

18

TITULO: "EVOLUCION DE LAS REGIONES INTERGENICAS DEL LOCUS GH-PL EN LOS PRIMATES DEL VIEJO MUNDO".  
Q.F.B. Gloria Leticia Corrales F.

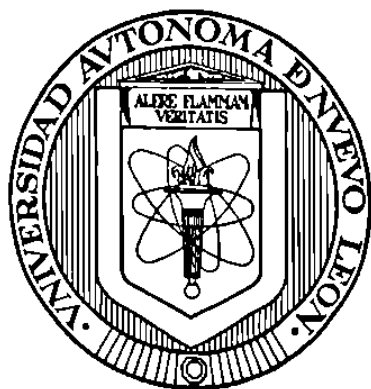
TM  
QL737  
.P9  
C6  
c.1



1080095023

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



EVOLUCION DE LAS REGIONES INTERGENICAS  
DEL LOCUS GH-PL EN LOS PRIMATES DEL VIEJO MUNDO

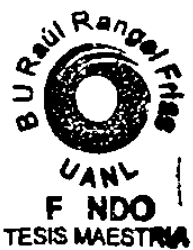
Por

Q.F.B. GLORIA LETICIA CORRALES FELIX

Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS  
Con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Diciembre del 2000

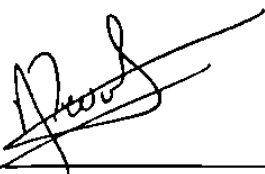
TM  
GL737  
.P9  
C6



El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL, bajo la dirección de la Dra. Agnès Revol de Mendoza y la co-dirección del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

**EVOLUCION DE LAS REGIONES INTERGENICAS DEL LOCUS GH-PL EN  
LOS PRIMATES DEL VIEJO MUNDO**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA**  
Director de Tesis



---

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



---

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



---

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

## AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y tecnología por el otorgamiento de la beca que me permitió realizar los estudios de posgrado.

Al Dr. Hugo A. Barrera por permitirme formar parte de la ULIEG, así como las sugerencias y comentarios para la realización de esta tesis.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Agnès Revol de Mendoza por el apoyo incondicional que me brindó durante el trabajo experimental, por las etapas difíciles en las cuales siempre me ayudó para seguir a delante y sobre todo por que siempre estuvo dispuesta en brindarme su ayuda.....MIL GRACIAS.

A la Dra. Herminia por sus comentarios oportunos y por el interés mostrado en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Luis Villarreal quién amablemente donó el DNA de macaco para la realización de este trabajo.

A la Dra. Ana M. Sifuentes por sus sugerencias oportunas en la realización de esta tesis, pero sobre todo por su amistad incondicional.

A la M.C. Dolores Esquivel por la secuenciación de las muestras y por que siempre estuvo dispuesta a ayudarme incondicionalmente.

Al M.C. Martín Canizales e Hipólito Castillo por haber proporcionado las construcciones para realizar los ensayos de hibridación.

A mi compañeros de Biología Molecular: Lulú, Ana, Lolita, Claudio y Rafael por la gran amistad, el apoyo que me brindaron, y por compartir momentos de alegría que fueron muy reconfortables.

A toda la generación que fue muy singular: LOS DOCE, Lulú, Clarisa, Nancy, Malena, Itzel, Polo, Sergio, Virgilio, Mauricio, Prisco, Aurelio por haber compartido una parte importante de nuestras vidas.

A los integrantes del grupo APA: Lulú, Clarisa, Marco, Adrián, Luis Miguel, Claudio por compartir momentos muy especiales que son inolvidables.

A toda la ULIEG: Iram, Sandra V, Irma, Edy, Martín, Iván, Celia, Paty, Hugo, Ale, Vicky, Raquel, Carmen, Sandra M., Andrés, Gerardo, Alma Rosa, Pablo, don Raúl, don Pedro, Daniel, Edu.



## **DEDICATORIA**

### **A DIOS**

#### **A MIS PADRES**

Por haberme enseñado las cosas buenas de la vida, por que a pesar de la distancia me apoyaron en todo momento, por su comprensión y amor.

#### **A MIS HERMANOS**

Mario, Sergio, Carmen, Israel, Francisco, Marlen, Judith, Joel  
Gracias por el apoyo que me brindaron y por que siempre confiaron en mí  
los quiero mucho.

#### **A MIS SOBRINOS**

Sergio Mario, Alberto, Mario, Yamiletzi, Carmen Leticia Marlen por todo  
su cariño.

