UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

REGULACION DEL COMPLEJO MULTIGENICO hGH-hPL MEDIADO POR HORMONAS Y FACTORES TRANSCRIPCIONALES

POR:

M.C. MARTIN CANIZALES ESPINOSA

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

Noviembre de 2002

TD
QH511
.C3
2003
c.1

1080124497

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

REGULACION DEL COMPLEJO MULTIGENICO hGH-hPL MEDIADO POR HORMONAS Y FACTORES TRANSCRIPCIONALES

Por

M.C. MARTIN CANIZALES ESPINOSA

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTORADO EN CIENCIAS

con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Febrero de 2003

TD
QH511
.C3
2003

Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS DOCTORADO

El presente trabajo, fue realizado en el laboratorio de Biología Celular, de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, U.A.N.L., bajo la dirección de la Dra. Herrminia G. Martínez Rodríguez y co-dirección del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

AGRADECIMIENTOS

Importante siempre será, hacer reconocimiento a quién lo ha ganado, quiero expresar mi profundo agradecimiento y admiración a mi maestra, entrenadora de ideas y forma de pensar, mi AMIGA, Herminia Martínez, ejemplo constante de que ante perseverancia, empeño y sobre todo, mucha, mucha paciencia; es posible llegar al final. Esto, es sólo el inicio de otra etapa y camino por andar juntos.

Un reconocimiento para aquel a quién vi desarrollarse como líder en la ULIEG después, estatal y nacional, Dr. Hugo A. Barrera-Saldaña. "Sin andar por las ramas", sólo puedo escribir de igual manera que ésta; es otra etapa de crecimiento.

También, a una gran colaboradora experimental y de ideas durante este camino en la ULIEG, pues casi fue el mismo tiempo profesional que paso desde que ambos llegamos, mi amiga Dra. Agnes Revól. Seguimos en el camino.

A la Dra. Diana Reséndez y Dr Mario C. Salinas, por las aportaciones al enrriquecimiento de este manuscrito.

Un agradecimiento al personal y a los que antes y ahora, conformaron y conforman la ULIEG, de quiénes apredí demasiadas cosas (profesional y personal), con los que crecí e hicieron de la vida en la ULIEG, como mi segunda casa.

Extiendo el agradecimiento, al Consejo Nacional de Ciencia y Teconología, por el apoyo económico brindado para lograr este otro objetivo de vida.

Dedicatorias

Agradezco profundamente a mis padres, la comunicación y la libertad otorgada que me brindaron, como ser humano y persona independiente. Por la confianza depositada y por el amor de padres, que siempre me han profesado, GRACIAS.

Al clan familiar Canizales-Espinosa, las recientes generaciones derivadas de este clan, por los gratos momentos vividos de esparcimiento familiar.

A mi compañera de vida, mi esposa Alma, por toda ésta mitad de nuestra vida, vivida juntos. Por tí, mí estímulo de vida...

REGULACIÓN DEL COMPLEJO MULTIGÉNICO hGH-HPL MEDIADO POR HORMONAS Y FACTORES TRANSCRIPCIONALES

Aprobación de la Tesis:

DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ
Director de Tesis

DR. HUGO A. BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis

DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
1er. VOCAL

DRA. DIANA RESÉNDEZ PÉREZ
2do. VOCAL

DR. MARIO C. SALINAS CARMONA
3er. VOCAL

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

RESUMEN

M.C. Martín Canizales Espinosa Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

Título del Estudio: *ESTUDIO DE REGULACION EN EL COMPLEJO MULTIGENICO hGH-hPL MEDIADO POR HORMONAS Y FACTORES TRANSCRIPCIONALES*

Número de páginas: 147 Candidato al grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

INTRODUCCIÓN: El complejo multigénico de la hormona del crecimiento humano, está constituido por 5 genes que presentan elevada homología en su secuencia nucleotídica (>95%), pero que se expresan en tejidos diferentes: hGH-N en la pituitaria y los demás (hGHV y hPLs) en placenta, donde éstos tienen variados niveles de expresión. La regulación génica en este locus, ha sido estudiada desde diferentes abordajes a saber: 1) Construcción de recombinantes con el promotor de alguno de los genes, dirigiendo la expresión de genes reporteros no humanos, 2) Efecto hormonal y de metabolitos en el nivel de transcripción de algunos genes del complejo (*hPL-2 y hPL-3*) en cultivo de células, cultivos primarios o en placenta, 3) Estudio de la transactivación de promotores basales por factores transcripcionales específicos de tejido y ubicuos, y 4) Análisis de dos de los tres potenciadores del locus sobre promotores heterólogos.

Los anteriores análisis se hicieron con algunos genes del complejo, pero nunca se han estudiado todos los genes bajo un mismo sistema de análisis. Este trabajo, abordó el estudio de los elementos reguladores de los 5 genes del complejo hGH-hPL, por transfección y en forma paralela.

OBJETIVO: Estudiar la regulación de la familia multigénica hGH-hPL mediada por hormonas y factores transcripcionales. METODO: Se realizaron construcciones plasmídicas para estudiar las diferentes regiones estructurales y reguladoras de los genes del complejo hGH-hPL (promotores, unidad transcripcional [hPL-1 y hGHV] y potenciadores del *locus*). La respuesta de los promotores en ausencia o presencia de hormonas, moduladores, factores transcripcionales y potenciadores, se evaluó midiendo la expresión del gen reportero (*hGH-N*) por ELISA, después de transfectar transitoriamente células derivadas de pituitaria, placenta y de cérvix. El efecto de las unidades transcripcionales de hPL-1 y hGH-V en construcciones híbridas con hGH-N, se analizó por RT-PCR cuantitativo.

Conclusiones y contribuciones: Se obtuvo una colección de recombinantes de las diferentes regiones reguladoras de los genes del complejo *hGH-hPL*, los cuales permitieron estudiar la regulación de los diferentes genes, bajo las mismas variables de análisis. Este estudio demostró que las regiones promotoras tienen un efecto diferencial de activación en los niveles de expresión de cada gen del locus, posiblemente debido a la presencia y/o ausencia de elementos de respuesta a activadores o represores Igualmente, se evidenciaron a dos elementos represores importantes: Uno localizado en la región distal del promotor que reprime la expresión de hGH-N en células diferentes a hipófisis y otro en la región promotora proximal de todos los genes, que reprime la expresión indistintamente del tipo celular analizado. Los factores transcripcionales activaron diferencialmente a los promotores proximales, con Pit 1 activando preferentemente en tejido pituitario, PLA-1 en placenta y SP1 sin efecto significativo de activación. Los datos muestran un efecto de activación preferente de tejido, el cual puede deberse a la interacción de los factores POU con otras proteínas específicas de tejido. Los potenciadores activaron la expresión solo en tejido placentario y en forma diferente para cada promotor. El análisis de la primer mitad de hPL-1 combinada con la segunda mitad del gen hGH-N, mostró mayores niveles de transcripción mientras el gen hPL1 completo reparado, tuvo nulos niveles de transcripción; en el caso de hGH-V, la segunda mitad del gen tuvo mayor actividad transcripcional. En resúmen, los datos en conjunto del análisis de las quimeras, sugieren la presencia de secuencias activadoras (primer intrón de hPLs) y represoras (hGH-V) en las regiones estructurales de estos genes, responsables quizás del comportamiento de los genes del complejo hGH-hPL.

Dra. Hermina Gpe. Martínez Rodríguez, Director de Tesis.

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, Co-Director de Tesis.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo		Página
I INTRODUCCION		1
1.1	Selección del sistema de estudio	1
1.2	El complejo multigénico hGH-hPL como modelo de regulación génica	1
1.3	Regulación de la transcripción en el complejo hGH-hPL	3
1.4	Control de la estructura de la cromatina del complejo hGH-hPL	4
1.5	Factores trans y moduladores con actividad en el locus	5
1.6	Factor transcripcional Sp-1	8
1.7	Control específico de tejido	8
1.8	Control hormonal	10
1.9	Secuencias potenciadoras en el extremo 3'de los genes hPL	12
II. OBJETIVOS		16
2.1	Justificación	16
2.2	Objetivo General	16
2.3	Objetivos Particulares	17
2.4	Estrategia General de Objetivos	19
III. MATERIALES Y METODOS		23
3.1	Origen de los reactivos	23
3.2	Origen del material biológico	24
3.3	Equipo	25
3.4	Métodos	26
	3.4.1 Construcción de recombinantes (versiones promotoras largas)	26
	3.4.2 Construcción de recombinantes versiones -496, -140 y -70 pb	27
	3.4.3 Clonación de secuencias potenciadoras	30
	3.4.3.1 Extracción de DNA genómico por la técnica de TSNT	30
	3.4.3.2 Condiciones de amplificación por PCR de los potenciadores	31
	3.4.3.3 Clonación, secuenciación y caracterización de las clonas	31
	3.4.4 Estrategia de construcción de quimeras hPL-1 y hGH-V	35
	3.4.5 Construcción de vectores usados para PCR competitivo	35
	3.4.5.1 Transfección de pβActinahGHN21K en diferentes líneas celulares	38
	3.4.5.2 Extracción de RNA de células transfectadas	39
	3.4.5.3 Construcción del competidor para RT-PCR cuantitativo	39
	3.4.5.4 Protocolo de digestión con nucleasa S1 para microdeleciones	41
	3.4.6 Mantenimiento de las líneas celulares	42
	3.4.7 Transfección y condiciones óptimas del cultivo celular para ensayos de expresión	43
	3.4.7.1 Protocolo de transfección	43
	3.4.8 Ensayos de respuesta a moduladores de la transcripción	44
	3.4.8.1 Ensayo de β-Galactosidasa y normalización	46

3.4.1.2 Cuantificación de hormona del crecimiento humano 47
3.4.9 Adición del competidor al RT-PCR cuantitativo 47
3.5 Análisis de resultados 50

IV. RESULTADOS 51
4.1 Análisis de regiones promotoras de los genes hGH-hPL 51
4.1.1 Construcción de recombinantes 51
4.1.2 Comportamiento en cultivo celular 52
4.1.3 Análisis de moduladores de la transcripción 55
4.1.4 Análisis del efecto de factores de transcripción 59

4.2 Análisis de la región 3' de los genes Lactógeno Placentario 62
4.2.1 Clonación de potenciadores del locus hGH-hPL 62
4.2.2 Secuenciación de potenciadores 65
4.2.3 Sub-clonación de potenciadores en recombinantes con promotor 0.5 kb 66
4.2.4 Transfección de recombinantes con promotor 0.5 kb-potenciador 66

4.3 Análisis de las unidades transcripcionales de hPL-1 y hGH-V 69
4.3.1 Construcción de quimeras de hPL-1 y hGH-V con hGH-N 69
4.3.2 Detección de la expresión de las quimeras por RT-PCR semicuantitativo 72
4.3.3 Construcción del vector para determinar eficiencia de transfección 74
4.3.4 Expresión del vector pβactinahGHN21K en cultivo celular 76
4.3.5 Desarrollo del sistema de RT-PCR cuantitativo 77
4.3.6 Construcción de quimeras para análisis del 1er intrón de genes hGH-hPL 81

4.4 Pruebas estadísticas 83
4.4.1 Análisis de varianza e inferencia estadística 83

V. DISCUSION 84
5.1 Regulación en la región 5', comportamiento de los promotores del complejo hGH-hPL 85
5.1.1 Regiones promotoras distales 85
5.1.2 Comportamiento de los promotores proximales en ambas líneas celulares. 87
5.1.3 Elementos represores activos en los promotores del complejo hGH-hPL 88
5.2 *Respuesta a moduladores hormonales por las versiones promotoras largas* 91
5.3 *Respuesta de los promotores proximales a factores transcripcionales* 96
5.4 *Respuesta de los promotores proximales a potenciadores del locus* 99
5.5 *Análisis de las unidades transcripcionales de los genes hPL-1 y hGH-V* 102
5.6 *Análisis del efecto del intrón 1 en los niveles de transcripción de genes placentarios* 105

VI. CONCLUSIONES 108
VII PERSPECTIVAS 110
REFERENCIAS 111
ANEXOS 124
RESUMEN AUTOBIOGRAFICO 156

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura del complejo hGH-hPL	5
2. Alineamiento de regiones promotoras proximales	7
3. Moduladores en el locus hGH-hPL	11
4. Alineamiento del primer intrón de los genes del complejo hGH-hPL	12
5. Alineamiento de secuencias potenciadoras	14
6. Estrategia general para objetivos 1, 2, 3 y 4	19
7. Estrategia general para objetivos 5 y 6	20
8. Estrategia de análisis de las unidades transcripcionales de los genes hPL-1 y hGH-V	21
9. Obtención de los potenciadores del locus hGH-hPL	22
10. Construcción de vector intermediario para pβactinahGHN21K	37
11. Construcción y análisis del vector pβactinahGHN21K	38
12. Alineamiento de secuencias de los DNAc de HGH 20 K y hGH 20KδEdr1	40
13. Estrategia general para obtener el competidor hGH 20KδEdr1	41
14. Caracterización de recombinantes	52
15. Análisis de la potencia y especificidad de los promotores	53
16. Ubicación de elementos reguladores	55
17. Eficiencia de transfección y cuantificación de HGH en células JEG-3	56
18. Efecto de moduladores en los niveles de expresión en células JEG-3	57
19. Efecto de moduladores en los niveles de expresión en células GC	58
20. Efecto de factores transcripcionales en células JEG-3	60
21. Efecto de factores transcripcionales en células GC	61
22. Amplificación por PCR y clonación de los potenciadores hPL	63
23. Mapas de restricción de las secuencias potenciadoras de los genes hPL	64
24. Caracterización e identificación de los potenciadores clonados	65
25. Subclonación del potenciador hPL-3 en recombinantes con promotor proximal	66
26. Efecto de potenciadores sobre promotores proximales en células JEG-3	67
27. Efecto de potenciadores sobre promotores proximales en células GC	68
28. Mapas de restricción de quimeras de hPL-1, hGH-V/hGH-N	70
29. Caracterización de quimeras hPL1-hGHV/hGH-N con enzimas diagnósticas	71

30. Semi-cuantificación del efecto de unidades transcripcionales 72
31. Caracterización por PCR de pBShGHN21K 74
32. Construcción de pβactinahGHN21K 75
33. Caracterización de pβactinahGHN21K 76
34. Detección por RT-PCR de la expresión de pβactinahGHN21K en diferentes líneas celulares 77
35. Caracterización por PCR de pBShGH20KδEdr1 78
36. Análisis del competidor para el sistema RT-PCR competitivo 79
37. RT-PCR cuantitativo de quimeras hPL-1, hGHV/hGHN 80
38. Cuantificación del número de atomoles 80
39. Construcción de vectores para estudiar el efecto sinérgico promotor-primer intrón 82
40. Concentración de HGH obtenida con quimeras con de primer intrón 83
41. Efecto del primer intrón sobre el promotor de genes placentarios en JEG-3 83

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla I. Condiciones de digestión enzimática de promotores largos 27

Tabla II. Condiciones de digestión enzimática de promotores basales 28

Tabla III. Oligonucleótidos para amplificar los potenciadores hGH-hPL 30

Tabla IV. Niveles de HGH detectados en los ensayos con moduladores 58

Tabla V. Niveles de activación relativa por moduladores en JEG-3 y GC 59

Tabla VI. Concentración de HGH y veces de activación con factores transcripcionales en JEG-3 60

Tabla VII. Concentración de HGH obtenida por estímulo con factores transcripcionales en GC 62

Tabla VIII. Activación de potenc iadores en los promotores del locus hGH-hPL en células JEG-3 69

Lista de abreviaturas

AR	Ácido retinoico
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Albúmina sérica bovina
°C	Grados centígrados
CAT	Cloranfenicol acetil-transferasa
CPRG	chlorophenolred-ß-D-galactopyranoside (por sus siglas en inglés)
CRE	Elemento de respuesta a ciclinas
C/EBPβ	Proteína β de unión al potenciador/CCAAT
DMEM	Medio mínimo esencial de Dulbeco's
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAc	Ácido Desoxiribonucleico complementario
E.D.T.A.	Etilendiaminotetraacético
EF	Ester de forbol
fg	Femtogramo
g	Gramos
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GHF-1	Factor de la hormona del crecimiento 1
h	Hora

hCMV	Citomegalovirus humano
HGH	Hormona del crecimiento humano
HPL	Hormona lctogénica pacentaria humana
hGH-N	Gen de la hormona del crecimiento humano
hGH-V	Gen de la hormona variante del crecimiento humano
hPL	Gen de la hormona del lactógeno placentario humano
H_2Odd	Agua bi-destilada
InrE	Elemento iniciador de la transcripción
IPTG	Isopropil-β-D-Tiogalactósido
kDa	Kilodaltones
kb	Kilobases
l	Litros
lac	Lactosa
LB	Medio de Luria Bertani
M	Molar
mg	Miligramos
min	minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
NEB	New England Biolabs
NF-1	Factor nuclear 1
ng	Nanogramos
nM	Nanomoles

μ	Micras
μg	Microgramos
μl	Microlitros
OPTI-MEM	Medio mínimo esencial - óptimo
pb	Pares de bases
PBS	Buffer Salino
pH	Potencial de Hidrógeno
pg	Picogramo
Pit-1	Factor pituitario 1
PLA-1	Factor placentario 1
RLU	Unidades relativas de luz.
RSV	Virus del Sarcoma de Rous
s	segundos
Sp1	Proteína específica 1
TE	Tris-EDTA
Tet	Tetraciclina
TFIIA, B, D, E y H	Factores transcripción generales de la RNA polimerasa III.
T3	Tri-yodotironina
U	Unidades
UV	Luz Ultravioleta

μ	Micras
μg	Microgramos
μl	Microlitros
OPTI-MEM	Medio mínimo esencial - óptimo
pb	Pares de bases
PBS	Buffer Salino
pH	Potencial de Hidrógeno
pg	Picogramo
Pit-1	Factor pituitario 1
PLA-1	Factor placentario 1
RLU	Unidades relativas de luz.
RSV	Virus del Sarcoma de Rous
s	segundos
Sp1	Proteína específica 1
TE	Tris-EDTA
Tet	Tetraciclina
TFIIA, B, D, E y H	Factores transcripción generales de la RNA polimerasa II.
T3	Tri-yodotironina
U	Unidades
UV	Luz Ultravioleta