

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

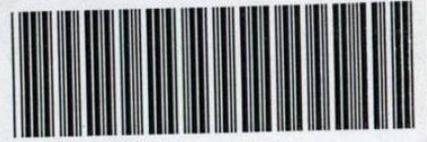


“REGULACION DE LA EXPRESION DIFERENCIAL
DEL GEN hGH-V EN CELULAS EN CULTIVO”

POR:
CLARISA GPE. ORTIZ CERVANTES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR
E INGENIERIA GENETICA

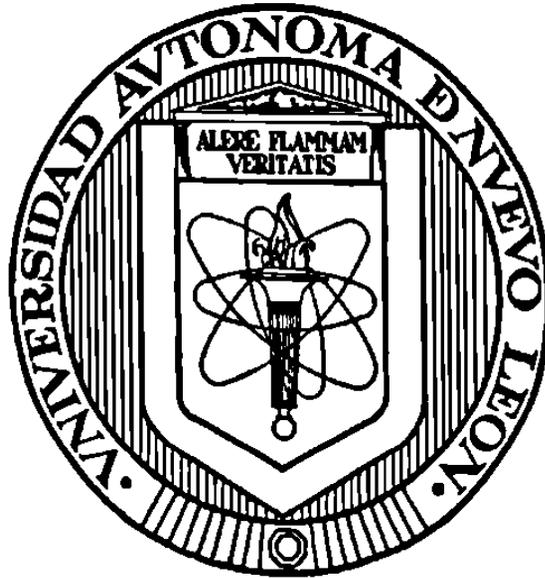
JULIO DE 2002



1080114220

000 300376

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**“REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN
hGH -V EN CÉLULAS EN CULTIVO”**

POR

CLARISA GPE. ORTIZ CERVANTES

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

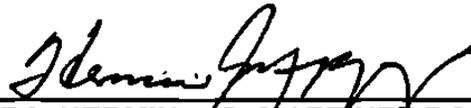
JULIO DEL 2002

TM
QH440
.4
.07
2002



REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN hGH-V EN CELULAS EN CULTIVO

Aprobación de la Tesis:



DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRIGUEZ
Director de Tesis



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co – Director de Tesis



DRA AGNES REVOL DE MENDOZA
Comisión de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
De Investigación y Estudios de Posgrado

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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez por la confianza, paciencia y apoyo que me brindó, gracias por sus consejos.

Al Dr. Hugo Barrera-Saldaña por darme la oportunidad de incursionar en el hermoso mundo de la investigación.

A la Dra. Agnès Revol de Mendoza, por sus sugerencias para la elaboración de este manuscrito.

A los que coincidimos en el laboratorio de Biología Celular: Martín, Polo, Virgilio, Martha y Yolanda muchas gracias por todos los gratos momentos que pasamos.

A la “Generación de los 12” Lulú, Lety, Malena, Nancy, Polo, Sergio, Virgilio, Itzel, Mauricio, Prisco y Aurelio, por la amistad que me brindaron durante este tiempo.

A los que coincidimos la ULIEG: Irma, Iram, Claudio con quienes compartí momentos muy agradables.

A mi buena amiga Mónica que siempre estuvo conmigo. Muchas Gracias Moni.

A mis amigos de siempre, que a pesar de la distancia y diferencia de ideas siempre han estado conmigo: Veronica, Luz, Lizbeth, Oscar, Juan.

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

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

DEDICATORIAS

A mis queridos padres, Sres. Antonio Ortiz Medina y Gregoria Cervantes Fajardo, por todo el amor, apoyo y confianza que me brindan. Madre tus palabras de confianza me han ayudado en esta importante etapa.

A mi hermano Marco Antonio y a mi nueva hermana Flerida por todo su cariño.

A toda mi familia con quienes crecí y al vernos de nuevo comparto momentos muy gratos.

*Mientras la vida sigue su curso,
¿Quién leerá....este recuerdo de aquella cuya memoria jamás morirá?.....*

TABLA DE CONTENIDO

Página

Capítulo I

Introducción	1
1.1 Modelo de estudio : El locus hGH – hPL	2
1.2 Proteínas codificadas por el complejo hGH – hPL	3
1.3 Funciones de las hormonas codificadas por los genes del complejo hGH hPL	5
1.4 Factores transcripcionales que influyen en la expresión de los genes del complejo hGH – hPL	8
1.5 Influencia de la longitud de los promotores en la expresión	12
1.6 Estimuladores de la expresión de hPL	13
1.6.1 Suero materno	13
1.6.2 AMPc	14
1.6.3 Interleucina 6 y factores de crecimiento	14
1.6.4 Moléculas esteroides y triyodo tironina	15
Justificación	16

Capítulo II

Objetivos	17
2.1 Objetivo general	17
2.2 Objetivos específicos	17

Capítulo III

Material y métodos	18
3.1 Origen de los reactivos	18
3.2 Secuencias de los iniciadores utilizados	19
3.3 Origen del material biológico	19
3.4 Equipo	20
3.5 Condiciones del cultivo celular	21
3.6 Transfección mediante lipofección	22
3.7 Detección de β - Galactosidasa	23
3.8 Cuantificación de proteínas totales	25
3.9 Detección de hGH – N (ELISA)	26
4.0 Extracción del RNA	28
4.1 Cuantificación de los niveles de expresión de hGH – V	29

