico ampicilina (25 mg/ml). Se incubó por 2-3 h hasta obtener una densidad óptica de 0.4. El crecimiento bacteriano se centrifugó a 5000 rpm/15 min en frascos de 500 ml con la finalidad de empastillar las células. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 10 ml de solución I (glucosa 50 mM, tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8) y 2 ml de lisozima recién preparada (10 mg/ml en tris-HCl pH 8). Luego se adicionaron 20 ml de solución II recién preparada (NaOH 0.2 N, SDS al 1%) con la finalidad de provocar la lisis celular, el frasco se agitó mediante movimientos giratorios y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se agregaron 15 ml de solución III (60 ml de Acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de Acido acético glacial y 28.5 ml de agua) previamente refrigerada, se mezcló suavemente por inversión y se incubó por 10 min hasta la formación de un precipitado blanco. El lisado bacteriano se centrifugó a 10,000 rpm/15 min y se rescató el sobrenadante. Se precipitó el DNA plasmídico con 2.5 volúmenes de etanol al 100 % y en incubación a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 1h. Una vez formado un precipitado blanco se centrifugó a 5000 rpm/15 min para empastillar el DNA. El etanol se desechó por decantación, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 1 ml de solución TE pH 8. Se midió la concentración de DNA mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 y 280 nm.

### **3.4.2.1 Purificación de los recombinantes por el método de gradiente con Cloruro de Cesio (modificación del método de Clewell, D.B. y cols., 1972)**

La solución de DNA se llevó a un volumen final de 4 ml con agua milliQ estéril y se agregaron a ésta 4 g de Cloruro de Cesio. El tubo Falcon se cubrió con papel aluminio y se le adicionó 0.5 ml de bromuro de etidio (10 mg/ml en agua). Se obtuvo una densidad final de 1.55 g/ml (índice de refracción de 1.386) y la concentración de bromuro de etidio es de aproximadamente 740 µg/ml.

La solución se incubó a temperatura ambiente por 30 min para permitir la formación de un complejo proteína-bromuro de etidio, el cual se eliminó por centrifugación a 8000 rpm por 5 min. La solución acuosa se transfirió a uno de los tubos de ultracentrífuga de 4 ml, se adicionó al tubo aceite mineral y se selló. Para dar lugar a la formación del gradiente, el tubo se centrifugó a 96,000 rpm en un rotor TLA 100.4 por 12 h. Una vez formado el gradiente e identificada la banda de interés se insertó una aguja 20-G en la parte superior del tubo para permitir la entrada de aire y se recuperó la banda del plásmido por succión con una jeringa de 3 ml y una aguja 20-G cubierta con vaselina que fué insertada a 1 cm por debajo de la banda y con el bisel hacia arriba. La solución se colocó en un tubo Falcon de 15 ml previamente cubierto con papel aluminio. Se eliminó el bromuro de etidio mediante extracciones sucesivas con 1 volumen de alcohol isoamílico. Para esto, la mezcla se agitó suavemente por inversión, esto se repitió hasta que desapareció el color del bromuro de etidio.

### 3.4.2.2 Diálisis

Una vez eliminado el bromuro de etidio, la solución se colocó con ayuda de una pipeta en una membrana para diálisis sellada en ambos extremos, se sumergió en un recipiente con 2 l de agua destilada, se llevó a un cuarto frío en donde se dializó por 2 h. Se realizó un cambio de agua y se dejó dializando por 12 h más. El contenido de la bolsa se recuperó y se mezcló con 2.5 volúmenes de etanol al 100% en frío y 1/10 parte de acetato de sodio 3 M pH 5, se dejó precipitar por 2-3 h a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó a 5000 rpm. La pastilla obtenida se resuspendió en 1 ml de TE

### 3.4.2.3 Cuantificación del DNA plasmídico:

Se determinó la cantidad y calidad del DNA obtenido en absorbancia de 260 y 280 nm. Para esto se prepararon diluciones de 1:1000 y por triplicado. En la realización de los cálculos se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de DNA} = (\text{F. D.}) (50) (\text{Abs}).$$

Donde: F.D.= Factor de dilución

50 =Factor de conversión a  $\text{ng}/\mu\text{l}$

Abs= Absorbancia

Finalmente una vez determinada la calidad mediante la relación de absorbancias a  $\lambda$  de 260/280 (considerándose DNA de buena calidad con valores próximos o iguales a

1.8) se determinó la concentración total de DNA y se diluyó hasta obtener una concentración final de  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### **3.4.3 Estudios de expresión del gen hGH-N.**

#### **3.4.3.1 Condiciones del cultivo celular.**

Se empleó como sistema de expresión la línea celular GC derivada de hipófisis de rata (Hay, R., 1992). Para ello se utilizó un vial de células conservadas en congelación en nitrógeno líquido. Se procedió a la descongelación inmediata por inmersión en baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, el contenido del vial se colocó en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml y se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. Se decantó el sobrenadante en condiciones de esterilidad y se resuspendió el botón de células en 1 ml de medio de cultivo DMEM (Gibco-BRL) con 10% de SBF y 1 ml de solución de antibióticos (Sulfato de Estreptomicina  $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$  y Penicilina  $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ). La resuspensión se depositó en botellas de  $25\ \text{cm}^2$  a las que previamente se les adicionaron 7 ml de medio DMEM, manteniéndose en incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera húmeda con  $\text{CO}_2$ .

### **3.4.3.2 Mantenimiento del cultivo celular.**

A un cultivo confluyente de células se le eliminó el medio de cultivo y para desprenderlas del substrato se agregaron 2 ml de solución de tripsina 1X (4 ml de tripsina al 2.5 %, 2.4 ml de rojo de fenol al 1%, 0.08 gr de EDTA, 4 ml de solución de antibióticos 100X, 176 ml de solución TD2X y 176 ml de agua milliQ). Se incubó a 37°C por 5 min y una vez que las células se desprendieron, se recuperaron con ayuda de una pipeta y se colocaron en un tubo de ensayo de 15 ml. La suspensión de células se centrifugó a 3000 rpm por 5 min, se eliminó la tripsina y se resuspendió el botón de células en 3 ml de medio DMEM. Se realizó conteo celular en un hemocitómetro o cámara de Neubauer y se transfirió una alícuota que contenía aproximadamente  $7 \times 10^4$  células a una botella nueva con medio DMEM conteniendo 10% de suero bovino fetal.

### **3.4.3.3 Transfección de los recombinantes pBI-EGFP-hGH-N y pBIG3i-rtTA-hGH-N.**

A partir de cultivos con una confluencia del 80% y en fase logarítmica, se procedió a levantar las células con tripsina 1X y realizar la cuenta celular. Inoculando  $1 \times 10^6$  células en placas de 35 mm, se incubaron por 12 a 24 h y se transfectaron con 750 ng del vector pBI-EGFP-hGH-N y la misma cantidad del vector pBIG3i-rtTA, con 3  $\mu$ l de lipofectamina y 1  $\mu$ l de reactivo plus, de acuerdo a las indicaciones de la casa

comercial Gibco-BRL. También se transfectó en la mezcla el vector pCMVSPORT- $\beta$ gal que contiene al gen reportero para  $\beta$ -galactosidasa.

Para estandarizar las condiciones de transfección se realizaron diversos ensayos variando la concentración de los recombinantes. Las concentraciones ensayadas para el recombinante pBIG3i-rtTA-hGH-N, así como para pCMVSPORT- $\beta$ gal fueron: 1.5, 1.0, 0.7, 0.5 y 0.25  $\mu$ g. En el caso de la lipofectamina y reactivo plus se mantuvieron volúmenes constantes de 3 y 1  $\mu$ l por caja de 35 mm, respectivamente.

#### Descripción del protocolo:

En un tubo (tubo A) se colocaron 0.75  $\mu$ g de cada uno de los vectores pBI-EGFP-hGH-N y pBIG2i-rtTA (sistema “tet On” biplasmídico) y pBIG3i-rtTA-hGH-N (sistema “tet On” monoplasmídico) en cotransfección con el vector pCMVSPORT- $\beta$ -Gal que contiene al gen reportero de  $\beta$ -Galactosidasa. Se completó a 100  $\mu$ l con medio de cultivo OPTI-MEM libre de suero y antibiótico. En otro tubo (tubo B) se adicionaron 3  $\mu$ l del reactivo de lipofectamina y 1  $\mu$ l del reactivo plus lipofectamina y finalmente se completó a un volumen de 100  $\mu$ l con medio de cultivo OPTI-MEM.

Se mezcló el contenido de ambos tubos y se incubó a temperatura ambiente por 25- 45 minutos. Una vez hecho esto, se agregaron al tubo 800  $\mu$ l de medio OPTI-MEM y se vació el contenido en una placa que contenía el cultivo celular con una confluencia de un 70-80% aproximadamente. Las placas se incubaron a 37°C por 5 h y se sustituyó el medio de cultivo por medio OPTI-MEM completo (10% suero bovino fetal y solución de antibióticos). Se realizaron los ensayos de expresión en un tiempo de 45 h después de la transfección.

#### **3.4.3.4 Inducción de la expresión:**

Se empleó como inductor de la expresión un derivado de la tetraciclina (doxiciclina). Se realizaron ensayos variando la concentración del antibiótico, para lo cual se utilizaron las siguientes concentraciones: 0, 10, 100 y 1000 ng/ml por un tiempo de inducción de 48 h.

#### **3.4.3.5 Cuantificación y normalización de la actividad de $\beta$ -Galactosidasa.**

Para la determinación de la actividad de  $\beta$ -Galactosidasa se siguió el protocolo descrito por Eustice y cols., 1994.

Una vez terminado el tiempo de incubación de la transfección, se recuperó el medio de cultivo para determinar posteriormente la concentración de HGH. Por otro lado, la monocapa de células se lavó con 0.5 ml de solución PBS pH 7.4 y se adicionaron 250  $\mu$ l de Buffer de lisis pH 8 (Tris-HCL- 0.1 % de tritón 100 X). Para aumentar la lisis celular, el lisado se sometió a 3 ciclos de congelamiento a  $-70^{\circ}\text{C}$  y descongelamiento a temperatura ambiente. Después las muestras se centrifugaron a 3000 rpm para empastillar los restos celulares. Del sobrenadante obtenido (extracto proteico) se tomaron 50  $\mu$ l para llevar a cabo una reacción con 150  $\mu$ l del sustrato para  $\beta$ -Galactosidasa CPRG (rojo de clorofenol  $\beta$ -D Galactopiranosido) a una concentración de 1mg/ml.

La reacción se llevó a cabo a 37°C en un tiempo de 30 min y se determinó la intensidad del color, midiéndose la absorbancia a 580 nm. La actividad de  $\beta$ -Galactosidasa se determinó mediante la siguiente fórmula (Carrol, 1992):

$$\text{Actividad de } \beta\text{-Galactosidasa (U)} = \frac{10^9 \times \text{Abs}^{580}}{(\# \text{ de células.}) (t \text{ de incub. en h})}$$

Para normalizar la actividad de  $\beta$ -Galactosidasa en U/ $\mu$ g de proteína se cuantificó la concentración de proteína total en el extracto celular mediante la técnica de Bradford. Se realizó la normalización mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Actividad de } \beta\text{-Galactosidasa en U.}}{\mu\text{g de proteínas totales.}} = \text{U de } \beta\text{-galactosidasa}/\mu\text{g de proteína}$$

**3.4.3.5.1 Cuantificación de proteínas (Bradford, 1976).** En tubos Eppendorf de 0.5 ml se colocaron 1.0, 2.5, 5.0, 12.5 y 15  $\mu$ l de una solución estándar con una concentración de 0.5 mg/ml de albúmina sérica bovina. Cada tubo se aforó a 50  $\mu$ l con solución de NaCl 150 mM. Cada solución tenía una concentración equivalente a 0.5, 1.25, 2.5, 6.25 y 7.5  $\mu$ g respectivamente.

La reacción se llevó a cabo con la adición de 150  $\mu$ l del colorante azul brillante de Coomassie G-250, se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. En paralelo con la elaboración de la curva de

calibración se determinó la concentración de proteína de cada una de las muestras problema mediante diluciones 1:10.

### 3.4.3.6 Cuantificación de los niveles de expresión de HGH

Se midió la concentración de HGH presente en el medio de cultivo con un inmunoensayo de ELISA basado en el principio del “sandwich” y de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial Borehringer Mannheim. El protocolo se describe a continuación:

#### a).- Preparación de la curva de calibración

Se preparó una serie de diluciones estándar en tubos Eppendorf de 1.5 ml tal y como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Preparación de la curva de calibración que se empleó en la cuantificación de los niveles de expresión de HGH.

Paso	Solución de HGH (400 pg/ml)	Buffer de muestra (solución 7)	Concentración de HGH (pg/ml)
0	0	1000µl	0
1	1000 µl	0 µl	400
2	500 µl del paso 1	500 µl	200
3	500 µl del paso 2	500 µl	100
4	500 µl del paso 3	500 µl	50
5	500 µl del paso 4	500 µl	25
6	500 µl del paso 5	500 µl	12.5

De cada estándar se tomaron 200  $\mu$ l o la misma cantidad de la muestra problema. Se cubrió la placa de 8 pocillos con una hoja adhesiva y se incubó a 37°C por 1 h. Pasado el tiempo de incubación se removió la solución completamente y se lavó 5 veces cada pocillo con 250  $\mu$ l de buffer de lavado (solución 6), por cada lavado se esperó 30s y se eliminó el buffer cuidadosamente. Se adicionaron 200  $\mu$ l de la solución Anti-hGH-DIG (Digoxigenina anti-HGH, dilución 2a), se cubrió la placa con una hoja adhesiva y se incubó de nuevo a 37°C por 1 h.

Se repitió el lavado y se adicionaron 200  $\mu$ l de la solución Anti-DIG-PEROXIDASA (Anti-DIG-POD, solución 3a), se cubrió la placa con una hoja adhesiva y se incubó a 37°C por 1 h Pasado el tiempo de incubación se lavaron las muestras de nuevo y se les adicionó 200  $\mu$ l del sustrato POD ( Sustrato para peroxidasa, solución 4) incubándose a temperatura ambiente en oscuridad por 15 min. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 405 nm con referencia a 493 nm Se graficaron los valores de absorbancia contra concentración de cada uno de los estándares para así determinar la concentración de las muestras problema.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

#### **4.1 Subclonación de la unidad transcripcional del gen hGH-N en el vector de expresión pBI-EGFP.**

La recuperación de la unidad transcripcional del gen hGH-N se realizó a partir del vector pBShGH-N en dos pasos, en el primero se eliminó el promotor y se religó el vector y en el segundo se obtuvo la unidad transcripcional de hGH-N; previo a esto se realizó la caracterización de los vectores pBShGH-N y pBI-EGFP.

##### **4.1.1 Caracterización de los vectores pBShGH-N y pBI-EGFP.**

Para corroborar la identidad de los vectores pBShGH-N y pBI-EGFP, se digirió el primero con las enzimas de restricción *Bam*HI+*Eco*RI, *Pst* I y *Pvu* II, mientras que el segundo se digirió con *Spe* I+*Hind* III, *Xba* I+*Eco*RV (ver fig 12).

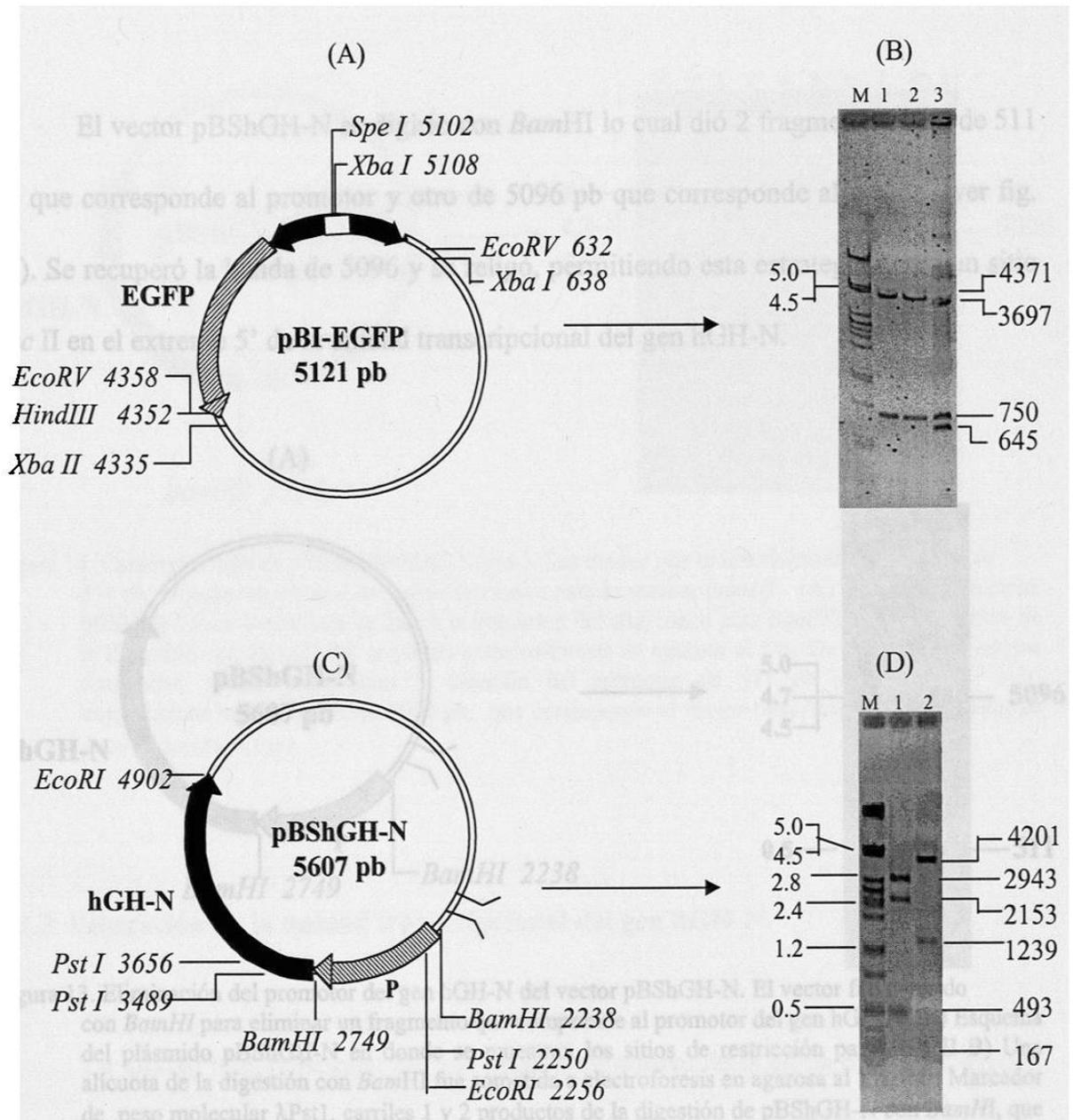


Figura 12. Caracterización de los vectores pBI-EGFP y pBShGH-N. Se muestran los mapas de restricción de ambos vectores. (A) El vector pBI-EGFP se sometió a doble digestión con las enzimas *Spe I*+*Hind III* y *Xba I*+*EcoRV*. B).-Una alícuota de la reacción de digestión se sometió a corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% en donde M=marcador de peso molecular  $\lambda$ *Pst*I, en el carril 1 y 2 se muestran los productos de la digestión con las enzimas *Spe I*+*Hind III* con tamaños de 4371 y 750 pb y en el carril 3 se observan tres de cinco fragmentos con tamaños de 3697, 750, 645 y dos restantes con tamaños de 23 y 6 pb, los cuales dado su tamaño pequeño se salen del gel durante la electroforesis. C y D) Mapa y productos de digestión del vector pBShGH-N mostrando en el carril 1 que la doble digestión *BamHI*+*EcoRI* liberó 4 fragmentos con tamaños de 2943, 2153, 493 y uno de 18 pb que se sale durante el corrimiento electroforético, en el carril 2 el vector se digirió con *Pst I*, liberándose 3 fragmentos con tamaño de 4201, 1239 y 167 pb.

#### 4.1.2 Eliminación del promotor del gen hGH-N en el vector pBShGH-N.

El vector pBShGH-N se digirió con *Bam*HI lo cual dió 2 fragmentos: uno de 511 pb que corresponde al promotor y otro de 5096 pb que corresponde al vector (ver fig. 13). Se recuperó la banda de 5096 y se religó, permitiendo esta estrategia ganar un sitio *Sac* II en el extremo 5' de la unidad transcripcional del gen hGH-N.

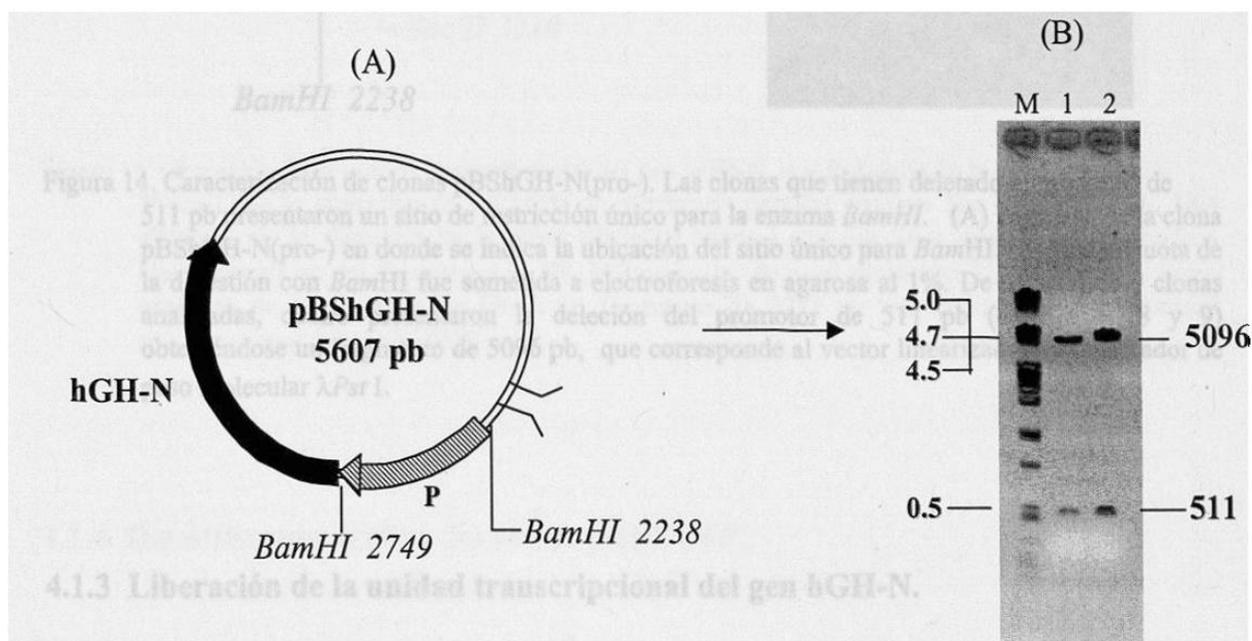


Figura 13. Eliminación del promotor del gen hGH-N del vector pBShGH-N. El vector fue digerido con *Bam*HI para eliminar un fragmento que comprende al promotor del gen hGH-N . A) Esquema del plásmido pBShGH-N en donde se muestran los sitios de restricción para *Bam*HI B) Una alícuota de la digestión con *Bam*HI fue sometida a electroforesis en agarosa al 1%, M= Marcador de peso molecular  $\lambda$ Pst1, carriles 1 y 2 productos de la digestión de pBShGH-N con *Bam*HI, que liberó una banda de 511 pb que corresponde al promotor y la banda de 5096 pb al resto del vector.

La transformación de bacterias con el producto de la ligación permitió la obtención de 9 clonas candidatas, de las cuales al ser caracterizadas con la enzima *Bam*HI, cuatro presentaron la delección del fragmento de 511 pb (ver fig. 14 ).

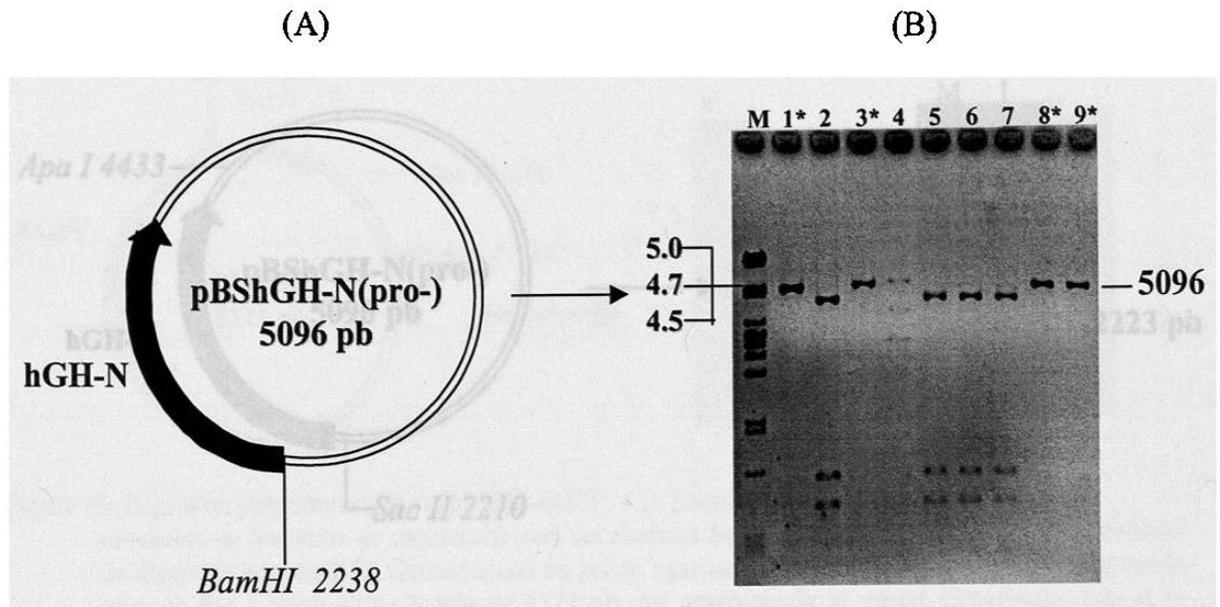


Figura 14. Caracterización de clonas pBShGH-N(pro-). Las clonas que tienen deletado el promotor de 511 pb presentaron un sitio de restricción único para la enzima *Bam*HI. (A) Esquema de la clona pBShGH-N(pro-) en donde se indica la ubicación del sitio único para *Bam*HI. (B) Una alícuota de la digestión con *Bam*HI fue sometida a electroforesis en agarosa al 1%. De un total de 9 clonas analizadas, cuatro presentaron la delección del promotor de 511 pb (carriles 1,3,8 y 9) obteniéndose un fragmento de 5096 pb, que corresponde al vector linearizado. M= Marcador de peso molecular  $\lambda$ Pst I.

#### 4.1.3 Liberación de la unidad transcripcional del gen hGH-N.

La unidad transcripcional del gen hGH-N se obtuvo de la clona pBShGHN(pro-), que se sometió a una reacción de digestión con las endonucleasas *Sac* II y *Apa* I, de la que se liberó un fragmento de 2223 pb (ver fig. 15). Estos sitios de restricción permitieron la subclonación de la unidad transcripcional dentro del vector pBI-EGFP, ubicándolo bajo la regulación del promotor bidireccional modulado por doxiciclina.

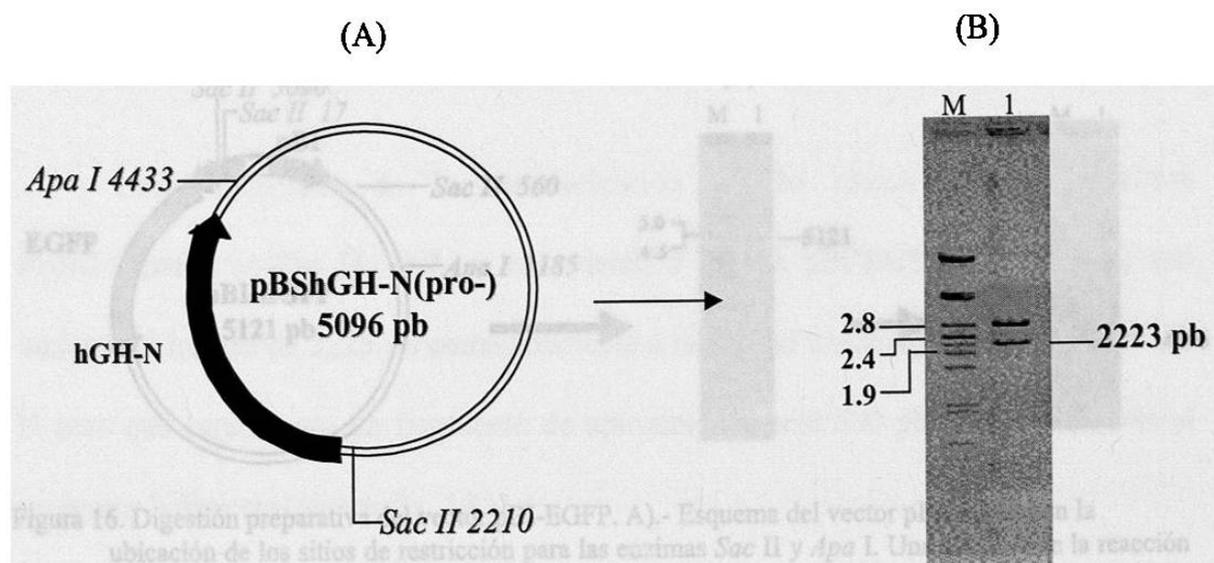


Figura 15. Obtención de la unidad transcripcional del gen hGH-N. A)- Esquema de la clona pBShGH-N(pro-) con la ubicación de los sitios de restricción para las enzimas *Sac II* y *Apa I*. B). Una alícuota de la digestión de la clona pBShGH-N(pro-) con *Sac II* y *Apa I* fue sometida a electroforesis en gel de agarosa al 1%, M= marcador de peso molecular  $\lambda Pst1$ , carril 1: como producto de la digestión se liberó un fragmento de 2223 pb que corresponde a la unidad transcripcional del gen hGH-N.

#### 4.1.4 Digestión preparativa del vector pBI-EGFP.

El vector pBI-EGFP se digirió con la enzima *Apa I* y los productos de la digestión se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, obteniéndose un fragmento de 5121 pb que corresponde al vector linearizado (ver fig. 16B), después se hicieron digestiones parciales al agregar a la misma mezcla de reacción la enzima *Sac II*. Como producto de esto último se obtuvo un fragmento de 4496 pb, visualizado en gel de agarosa al 1% (ver fig. 16C).

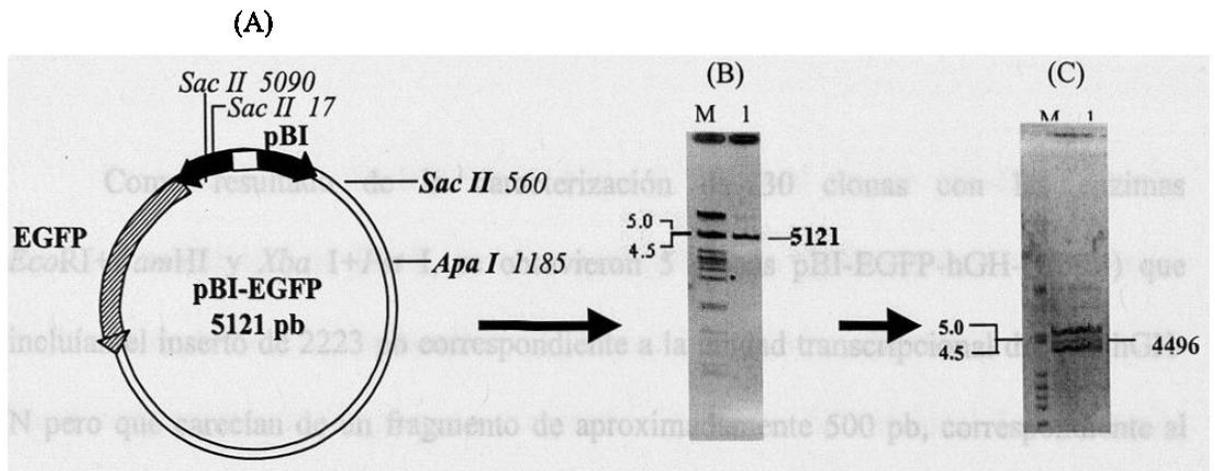


Figura 16. Digestión preparativa del vector pBI-EGFP. A).- Esquema del vector pBI-EGFP con la ubicación de los sitios de restricción para las enzimas *Sac II* y *Apa I*. Una alícuota de la reacción de digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. B) La digestión del vector con la enzima *Apa I* originó una banda de 5121 pb que corresponde al vector linealizado. C).- A la misma reacción de digestión se adicionó la enzima *Sac II* y se buscó obtener una digestión parcial del vector con esta enzima, lográndose obtener el fragmento de aproximadamente 4496 pb deseado. M= marcador de peso molecular  $\lambda Pst1$ .

#### 4.1.5 Ligación de la unidad transcripcional de hGH-N y el vector pBI-EGFP.

Los fragmentos purificados del gen hGH-N de 2223 pb y del vector pBI-EGFP de 4496 pb se sometieron a una reacción de ligación (ver fig 17), 5  $\mu$ l de la cual se utilizaron para transformar bacterias.

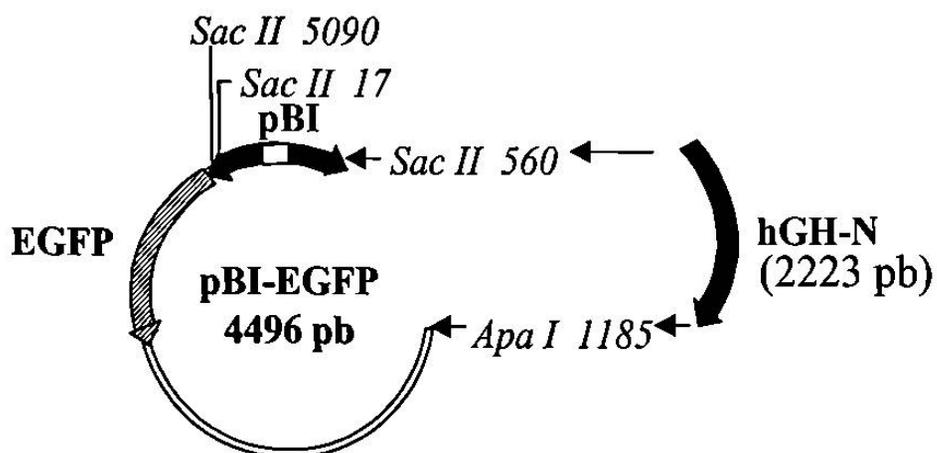


Figura 17. Esquema del vector pBI-EGFP indicando los sitios de restricción para *Sac II* y *Apa I* entre las cuales fue subclonada la unidad transcripcional del gen hGH-N.

#### 4.1.6 Caracterización de clonas pBI-EGFP-hGH-N

Como resultado de la caracterización de 30 clonas con las enzimas *EcoRI*+*BamHI* y *Xba I*+*Pst I*, se obtuvieron 5 clonas pBI-EGFP-hGH-N(pro-) que incluían el inserto de 2223 pb correspondiente a la unidad transcripcional del gen hGH-N pero que carecían de un fragmento de aproximadamente 500 pb, correspondiente al promotor bidireccional (ver fig. 18 ).

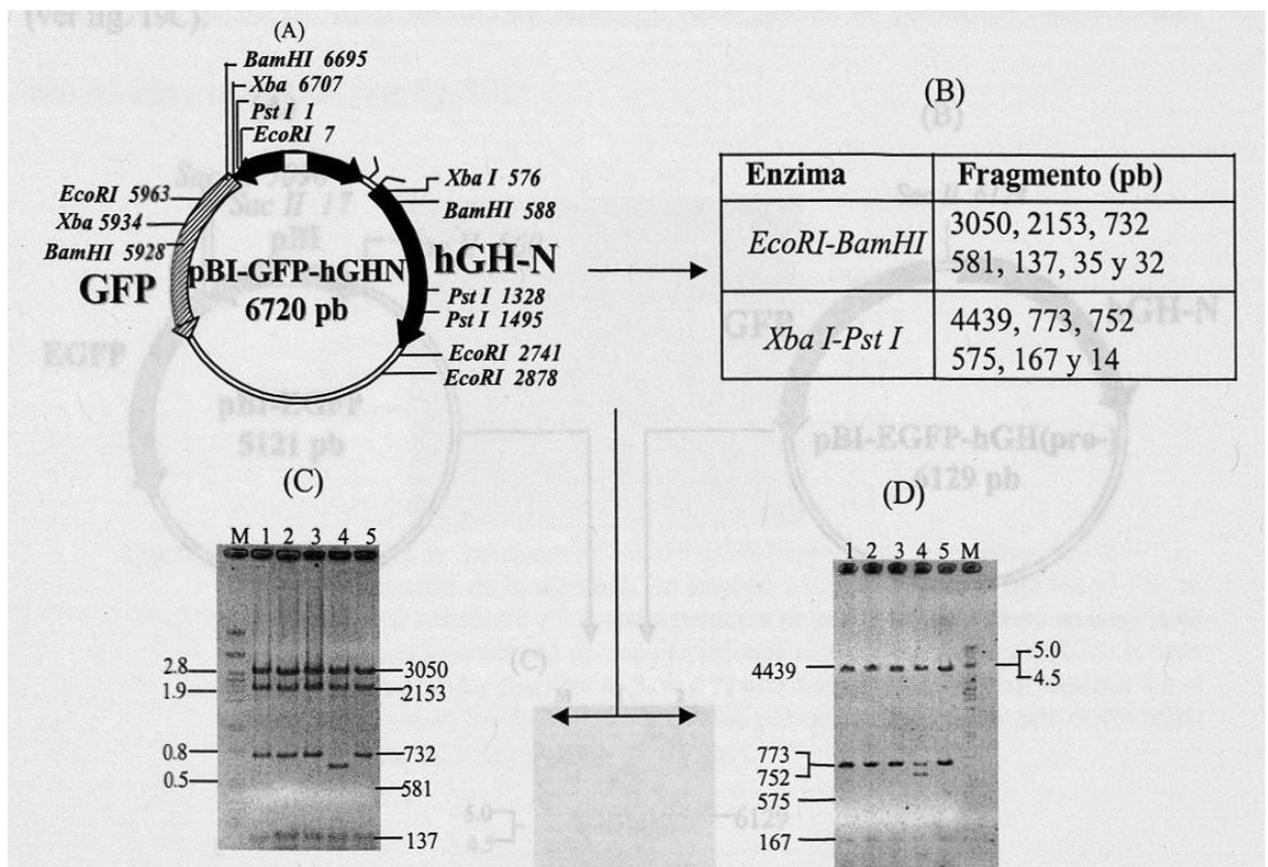


Figura 18. Caracterización de clonas pBI-EGFP-hGH-N. A).- Esquema de la clona pBI-EGFP-hGH-N con la ubicación de los sitios de restricción para las enzimas *BamHI*+*EcoRI*, *Xba I*+*Pst I*. B).- En el cuadro se indican el número y el tamaño de los fragmentos liberados producto de la doble digestión de la clona con dichas enzimas. Una alícuota de la digestión de cada una de las clonas se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. (C).-Producto de la digestión de las clonas pBI-EGFP-hGH-N con las enzimas *EcoRI*+*BamHI*, se observan 4 de los 7 fragmentos esperados con los siguientes tamaños: 3050, 2153, 732 y 137 pb, los tres fragmentos restantes uno de 581 que está ausente y dos de 35 y 32 pb que no se alcanzan a visualizar en el gel dado que por su tamaño pequeño alcanzan a salirse del mismo en la electroforesis. (D) La digestión de las mismas clonas con las enzimas *Xba I*+*Pst I*, liberó 6 fragmentos, 4 de estos se logran visualizar en el gel con tamaños de: 4439, 773, 752 y 167, otro de 575 pb que ésta ausente, un fragmento pequeño de 14 pb que también se pierde. M= marcador de peso molecular  $\lambda$ *Pst*1.

#### 4.1.7 Reinserción del promotor bidireccional en las clonas pBI-EGFP-hGH-N(pro-)

Tanto la clona pBI-EGFP-hGH-N(pro-), como el vector pBI-EGFP fueron digeridos con la enzima *Sac* II, lo que en el caso de la primera permitió obtener un fragmento de 6129 pb correspondiente a la clona linearizada, mientras que el segundo liberó un fragmento de 543 pb que corresponde al promotor bidireccional. Los productos de la digestión fueron resueltos por corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% (ver fig. 19C).

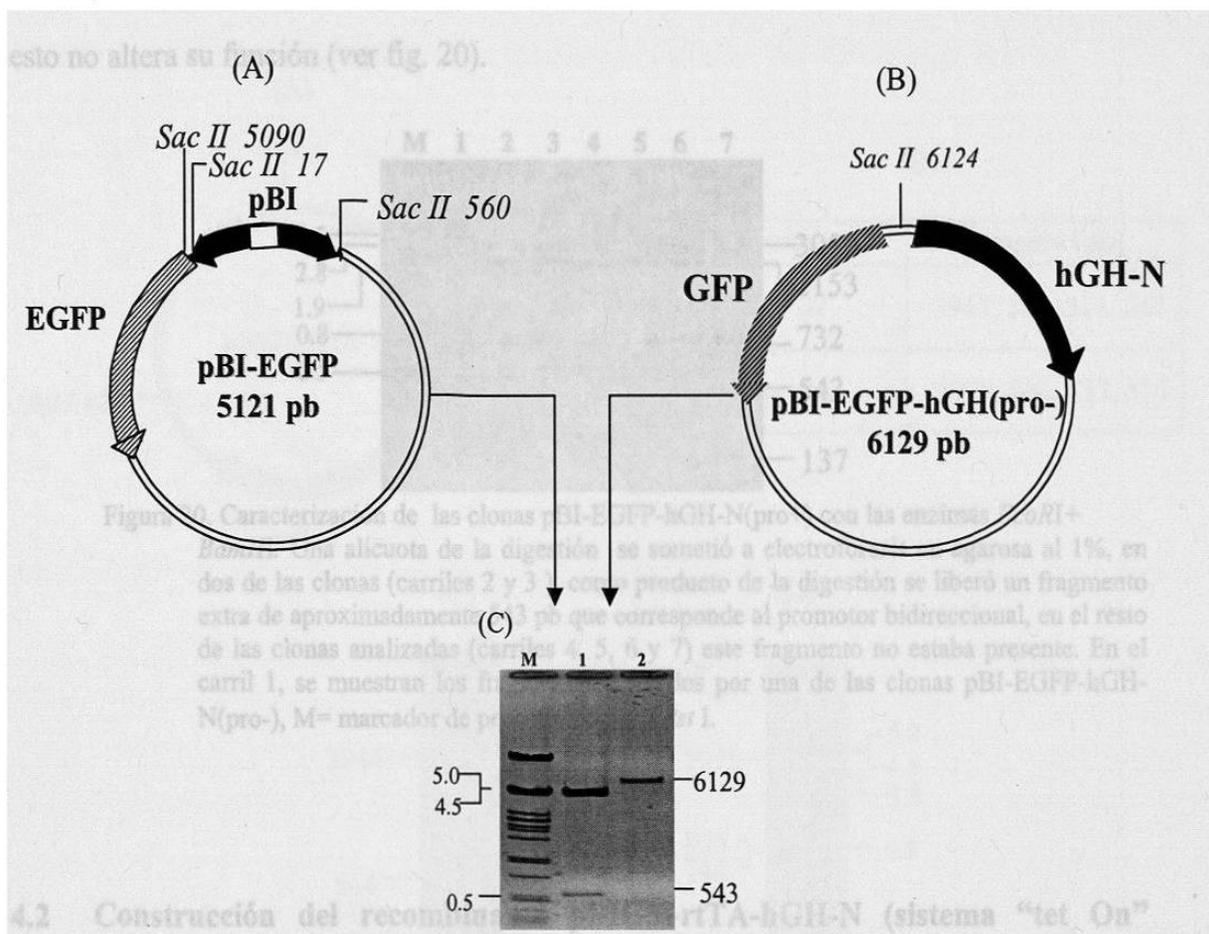


Figura 19. Digestión del vector pBI-EGFP y de la clona pBI-EGFP-hGH-N(pro-) con la enzima *Sac* II.

En A y B se muestran esquemas indicando la ubicación de los sitios de restricción para *Sac* II. (C).- Una alicuota de la digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. En el carril 1, producto de la digestión de pBI-EGFP se liberó un fragmento de 543 pb que corresponde al promotor bidireccional, en el carril 2, producto de la digestión de la clona pBI-EGFP-hGH-N(pro-) se obtuvo un fragmento de 6129 pb que corresponde a la clona linearizada. M= marcador de peso molecular  $\lambda$ PstI.

Ambos fragmentos el de 6129 y 543 pb se purificaron y se sometieron a una reacción de ligación.

Se realizó la transformación de bacterias, obteniéndose 32 clonas candidatas, que se caracterizaron mediante una doble digestión con las enzimas *EcoRI*+*Bam**HI*, de las cuales las clonas 11 y 15 presentaron el número y tamaño de los fragmentos deseados, incluyendo un fragmento de aproximadamente 500 pb que corresponde al promotor bidireccional. La variación en el tamaño de este fragmento se debe al sentido en el que se integró el promotor en el vector, sin embargo dado que es un promotor bidireccional esto no altera su función (ver fig. 20).



Figura 20. Caracterización de las clonas pBI-EGFP-hGH-N(pro+) con las enzimas *EcoRI*+*Bam**HI*. Una alícuota de la digestión se sometió a electroforesis en agarosa al 1%, en dos de las clonas (carriles 2 y 3), como producto de la digestión se liberó un fragmento extra de aproximadamente 543 pb que corresponde al promotor bidireccional, en el resto de las clonas analizadas (carriles 4, 5, 6 y 7) este fragmento no estaba presente. En el carril 1, se muestran los fragmentos liberados por una de las clonas pBI-EGFP-hGH-N(pro-), M= marcador de peso molecular  $\lambda$ *Pst* I.

#### 4.2 Construcción del recombinante pBIG3i-rtTA-hGH-N (sistema “tet On” monoplasmídico)

Se planeó la construcción de un vector que tuviera bajo la regulación del promotor inducible con doxiciclina tanto la secuencia que codifica para el

transactivador, como la de hGH-N. Para proceder a construirlo fue necesario caracterizar el vector de clonación pBIG3i-rtTA.

#### 4.2.1 Caracterización del vector pBIG3i-rtTA

Para corroborar la identidad del vector pBIG3i-rtTA se sometió a digestión con las enzimas *Hind* III, *Sal* I y *Bgl* I (ver fig. 21)

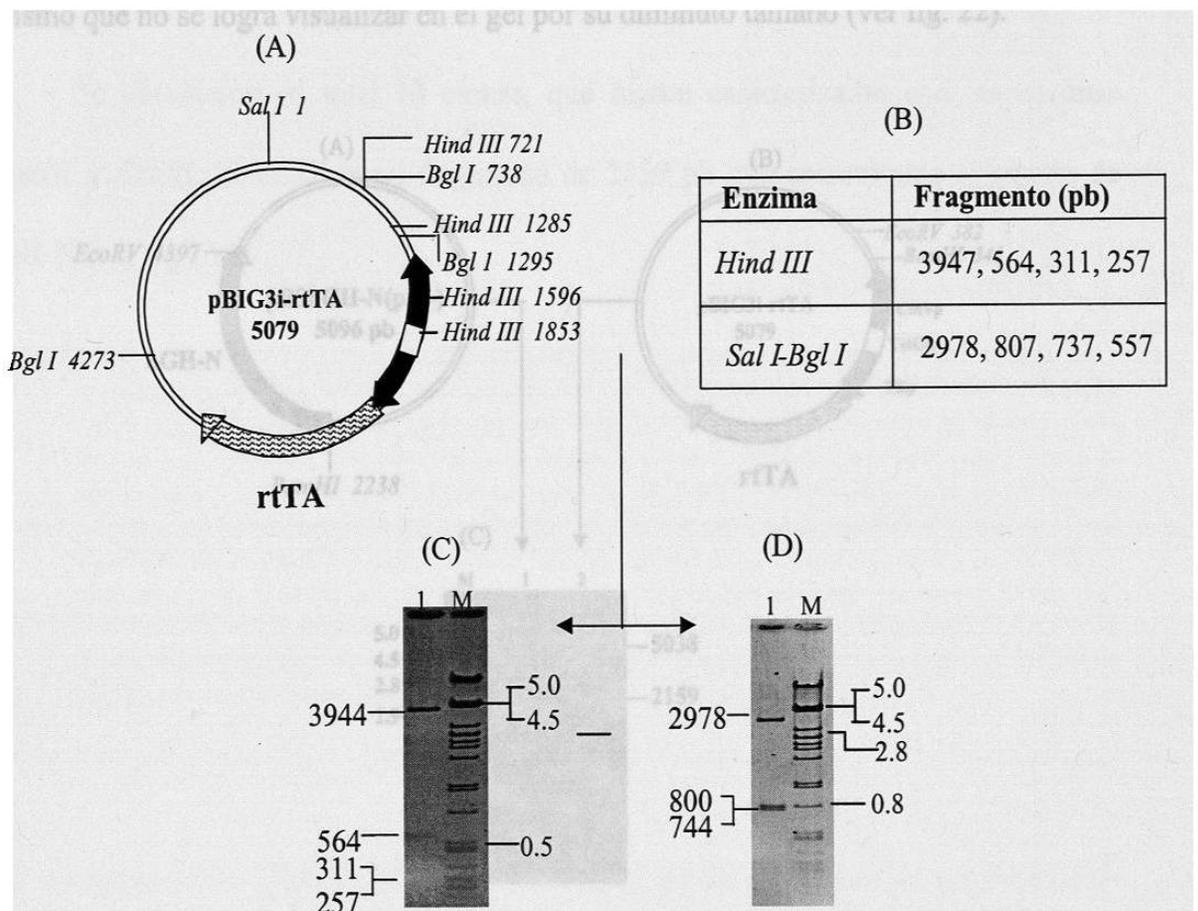


Figura 21. Caracterización del vector pBIG3i-rtTA. A).-Esquema del vector con la ubicación de los sitios de restricción para las enzimas *Hind* III, *Bgl* I y *Sal* I. B).- En el cuadro se muestran los tamaños de los fragmentos liberados por las enzimas utilizadas en la caracterización. Una alícuota de la digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, C).-Producto de la digestión del vector con *Hind* III y D) Producto de la digestión del vector con las enzimas *Sal* I+*Bgl* I. M= marcador de peso molecular  $\lambda$ PsI1.

#### 4.2.2 Obtención de la unidad transcripcional del gen hGH-N y digestión preparativa del vector pBIG3i-rtTA.

La unidad transcripcional del gen hGH-N se obtuvo con la digestión de una de las clonas pBShGH-N(pro-) obtenida previamente en este trabajo (sección 3.4.1.1.4). Al digerir a la clona pBShGH-N(pro-) con las enzimas *Bam*HI+*Eco*RV se liberó un fragmento de 2159 pb, a su vez la digestión del vector de clonación pBIG3i-rtTA con las mismas enzimas permitió obtener dos fragmentos: uno de 5038 pb y el otro de 42 pb mismo que no se logra visualizar en el gel por su diminuto tamaño (ver fig. 22).

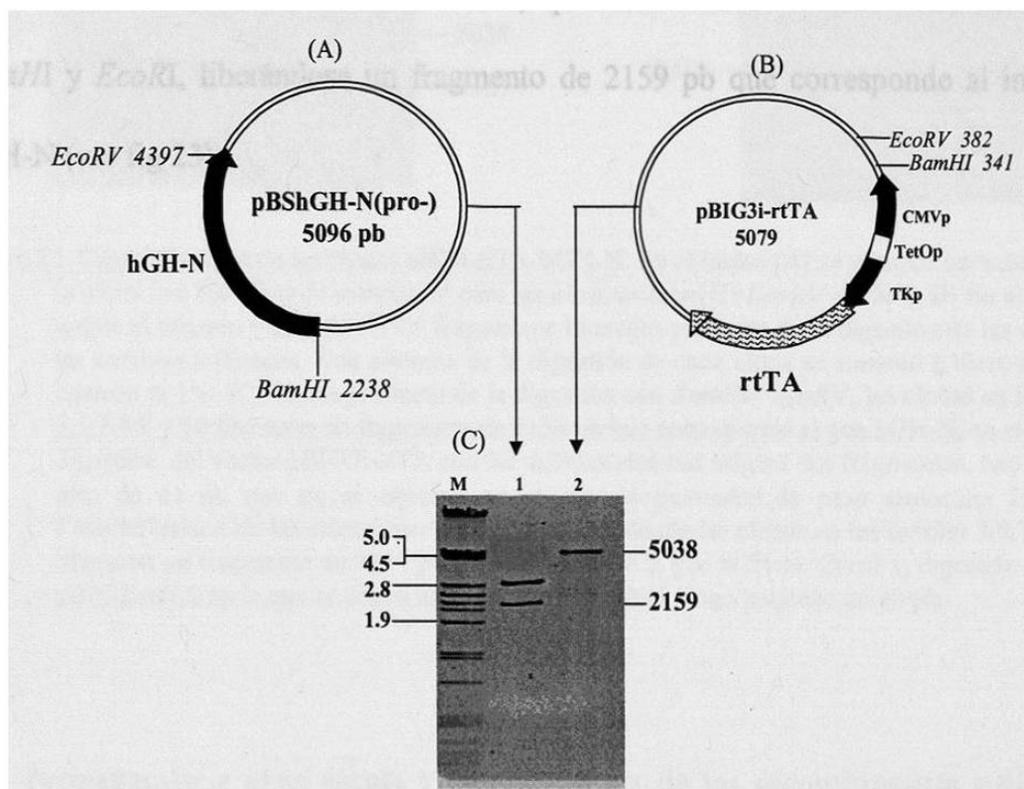


Figura 22. Digestión de la clona pBS-hGH-N(pro-) y el vector de clonación pBIG3i-rtTA. En A y B se muestra un esquema de ambos vectores con la ubicación de los sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Eco*RV. (C) .-Una alícuota de la digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, en el carril 1, producto de la digestión de la clona pBShGH-N(pro-) se liberó un fragmento de 2159 pb que corresponde al gen hGH-N, en el carril 2 como producto de la digestión del vector pBIG3i-rtTA se obtuvieron dos fragmentos uno de 5038 y otro de 42 pb. M= marcador de peso molecular  $\lambda$ PstI.

### **4.2.3 Ligación de la unidad transcripcional del gen hGH-N en el vector pBIG3i-rtTA y transformación de *E. coli* (cepa TOP 10 F')**

El fragmento de 2159 pb que corresponde a la unidad transcripcional de hGH-N y el de 5038 pb correspondiente al vector pBIG3i-rtTA se purificaron y se ligaron. Con los productos de la ligación se realizó la transformación de bacterias (cepa TOP 10 F').

### **4.2.4 Caracterización de clonas pBIG3i-rtTA-hGH-N**

Se obtuvieron en total 10 clonas, que fueron caracterizadas con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI, liberándose un fragmento de 2159 pb que corresponde al inserto de hGH-N (ver fig 23).

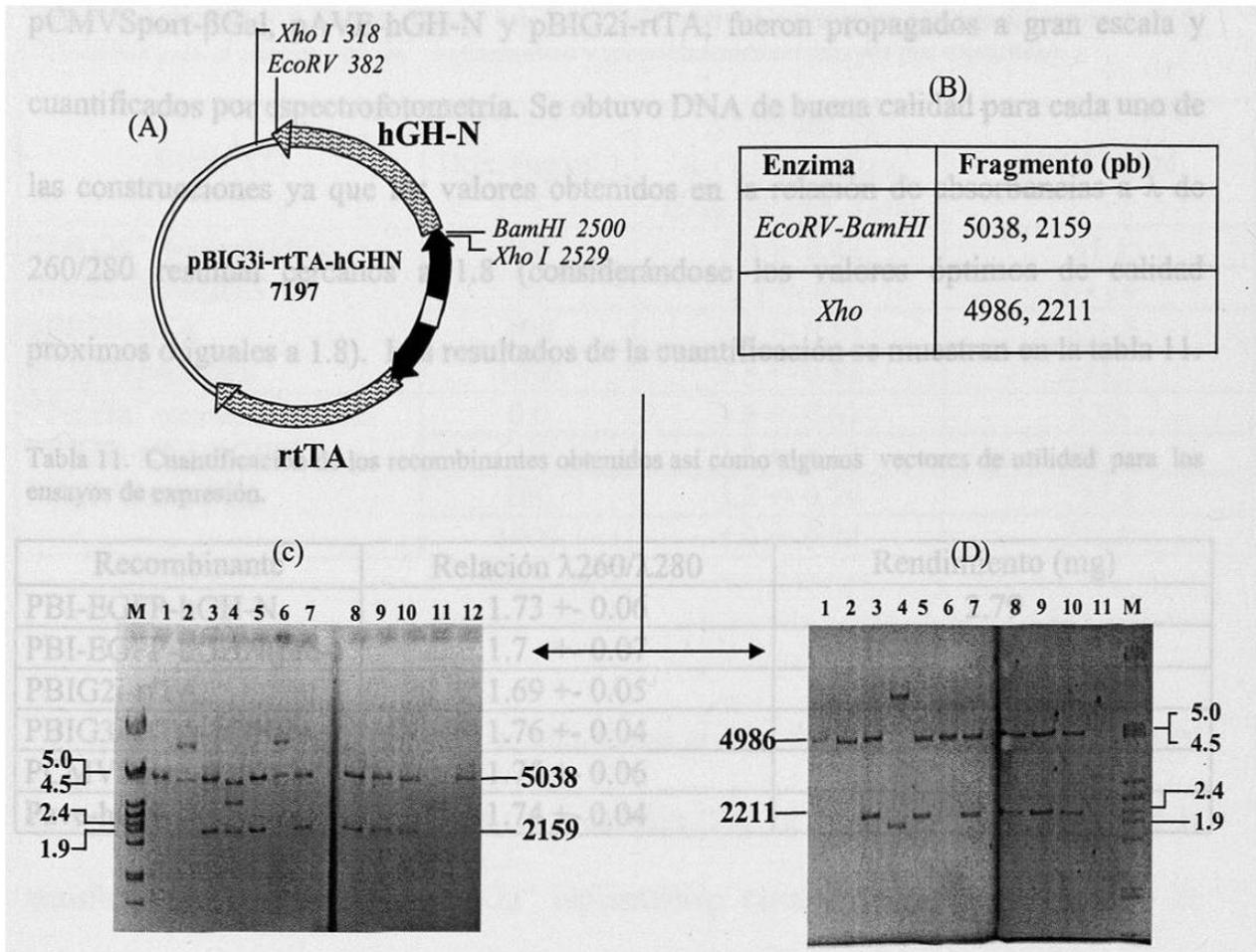


Figura 23. Caracterización de las clonas pBI3i-rtTA-hGH-N. En el inciso (A) se muestra un esquema de la clona con los sitios de restricción para las enzimas *BamHI*+*EcoRV* y *Xho* I. B) En el cuadro se indica el número y tamaño de los fragmentos liberados producto de la digestión de las clonas con las enzimas utilizadas. Una alícuota de la digestión de cada clona se sometió a electroforesis en agarosa al 1%. (C) Como producto de la digestión con *BamHI*+*EcoRV*, las clonas en los carriles 3,5,7,8,9 y 10 liberaron un fragmento de 2159 pb que corresponde al gen hGH-N, en el carril 1 la digestión del vector pBIG3i-rtTA con las mismas enzimas origina dos fragmentos, uno de 5038 y otro de 41 pb que no se observa en el gel. M=marcador de peso molecular  $\lambda$ PstI.. (D) Caracterización de las clonas con la enzima *Xho* I, donde las clonas en los carriles 3,5,7,8,9 y 10, liberaron un fragmento de 2211 pb que corresponde la gen hGH-N. Carril 1, digestión del vector pBIG2i-rtTA en la que se liberó un fragmento de 4986 y uno pequeño de 89 pb.

### 4.3 Propagación a gran escala y cuantificación de los recombinantes pBI-EGFP-hGH-N y pBIG3i-rtTA-hGH-N.

Con la finalidad de obtener DNA de alta calidad para los estudios de expresión, los recombinantes pBI-EGFP-hGH-N y pBIG3i-rtTA-hGH-N, así como los vectores

pCMVSPORT-βGal, pAVE-hGH-N y pBIG2i-rtTA, fueron propagados a gran escala y cuantificados por espectrofotometría. Se obtuvo DNA de buena calidad para cada uno de las construcciones ya que los valores obtenidos en la relación de absorbancias a  $\lambda$  de 260/280 resultan cercanos a 1.8 (considerándose los valores óptimos de calidad próximos o iguales a 1.8). Los resultados de la cuantificación se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Cuantificación de los recombinantes obtenidos así como algunos vectores de utilidad para los ensayos de expresión.

Recombinante	Relación $\lambda$ 260/ $\lambda$ 280	Rendimiento (mg)
PBI-EGFP-hGH-N	1.73 +- 0.06	2.79
PBI-EGFP-hGHN(pro-)	1.7 +- 0.07	1.75
PBIG2i-rtTA	1.69 +- 0.05	3.05
PBIG3i-rtTA-hGH-N	1.76 +- 0.04	1.5
PCMVSport-Bgal	1.75 +- 0.06	3.8
Pave-hGH-N	1.74 +- 0.04	1.6

#### 4.4 Expresión de HGH y β-galactosidasa en células GC

Se cotransfectaron en paralelo los recombinantes que constituyen al sistema “tet On” biplasmídico (recombinantes pBI-EGFP-hGH-N y pBIG2i-rtTA) y el sistema “tet On” monoplasmídico (recombinante pBIG2i-rtTA-hGH-N), con el vector pCMVSPORT-βGal. Se determinó la eficiencia de transfección para cada ensayo por actividad de β-galactosidasa, normalizada por  $\mu$ g de proteína. Se obtuvieron valores muy similares en ambos ensayos. Así mismo, en relación a la proteína reportera (HGH) los valores obtenidos se incrementaron desde 31.1 hasta 253.5 ng/ml en el caso del sistema “tet On” biplasmídico y de 33.5 hasta 255.9 ng/ml para el sistema “tet On” monoplasmídico, conforme se aumentó la dosis de doxiciclina (ver tabla 12).

Tabla 12. Actividad de  $\beta$ -Galactosidasa y valores de HGH obtenidos por inducción con diferentes dosis de doxiciclina para el sistema "tet On" biplasmídico y monoplasmídico (ensayos por triplicado).

ENSAYO	Dox. (ng/ml.)	Actividad de $\beta$ -Galactosidasa U/ $\mu$ g de prot. Total	HGH ng/ml
"Tet On" biplasmídico pBI-EGFP-hGHN pBIG2i-rtTA pCMVSPORT- $\beta$ gal	0.0	2.9 +- 0.42	31.1
	10	3.1 +- 0.5	69.14
	100	3.5 +- 0.58	151.5
	1000	3.3 +- 0.51	253.5
"Tet On" monoplasmídico PBIG3i-rtTA-hGHN PCMVSport- $\beta$ gal	0.0	3.8 +- 0.61	33.5
	10	3.3 +- 0.53	88.7
	100	3.2 +- 0.29	237.1
	1000	4.0 +- 0.72	255.9

Dado que en estos ensayos se obtuvieron niveles de HGH basales de 32.3 ng/ml en promedio para ambos sistemas sin inducción (0.0 ng de doxiciclina), se realizó la transfección de un sistema "tet On" biplasmídico carente del promotor mínimo de Citomegalovirus, para ver si se disminuían los valores basales, lo cual se logró (ver tabla 13).

Tabla 13. Actividad de  $\beta$ -Galactosidasa y niveles de expresión de HGH basales obtenidos con el sistema "tet-On" biplasmídico carente del promotor bidireccional regulable por doxiciclina.

ENSAYO	Dox. (ng/ml)	Actividad de $\beta$ -Galactosidasa U/ $\mu$ g de prot. Total	HGH ng/ml
pBI-EGFP-hGHN(pro-) pBIG2i-rtTA pCMVSPORT- $\beta$ gal	0.0	2.9 +-0.38	0.034
	10	3.6 +-0.53	0.082
	100	3.6 +-0.36	0.061
	1000	3.0 +-0.48	0.045

Como control positivo de expresión de HGH fué utilizado el vector pAVE-hGHN, el cual tiene la unidad transcripcional de hGH bajo la regulación del promotor nativo del Citomegalovirus humano. Este vector se cotransfectó con los vectores

pBIG2i-rtTA y pCMVSPORT-βGal. Se obtuvieron en promedio niveles de expresión de HGH de 41.7 ng/ml y se observó que éstos niveles no se afectaron por dosis crecientes de doxiciclina en presencia de la proteína transactivadora. Por otro lado, en el caso del control negativo (sin transfección de DNA) no se detectó actividad de β-galactosidasa ni HGH (ver tabla 14).

Tabla 14. Valores de actividad β-galactosidasa y concentración de HGH obtenidos con cada uno de los controles utilizados en el ensayo de transfección.

ENSAYO	Dox. (ng/ml)	Actividad de β-Galactosidasa U/μg de prot. Total	HGH ng/ml
(C +) pAVE-hGH-N pBIG2i-rtTA pCMVSPORT-βgal	0.0	2.0 ±0.63	42.0
	10	1.6 ±0.38	32.0
	100	2.2 ±0.42	52.8
	1000	2.0 ±0.72	40.0
C –Sin transfección	1000	0.0	0.0

## CAPITULO V

### DISCUSIÓN

El gen hGH-N es uno de los miembros del complejo génico hGH-hPL mas ampliamente caracterizado. Con la finalidad de producir la hormona codificada por éste y dado su importancia farmacéutica, se han utilizado diferentes sistemas de expresión.

El sistema “tet”, a diferencia de otros sistemas en los que ha sido producida la hormona, ofrece la ventaja de que además de producirse tanto *in vitro* como *in vivo*, puede regular sus niveles de expresión suministrando ya sea al medio o por vía oral según sea el caso, pequeñas dosis de antibiótico.

El sistema posee promotores heterólogos que permiten la expresión del gen de interés en un amplio número de líneas celulares; incluyendo a la línea celular GC. Esto nos permitió establecer un sistema de expresión de HGH regulable por doxiciclina en células de hipófisis.

Una vez que los recombinantes fueron transfectados se determinó la eficiencia de transfección por actividad de  $\beta$ -galactosidasa para cada ensayo, obteniéndose en

promedio 3.3 U de  $\beta$ -galactosidasa/ $\mu$ g de proteína total. Estos valores nos indican que los recombinantes fueron transfectados de un manera eficiente y uniforme. En relación a los niveles de expresión de HGH, estos se ven incrementados significativamente conforme se aumenta la dosis de doxiciclina en concentraciones que van desde 32 ng de HGH en el estado no inducido (expresión basal) hasta 255 ng en el estado inducido (1.0  $\mu$ g de doxiciclina), indicándonos con ésto que el sistema regula eficientemente la expresión del gen hGH-N.

Algunos estudios en los que se han expresado diferentes genes utilizando el sistema “tet Off” han reportado niveles de inducción que van desde 5 hasta 10 veces con respecto a los niveles de expresión basales. En el caso del sistema “tet On”, se han reportado niveles de inducción de casi 10 veces en la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) (Jaworski y cols., 2000) y de hasta 13.5 veces para la  $\alpha$ -lactoalbúmina recombinante de ratón (Souliey y cols., 1999).

Nuestros resultados indican niveles de expresión de HGH que superan hasta en 7 veces a los niveles basales obtenidos coincidiendo con los ya reportados, aunque se tienen antecedentes de que los niveles de expresión de un gen determinado, ya sea bajo la regulación del sistema “tet Off” o “tet On”, pueden ser afectados por el tipo celular utilizado (Ackland-Berlung, 1995), por lo que queda pendiente ensayar estas construcciones en otras líneas celulares.

En nuestro estudio se obtuvieron niveles de expresión basales de 32 ng de HGH en promedio para ambos sistemas, lo cual también se ha mencionado en otros trabajos (Howe y cols., 1995). Sin embargo con la finalidad de disminuir este efecto y corroborar si los niveles de expresión se debían a la fuerza del promotor mínimo del Citomegalovirus, se transfectó un recombinante que carece del mismo y los niveles de HGH obtenidos se disminuyeron prácticamente a niveles de cero.

Hay un único estudio en que se ha expresado el gen hGH-N en el sistema "tet Off" utilizando la línea celular NIH3T3 y en el cual los niveles de expresión de HGH reportados fueron aproximadamente de 100 ng/ml, obtenidos por un tiempo de inducción de 24 h (Sturtz y cols., 1998). En el presente estudio se logró la detección de hasta 250 ng/ml de HGH por un tiempo de inducción de 48 h en el sistema "tet On" y la línea celular GC.

Estos resultados nos indican que ambos sistemas generan niveles de expresión de HGH muy similares, sin embargo el hecho de que el sistema "tet On" se encienda únicamente cuando se adiciona doxiciclina pudiese representar una ventaja sobre el sistema "tet Off" que se apaga cuando el antibiótico está presente, evitando así suministrar de manera permanente el antibiótico. Fue por ello que en este trabajo se construyó un plásmido que integra al transactivador y al gen de interés con la finalidad de hacer más eficiente al sistema "tet On" y simplificar su manipulación. Cuando comparamos el sistema "tet On" en sus dos versiones (sistema "tet On" biplasmídico y sistema "tet On" monoplasmídico) detectamos niveles de expresión de HGH muy similares y por lo tanto no encontramos diferencias significativas. No obstante, la

generación de un sistema "tet On" integrado en un solo plásmido facilitó los ensayos de expresión, disminuyendo el número de plásmidos en la cotransfección minimizando así el riesgo de toxicidad celular por altas concentraciones de DNA.

Este trabajo sienta las bases para estudiar los efectos de HGH modulando su expresión de manera que no se produzca constitutivamente, sino en periodos determinados por la adición del antibiótico. La producción de hormona de crecimiento bajo un sistema de encendido y apagado, controlado según las necesidades de la investigación facilitará esclarecer los mecanismos de acción de la proteína sobre muchos procesos celulares, pudiendo incluso tal vez aspirar a reproducir las fluctuaciones de su producción durante las diferentes etapas del desarrollo, así como facilitar las investigaciones sobre su potencial regenerativo sobre tejidos dañados y/o derivados de personas de edad avanzada.

Además este sistema tiene la ventaja de que puede ser utilizado tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que con la introducción de pequeñas modificaciones en el mismo puede generarse expresión tejido específica ya sea de hGH o de otros genes heterólogos; permitiendo a la vez regular los niveles de expresión encendiendo a apagando el sistema con el antibiótico doxiciclina.

## **CAPITULO VI**

### **CONCLUSIONES**

- 1.-Se logró establecer un sistema de expresión de HGH regulable por doxiciclina.
- 2.-Los niveles de expresión basales de HGH obtenidos sin utilizar inductor se deben al efecto o fuerza del promotor mínimo de hCMV.
- 3.-Los niveles de expresión de HGH entre el sistema “tet On” biplasmídico y el sistema “tet On” monoplasmídico, son muy similares.
- 4.-La concentración de HGH utilizando la máxima concentración del inductor (1000 ng de Doxiciclina) es 7 veces más altos que los derivados del estado no inducido (0.0 ng de Doxiciclina).

## REFERENCIAS

- Ackland-Berlung and Leib ,A.D., (1995).Efficacy of tetracycline controlled gene expression is influenced by cell type., *BioTechniques*. 18:196-200.
- Barrera-Saldaña H.A (1998) Growth hormone and placental lactogen: biology, medicine and biotechnology. *Gene*. 211: 11-18
- Bradford, M.M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Benveniste, R., Stachura, M.E., Szabo, M., Frohman, L.A. (1975) Big growth hormone (GH): conversion to small GH without peptide clavaje. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41:422-125.
- Camacho, V.O., Mannucci, L., Amaldi, F., (1998). Construction of *Xenopus* (B3.2) and human (HeLa) cell lines expressing the tetracycline-controlled transactivator (tTA) *In vitro cell Dev, Biol. Animal.*, 34:14-15.
- Carrol, M.J. and Taichman, B.L. (1992) Characterization of the human involucrin promoter using a transient  $\beta$ -galactosidase assay. *J. of Cell Science*. 103: 925-930.
- Castrillo, D.J.L., Barrera-Saldaña, H. (1998) Proyecto genoma humano en la UANL: Parte IV: El gen hGH-N y su regulación hipofisaria. 1(4):333-338.
- Cell Culture Catalogue. (1996). SIGMA BIO-SCIENCES
- Chawla, R.K., Parks, J.S., and Rudman, D., (1983) Structural variants of human growth hormone. Biochemical, Genetics and Clinicals Aspects. *Ann. Rev. Med.* 34:519-547.
- Chen, E., Yu -Cheng-Liao., Smith, H.D., Barrera-Saldaña, HA., Gelinas, E.R., and Seeburg, H.P., (1989)., The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology and evolution. *Genomics*: 479-497
- Clewell, D.B., Helsinki, D.R., (1972) Purification of closed circular DNA by equilibrium centrifugation in CsCl-ethidium bromide gradient. *J. Bacteriol.* 110:1135

- Cooke, E.N., Ray, J., Emery, G.J., and Lieghaber, A.S., (1987). Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone preproteins. *J. Clin. Invest.* 80(12):3001-3006.
- Cooke, E.N., Ray, J., Watson, A.M., Estes, A.P., Kuo, A.B., and Lieghaber, A.S., (1988). Human Growth hormone gene and the highly homologous growth hormone variant gene display different splicing patterns. *J. Clin. Invest.* 82: 270-275.
- Cuortois, S.J., Lafontaine, D.A., Durvieux, S.M., Rousseau, G.G. (1990) Nuclear factor-1 and activator protein-2 bind in a mutually exclusive way to overlapping promoter sequences and *trans*-activate the human growth hormone gene. *Nucleic Acids Res.* 18:57.
- De Noto, F.S., Moore D.D., Goodman, H.M., (1981). Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 9:3719-3723.
- Escamilla, T.L., (1996) Biosíntesis de la hormona del crecimiento humano recombinante (HGHr) en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. U.A.N.L.
- Eustice, D.C., Feldman, P.A., Colberg-Poley, A.M., Buckery, R.M., and Neubauer, R.H., (1991) A sensitive method for the detection of  $\beta$ -Galactosidase in transfected mammalian cells. *Biotechniques.* 11(6):739-742.
- Foecking, M.K., and Hofstetter, H., (1986) Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene.* 45:101-105.
- Frankenne, F., Scippo, M.L., Van Beeumen, J., Igout, A. and Hennen, G. (1990). Identification of placental human growth hormone as the growth hormone-V gene expression product. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 71:15-18.
- Furth, A.P., Onge, St. L., Böger, H., Gruss, P., Gossen, M., Kistner (1994). Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc. Natl. Acad. USA.* 91:9302-9306.
- Fishman, I.G., Kaplan, L.M., and Buttrick, M.P., (1994). Tetracycline-regulated cardiac gene expression *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, 93:1864-186
- Goffin, V., Shiverick, K.T., Kelly, P.A., and Martial, J.A. (1996). Sequence function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen and related proteins in mammals. *Endocrinology.* 137(4):385-410.

- Goeddel, D.V., Heyneker, H.L., Hozumi, R., Itajura, k., Yansura, D.G. (1979) Direct expresión in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature*. 281: 544-548
- Gossen, M., Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:5547-5551.
- Gossen, M., Bonin, A.L., Bujard, H.(1994) Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokariotic regulatory elements. *Trends Biotechnol.* 12:58-62
- Gossen, M and Bujard, H. (1995), Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type : Comentary. *BioFeedback*. 19:155-15
- Gossen, M., Freunlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W., Bujard, H., (1995). Transcriptional activation by tetracycline in mammalian cells. *Science*. 268:1766-1769-
- Harper, M.E., Barrera-Saldaña, H.A., Gelinas, R.E., and Saunders, G.F. (1982) Chromosomal Localization of the human placental lactogen growth hormone gene cluster to 17q22-24. *Am. J. Human Genetic*. 34:227-234
- Hay, R, et al, (1992). Catalogue for CELL LINES AND HYBRIDOMAS. 7nd ED. American Type Culture Collection.
- Howe, R.J., Skryabin, V.B., Belcher, M.S., Zerillo, A.C., and Schmauss, C., (1995). The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines. *The J. of Biological Chemistry*. 23:14168-14174.
- Huang, C.J., Spinella, F., Nazarian, R., Lee, M.M., Dopp, J.M. and Vellis, j. (1999) Expression of green fluorescent protein in oligodendrocytes in a time and level controllable fashion with a tetracycline regulated system. *Mol. Med*. 5(2):129-137.
- Instruction Manual, (1989). Cat. No. 1-585-878. Colorimetric enzyme immunoassay for the quantitative determination of secreted human growth hormone (hGH). Boehringer Mannheim, pp1-15.
- Instruction Manual. (1995). Cat. No. 18324-012. Lipofectamine™ Reagent. Gibco-BRL, p1-2.
- Jaworski, J., Figiel, I., Proszynski, T., Kaczmarek, L. (2000) Efficient expression of tetracycline responsive gene after transfection of dentate gyrus neurons in vitro. *J. Neurosci. Res*. 60(6):754-60.

- Juárez, A.E., Castro, M.F. (1995). 22kDa and 20 kDa hGH isoforms show differential effects when assayed in 3T3-F442A and 3T3-F442A/C4 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 217:28-33.
- Lecomte, C.M., Renard, A. (1987) A variant of 17.5 kDa produced by alternative splicing. An additional consensus sequence which might play a role in branchpoint selection. *Nucleic Acids Res*. 15:6331-6348.
- Lemaigre, F.P., Courtois, S.J., Lafontaine, D.A., Rousseau, G.G. (1989) Evidence that the upstream stimulatory factor, the Sp-1 transcription factor bind *in vitro* to the promoters of the human growth hormone gene. *Eur. J. Biochem*. 181:555.
- Lemaigre, P.F., Lafontaine, A.D., Courtois, J.S., Durvieux, M.S. and Rousseau, G.G., (1990) Sp1 Can Display GHF-1 From Its Distal Binding Site and Stimulate Transcription From the Growth Hormone Gene Promoter. *Molecular and Cellular Biology*. 10:1811-1814.
- Lewis, U.J., Dunn, J.T., Bonewald, L.F., Seavey, B.K., and Vanderlaan, W.P. (1978) A naturally occurring structural variant of human growth hormone. *J. Biol. Chem*. 253:2679-2687.
- Lewis, U.J., Singh, R.N., Tutwiler, G.F., Sigel, M.B., Vanderlaan, E.F. (1980) Human growth hormone: A complex of proteins. *Rec. Progr. Horm. Res*. 36:477-508.
- MacLeod, J.N., Lee, A.K., Liebhaber, S.A., Cooke, N.E., (1992) Developmental control and alternative splicing of the placentally expressed transcripts from the human growth hormone gene cluster. *J. Biol Chem*. 267:14219-14226.
- Magalani, A., Ferrari, F., Savoldi, G., Ingrassia, R., Albertini, A., Pollio, G., Patrone, C., Maggi, A. and Lorenzo Di. D., (1995), Specificity of action of a herpes virus VP16/tetracycline-dependent *Trans*-activator in mammalian cell cultures. *DNA and Cell Biology*. 14:665-671.
- Martínez-Torres, A. (1992). Expresión en *Escherichia coli* de las hormonas del crecimiento humano y bovino en fusión con la proteína de unión a la maltosa. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. U.A.N.L.
- Mayo, E.K., Warren, R., Palmiter, R.D. (1982) The mouse metallothionein I gene is transcriptionally regulated by cadmium following transfection into human or mouse cells. *Cell* 29:99-108.
- Murria, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, V.W. (1997). Bioquímica de Harper. 10ª Ed., Manual Moderno, S.A. de C.V., Mex. Cap. 45. pp609-629.
- Nachtigal, W.M., Nickels, E.B., Cattini, A.P., (1993). Pituitary-Specific Repression of Placental Members of the Human Growth Hormone Gene Family. *Molecular and Cellular Biochemistry*. *J Biol Chem*. 25;268(12):8473-9.

- Nickel, E.B., Nachtigal, W.M., Bock, E.M. and Cattini, A.P. (1991). Differential binding of rat pituitary-specific nuclear factors to the 5' flanking region of pituitary and placental members of the human growth hormone gene family. *Molecular and Cellular Biochemistry* 106:181-187.
- Nickel, B.E., Cattini, P.A. (1996) Nucleasa sensitivity of the human growth hormone-chorionic somatomammotropin locus in pituitary and placenta suggest different mechanisms for tissue-specific regulation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 118(1.2):155-162.
- Ortíz, L.R. (1992) Obtención de líneas celulares productoras de las isoformas de 20 y 22 K de la hormona del crecimiento humano. Tesis de Maestría. U.A.N.L.
- Paladini, A., Pea, C., and Poskus E. (1982). Molecular biology of growth hormone. *JGR. Hurrel.* 15:25-56.
- Peritz, L.N., Fodor, E.J., Silversides, D.W., Cattini, P.A., Baxter, J.D., Eberhardt, N.L. (1988) The human growth hormone gene contains both positive and negative controls elements. *J. Biol. Chem.* 263-5005-5010.
- Ramírez, S.R., Reséndez, P.D., Alvidrez, Q.L., Varela, M.R., Martínez, R.H.G., and Barrera-Saldaña, H.A., (1990) New vector the efficient expression of mammalian genes in cultured cells.
- Rossi, M.V. and Blau, M.H. (1998) Recent advances in inducible gene expression systems. *Current Opinion in Biotechnology.* 9:451-456.
- Rotwein, P., and Kajimoto, Y. (1991). Evolution of the insulin-like growth factor I gene: conservation of structure and function. Modern concepts of insulin-like growth factors. *Elseviers Science Publishing, Co, Inc.*
- Saez, E., No., D., West, A., and Evans. M.R. (1997) Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Current Opinion in Biotechnology.* 8:608-616.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., (1989). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schultze, N., Burki, Y., Lang, Y., Certa, U., and Bluethmann, H., (1996). Efficient control of gene expression by single step integration of the tetracycline system in transgenic mice. *Nature Biotechnology.* 14:499-503.
- Schwarzeler, P., Untergasser, G., Herman, M., Dirrhofer, S., Abendsyein, B., Modersbacher, S., and Berger, P. (1997) Selective growth hormone /placental lactogen transcription and hormone production in pre- and postmenopausal human ovaries. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 82:3337-3341.

- Shockett, P., Difilipantonino, M., Hellman, N., and Schatz G.D., (1996) A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:6522-6526.
- Soulier, S., Stinnakre, M.G., Lepourry, L., Mercier, J.C., Vilotte, J.L. (1999) Use of doxycycline controlled gene expression to reversibly alter milk protein composition in transgenic mice. *European Journal of Biochemistry.* 260(2): 533-539.
- Sturtz, G.F., Cioffi, L., Wittmer, S., Sonk, J.M., Shafer, A., Li, Y., Leeper, J.N., Gbur, S.J., Shulok, J., Platika, D. (1998) Tetracycline regulatable expression vectors tightly regulate in vitro gene expression of secreted proteins. *Gene.* 221:279-285.
- Thompson, R., Rodríguez, A., Kowarski, A., Blizzard, R.M. (1972) Growth hormone. *J. Clin. Invest.* 51:3193-3199.
- Untergasser, G., Kranewitter, W., Schwaerzier, O., Madersbacher, S., Dirnhofer, S., Berger, P. (1997) Organ-specific expression pattern of the human growth hormone /placental lactogen gene cluster in the testis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 130:53-60.
- Walker, H.W., Susan, L., Fitzpatrick, L.S., Barrera-saldaña, H.A. Resendez, P.D. and Sauders, F.G.(1986) The Human Placental Lactogen Genes: Structure, Function Evolution and Transcriptional Regulation.
- Wallis, M. (1980) Growth hormone: deletions in the protein and introns in the gene. *Nature* 284:512.
- Watahiki, M., Yamamoto, M., Yamakawa, M., Tanaka, M., Nakashima, K., (1989). Conserved and unique amino acid residues in the domains of the growth hormones. *J. Biol. Chem.* 264:312-316.
- Yuang, W.U. and Cheng-Ming Chiang. (1996). Establishment of stable Cell lines expressing potentially toxic proteins by tetracycline-regulated and epitope-tagging methods. *Biotechniques.* 21:718-725.

## **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

Hipólito Castillo Ureta

Candidato para el grado de  
Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología  
Molecular e Ingeniería Genética

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

**Campo de estudio:** Biología Molecular

### **Biografía:**

Datos personales: nacido en Culiacán, Sinaloa; el 13 de Agosto  
de 1969, hijo de Carmelo Castillo Medina y Josefa Ureta Montoya.

**Educación:** Egresado de la Universidad Autónoma de Sinaloa, grado obtenido  
Licenciado en Biología con Especialidad en Biología Experimental.

## **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

Hipólito Castillo Ureta

Candidato para el grado de  
Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología  
Molecular e Ingeniería Genética

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

**Campo de estudio:** Biología Molecular

### **Biografía:**

Datos personales: nacido en Culiacán, Sinaloa; el 13 de Agosto  
de 1969, hijo de Carmelo Castillo Medina y Josefa Ureta Montoya.

**Educación:** Egresado de la Universidad Autónoma de Sinaloa, grado obtenido  
Licenciado en Biología con Especialidad en Biología Experimental.

## Anexo 1

### MGH-N (Región promotora proximal)

CTGACATCCTTCTCCGCGTTCAGGTTGGCCACCATGGCCTGCGGCCAGAGGGCACCCACGTGACCCTTAAAGAGAGGAC  
AAGTTGGGTGGTATCTCTGGCTGACACTCTGTGCACAACCTCACAACACTGGTGACGGTGGGAAGGGAAAGATGACAA  
GCCAGGGGGCATGATCCCAGCATGTGTGGGAGGAGCTTCTAAATTATCCATTAGCACAAGCCCGTCAGTGGCCCCATGC  
ATAAATGTACACAGAAACAGGTGGGGCAACAGTGGGAGAGAAGGGGCCAGGTATAAAAAGGGCCCACAAGAGACCAGC  
TCAA

### MGH-V (Región promotora proximal)

CTGACATCCTTCCCCGTTTCAGGTTGGCCACCATGATGTGCTGCCAGAGGGCACCCACCTGCTCCTTAAAGAGAGGAC  
AAGTTGGGTGGTATCTCTGGCCGACACTCTGTGCACAACCTTACGATGCTGGTAACGGTGAGAAGGGAAAGATGACAA  
GCCAGGGGGCATGATCCCAGCATGTGTGGGAGGAGCTTCTAAATTAGCCATTAGCACAGGTACATCAGTGGCCCCATGT  
GTAAACGTACAGAGAAATAGGTGGGGTCAAGCAGCAAGAGATAAGGGGCCAGGGTATAAAAAGGGCCCACAAGAGACCA  
GCTCCA

### Mapp12 (Región promotora proximal)

CTGACATCCTTCCCCGTTTCAGGTTGGTACCATGATGTGCTGCCAGAGGGCACCCACCTGCTCCTTAAAGAGAGGAC  
AAGTTGGGTGGTATCTCTGCCGACACTCTGTGCACAACCTTACGATGCTGGTAACGGTGAGAAGGGAAAGATGACAAG  
CCAGGGGGCATGATCCCAGCACGTGTGGGAGGAGCTTCTAAATTAGCCATTAGCACAGGTACATCAGTGGCCCCATGCG  
TAAACGTACAGAGAAATAGGTGGGGTCAAGCAGCAAGAGATAAGGGGCCAGGGTATAAAAAGGGCCCACAAGAGACCCG  
CTCCACC

### Mapp14 (Región promotora proximal)

CTACATCCTTCCCCACGTTTCAGGTTCCACCATGGCGTGCTGCCAGAGGGACCCACCTGACCCTTAAAGAGAGGACAG  
GTTGGGTAGTATCTCTGCCTACACTCTGGGACAACCTCACAATGCTAGTGACGATGGGAAGAGAAAGATGACAAGTCA  
GGGGCATGATCCCAGCATGTATGGGAGGACTTCTAAATTATCCATTAGCACAGGCACGTGAGTACGTACAGAGAAAC  
AAGTGGGGTCAAGCAGCGAGAGATAAGGGGCCAGGATATAAAAAGGGCCCACAAGAGACCAGCTCC

### Mappc6 (Región promotora proximal)

CTGACATCCTTCCCCACGTTTCAGGTTGGCCACCATGGCGTGCTGCCAGAGGACACCCACATGACCCTTAAAGAGAGGAC  
AAGTTGGGTGGTATCGCTGGCTGACCCTCTGCACAACCTCACAATATTTGGTGACCGTGGGAAGGGAAAGATGACAACC  
CAGGGGGCATGATCCCAGCATGTGTGGGAGGAGTTTCTAAATTAGCCACTAGCACAGGCACGTGAGGCCCATGCGTAA  
ACGTACAGAGAAATAGGCGGGGTCAAGCAGCAAGAGATAAGGGGCCAGGGTATAAAAAGGGCCCACAAGAGACCAGCTC  
CA

### Mappc2 (Región promotora proximal)

CTCACATCCTTCCCCACGTTTCAGGTTGGCCACCATGCGTGCTGCCAGAGACACCCACATGACCCTTAAAGAGAGGACAAGT  
TGGGTGGTATCGCTGGCTGACCCCTGCACAACCTCACAATATTTGGCGACCGTGGGAAGGGAAAGATGACAACCCAGG  
GGCATGATCCCGCATGTGTGGGAGGAGTTTCTAAATTAGCCACTAGCACAGGCACGTGAGGGCCCCATGCGTAAACGTA  
CAGAGAAATAGGCGGGGTCAAGCAGCAAGAGATAAGGGGCCAGGTATAAAAAGGGCCCACAAGAGACCAGCTCCA

### Mvpp16 (Región promotora proximal)

CTGACATCCTTCCCCACGTTTCAGGTTGGCCACCATGGCGTGCTGCCAGAGGACACCCACATGACCCTTAAAGAGAGGAC  
AGGTTGGGTGGTATCGCTGGCTGACCCTCTGCACAACCTCACAATGTTGGTGACGGTGGGAAGGGAAAGATGCCAAGC  
CAGGGGGCATGATCCCAGCATGTGTGGGAGGAGTTTCTAAATTAGCCAGTAGCACAGGCACGTGAGTGGCACCATGCGT  
AGACGTACAGAGAAATAGGTGGGGTCAAGCAGCAAGAGATAACGGGCCAGAGTATAAAAAGGGCCCACAAGAGACCAGC  
TCCA

### Mvppc8 (Región promotora proximal)

CTGACATCCTTCCCCACGTTTCAGGTTGGCCACCATGGCGTGCTGCCAGAGGACACCCACATGACCCTTAAAGAGAGGAC  
AGGTTGGGTGGTATCGCTGGCTGACCCTCTGCACAACCTCACAATGTTGGTGACGGTGGGAAGGGAAAGATGACAAGC  
CAGGGGGCATGATCCCAGCATGTGTGGGAGGAGTTTCTAAATTAGCCAGTAGCACAGGCACGTGAGTGGCACCTGCGTA  
TACGTACAGAGAAATAGGCGGGGTCAAGCAGCAAGAGATAAGGGGCCAGGGTATAAAAAGGGCCCACAAGAGACCAGCT  
CCA

### Mvppc6 (Región promotora proximal)

CTGCCATCCTTCCCCACGTTTCAGGTTGGCCACCATGGCGTGCTGCCAGAGGACACCCACATGAACCTTAAAGAGAGGAC  
AGGTTGGGTGGTATCGCTGGCTGAACCTCTGCACAACCTCACAATGTTGGTGACGGTGGGAAGGGAAAGATGACAAGC  
CAGGGGGCATGATCCCAGCATGTGTGGGAGGAGTTTCTAAATTAGCCAGTAGCACAGGCACGTGAGTGGCCACCATGCG

TAAACGTACAGCGAAATAGGTGGGGTCAAGCAGCAAGAGATAACGGGCCAGAGTATAAAAAGGGCCCAAGAGACCAG  
CTCCA

**Mvpd17 (Región promotora distal)**

CTGACATCCTTCCCCGTGTTTCAGGTTGGTCACCATGATGTGCTGCCAGACGGGCCCCACCTGCTCCTTAAAGAGAGGAC  
AAGTTGGGTGATATCTCTGGCTGACAGTCTGTGCACAACCCCTCACAGTGTGGTGACGGTGGGAAGGGAAACATGACAA  
GCCAGGGGGCATGATCCCAGCATGTGTGGGGGACTTCTAAATTAGCCATTAGCACAGGCACGTGAGTGGCACCATGCAT  
AAACGTACAGAGAAAACAGGTGGGGTCAAGCAGGAGAGATAAGGGGCAGGGTATAAAAAGGGCCCAAGAGACCAGCTC  
CA

**Mapd13 (Región promotora distal)**

TGGAAGAAAGGGATAGGATAGAGAGTGGGATAGGGTCAGTATGGGTCTCAAGGACGGGCTATACTGATATCCTTCCCTG  
CGTTGAGGTTGGCCACCATGGCGTGCTGCCAGAGGGCACCCACCTTCTCCTTAAAGAGAGGACAAGTTGGGTGATATCT  
CTGGCTGACACTCTGTGCACAACCCACACAGTGTGGTGACGGTGGGAAGGGAAACATGACAAGCCAGGGGGCATGATG  
CCAGCATGTGTGGGAGGAGCTTCTAAATTAGCCATTAGCACAGGCACGTGAGTGGTCCCTATGCATAAACGTACAGAGAA  
ACAGGTGGGGTCAAGCAGCGAGAGATAAGGGGCTAGGGTATAAAAAGGGCCCAAAGAGACCACTCCAGGA

**Mapd11 (Región promotora distal)**

GATAGGATAGAGAGTGGGATGGGGTCTGTAGGGGTCTCGAGGACTGGCTATCCTGACATCCTTCCCCGTGTTTCAGGTTG  
GCCACCATGATGTGCTGCCAGAGGGCACCCACCTGCTCCTTAAAGAGAGGACAAGTTGGGTGGTATCTCTGGCCGACAC  
TCTGTGCACAACCTTACGATGCTGGTAACGGTGAGAAGGGAAAGATGACAAGCCAGGGGGCATGATCCCAGCATGTGT  
GGGAGGAGCTTCTAAATTAGCCATTAGCACAGGTACATCAGTGGCCCCATGCGTAAACGTACAGAGAAATAGGTGGGGT  
CAAGCAGCAAGAGATAAGGGGCCAGGGTATAAAAAGGGCCCAAGAGACCAGCTCC