#### **A MIS AMIGOS**

Águeda, Rocío, Cesar, Antonio, Diana que siempre estuvieron conmigo  
apoyándome, los recuerdo con mucho cariño, nunca los olvidaré.

### **Y**

A todas las personas maravillosas que conocí durante este periodo muy  
importante en mi vida.

<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>PAGINA</b>
<b>Tabla 1.</b> Condiciones de reacción para la PCR-Larga	29
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de digestión enzimática	30
<b>Tabla 3.</b> Condiciones estándar para la PCR de las regiones promotoras proximales	33
<b>Tabla 4.</b> Digestión de pBS-(SK +) con <i>Eco</i> RV	36
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de marcaje del primer	41
<b>Tabla 6.</b> Condiciones estándares para la PCR	41
<b>Tabla 7.</b> Condiciones estándar para la PCR del potenciador	53
<b>Tabla 8.</b> Tamaño de los productos amplificados de las regiones promotoras obtenidas por PCR	56

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>PAGINA</b>
<b>Figura 1.</b> Organización del locus hGH-hPL	6
<b>Figura 2.</b> Regulación específica de tejido de los genes hGH-hPL	10
<b>Figura 3.</b> Evolución del locus GH-PL	12
<b>Figura 4.</b> Evolución de los primates	14
<b>Figura 5.</b> Estrategia general	18
<b>Figura 6.</b> Estrategia para obtener las regiones intergénicas	27
<b>Figura 7.</b> Obtención por PCR de diferentes longitudes de las regiones promotoras	32
<b>Figura 8.</b> Estrategia general para realizar la clonación de las regiones promotoras	35
<b>Figura 9.</b> Amplificación de las regiones intergénicas por PCR	44
<b>Figura 10.</b> Caracterización de las regiones intergénicas de macaco	46
<b>Figura 11.</b> Caracterización de las regiones intergénicas cortas del mono verde	47
<b>Figura 12.</b> Amplificación de las regiones promotoras proximales	48
<b>Figura 13.</b> Caracterización de las regiones promotoras de macaco	49
<b>Figura 14.</b> Amplificación de las regiones intergénicas intermedias	50
<b>Figura 15.</b> Amplificación de las regiones promotoras distales	51
<b>Figura 16.</b> Identificación de las clonas recombinantes	54
<b>Figura 17.</b> Caracterización del inserto de las clonas obtenidas	55
<b>Figura 18.</b> Identificación de las secuencias potenciadoras	57
<b>Figura 19.</b> Identificación de las secuencias inhibidoras	58
<b>Figura 20.</b> Identificación de las secuencias Alu	59
<b>Figura 21.</b> Identificación de la secuencia Kpn	60
<b>Figura 22.</b> Comparación de los promotores	63
<b>Figura 23.</b> Construcción del árbol filogenético de las regiones promotora	64
<b>Figura 24.</b> Hipótesis sobre la organización del locus GH-PL en los monos del viejo mundo	72

## NOMENCLATURA

$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{M}$	Concentración micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
DNA	Acido desoxirribonucleico
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dNTPs	Desoxirribonucleosidos trifosfato
h	Horas
min	Minutos
mM	Concentración milimolar
ml	Mililitro
ng	Nanogramos
$\mu\text{l}$	Microlitros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	$-\log [\text{H}^+]$
s	Segundos
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
X	Veces la concentración
UV	Luz Ultravioleta
EDTA	Acido etilendiaminotetra-acético
Amp <sup>+</sup>	Gen para $\beta$ -lactamasa
$\beta\text{gal}$	Gen para $\beta$ -galactosidasa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
V	Voltios
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

GH	Hormona del crecimiento
PL	Lactogeno placentario
Conc.	Concentración
U	Unidades de enzima
cbp	Cuanto basta para
mQ	MiliQ
DO	Densidad óptica
PA	Producto amplificado
nm	Nanómetro

## RESUMEN

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

**Q.F.B. Gloria Leticia Corrales Félix**

**Título del estudio: EVOLUCION DE LAS REGIONES INTERGENICAS DEL  
LOCUS GH-PL, EN LOS PRIMATES DEL VIEJO MUNDO.**

**Número de páginas: 80**

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

**Objetivo y método del estudio:** La familia multigénica de la hormona de crecimiento (GH) y de los lactógenos placentarios (PL) constituye un modelo excelente para estudiar los mecanismos de regulación de la expresión génica, los eventos de duplicación y en general la evolución del genoma en primates. En el humano, cinco genes integran el locus GH-PL, de los cuales únicamente hGH-N se expresa en hipófisis, mientras que los tres PLs y hGH-V lo hacen en la placenta. Las regiones intergénicas del locus son de particular interés por incluir a los elementos responsables de la especificidad de expresión (inhibidor y potenciador) y elementos repetitivos Alu que fueron implicados en los procesos de duplicación. Hasta la fecha, poco se conoce acerca del locus GH-PL en otros primates.