Capítulo IV

Resultados	35
4.1 Cultivo de las líneas celulares	35
4.2 RNA total de los cultivos celulares	35
4.3 Amplificación de los genes internos hGH – V / GAPDH en JEG – 3	37
4.4 Estudios de transfección	38
4.4.1 Vectores utilizados para los ensayos de transfección	39
4.5 Análisis de los genes reporteros β - galactosidasa y hGH-N	40
4.6 Análisis por RT – PCR de la expresión del gen hGH – V transfectado	42

Capítulo V

Discusión	46
-----------	----

Capítulo VI

Conclusiones	51
Referencias	52

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1.- Preparación de los estándares de HGH	27
2.- Componentes de la RT- PCR	31
3.- Preparación de la PCR para hGH – V	31
4.- Preparación de la PCR para GAPDH / hGH – V	33
5.- Actividad de β -Galactosidasa	38

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.- Anatomía del complejo multigénico hGH - hPL	3
2.- Estrategia general	34
3.- RNAs totales de la línea celular JEG – 3	36
4.- RNAs totales provenientes de las líneas celulares JEG – 3 y GC transfectadas	36
5.- Productos amplificados de hGH – V y GAPDH	37
6.- Vectores utilizados en los ensayos de transfección	39
7.- Análisis del gen reportero β -galactosidasa en la línea celular JEG – 3	40
8.- Análisis del gen reportero β -galactosidasa en la línea celular GC	41
9.- Análisis del gen hGH – N por ELISA	42
10.- Amplificación de GAPDH / hGH – V en la línea celular JEG – 3 transfectada	43
11.- Densitometría de la amplificación de GAPDH / hGH - V	44
12.- Amplificación de GAPDH / hGH – V en la línea celular GC transfectada	45

NOMENCLATURA

μ l	Microlitro
μ g	Microgramo
μ M	Concentración micromolar
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
Abs	Absorbancia
BSA	Albúmina sérica bovina
CPRG	Rojo de clorofenol beta – D galactopiranosido
DMEM	Medio mínimo esencial Dulbecco's
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético
GPDH	Glicerol 3- fosfato deshidrogenasa
GH	Homona del crecimiento
HGH -N	Homona del crecimiento normal
HGH - V	Homona del crecimiento variante
h	Horas
IGF - 1	Factor de crecimiento parecido a insulina
kDa	Kilodaltones
M	Molar
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
N	Normal
nm	Nanómetro
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Logaritmo del recíproco de la concentración de iones hidrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa
S	Segundos
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBE	Buffer tris– borato
TE	Buffer tris- EDTA
T3	Homona. 3, 3', 5- Triyodotironina
UV	Ultravioleta
U	Unidades
1,25-(OH) ₂ D3	1, 25 – dihidroxivitamina D3

V	Voltios
Vol.	Volumen
X	Número de veces la concentración

RESUMEN

Clarisa Gpe. Ortiz Cervantes

Fecha de Graduación: Julio, 2002

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

**Título del Estudio : REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL
GEN hGH – V EN CÉLULAS EN CULTIVO**

Número de páginas : 58

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

Área de estudio: Biología Molecular

Propósito y Método del Estudio: La familia de genes hGH – hPL consta de 5 genes localizados en el brazo largo del cromosoma 17, compartiendo entre sí una similitud en secuencia nucleotídica superior al 90 %. Estos genes tienen una expresión selectiva de tejido y niveles de expresión muy variables. Diferencias en las secuencias de los elementos de respuesta a factores transcripcionales tales como vitamina D, éster de forbol, ácido retinoico, triyodo - tironina, interleucina – 6, AMPc, quizás puedan explicar la expresión diferencial que se observa entre los genes del complejo que se expresan en un mismo tejido. El gen hGH – V se expresa en la placenta y codifica para una hormona de crecimiento que alcanza a la circulación materna y sustituye al final del embarazo a la hormona de crecimiento producida en la hipófisis de la madre. hGH - V es el gen activo que se expresa a mas bajos niveles y poco se conoce acerca de la expresión y de su regulación por los diferentes factores transcripcionales.

En este trabajo se realizó un estudio comparativo de la expresión de la regulación de la expresión del gen hGH–V por diferentes moduladores en cultivo celular (JEG – 3 derivada de coriocarcinoma de placenta humana y GC de hipófisis de rata).

Contribuciones y conclusiones: La expresión endógena de hGH – V no se detectó por RT – PCR en la línea celular JEG – 3, ni en presencia de moduladores (ácido retinoico, triyodotironina y éster de forbol), en cambio en los experimentos de transfección al analizar el gen reportero β -galactosidasa se observó que los tres moduladores aumentaron desde casi 6 veces para ácido retinoico, 5 veces para triyodotironina y 5.3 para éster de forbol. En los ensayos de RT – PCR en los que se analizó la expresión del vector que contenía el gen completo de hGH – V se logró detectar un producto de amplificación y se observaron variaciones de la expresión del promotor con los diferentes moduladores, éstas concordaron con lo observado en los ensayos por ELISA. Se comprobó la especificidad tisular de los promotores de los genes hGH – V y hGH – N.

FIRMA DEL DIRECTOR:



Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez

FIRMA DEL CO-DIRECTOR:



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña