

Regulación en el complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

todas las líneas celulares además, funcionó como competidor por los oligos en la PCR. Lo anterior permitió evaluar la eficiencia de transfección, además los niveles de expresión de HGH 20 K no saturaron la linearidad de la RT-PCR, se corroboró la naturaleza ubicua del promotor β actina humana y además, su fuerza de transcripción no fue mayor a la del promotor proximal de hGH-N.

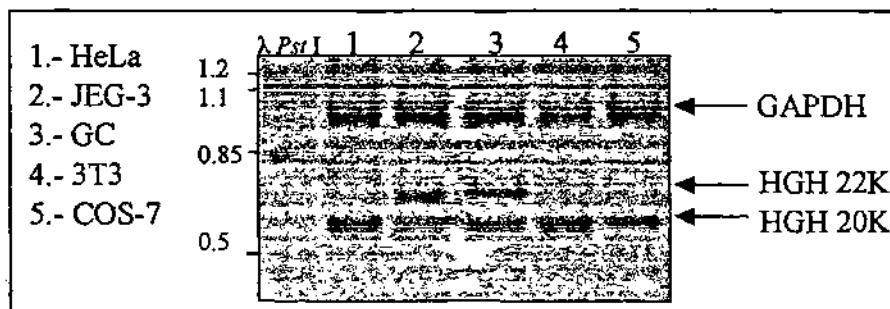


Figura 34. Detección por RT-PCR de la expresión p β actinahGHN21K en diferentes líneas celulares. Cinco líneas celulares fueron utilizadas para analizar la expresión del vector de p β actinahGHN21K (producto de expresión: 20K) cotranfектado con pBShGHEco-Ssp (producto de expresión: 22K) en una relación de 3:1, respectivamente. De las células transfectadas se extrajo el RNA total y se realizó RT-PCR en un paso con los oligonucleótidos 112-113 junto con GAPDH, para normalizar la concentración de RNA en cada muestra. Los carriles 1 y 2 presentan el resultado de RT-PCR de células humanas (JEG-3 y HeLa) mientras en 3, 4 y 5 células no humanas (GC, COS-7 y 3T3). Se aprecia la presencia de tres bandas, la de mayor peso molecular GAPDH en intensidad muy similar en todos los carriles y bandas de 22K y 20K con variabilidad en la intensidad que demuestra competencia por los oligonucleótidos, además el promotor β actina fue activo en todas las líneas celulares mientras el de hGH-N, sólo en las células JEG-3 y GC.

4.3.5 Análisis por RT-PCR cuantitativo.

La delección de 27 nucleótidos en el segundo exón con el oligonucleótido *Edr1* y la técnica “d-Loop”(102). Técnica ya descrita en la sección de Material y Métodos permitió obtener el plásmido competidor para los ensayos de RT-PCR competitivo.

Regulación en el complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

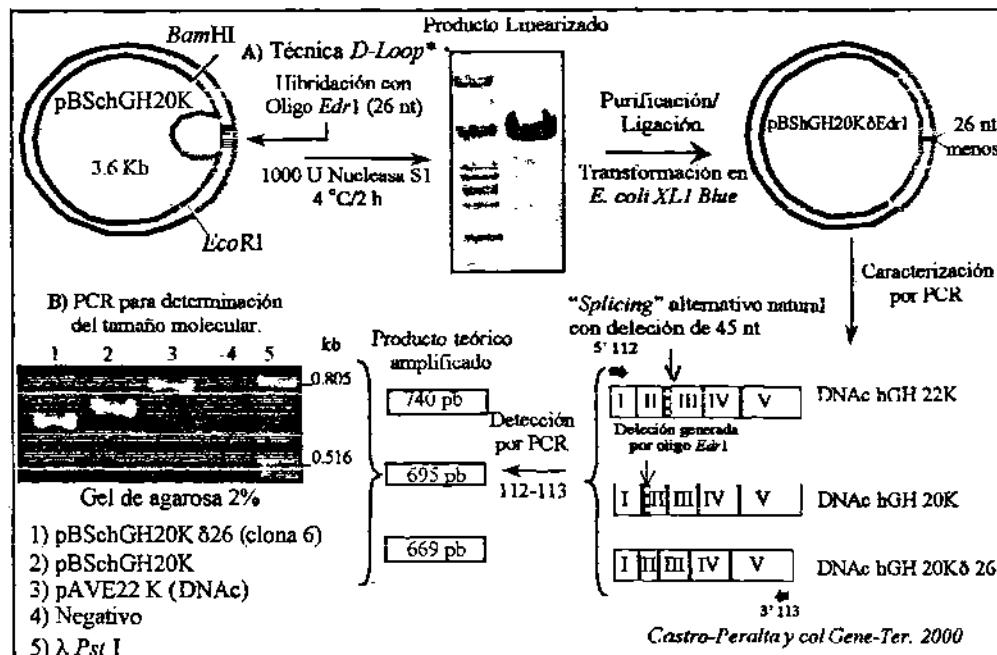


Figura 35. Caracterización por PCR de pBShGH20KδEdr1. Una de las clonas derivada del producto de la digestión con nucleasa S1, ligación y transformación, se analizó por PCR con los oligonucleótidos 112-113. Como controles de tamaño se utilizaron a los vectores pAVEhGH22K que tiene clonado el DNAc de HGH 22K y pBShGH20K del que se partió. Los productos de PCR se separaron en gel de agarosa al 2 % donde se aprecia que la clona, efectivamente difiere en tamaño y puede ser separada eficientemente de los controles.

Antes de realizar los ensayos competitivos del análisis de las unidades transcripcionales de hGH-V y hPL-1, evaluamos primero dos estrategias de cómo el competidor podría ser incorporado a la reacción de RT-PCR. La primera fue como DNA plasmídico previa cuantificación, la segunda estrategia consistió en sintetizar RNA en una reacción de transcripción *in vitro* con el estuche comercial Megascript T7 de la compañía *Ambion* y evaluar además, la eficiencia de retrotranscripción en la RT-PCR. El transcripto sintético se cuantificó por UV, se diluyó y se adicionaron 1, 3 y 5 fg a la reacción de RT-PCR llevada a cabo en un solo paso. La densitometría de geles con ambas estrategias después de la RT-PCR, determinaron que ambas metodologías son igualmente eficientes y sensibles, que no era necesario evaluar la eficiencia de RT, por lo que decidimos utilizar el plásmido para los ensayos de RT-PCR cuantitativo. La figura 36 muestra los resultados del análisis de la titulación del competidor y de RNA de placenta humana, necesarios para tener un sistema competitivo en la reacción de RT-PCR.

Regulación en el complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

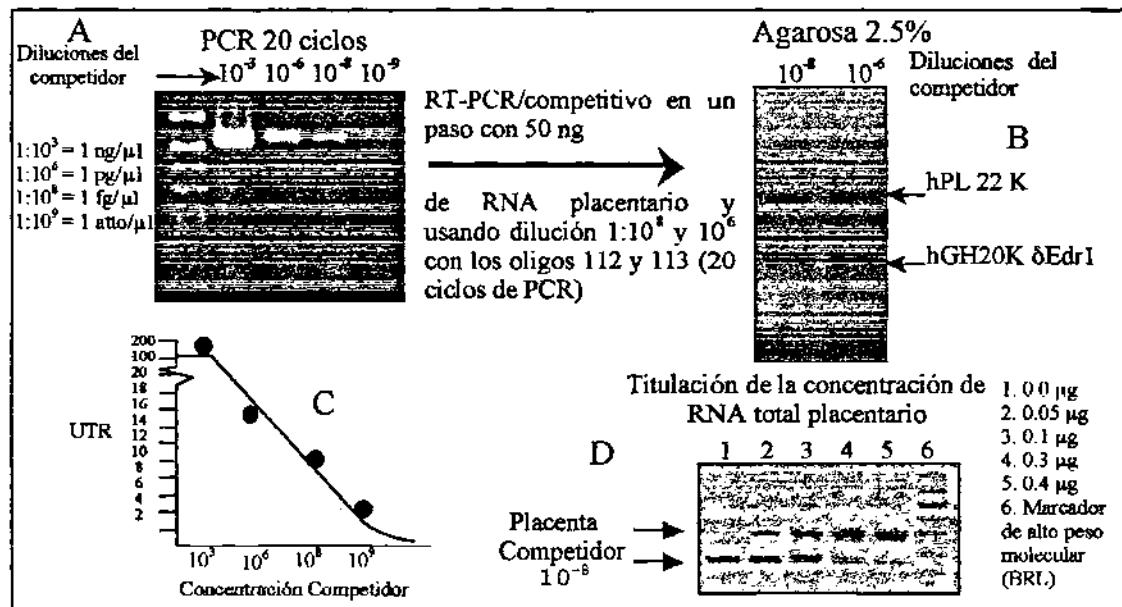


Figura 36. Análisis del competidor para el sistema RT-PCR competitivo. Para estudiar la concentración en que el competidor debía ser agregado a la PCR, A: primero se hicieron diluciones del competidor (en órdenes de 1000 veces) B: Gel de agarosa donde se separaron las bandas de los genes hPL a partir del RNA total de placenta humana, del competidor adicionado en dos diluciones al RNA comaplicificado por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos 112 y 113 y un programa de 20 ciclos. Las bandas demostraron variabilidad densitométrica, asumiéndose con ellos que existía competencia entre los amplicones. C: Gráfica de unidades de transmitancia relativa (UTR) vs concentración del competidor. D: Se usó la dilución del competidor 10^{-8} (1 pg/ μl) y se adicionó a diferentes concentraciones de RNA total de placenta humana para detectar la cantidad de RNA necesaria en la reacción para seguir teniendo competencia. El producto de PCR se separó en gel de agarosa al 2% y se determinó la densidad de las bandas por transmitancia con el *GelDoc* 2000. La concentración de RNA seleccionada para analizar las muestras transfectadas fue de 0.1 μg pues en esta dilución, el competidor no presentó saturación de la lectura de transmitancia y tenía equivalencia con los niveles de expresión de genes hPL derivados de placenta.

Después de este análisis, se co-transfектaron las quimeras de las unidades transcripcionales de hGH-V o hPL-1/hGH-N en JEG-3 con p β bactinahGHN21K y después de 48 h, se extrajo el RNA total para analizar los niveles de expresión. A cada muestra de RNA se le adicionaron 2500 fg (2.5 pg) del competidor, (equivalentes a 10 atomoles, ver detalles de cálculos en Material y Métodos) y se procedió a la RT-PCR cuantitativa con los oligonucleótidos 112 – 113 (para transcritos hGH-hPL) y 104 – 106 (para transcritos GAPDH). La concentración de RNA final usada de células transfectadas fue de 350 ng pues la analizada previamente (100 ng), fue insuficiente para establecer competencia con el competidor (datos no mostrados), posiblemente debido a que los ensayos de optimización los hicimos con los productos de expresión endógena, mientras los derivados de transfección frecuentemente son mayores que los de expresión interna (111,112). Los productos RT-PCR, se separaron en gel de agarosa al 2.0% y

Regulación en el complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

se analizó la densidad de las bandas por transmitancia, con el fotodocumentador *GelDoc 2000*. La figura 37 muestra el gel obtenido al separar las bandas de la RT-PCR cuantitativa y en la figura 38, la tabulación y cuantificación del número de atomoles relacionados con la densidad de la banda del competidor.

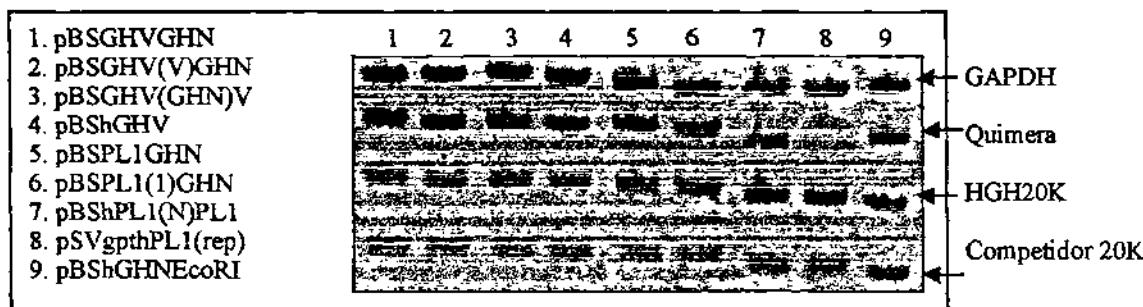


Figura 37. RT-PCR cuantitativo de quimeras hPL-1, hGH-V/hGHN. La figura muestra el patrón de bandas obtenidas al separarlas en gel de agarosa 2% producto de la RT-PCR cuantitativa. Las bandas de la parte superior a la inferior, corresponden a los productos: GAPDH, quimera hGH-hPL1/hGH-N, HGH 20 K derivada de β bactinahGHN21K y 20K β Edr1 (competidor adicionado). Las bandas fueron cuantificadas utilizando densitometría con el fotodocumentador GelDoc 2000.

A

Análisis de unidades transcripcionales de hPL-1 y hGHV (atomoles)									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	
V/GHN	V/V/N	V/N/V	V/V	PL1N	1/1/N	1/N/1	pSVPL1	hGHN1	
7,5	2,5	6,2	4,2	4,51	7,8	1,5	0,26	4,7	
6,2	3,2	5,8	2,8	4,7	6,5	2,9	0,11	6,1	
5,2	1,7	4,9	2,9	4,1	5,9	3,7	0,16	5,5	
Media	6,3	2,466667	5,633333	3,3	4,436667	6,733333	2,7	0,176667	5,433333
Desv. Std.	1,153256	0,750555	0,665833	0,781025	0,306649	0,971253	1,113553	0,076376	0,702377

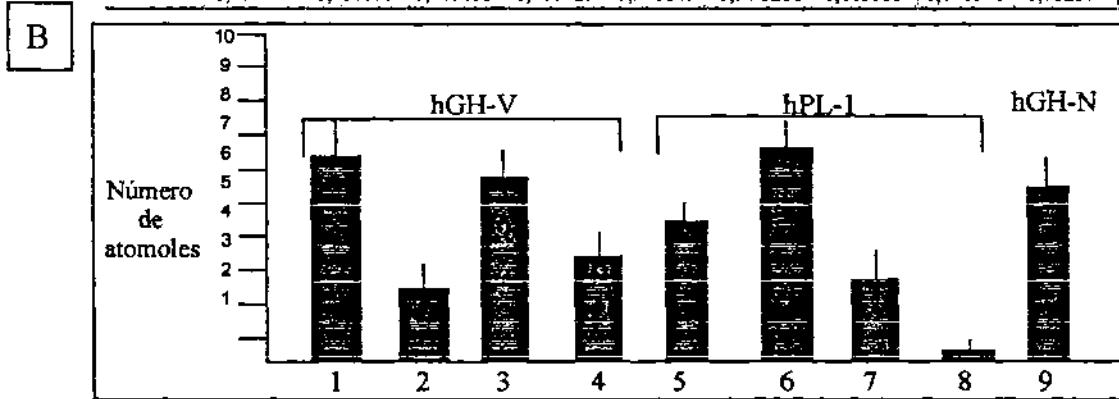


Figura 38. Cuantificación del número de atomoles A: Las bandas del gel anterior fueron cuantificadas por densitometría con los valores de transmitancia y se calculó el número de atomoles, al relacionar la transmitancia de las bandas de las quimeras contra la del competidor adicionado (de concentración conocida 10 atomoles, relación de cálculo presentada en *Material y Métodos*). B: Los valores se graficaron y los datos sugieren que la primera mitad de hGH-V no presenta efecto para activar la expresión de la quimera, mientras la primera mitad de hPL-1 sí aumenta la transcripción. La construcción de pSVgpthPL1r, no presentó niveles de expresión detectables, dato evidenciado previamente en la ULIEG (137).

Los sugerían que la primer mitad hPL-1 participa en activación, por ello se pensó que algún elemento incluido en el primer intrón del gen podría actuar en conjunto con el promotor natural para producir mayores niveles de expresión. Para tratar de evidenciar este punto, y además hacer extensivo el análisis de la unidad transcripcional a todos los genes del complejo, construimos otra colección de recombinantes que conservaban el promotor y primer intrón de los genes de expresión placentaria (hPLs y hGH-V), fusionados al resto de la unidad transcripcional de hGH-N a partir del segundo exón y los transfecmos en cultivo celular de placenta, JEG-3. La proteína HGH es codificada a partir del tercer exón del gen hGH-N por lo que en las quimeras, podía ser usada como reportera para estudiar el efecto del primer intrón en la activación del promotor de estos genes.

4.3.6 Construcción de quimeras para análisis del 1er Intrón de genes hGH-hPL.

Para lograr los recombinantes, se digirieron los plásmidos pBShGH-hPL *EcoRI-PvuII* con las enzimas de restricción *Aat* II y *Kpn* I para recuperar la porción del vector que conserva el promotor hGH-V ó hPL con el exón I, intrón 1 y 6 nucleótidos del exón II, de cada gen placentario. El vector pBShGHNEcoSsp también se digirió con las mismas enzimas para recuperar la unidad transcripcional de hGH-N *Aat-Kpn*, la cual se ligó a los vectores antes purificados. Los recombinantes resultantes conservan el promotor de 500 pb de los genes placentarios, el exón I e intrón 1 y seis nucleótidos del exón II fusionados al gen hGH-N, desde el exón II hasta el exón V. Esta estrategia de clonación, permitió comparar los niveles de expresión de HGH (codificada a partir del tercer exón) obtenidos con estos recombinantes y compararlos con los obtenidos usando las construcciones con promotor proximal de hGHV o hPL, fusionado a la unidad transcripcional completa de hGH-N.

La figura 39, resume el proceso para la construcción de estos recombinantes, los cuales se caracterizaron con la enzima *Pst* I que permitió diferenciar claramente a todas las construcciones (mapas de restricción y fragmentos esperados, incluidos en sección de Anexos).

Regulación en el complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

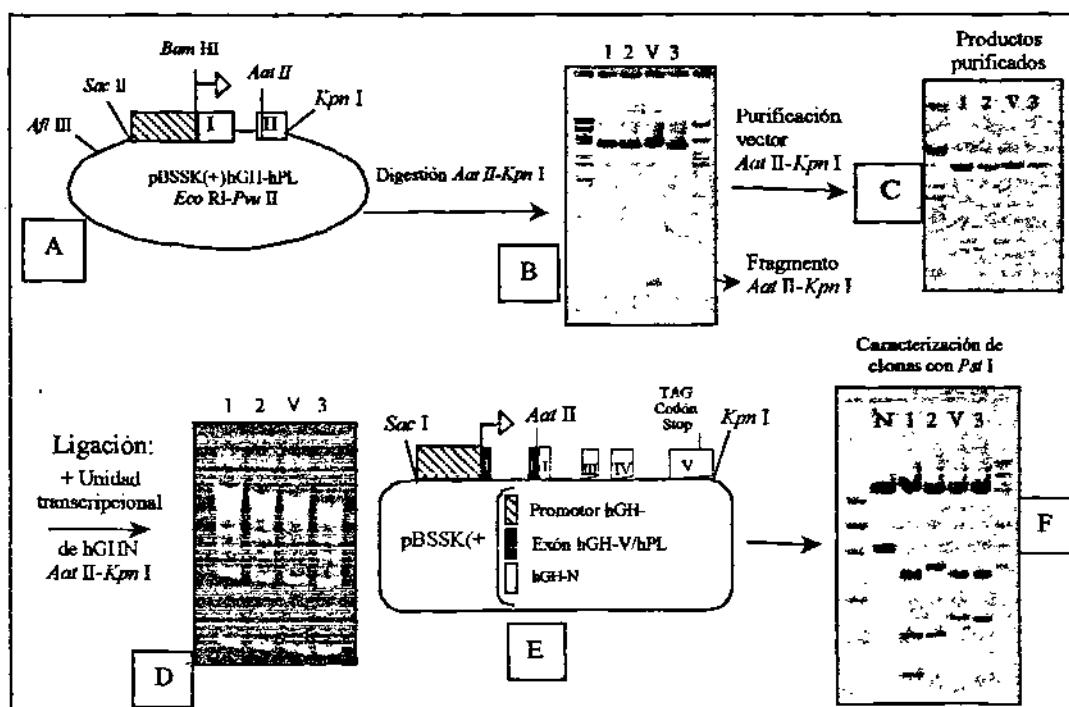


Figura 39. Construcción de vectores para estudiar el efecto sinérgico promotor-primer intrón. Se obtuvieron cuatro diferentes recombinantes a partir de las construcciones en pBlueScript hGH-hPL Eco-Pvu II (A), los cuales se digirieron con las enzimas de restricción *Aat* II y *Kpn* I (B). Los vectores conservaban el promotor hGH-V/hPL, exón I e intrón I. Se purificaron (C) y ligaron a la unidad transcripcional de hGH-N purificada digerida también con las mismas enzimas (D). Los recombinantes obtenidos (E) se caracterizaron con la enzima *Pst* I (F), que identifica a cada uno de los recombinantes por presentar diferentes patrón de bandas.

Las construcciones recombinantes caracterizadas y purificadas por CsCl, se co-transfектaron con pCMV Sport β Gal en células JEG-3. Después de 48 h, se realizó el análisis de la expresión de HGH en el medio extracelular y la enzima β -Galactosidasa en el extracto celular. La figura 40 muestra los niveles de HGH obtenidos con los recombinantes, los cuales presentan niveles diferentes a los obtenidos con recombinantes que contienen únicamente los promotores hGH-hPL fusionados a la unidad transcripcional completa de hGH-N y confirma el efecto observado para las quimeras de hPL-1 y hGH-V. Los resultados demuestran claramente, que el primer intrón de hPL-2 así como el de hPL-3, favorece la transcripción de su promotor, el de hPL-1 tiene mínimo efecto estimulador, mientras que el de hGH-V no presenta ningún efecto de activación sobre su promotor proximal.

Regulación en el complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

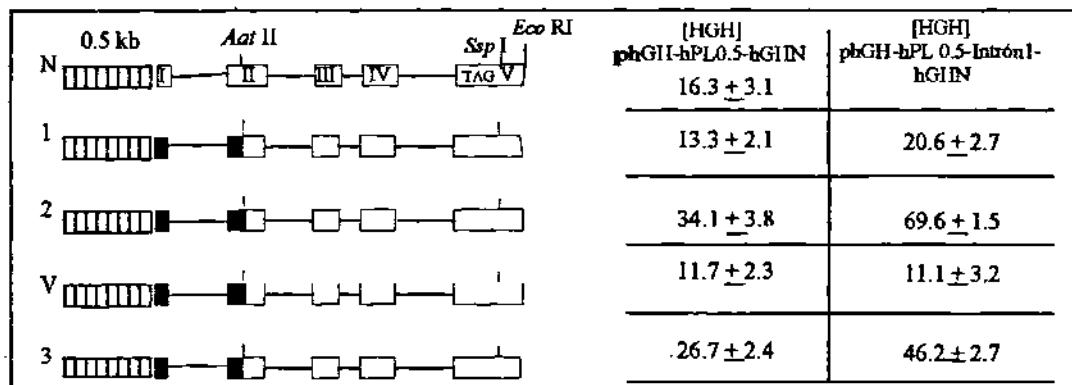


Figura 40. Concentración de HGH obtenida con quimeras de primer intrón. La tabla resume los obtenidos después de cuantificar la proteína reportera HGH. Es importante remarcar la activación positiva que sufren las construcciones con el primer intrón de cada gen hPL que retienen su promotor proximal, pero no el recombinante de hGHV, el cual no presentó efecto significativo de activación en esta línea celular (JEG-3). █ Promotor hGH-hPL, □ Exones de la unidad transcripcional hGH-N, █ Exón I e inicio de Exón II de genes hPL o hGH-V.

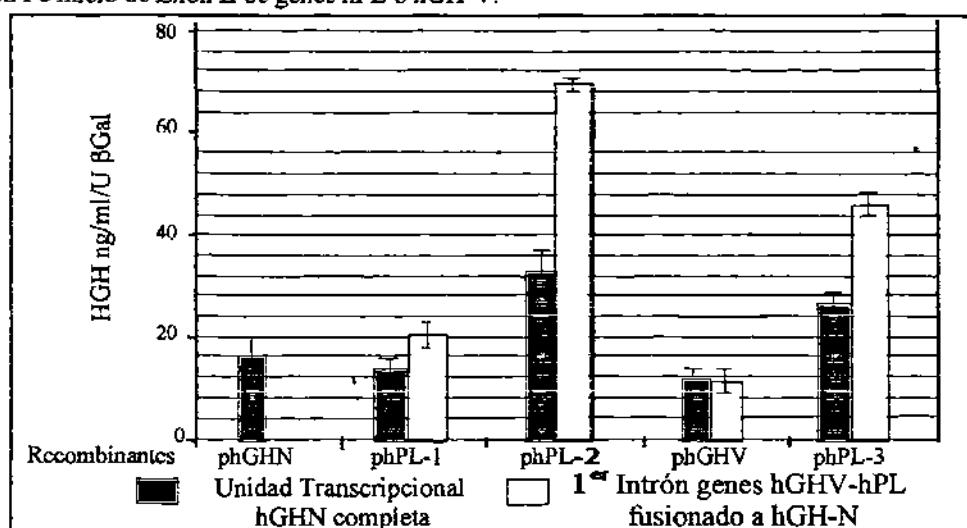


Figura 41. Efecto del primer intrón sobre el promotor de genes placentarios en células JEG-3. Los recombinantes obtenidos en el paso anterior, se analizaron en células de placenta por triplicado y los niveles de HGH demuestran que en el caso del primer intrón de los genes hPL-2 y hPL-3 combinado con su promotor natural, aumenta al doble o casi el doble respectivamente, los niveles de expresión de la proteína reportera. El caso del recombinante de hPL-1, aumentó cerca de un 30% mientras que en hGH-V, no se detectó diferencias de activación.

4.4 Pruebas estadísticas.

4.4.1 Análisis de Varianza e inferencia estadística.

Se realizó ANOVA simple para la comparación del valor F, las tablas de resultados se muestran en la sección de ANEXOS para cada sección de objetivos analizada. El caso del análisis del intrón uno demuestran diferencias significativas y evidencian que participa en la expresión y niveles de transcripción de los promotores de los genes de lactógeno placentario en JEG-3.

CAPITULO V**DISCUSION.**

El estudio de los elementos reguladores involucrados en la transcripción de un gen, se centra en la identificación de aquellos que de manera directa o indirecta, pueden afectar la tasa, momento o lugar de la transcripción. Para lograr lo anterior, es frecuente abordar en forma independiente cada uno de los elementos estructurales (Promotor, unidad transcripcional o región 3' no traducible) que integran al gen de interés a veces con la ayuda de genes no relacionados (genes reporteros) que puedan informar del comportamiento de la región génica que pretendemos investigar.

En el humano, se ha estudiado una amplia variedad de regiones génicas siguiendo los principios anteriores. Una de ellas la constituye el complejo de las hormonas del crecimiento humano y lactógeno placentario. Este complejo hGH-hPL ha sido considerado como un excelente modelo para estudiar mecanismos de regulación de la expresión a nivel transcripcional, así como tejido específica, pues aunque sus genes tienen una similitud cercana al 95% en secuencia nucleotídica codificante, mínimas diferencias en sus regiones reguladoras como el promotor, región 3' e incluso en la unidad transcripcional, provocan que se expresen en tejidos distintos (hGH-N en pituitaria y hPLs – hGHV en la placenta) y en niveles de expresión diferentes. Muy posiblemente estas variaciones en secuencia entre los genes del complejo, los hacen blanco de diferentes efectores hormonales o factores de transcripción, que de alguna manera alteran los patrones de expresión.

Para estudiarlos en este trabajo, se estudió en forma sistemática y en paralelo, las regiones reguladoras de los genes hGH-hPL como:

- 1) Variaciones en la longitud del promotor de cada gen.
- 2) Diversos moduladores sobre las versiones largas de los promotores.
- 3) Factores de transcripción sobre las versiones promotoras de -496 pares de bases.
- 4) Porciones de las unidades transcripcionales de hPL-1 y hGH-V.
- 5) Los potenciadores de los genes hPL sobre los promotores proximales (-496 pb).

La discusión de los resultados obtenidos con este trabajo, serán presentados en base al orden de los objetivos propuestos.

5.1 Regulación en la región 5', comportamiento de los promotores del complejo hGH-hPL.

La primera parte consistió en la subclonación de las regiones reguladoras de los genes hGH-hPL fusionándolas al gen hGH-N. Una vez construida la serie de recombinantes, se analizaron por transfección transitoria en cultivos celulares derivados de placenta (JEG-3), pituitaria (GH-3 o GC) y de cérvix humano (HeLa) como testigo.

5.1.1 Regiones promotoras distales.

Con la subclonación de los elementos promotores, obtuvimos una colección amplia de recombinantes con longitudes largas (entre -2 y -3 kb) y cortas (-496, -140 y -70 pb), de estas regiones. El análisis de las versiones promotoras largas en células JEG-3 demostró que hGHN no fue capaz de generar niveles de expresión detectables de HGH mientras que la de -496 pb sí, lo cual nos hizo suponer la acción de un mecanismo o factor de represión, actuando en la región promotora distal de este gen.

Los promotores de hPL-1 y hPL-3 tuvieron un comportamiento similar entre ellos sin diferencias significativas en los niveles de expresión del gen reportero de acuerdo a los valores F de ANOVA, mientras hPL-2 tuvo niveles de expresión casi tres veces mayores a los anteriores. Hasta este momento, los resultados en JEG-3 reproducían el comportamiento observado en el ambiente fisiológico de la placenta humana. Pero interesantemente, el promotor de hGH-V, considerado uno de los genes más débiles del complejo y que alcanza órdenes de expresión 1000 veces menores que los de hPL-2, según los reportes originales de Chen y cols en 1989 (12), en estos ensayos repetidamente mostró niveles elevados de transcripción comparables con los obtenidos por el promotor de hPL-2; varios argumentos pueden explicar este comportamiento:

- 1) Uno se relaciona con el tamaño de la región promotora de hGH-V clonada, la cual tal vez carece de elementos de unión a represores ubicados en regiones más distales del promotor (hacia el extremo 5'), presentes sólo en la secuencia nativa de hGH-V en la cromatina.
- 2) Diferencias en la concentración de glucosa entre el medio Opti-MEM comparado con RPMI-1640 (regularmente utilizado por los grupos de investigación que reportan nulos o muy bajo nivel de transcritos de hGH-V en JEG-3) o concentraciones del suero bovino fetal (ellos utilizan 15%, mientras que nosotros usamos 10%) utilizadas por los mencionados grupos, pueden haber alterado el patrón de expresión endógena y del promotor de hGH-V transfecido, pues algunos grupos han demostrado que HGH-V secretada *in vitro*, es inhibida por los niveles de glucosa (114).
- 3) Quizás las regiones cromatinicas del promotor de hGHV en el DNA genómico se encuentran hipermetiladas, lo que provoca que los factores transcripcionales no puedan accesar a las secuencias blanco. Este punto puede ser apoyado por los experimentos de Jiménez y cols. en 1993 en el que sus experimentos sugieren que cambios en la cromatina entre pituitaria y placenta, puede preceder la activación transcripcional de los miembros del complejo hGH-hPL (14).

En resumen, las versiones promotoras largas de hGH-N, hPL-1, hPL-2 y hPL-3 reprodujeron el comportamiento de los niveles de expresión detectados en placenta, así como la especificidad tisular, pero el gen hGHV se comportó con otros niveles de expresión, simulando tal vez la situación que se presenta en las etapas finales del embarazo en las que la concentración de HGH secretada por la placenta es mayor y sustituye casi por completo a la HGH secretada por la pituitaria (34).

5.1.2 Comportamiento de los promotores proximales en ambas líneas celulares.

La versión promotora corta de -496 pb de hPL-2 en JEG-3 mostrados en la figura 15, tuvo un comportamiento muy similar entre hGH-N y hGH-V sin diferencias significativas entre ellos y aunque se eliminó la región distal en hGH-V, siguió teniendo niveles de expresión similares a los de hPL-2 lo que puede deberse a que al eliminar muchos de los elementos de respuesta por la delección de la región promotora distal, se provoca un comportamiento más similar de las regiones reguladoras, como lo sugiere Weerdt y cols. trabajando la región promotora distal del gen de prolactina humana (115).

El estudio de la versión promotora de -496 pb en células GH-3, mostró que hGH-N, hPL-2 y hGH-V tuvieron niveles de expresión más elevados que hPL-1 y hPL-3. Nuestros resultados, confirman parcialmente otros ya obtenidos con los promotores proximales de hGH-N, hPL-2 y hGH-V, pero realizados en células GC por Nickel y cols. en 1990 y 1991 (22,47), quienes demostraron que el promotor proximal de hGH-V tuvo niveles casi nulos de expresión al compararse con el promotor de hGH-N, mientras el de hPL-2 fue el más fuerte. En nuestros ensayos, debido a las desviaciones estándard experimentales el promotor proximal de hGH-V se comporta similar a los de hGH-N y hPL-2. El comportamiento de hPL-2 y hGH-N pero no hGH-V, concuerdan con los datos de dichos investigadores; quienes explican la inhibición de hGH-V en sus experimentos, por ensayos de protección a DNase utilizando extractos nucleares de células GC adicionados a los promotores de hGH-V, hGH-N y hPL-2. Sus resultados demostraron que la secuencia proximal de unión a Pit-1 en el promotor hGH-V no interactúa con el factor transcripcional, debido a mutaciones en esta región (revisar alineamiento de promotores figura 2), mientras las correspondientes de hPL-2 y hGH-N si podían hacerlo (22, 70).

Una posible explicación de por qué el promotor proximal de hGH-V expresa niveles de HGH comparables a los de hGH-N en este estudio, puede ser debido a que la unidad transcripcional hGH-N actúe de manera sinérgica con el promotor de hGH-V favoreciendo su potencia de transcripción, como ha sido demostrado previamente por Kolb y cols. en 1988,

analizando regiones exónicas e intrónicas del gen hGH-N, tanto con un promotor heterólogo, como con el promotor proximal de hGH-N (85); mientras que el promotor de hPL-2 es más activo que el de hGH-N, quizás debido a que la pobre unión de Pit en su región distal (47); es desplazada por el factor ubicuo Sp-1, lo cual ha sido comprobado previamente por Lemaigre y cols. en 1990 con el promotor de hGH-N (53,116). Este evento podría activar consecuentemente más la transcripción de hPL-2 que la de hGH-N. La incapacidad para unir a Pit, ya sea a la región proximal (hGH-V) o a la distal (hPL-2), se correlaciona con los niveles de expresión para cada promotor proximal en células GC, como lo sugirieron Natchigal y cols. en 1989 (70), por lo que posiblemente un mecanismo similar, sucede en nuestros ensayos con GH-3..

Desconocemos si los menores niveles de HGH que detectamos con los promotores de hPL-1 y hPL-3 en la misma línea celular pituitaria, se deben a un comportamiento similar al atribuido para hGH-V de incapacidad para unir a Pit-1 en la región proximal (47) o bien, debido a que Pit-1 unido a estos promotores puede presentar pobre interacción con otras proteínas cooperadoras de la transcripción en la pituitaria o en placenta, necesarias para aumentar los niveles de transcripción, como lo demostraron previamente Bradford y cols. en 1997, estudiando la interacción de Pit-1 con el proto-oncogen ETS-1, unión que permite distinguir la activación y expresar específicamente los promotores de hGH-N o prolactina humana, en sus respectivos tipos celulares (117).

5.1.3 Elementos represores activos en los promotores del complejo hGH-hPL.

La especificidad obtenida con las versiones promotoras largas de hPL para impedir la transcripción en células de pituitaria, se debe a que conservan el elemento P descrito por Chen y cols. en 1989 (12), el cual está relacionado con la inhibición en pituitaria de acuerdo a los ensayos de Natchigal y cols. en 1993 (71), utilizando el elemento P de hGH-V y corroborado por Norguay y cols. con el elemento P de hPL-2 quién atribuye el efecto de represión a la unión del factor ubicuo NF-1 a esta región (118). La represión en células GH3 que detectamos con las versiones largas de los promotores placentarios, sugiere que el elemento P es

similarmente activo en los otros genes del complejo (hPL-1 y hPL-3) y al no estar presente en hGH-N, fue el único que se expresó.

Contrariamente, la incapacidad del promotor largo de hGH-N en JEG-3 para expresar HGH comparada con la versión promotora de -496 pb que si fue activa, nos hace suponer la acción de un elemento represor específico de hGH actuando entre -0.5 y -2.1 kb, que impide la expresión en células de origen diferente a la pituitaria. Este elemento ha sido sugerido anteriormente por Larsen y cols. en 1986, trabajando con una versión promotora de -1.8 kb del promotor de GH de rata en células GC, fibroblastos y células de riñón dirigiendo la expresión del gen bacteriano CAT, demostrando que la construcción es activa en células GC de pituitaria de rata pero presenta un efecto de inhibición de la expresión en líneas celulares que no son de pituitaria (119). En otro estudio, Park y cols. (120), señalaron al factor YY1, también conocido como NF-E1 o UCRBP (sitio de unión consenso: CGCCATNTT), como el responsable de la represión del promotor largo de GH de bovino en células HeLa, varios sitios de respuesta a YY1 están presentes en la región distal de promotores del complejo (revisar ANEXOS), sin embargo a la fecha no se ha estudiado su efecto en el de hGHN.