Este trabajo se enfocó en obtener las regiones intergénicas de dos monos del viejo mundo (macaco y mono verde) por medio de PCR-Larga, además de inferir sobre la presencia en éstas de los elementos regulatorios y de las secuencias repetitivas Alu y Kpn. Para complementar el estudio se realizó una comparación de las regiones promotoras con el propósito de precisar las relaciones filogenéticas entre éstas e inferir sobre la evolución de la regulación.

**Conclusiones y contribuciones.** Por medio de PCR-Larga, se logró obtener cinco regiones intergénicas del locus GH-PL de los dos monos estudiados: siendo tres largas (~ 12000 pb) y dos cortas (~ 5000pb). Este resultado demuestra que a diferencia del humano, en los primates del viejo mundo el locus GH-PL consta de seis genes. Mientras que en las regiones intergénicas largas se encuentra presente únicamente el elemento iniciador, la secuencia inhibidora está en todas, por lo tanto, los elementos de regulación fueron adquiridos antes de la divergencia de los monos del viejo mundo, y los genes GH-PL en estas especies presentan ya la especificidad de expresión tisular.

Las secuencias Alu fueron evidenciadas en las regiones intergénicas del locus GH-PL del macaco y mono verde, mientras que no se encontró elemento Kpn, por lo tanto éste se introdujo después de la divergencia de los monos del viejo mundo.

Se clonaron y secuenciaron cinco regiones promotoras del locus GH-PL de ambos monos (faltando la del primer gen del locus). La comparación de éstas indicó claramente que surgieron por duplicaciones sucesivas, sin embargo estos eventos fueron independientes de los que participaron en la formación del locus humano. Este trabajo confirmó que el locus GH-PL constituye una región muy dinámica dentro del genoma de los primates y por lo tanto constituye un excelente modelo para estudios evolutivos.

---

Dra. Agnès Revol de Mendoza  
Asesor

---

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña  
Coasesor

# INDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>PAGINA</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	i
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ii
<b>NOMENCLATURA</b>	iii
<b>RESUMEN</b>	v

## **CAPITULO 1. INTRODUCCION**

1.1 Importancia de las secuencias repetitivas en el genoma eucariote	2
1.1.1 Las secuencias altamente repetitivas	2
1.1.2 Las familias multigénicas	4
1.2 El complejo multigénico GH-PL como modelo de estudio	5
1.2.1 Organización del locus hGH-hPL	5
1.2.2 Regulación génica de los genes del locus hGH-hPL	8
1.2.3 Evolución molecular del complejo GH-PL en primates	11
1.2.3.1 Hipótesis actual sobre la formación del locus hGH-hPL	11
1.2.3.2 El complejo GH-PL en primates	13
1.3 Justificación	16

## **CAPITULO II. OBJETIVOS**

2.1 Objetivo general	17
2.2 Objetivos específicos	17

## **CAPITULO III. ESTRATEGIA GENERAL**

## **CAPITULO IV. MATERIALES Y METODOS**

4.1	Material	19
4.1.1	Origen de los reactivos	19
4.1.2	Material biológico	20
4.2	Equipo	21
4.3	Métodos	23
4.3.1	Obtención y cuantificación del DNA	23
4.3.1.1	Extracción de DNA genómico	23
4.3.1.2	Extracción de DNA plásmidico	24
4.3.1.3	Análisis electroforético y cuantificación del DNA	25
4.3.2	Obtención por PCR-Larga y caracterización de las regiones intergénicas del locus GH-PL	26
4.3.2.1	Optimización de las condiciones de amplificación por PCR-Larga	27
4.3.2.2	Caracterización enzimática de las regiones intergénicas	30
4.3.2.3	Purificación de las bandas amplificadas	30
4.3.3	Análisis de las regiones promotoras por PCR	31
4.3.3.1	Obtención de la región promotora proximal (380 pb)	32
4.3.3.2	Obtención de la región promotora intermedia (1050 pb)	33
4.3.3.3	Obtención de las regiones promotoras distales (~3000pb)	34
4.3.4	Clonación de los productos amplificados de las regiones promotoras proximales y distales	34
4.3.4.1	Preparación del vector T	35
4.3.4.2	Ligación y transformación	36
4.3.4.3	Determinación de la secuencia nucleotídica	38
4.3.5	Preparación de las sondas para los ensayos de hibridación	38
4.3.5.1	Obtención de la sonda del inhibidor	39
4.3.5.2	Obtención de la sonda del Alu	39
4.3.5.3	Obtención de la sonda de Kpn	39



4.3.5.4 Marcaje de las sondas	39
4.3.5.5 Obtención y marcaje de la sonda del potenciador	40
4.3.6 Hibridación en gel	42
4.3.6.1 Preparación del gel	42
4.3.6.2 Condiciones de hibridación	42
4.3.7 Análisis de las secuencias nucleotídicas	43

## **CAPITULO V. RESULTADOS**

5.1 Obtención de las regiones intergénicas del locus GH-PL	44
5.2 Caracterización de las regiones intergénicas	45
5.3 Caracterización de las regiones intergénicas cortas	46
5.4 Obtención de las regiones promotoras por PCR	47
5.4.1 Obtención de las regiones promotoras proximales	48
5.4.2 Obtención de las regiones promotoras intermedias	49
5.4.3 Obtención de las regiones promotoras distales	50
5.5 Clonación de las regiones promotoras proximales y distales	54
5.6 Identificación de las secuencias potenciadoras	56
5.7 Identificación de las secuencias inhibidoras	57
5.8 Identificación de las secuencias repetitivas Alu	59
5.9 Identificación de las secuencias repetitivas Kpn	60
5.10 Secuenciación de las regiones proximales y distales	61
5.11 Análisis de las secuencias promotoras	61

## **CAPITULO VI. DISCUSION**

6.1 Cinco Regiones intergénicas integran el locus GH-PL de los monos del viejo mundo	66
6.2 Evolución de los promotores proximales	67
6.3 Evolución de las regiones promotoras intermedias y distales	70
6.4 El locus GH-PL es altamente dinámico	71

**CAPITULO VII. CONCLUSIONES**

73

**CAPITULO VIII. BIBLIOGRAFÍA**

76

<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>PAGINA</b>
<b>Tabla 1.</b> Condiciones de reacción para la PCR-Larga	29
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de digestión enzimática	30
<b>Tabla 3.</b> Condiciones estándar para la PCR de las regiones promotoras proximales	33
<b>Tabla 4.</b> Digestión de pBS-(SK +) con <i>Eco</i> RV	37
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de marcaje del primer	42
<b>Tabla 6.</b> Condiciones estándar para la PCR del potenciador	43
<b>Tabla 7.</b> Tamaño de los productos amplificados de las regiones promotoras obtenidas por PCR	55
<b>Tabla 8.</b> Recapitulación de las clonas obtenidas de las regiones promotoras	58

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>PAGINA</b>
<b>Figura 1.</b> Organización del locus hGH-hPL	7
<b>Figura 2.</b> Regulación específica de tejido de los genes hGH-hPL	10
<b>Figura 3.</b> Evolución del locus GH-PL	12
<b>Figura 4.</b> Evolución de los primates	14
<b>Figura 5.</b> Estrategia general	18
<b>Figura 6.</b> Estrategia para obtener las regiones intergénicas	27
<b>Figura 7.</b> Obtención por PCR de diferentes longitudes de las regiones promotoras	32
<b>Figura 8.</b> Estrategia general para realizar la clonación de las regiones promotoras	36
<b>Figura 9.</b> Amplificación de las regiones intergénicas por PCR	46
<b>Figura 10.</b> Caracterización de las regiones intergénicas de macaco	48
<b>Figura 11.</b> Caracterización de las regiones intergénicas cortas del mono verde	49
<b>Figura 12.</b> Amplificación de las regiones promotoras proximales	50
<b>Figura 13.</b> Caracterización de las regiones promotoras de macaco	51
<b>Figura 14.</b> Amplificación de las regiones intergénicas intermedias	52
<b>Figura 15.</b> Amplificación de las regiones promotoras distales	53
<b>Figura 16.</b> Identificación de las clonas recombinantes	56
<b>Figura 17.</b> Caracterización del inserto de las clonas obtenidas	57
<b>Figura 18.</b> Identificación de las secuencias potenciadoras	59
<b>Figura 19.</b> Identificación de las secuencias inhibidoras	60
<b>Figura 20.</b> Identificación de las secuencias Alu	61
<b>Figura 21.</b> Identificación de la secuencia Kpn	62
<b>Figura 22.</b> Comparación de los promotores	65
<b>Figura 23.</b> Construcción del árbol filogenético de las regiones promotoras	66
<b>Figura 24.</b> Hipótesis sobre la organización del locus GH-PL en los monos del viejo mundo	74

## NOMENCLATURA

$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{M}$	Concentración micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
DNA	Acido desoxirribonucleico
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfato
h	Horas
min	Minutos
mM	Concentración milimolar
ml	Mililitro
ng	Nanogramos
$\mu\text{l}$	Microlitros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	$-\log [\text{H}^+]$
s	Segundos
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
X	Veces la concentración
UV	Luz Ultravioleta
EDTA	Acido etilendiaminotetra-acético
Amp <sup>+</sup>	Gen para $\beta$ -lactamasa
$\beta\text{gal}$	Gen para $\beta$ -galactosidasa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
V	Voltios
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

GH	Hormona del crecimiento
PL	Lactógeno placentario
Conc.	Concentración
U	Unidades de enzima
cbp	Cuanto basta para
mQ	MiliQ
DO	Densidad óptica
PA	Producto amplificado
nm	Nanómetro

## RESUMEN

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

Q.F.B. Gloria Leticia Corrales Félix

Título del estudio: **EVOLUCION DE LAS REGIONES INTERGENICAS DEL LOCUS GH-PL, EN LOS PRIMATES DEL VIEJO MUNDO.**

Número de páginas: 80

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

**Objetivo y método del estudio:** La familia multigénica de la hormona de crecimiento (GH) y de los lactógenos placentarios (PL) constituye un modelo excelente para estudiar los mecanismos de regulación de la expresión génica, los eventos de duplicación y en general la evolución del genoma en primates. En el humano, cinco genes integran el locus GH-PL, de los cuales únicamente hGH-N se expresa en hipófisis, mientras que los tres PLs y hGH-V lo hacen en la placenta. Las regiones intergénicas del locus son de particular interés por incluir a los elementos responsables de la especificidad de expresión (inhibidor y potenciador) y elementos repetitivos Alu que fueron implicados en los procesos de duplicación. Hasta la fecha, poco se conoce acerca del locus GH-PL en otros primates.

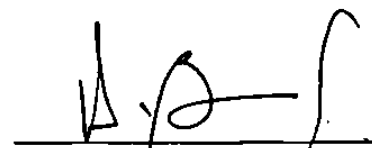
Este trabajo se enfocó en obtener las regiones intergénicas de dos monos del viejo mundo (macaco y mono verde) por medio de PCR-Larga, además de inferir sobre la presencia en éstas de los elementos regulatorios y de las secuencias repetitivas Alu y Kpn. Para complementar el estudio se realizó una comparación de las regiones promotoras con el propósito de precisar las relaciones filogenéticas entre éstas e inferir sobre la evolución de la regulación.

**Conclusiones y contribuciones.** Por medio de PCR-Larga, se logró obtener cinco regiones intergénicas del locus GH-PL de los dos monos estudiados: siendo tres largas (~ 12000 pb) y dos cortas (~ 5000pb). Este resultado demuestra que a diferencia del humano, en los primates del viejo mundo el locus GH-PL consta de seis genes. Mientras que en las regiones intergénicas largas se encuentra presente únicamente el elemento iniciador, la secuencia inhibidora está en todas, por lo tanto, los elementos de regulación fueron adquiridos antes de la divergencia de los monos del viejo mundo, y los genes GH-PL en estas especies presentan ya la especificidad de expresión tisular.

Las secuencias Alu fueron evidenciadas en las regiones intergénicas del locus GH-PL del macaco y mono verde, mientras que no se encontró elemento Kpn, por lo tanto éste se introdujo después de la divergencia de los monos del viejo mundo.

Se clonaron y secuenciaron cinco regiones promotoras del locus GH-PL de ambos monos (faltando la del primer gen del locus). La comparación de éstas indicó claramente que surgieron por duplicaciones sucesivas, sin embargo estos eventos fueron independientes de los que participaron en la formación del locus humano. Este trabajo confirmó que el locus GH-PL constituye una región muy dinámica dentro del genoma de los primates y por lo tanto constituye un excelente modelo para estudios evolutivos.

  
Dra. Agnès Revol de Mendoza  
Asesor

  
Dr. Hugo A. Barrera Saldaña  
Coasesor