El análisis de las regiones distales con el software MatInspector, para la búsqueda de elementos de respuesta a moduladores o factores de transcripción, identificó varios sitios de unión a Pit-1, que no han sido reportados en todos los promotores de los genes del complejo analizados en este trabajo (hGHN 2240 pb:-2050/-2041,-1584/-1575, hPL-1 2490 pb: -1212/-1203, hPL-2 3420 pb: -3246/-3237, -1256/-1246, hGH-V 2730 pb:-1252/-1242, hPL-3 2730 pb:-1251/-1242, en base a la secuencia originalmente reportada por Chen y cols. en 1989). Adicionalmente, regiones HS detectadas por ensayos de protección a DNAsa cercanas a los sitios de respuesta a Pit-1 que aquí referimos, se han descrito también por Romero-Prado en el laboratorio del Dr Castrillo-Diez, en Madrid, España, utilizando Baes que poseen regiones clonadas del locus hGH-hPL, pero se desconoce aún su función (comunicación personal y presentación oral del trabajo en el Congreso Nacional de Genética Humana, Noviembre 2000, Mty. N.L.). Estas regiones podrían estar relacionadas también con los niveles de expresión y

Regulación del complejo multigénico hGH-hPI, mediado por hormonas y factores transcripcionales

especificidad de tejido de hGH-N, como los descritos por Jones y cols. en 1995 (37) y Su y cols. en 2000 (42), en regiones localizadas más distalmente en el promotor de hGH-N.

Con respecto al promotor largo hPL-1, aunque presentó un comportamiento activo, los niveles de expresión del gen reportero fueron menores al de los otros promotores placentarios. Al analizar las secuencias distales de los promotores vía Internet, interesantemente localizamos en la región distal múltiples sitios de respuesta al factor POU, Oct-1 (9 sitios, mientras que para los otros genes son mucho menores, 3 para hGHN, 2 para hPL-2, 2 para hGH-V y 3 para hPL-3). Este factor, inicialmente fue señalado por Peritz y cols. en 1988 como activador de los promotores proximales del complejo (121), mientras reportes más recientes como los de Chandran y cols. en 1996, mostró que secuencias de respuesta a glucocorticoides pueden presentar capacidad represora al unirse en forma heteromérica a Oct-1 en el promotor de gonadotropina coriónica, un gen que se expresa también en la placenta (122) y por Kakizawa y cols. en 2001, quienes encontraron el mismo efecto, pero uniéndose Oct-1 con receptores de ácido retinoico y T3 (123). Estos resultados cuestionan si los niveles de expresión de este factor en la placenta y su relación con los elementos de respuesta al mismo en el promotor de hPL-1, participan de la pobre actividad del promotor observado en este trabajo y si se relaciona con los bajos niveles de hPL-1 en el sinciciotrofoblasto placentario.

Otro elemento represor presente en todos los promotores, lo detectamos entre -140 y -496 pb, pues los recombinantes de -140 pb presentaron consistentemente mayores niveles de expresión que los recombinantes con promotor de -496 pb. Son varios los reportes que han descrito la acción de este elemento negativo en el promotor del gen GH de diversas especies, como Roy y cols. en 1994, trabajando con el promotor de GH de rata (rGH) relacionó la unión del factor NF-1 de hígado con tres proteínas nucleares, para ejercer su función represora, ubicando su acción entre -322 y -293 pb en células de riñón de mono COS-1 y células de pituitaria GH₄C₁ (123). Esto fue confirmado por Park y cols. en 1996 mediante una estrategia similar a la de Roy con el promotor de GH bovina en células HeLa y GH3 el cual tenía una

deleción entre -336/-240 y que presentó mayores niveles de expresión del gen reportero CAT (entre 5.5 y 2.2 veces más), que el promotor proximal completo (119).

Los ensayos realizados por Nachtigal y cols. en 1989 (70) con el promotor hPL-2 en células GC, y de Fitzpatrick y cols. en 1990 con el promotor de hPL-3 en JEG-3 (60), los de Roy y cols. con el promotor proximal de GH de rata en células GC (124), también señalan una región silenciadora entre -315 y -124. Peritz y cols. en 1988, relacionaron la actividad del mencionado represor en el promotor de hGH-N más específicamente entre -308 y -235 (121). En resumen, todos estos grupos han descrito la acción del elemento represor invariablemente ubicado entre -300 y -140 pb, para hGH-N, hPL-2 o hPL-3 y en este trabajo, se demostró que dicho elemento tiene el mismo efecto en los promotores hPL-1 y hGH-V, tanto en línea celular humana de placenta (JEG-3), como en la línea celular de pituitaria de rata (GH-3).

5.2 Respuesta a moduladores hormonales por las versiones promotoras largas

Diversos reportes en la literatura describen la activación de los promotores por efectores hormonales, principalmente las versiones cortas (-496 pb) (48,79,81); algunos comparan dos regiones promotoras largas (hPL2 ó hPL3) (74,76,78,80), en este trabajo se describe la respuesta de las cinco versiones promotoras largas a cuatro moduladores hormonales previamente caracterizados en algunos de los promotores proximales o distales del complejo.

La respuesta de los promotores largos a los moduladores hormonales en JEG-3, fue principalmente de activación incluso con el promotor de hGHN, el cual inicialmente se había comportado como el promotor más débil en JEG-3 ya que en apariencia la acción de los moduladores (excepto en el caso de T3), inhibió el efecto del represor en esta línea celular con efecto en el promotor distal y que se sugirió inicialmente durante este trabajo.

En el caso de la triiodotironina, en JEG-3 todos los promotores de los genes expresados en placenta fueron activados por esta hormona, en diferentes magnitudes, lo cual puede estar relacionado con el número de elementos de respuesta ubicados en el promotor distal [GHN (2.2 kb)=2, hPL1 (2.5 kb)=3, hPL2 (3.4 kb)=4, hGHV (2.6 kb)=2, hPL3 (2.8 kb)=4], pues

hPL-2 y hPL-3 fueron los más activados, coincidiendo interesantemente con que son los que presentan mayor número de elementos de respuesta a este factor hormonal.

T3 no tuvo niveles significativos de activación en hGH-N en células JEG-3 ni en GC, aunque cuenta con dos elementos de respuesta en el promotor distal [GHN (2.2 kb)=2] aunque una versión promotora larga de hGH-N no ha sido analizada previamente en células JEG-3, este efecto había sido descrito previamente en el promotor proximal por Cattini y cols. en 1986 (124) o Voz y cols. en 1991 (125), pero en células GC. Voz y cols. compararon la activación por T3 de los promotores proximales de hPL-3 y hGH-N en donde solamente el de hPL fue activado. Ellos supusieron que esto se debía a un efecto de competencia entre el complejo T3-receptor con Pit-1 por los sitios de respuesta y debido a que los promotores hPL presentan mutaciones en el sitio de unión a T3 en el promotor de -496 pb (elemento muy cercano al sitio de unión a Pit proximal) favoreciendo la acción de Pit, mientras la unión de T3-receptor en hGH-N impide la de Pit-1, provocando que este promotor no sea activado en células de pituitaria. Un efecto similar pero con alguna proteína POU placentaria, podría ser el responsable del comportamiento de hGH-N en JEG-3.

Otro dato similar fue reportado por Brent y cols. en 1988 (127), evaluando diferentes promotores de GH de rata, bovino y humano, [este último de similar tamaño (2.7 kb) al promotor hGH-N de este estudio] en células GC, el cual no fue activado por T3 mas sí por los otros moduladores. Ellos propusieron que muy posiblemente la incapacidad del promotor de hGH-N de responder al efecto de T3 se debia a diferencias aminoacídicas en el receptor de T3 humano y de las células de pituitaria de rata, impidiendo que el complejo receptor de rata unido a T3 fuera reconocido por las secuencias correspondientes en el promotor proximal de hGH, pero sí por los de rata y bovino, sugiriendo un mecanismo de activación transcripcional dependiente de especie. Este dato, nos indica que aparentemente los otros elementos distales de respuesta a T3 en el promotor de hGH-N, no surten efecto de activación si el elemento de unión al promotor proximal no puede unirse, como ha sido descrito por Weerdt y cols. en

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

2000 en el promotor largo de prolactina humana, un gen de expresión también en pituitaria y que tiene sistemas de regulación muy similares a los de hGH-N (128).

La incapacidad del promotor de hGH-N para ser activado por T3 en células GC, también está en acuerdo con los reportes de García-Villalba y cols en 1996 (79), que propusieron que hGH-N no responde a T3 porque el receptor para esta hormona compite con el receptor de vitamina D en el promotor proximal.

Es posible que muchos de los argumentos antes mencionados acerca de la respuesta del promotor de hGH-N a T3, tengan que ver con impedimentos estéricos entre los sitios blanco en el DNA y la interacción con factores de transcripción (Pit-1), sin embargo, otros investigadores como Zheng y cols. en 1992, propusieron que se debía a la acción de un elemento de respuesta a T3 negativo (nTRE) ubicado en la región 3' no traducible del gen hGH-N, específicamente localizado entre la posiciones +2030 y +2100, entre el codón stop y la región río arriba de la secuencia de poliA (128). Todas las construcciones con la versión promotora larga incluídas en este análisis, contienen la secuencia 3' antes mencionada y aún así presentan activación diferente, por lo que podría suceder que proteínas de regulación unidas a la región 3', puedan influir específicamente en un tipo de promotor y modularlo diferencialmente.

Lo anterior también fue propuesto por Zhang pues demostró que la secuencia de respuesta negativa a T3 en el extremo 3' de hGH-N, es dependiente de promotor y puede inactivar elementos de respuesta positivos a T3, ya que cuando se le fusionó el gen hGH-N al promotor proximal (496 pb) de hPL-3, inhibió la activación de este promotor por T3, más no la de otros promotores como RSV y γ actina. Sin embargo, en nuestros análisis con los promotores largos eso no sucede, indicándonos que posiblemente los otros elementos más distales de respuesta a T3 (el análisis del promotor distal mediante MatInspector ubica 2 elementos de respuesta a T3 en los promotores hGH, uno proximal y otro distal, mientras en hPL-1, hPL-2 y hPL-3 tienen 3, 4 y 4, respectivamente), pueden evitar el efecto de represión del nTRE en promotores hPL, pero no en el promotor largo de hGH-N. Zhang demostró también que el nTRE, es

dependiente de la posición pues al transferirlo al extremo 5' río arriba del promotor proximal de hGH-N, activó positivamente al promotor (128).

Es necesario remarcar que nuestra construcción pBShGHN *Sca* I transfectada, es la única que posee una porción mayor de la región 3' no traducible, por lo que no podemos descartar la posibilidad de que cambios conformacionales diferentes por presentar una secuencia 3' más corta en las otras construcciones con promotor hPL, puedan alterar los patrones de represión del nTRE o la presencia de otros elementos ubicados más al extremo 3' de la señal de poliadenilación en pBShGHN *Sca* I, puedan haber influido en su comportamiento. Algo similar fue descrito por Woychik y cols. en 1984 en relación con los requerimientos de la región 3' del gen de bGH y la correcta poliadenilación para su expresión eficiente en células GC y que puede influir en los niveles de expresión debido a inestabilidad del transcripto (129).

En el caso del ácido retinoico, todos los promotores respondieron positiva y significativamente a este modulador. La activación fue variable dependiendo del promotor del que se trataba y el comportamiento concuerda más con los resultados obtenidos usando el Software MatInspector al relacionar el número y ubicación de los elementos de respuesta a este modulador con el nivel de estímulo: GHN (2.2 kb)=3, hPL1 (2.5 kb)=5, hPL2 (3.4 kb)=4, hGHV (2.6 kb)=9, hPL3 (2.8 kb)=6, con excepción de hGH-V que es el promotor con mayor número de elementos de respuesta a ácido retinoico, metabolito hormonal importante en el proceso del embarazo (130,131), en nuestros ensayos de moduladores no fue el promotor que mejor respondió al efecto de éste y no contamos con una explicación clara al respecto de este comportamiento. En resumen y de manera general, ácido retinoico y T3 activaron a los promotores del complejo, con una tendencia (orden de activación por promotor) muy similar y oscilante entre tres y seis veces de estímulo, datos que están de acuerdo con los reportes de Stephanou y cols. en 1995 utilizando el promotor largo de hPL-3 y el gen reportero CAT (76).

Por otro lado, el producto de fosforilación de ciclinas provocado por la acción del metabolito del tipo segundo mensajero AMPc, se ha analizado y ubicado elementos de respuesta en algunos de los promotores del complejo (74), incluso en el interior de la unidad transcripcional de hGHN según los ensayos realizados por Dana y cols. en 1989 (77). Los promotores que mejor respondieron a la señal del segundo mensajero en células JEG-3 (datos mostrados en la figura 18 y tabla V) fueron hGH-N, hPL-2 y hPL-3, similares entre sí, y después hPL-1 y hGH-V, también muy similares entre ellos. Los datos del número de elementos de respuesta a AMPc detectados por MatInspector en los promotores, es el mismo entre hPLs y hGH-N (hGH-N, hPL-1, hPL-2 y hPL-3: 3 sitios, hGH-V: 4), sin embargo hGH-N fue mucho mejor transactivado por AMPc (6 veces, tabla V); una posible explicación es que el sitio de respuesta a AMPc localizado en la región transcripcional, actúa específicamente con su promotor natural en el vector pBShGHN *Sca I*, estimulando mejor los niveles de expresión, como lo sugirió originalmente Dana y cols. en 1989(77) o Zhang y cols con el nTRE (128).

Otro modulador ensayado fue el éster de forbol. En general los promotores del complejo respondieron pobremente a su acción en células JEG-3, en donde hPL-2 fue el que mejor nivel de HGH obtuvo y aún así, de todos los activadores estudiados en hPL-2, fue el de menor respuesta. El número de elementos en el promotor distal con respuesta a EF por promotor fueron: hGH-N (2.2 kb)=2, hPL-1 (2.5 kb)=3, hPL-2 (3.4 kb)=4, hGH-V (2.6 kb)=2, hPL-3 (2.8 kb)=4. Oury y cols. en 1997, describieron que la secuencia de respuesta a AMPc (-1102/-1096) en el promotor de hPL-3, presenta una sustitución nucleotídica comparada con la de hPL-2, que lo imposibilita para responder positivamente a AMPc pero no a EF mientras hPL-2 puede responder favorablemente a ambos (74). El número de veces de activación en los ensayos de Oury fueron mayores a los obtenidos en este trabajo, sin embargo varios puntos pueden ser responsables de las diferencias:

- 1) Las líneas celulares derivadas de placenta utilizadas fueron diferentes (ellos usaron BeWo y nosotros JEG-3).
- 2) Diferencias en la estabilidad del RNAm de los genes reporteros (hGH-N y CAT) en la célula placentaria.

Por otro lado, su reporte evidencia que hPL-3 presenta débil respuesta a AMPc y EF, mientras hPL-2 respondió mejor a AMPc que a EF; en nuestros análisis hPL-3 no presentó diferencias significativas en el estímulo con AMPc y EF pero, hPL-2 respondió mejor a AMPc que a EF. Este último dato de hPL-2, reproduce el comportamiento que Oury detectó, sin embargo las débiles diferencias observadas pueden deberse también a la longitud de los promotores pues los nuestros son más largos que los analizados por Oury.

Es importante aclarar que la búsqueda de secuencias consenso en los promotores y unidad transcripcional, para éster de forbol y los otros moduladores estudiados fué vía Internet con un software de acceso público que tiene parámetros pre-establecidos para detectar variaciones en las secuencias consenso que no fue posible modificar, por tanto es posible que algunos elementos de respuesta hayan sido excluídos en el análisis. Sin embargo, los niveles de estímulo detectados con éster de forbol, fueron consistentes y se reprodujeron en todas las veces en que se repitió el ensayo (9 veces). Desconocemos la razón de los bajos niveles de respuesta por los promotores a este metabolito y además, los reportes en la literatura concerniente a la respuesta del complejo hGH-hPL para este factor, es limitada.

5.3 Respuesta de los promotores proximales a los factores transcripcionales.

- Pit y PLA.

Son muy pocos los trabajos que se han realizado referentes al estudio de la actividad de factores de transcripción (Pit-1/PLA-1) por transfección en los promotores proximales del complejo y los pocos existentes, se centran en el efecto de Pit-1 en otras líneas celulares diferentes a pituitaria o placenta. Los ensayos de Ono y cols. en 1995 (132) analizó por co-transfección vectores con promotor de GH de rata y salmón, con vectores expresores de Pit-1

de rata o de salmón, en células HeLa y en células de epitelio de carpa (EPC). Sus resultados muestran que Pit-1 de rata transactiva preferentemente en células HeLa al promotor de GH de rata y Pit-1 de salmón, en células EPC al promotor de GH de salmón. Sus resultados sugieren que Pit-1 puede presentar interacción con la maquinaria de transcripción general en una forma específica de especie.

Nuestros ensayos de co-transfección en células GC y JEG-3 muestran que el promotor hGH-N es preferencialmente activado por Pit-1 humano en células GC y los de hPL por el factor PLA-1 en JEG-3, mientras hGH-V lo es con el factor Sp-1 indistintamente del tipo celular. Estos datos sugieren una posible preferencia para transactivar, no sólo a nivel de especie sino también quizás, transactivación preferente en el tipo celular donde normalmente los factores de transcripción son expresados. La anterior sugerencia esta de acuerdo con los resultados de Jiménez-Mateo en su tesis doctoral (57), quién clonó y estudió el factor PLA-1, factor POU de expresión placentaria, co-tranfectando el vector pRSVhPLA-1 con p(0.3)hPL3-luc (vector con el promotor de 0.3 kb de hPL-3 fusionado al gen luciferasa), el cual fue activado 2, 4 y 5 veces en células COS-7, GH-3 y JAR, respectivamente.

De manera general, los promotores proximales hGH-hPL fueron activados en mayor grado por los factores de transcripción en células GC que en JEG-3 (niveles de HGH obtenidos en ambas líneas celulares, tablas VI y VIII). En las construcciones con el promotor de hGH-N, mostró mejor efecto a Pit comparado con hPLA-1 mientras, al comparar la eficiencia de activación del promotor hPL-2 por Pit-1 o PLA-1, no hubo diferencias significativas (ver tabla VIII). En general, todos los promotores expresaron mayor nivel de la proteína reportera en GC que en JEG-3 al ser estimulados con los vectores que expresan los factores de transcripción POU y esto pudiera quizás, deberse a un sinergismo de Pit o PLA con otras proteínas exclusivas de tejido pituitario ausentes en placenta como lo sugirió Lira y cols. en 1993, necesarios para la eficiente activación del gen GH de rata en el ratón transgénico (133) o bien, debido a que los niveles endógenos de Pit-1 en células derivadas de pituitaria (estabilidad del RNAm es mayor en pituitaria) son mayores a los de PLA en

placenta y JEG-3, según la tesis de Jiménez-Mateo (57), cualquiera que sea el caso, dichos mecanismos pueden favorcer más la activación por Pit o PLA en células de pituitaria que de placenta.

Nuevamente, hGH-V no respondió eficientemente a los factores POU seguramente debido al efecto de la mutación detectada por Nickel en el sitio de unión proximal a Pit-1 y que ya mencionamos anteriormente (figura 2) (47). Al comparar la activación por los factores POU entre los promotores placentarios, es contrastante la diferencia obtenida por Pit-1 en hPL-2 y la obtenida con hPL-1 o hPL-3, pues aunque se sabe que el promotor proximal de hPL-2 es más fuerte en pituitaria que el correspondiente de hGH-N, no se había comparado contra la de los otros promotores hPL. En resumen, posiblemente las mínimas diferencias en secuencia (ver figura 2) en los promotores proximales hGH-hPL, se traducen en variabilidad del grado de respuesta a los factores de transcripción expresados por transfección, en JEG-3 y GC.

-Efecto de Sp-1 en células de pituitaria.

La activación por Sp-1 de los promotores hPL en células JEG-3 fue mínima (1.5 veces, ver tabla VI) y no concuerda con los reportes de disminución de la expresión en células JEG-3 reportados por Fitzpatrick y cols. en 1990 con el promotor hPL-3 (60). Dicho ensayo se realizó utilizando los niveles de expresión endógena de Sp-1 y evaluó las veces de disminución de la expresión del gen reportero (8 veces menos) en una construcción con promotor hPL-3 que tenía la región de unión al factor transcripcional deletada y que además, contenía el potenciador del gen hPL-3. Fitzpatrick sugirió que la unión de Sp-1 al promotor de los genes hPL, es importante para la regulación transcripcional mediada por el potenciador de los genes, mientras que en nuestros ensayos, utilizamos los niveles de expresión del factor transfectedo (sumado a los endógenos) en células GC o JEG-3 y evaluamos las veces de activación (no disminución de la expresión) en construcciones carentes del potenciador. Los resultados evidencian que los niveles de expresión exógena de Sp-1, aparentemente no alteran

dramáticamente la actividad de los promotores hPL transfectados y que posiblemente, el efecto de Sp-1 este más relacionado con la actividad basal del promotor o bien, como Jacquemin y cols. sugirieron donde la activación está mediada por el potenciador hPL-3 (91), en vez de ser considerado como un factor o elemento de potenciación al estar sobre-expresado. Quizás el co-transfectar las contrucciones de versión promotora de -496 pb con potenciadores del locus (obtenidas en este trabajo), con el vector expresor de Sp-1 humano, aportaría mayor información de cómo los niveles de expresión de este factor, pueden afectar la potencia de los promotores hGH-hPL y de que manera se ven regulados por éste.

5.4 Respuesta de los promotores proximales a potenciadores del locus.

La respuesta de los promotores proximales del complejo a los potenciadores de los genes hPL en JEG-3, fue positiva para el de hPL-3 pero nula para los de hPL-2 y hPL-1.

La variabilidad del nivel de activación puede explicarse por las mutaciones que han sido caracterizadas anteriormente en el potenciador de hPL-2 por Lytras y cols en 1996 (92), que inhiben su actividad estimuladora comparada con la del potenciador hPL-3. La reparación de las mutaciones en el potenciador hPL-2, recuperan su actividad alcanzando aproximadamente hasta el 98%, de la del potenciador nativo de hPL-3. Estas mutaciones no han sido estudiadas en el potenciador hPL-1 (homólogas a las de hPL-2) el cual presenta además una adicional, cercana al sitio de interacción con el factor TEF1 (+16694/+16704 según secuencia de Chen), del elemento DF4 (ver figura 5 de sección de introducción), que podría explicar por qué el potenciador de hPL-1 mostró menor fuerza en nuestro trabajo que la del potenciador hPL-2, evidenciando la importancia de TEF-1 en la actividad del potenciador (90).

En JEG-3, el potenciador hPL3 fue el más activo y aunque en apariencia estimuló diferencialmente a cada promotor, el análisis de las veces de activación demuestra que el nivel de estímulo por promotor son muy similares (excepto con hPL-1, ver tabla IX), lo que hace suponer que el potenciador actúa igualmente en cada promotor hGH-hPL pero el nivel total de HGH detectada para cada construcción, es dependiente de la fuerza transcripcional de cada

promotor para dirigir la expresión. Un ejemplo del anterior punto, es el promotor hPL-2 que fue el que tuvo menos veces de estímulo (22 veces), aunque en placenta es el más activo, mientras Jiang y cols. reportan datos de estímulo de 13 veces pero utilizando el gen reportero luciferasa (90).

El dato de que el promotor hPL-2 sea el menormente activado por el potenciador hPL-3 se vuelve interesante cuando después de analizar la región promotora con el software MatInspector, detectamos que la región proximal del promotor hPL-2 (-433 a -422) es el único que presenta un sitio de unión al factor transcripcional TEF-5, el cual según los reportes de Jacquemin y cols. en 1997 o de Jiang y cols. en 1999, es el principal responsable de la actividad estimuladora del potenciador de hPL-3 y que la mutación en el sitio de unión al mismo factor en el potenciador de hPL-2, es el responsable de su inactividad (134,135). El factor TEF-1 unido al potenciador hPL-3, ejerce su actividad al interaccionar con el factor TBP y la caja TATA, acercando el potenciador al promotor hPL, lo que permite también acercar al factor TEF-5 unido al potenciador. La cercanía en el ambiente cromosómico, provoca quizás la interacción de TEF-5 unido al potenciador de hPL-3 con la secuencia en el promotor hPL-2, acercándolo más a éste último y consecuentemente, activándolo más en placenta. En nuestras construcciones y por la estructura conformacional (diferente al ambiente genómico placentario), esta interacción puede provocar quizás, un debilitamiento de la unión de TEF-5 al potenciador y generar menor estímulo de hPL-2. Se ha sugerido que quizás el potenciador de hPL-3 está más cerca al promotor de hPL-2 debido a la conformación cromatinica en la placenta, generando mayor expresión de hPL-2 (14). El mecanismo de acercamiento podría ser debido a una unión sinérgica más estable (causada por el entorno cromatinico) mediada por TEF-1 y TEF-5, entre el promotor hPL-2 y el potenciador hPL-3, provocando mayor activación de hPL-2. Quizás la introducción de mutaciones en la secuencia de TEF-5 en el promotor de hPL-2, provocaría un nivel de estímulo igual al de los otros promotores placentarios.

Por otro lado, la discrepancia en los niveles de activación pueden deberse a otras tres diversas razones: 1. El tipo celular, pues nosotros utilizamos células JEG-3 mientras Jiang empleo células BeWo y ha sido reportado que aunque ambas líneas celulares son derivadas de placenta humana, difieren en el grado de madurez del sinciciotrofoblasto (136,137), 2. La variabilidad en los resultados pueden ser debidas a diferente estabilidad del RNA mensajero en las células de placenta JEG-3 o BeWo para los transcriptos derivados de los genes hGH-N o luciferasa, respectivamente 3. La presencia de elementos potenciadores en la unidad transcripcional de hGHN (localizados en intrones), que puedan favorecer la transcripción.

El análisis en células GC, corroboró la naturaleza específica de tejido para activar la transcripción por el potenciador hPL-3 pues los recombinantes con potenciador o carentes de él, tuvieron igual comportamiento. Este dato, anteriormente había sido reportado por Jiang y cols en 1997 con el promotor de hPL-2 unido al potenciador de hPL-3 en células de pituitaria y quién propuso que la inhabilidad del potenciador hPL-3 para activar en células GC, se debe que el factor GT-IIC presente en éste tipo celular, es capaz de unirse al factor TEF-1, impidiendo que éste último interaccione con sus secuencias blanco RF-1 y DF3 en el potenciador de hPL-3, provocando por tanto su represión (88).

Los resultados al estudiar la actividad de los potenciadores, nos confirma primero la variabilidad de la fuerza para estimular la transcripción, segundo que el potenciador de hPL-3 en apariencia posee el mismo efecto de estímulo en cada promotor y tercero, la naturaleza tejido específica de la secuencia para activar la transcripción. Además, la capacidad estimuladora se conserva indistintamente si la secuencia potenciadora es derivada de individuo de sexo femenino o masculino y finalmente, nunca se había analizado comparativamente todos los potenciadores del locus sobre el efecto de los promotores proximales hGH-hPL en un mismo estudio y bajo las mismas variables de análisis.

5.5 Análisis de las unidades transcripcionales de los genes hPL-1 y hGH-V.

Varios grupos de investigación (incluido el nuestro) han reportado variabilidad en los niveles de expresión de los genes del complejo de expresión placentaria. Los estudios se han realizado en placetas de diferentes estadios derivadas del embarazo tanto normales como con anomalías patológicas como diabetes e hipertensión o bien, en neoplasias y líneas celulares (23,24,48,138). Las mediciones se han realizado por muy variadas metodologías como hibridación con sondas específicas marcadas con ATP radiactivo, inmunohistoquímica, RT-PCR o RT-PCR acoplada a hibridación radiactiva, etc.

Consistentemente, se ha reportado a hPL-2 como el predominante en expresión, seguido por hPL-3, hPL-1 y hGH-V, respectivamente. La falta de expresión de hPL-1 ha sido tradicionalmente atribuida a una mutación en el sitio donador de splicing del segundo intrón, que lo inhabilita para procesar el transcripto inmaduro adecuadamente, clasificándolo originalmente como un pseudogene (12). La reparación de la mutación utilizando la secuencia homóloga de hPL-3, no causó que hPL-1 fuera capaz de producir transcriptos o proteína (99). Por otro lado, Misra y cols en 1994 (33), detectaron por RT-PCR, procesamientos alternativos del transcripto los cuales conservaban el marco de lectura para producir una proteína de función desconocida, lo que dejó en duda la clasificación de pseudogene originalmente adjudicada a hPL-1 (12,99,139).

Un estudio llevado a cabo en laboratorio por Reséndez-Pérez y cols en 1991 utilizando construcciones quimeras de los genes hPL-2 y hPL-3 con hGH-N, dirigidos por un promotor heterólogo fuerte (99,140), relacionó la participación de los 2 primeros exones de los genes de la familia hGH-hPL, con los niveles de transcripción así como con su procesividad.

Los resultados de la correcta funcionalidad de los promotores largos y proximales de hPL-1 y hGH-V obtenidos en este trabajo, nos hacen suponer que mecanismos adicionales de control de la expresión, ubicados posiblemente en la unidad transcripcional, podrían estar afectando la fuerza de su promotor y los niveles de expresión de estos genes en la placenta.

Precisamente con el fin de analizar este punto, construimos quimeras de hPL-1 y hGH-V con el gen hGH-N mediante una estrategia de mutagénesis por DNA homólogo similar a la descrita por Reséndez-Pérez y cols. (99,140) o por Liebhaber y cols. en 1986 con los genes GH y prolactina humanos (141), con la diferencia que en nuestro estudio utilizamos el promotor natural de los genes hPL-1 y hGH-V. Los resultados los cuantificamos por RT-PCR competitivo, empleando una construcción con el promotor de βactina humano dirigiendo la expresión de un gen que codifica HGH 20K como competidor y que usamos para evaluar la eficiencia de transfección.

La idea de usar un promotor ubicuo para expresar un gen que sirviera para evaluar eficiencia de transcripción en el análisis de genes del locus hGH-hPL, fue utilizada ya anteriormente por Zhang y cols. con el promotor de γ actina dirigiendo la expresión de gonadotropina coriónica humana, en un análisis de regulación de genes del complejo hGH-hPL y utilizando también en el mismo estudio a hGH-N como reportero (128). Nuestro ensayo fue además cuantitativo pues usamos un competidor plasmídico por los oligonucléótidos de concentración conocida y adicionado al inicio de la RT-PCR. Los controles de transfección y cuantificación funcionaron adecuadamente, en primer lugar obtuvimos un sistema de expresión de una variante de HGH regulada por un promotor ubicuo y segundo, un competidor que eficientemente puede ser co-amplificado en ensayos de RT-PCR.

Los resultados en atomoles, sugieren que la primera mitad de hPL-1 (exón I, intrón 1 y exón II) tiene capacidad de producir más transcritos que la segunda mitad (exón III, intrón 3, exón IV, intrón 4 y exón V), con el promotor proximal nativo; mientras hGH-V no tiene este efecto. Estos resultados, coinciden con los obtenidos por Reséndez-Pérez y cols. estudiando las quimeras de los genes hPL-2 y hPL-3 combinadas con hGH-N a nivel de proteína y reguladas por el promotor de metalotioneína de ratón. Ellos reportaron que la misma región de hPL-3 (*Bam* HI +2-Sac I +588), es capaz de sintetizar 8 veces más proteína que la correspondiente de hPL-2 en células COS-7 y sugirieron que este comportamiento puede

deberse al efecto de las regiones exónicas I y II de cada gen. Sin embargo, son varios los reportes actuales que ubican frecuentemente a elementos de regulación en las regiones intrónicas más que en los exones, como el caso de Kolb y cols. en 1998 (85) analizando el primer intrón del gen hGH-N o como el caso de los elementos de activación ubicados en el tercer intrón del gen GH de la trucha arcoiris estudiado por Bernardini y cols. en 1999 (142).

En 1998, Kolb y cols también demostraron que al utilizar una construcción con una mínima porción de un promotor de un proto-oncogen específico de glándula mamaria fusionado al gen hGH-N completo (todos los intrones), se expresaron concentraciones de HGH muy similares a las producidas por otra construcción carente de promotor, datos que corroboramos por ensayos de transfección en JEG-3 y GC de una construcción en pBluescript con el gen hGHN clonado de los sitios *Bam*H I (+2) a *Eco*R I (+2160) sin promotor (datos mostrados en la tesis de maestría del biólogo Hipólito Castillo-Ureta 2000) (143).

El análisis de los genes hPL-1 y hGHV así como los reportes de la unidad transcripcional hGH-N, nos hicieron suponer que los intrones participan de alguna manera en los niveles de expresión del RNAm y consecuentemente, en el nivel de proteína detectada. Específicamente en el primer intrón de hGH-N, Kolb demostró la existencia de un elemento promotor capaz de dirigir la expresión de genes reporteros como luciferasa. Con el programa MatInspector, detectamos en el primer intrón de todos los genes del complejo, un elemento caja CAT (N: +5371-+5373, PL-1: +12950-+12953, PL-2: +27618-+27621, GH-V: +42288-+42291, PL-3: +50440-+50444, según secuencia reportada por Chen 1989) el cual sumado al elemento de respuesta a glucocorticoides (sitio de unión conservado en todos los genes) o TEF-1 presente sólo en hPL-3 y hGH-V (resultado mostrado en la figura 4 y en sección de Anexos, MatInspector análisis de primer intrón), podría ser considerado un promotor carente de caja TATA, pero con elementos activadores suficientes como para dirigir una expresión eficiente.

El primer intrón de hPL-1 presenta además, un sitio de unión a Oct-1 (+12915+12928) que en conjunto con la secuencia de respuesta a glucocorticoides, pudieran reprimir la expresión de hPL-1 en la placenta, dato que sugerimos por los reportados de Chandran y cols. en 1999, quienes mostraron que el elemento de unión a glucocorticoides unido al factor Oct-1 en el promotor de la hormona relacionada a gonadotropina coriónica de ratón, reprime su transcripción (122). El anterior argumento, podría explicar el efecto en nuestros ensayos de mínima activación por la primer mitad del gen hPL-1 reparado sobre el promotor hPL-1 pero la magnitud del estímulo se ve influída por la fuerza del promotor proximal, efecto de compensación por parte de la segunda mitad de la quimera (intrones del gen hGH-N) o bien, a que existe efectivamente activación por la primer mitad de hPL-1 en la quimera, como ha sido demostrado por el mismo Kolb (85) y sugerido por Reséndez-Pérez y cols (140) en otros genes pertenecientes al complejo ó debido a que existe definitivamente.

En resumen, los datos de esta sección sugieren fuertemente que elementos de respuesta ubicados en la unidad transcripcional de los genes placentarios, pueden ser partícipes de los niveles de transcripción de su propio gen. Para analizar este punto, evaluamos específicamente el efecto del primer exón e intrón 1 de cada gen del complejo de expresión placentaria con su promotor nativo, en los niveles de expresión de hGH-N como reportero.

5.6 Análisis del efecto del intrón 1 en los niveles de transcripción de genes placentarios.

Los análisis realizados por Kolb y cols. con el gen hGH-N (85), por Reséndez Pérez y cols en 1991 con hPL-1, hPL-2 y hPL-3 (140), por Liebhhaber y cols. con quimeras de los genes hGH-N y prolactina (141), los análisis en el tercer intrón del gen GH de la trucha arcoíris (142), los datos reportados por Castillo-Ureta relacionados con los ensayos de la unidad transcripcional de hGH-N carente de promotor (143) y otros estudios con el gen GH de rata que relacionan la conformación y estabilidad activa de la unidad transcripcional mediada por los intrones (144), apuntan hacia el común denominador de que las unidades transcripcionales del

complejo (intrones), poseen elementos de regulación que de alguna manera pueden favorecer o reprimir la transcripción.

El análisis específico de la participación del intrón 1, lo realizamos construyendo quimeras con el promotor proximal nativo, el exón I e intrón 1 de los genes hPL ó hGH-V, fusionados al gen hGH-N a partir del segundo exón (*Aat* II +241) hasta el sitio de restricción *Eco* RI en la posición +2.1, construcción que permite codificar para una proteína HGH madura a partir del tercer exón, que sería utilizada como reportera en células JEG-3.

Los resultados de la tabla en la figura 40 y la gráfica de la figura 41, demuestran que el primer intrón de los genes hPL aumenta significativamente al doble (hPL-2) o casi al doble (hPL-1 y hPL-3), los niveles de expresión de HGH comparados con los de recombinantes conteniendo solamente el promotor proximal de los genes hPL con la unidad transcripcional completa de hGH-N, pero no se presentó aumento significativo con el recombinante de hGH-V que conserva su primer intrón. Liu y cols. en 1995, reportaron que los intrones del gen GH de rata, están involucrados en estimular el alineamiento del nucleosoma tanto *in vitro* como en el ratón transgénico (144), presumiblemente hace pensar que un mecanismo similar puede funcionar en los genes hGH-hPL, favoreciendo la regulación por su promotor quizás de una manera de tipo tejido específica.

Desconocemos precisamente si este efecto es de naturaleza tejido específico, pues el ensayo solamente lo realizamos en células JEG-3. El efecto del primer intrón, se relaciona también con la ubicación de las regiones hipersensibles a DNAsa I, reportadas en el primer intrón de los genes hGH-N y hGH-V por Jones y cols. en 1995 (37) o por Shewchuk y cols. en 1999 (40) y ausentes en los genes hPL (ver figura 1, flechas color negro). Ellos sugirieron, que pueden estar involucradas en la estabilidad del RNA derivado de las unidades transcripcionales, aumentándola en pituitaria y disminuyéndola en la placenta o bien, pueden

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

ser blanco de proteínas de expresión en placenta que unidas al primer intrón de los genes hGH, inhabilitan la activación de sus respectivos promotores en placenta. Un candidato responsable de este comportamiento represivo podría ser el factor de transcripción YY1, pues al analizar el primer intrón I mediante MatInspector (última sección de la parte de Anexos), localizamos su secuencia de unión en el primer intrón exclusivamente en los genes hGH formando parte de la caja CAT alternativa ubicada en esta región y además, porque Park y cols en 1996, también lo señalan como el factor responsable de la inhibición del promotor distal de bGH, en células no pituitarias (120).

Resumiendo los resultados de este trabajo, demuestran claramente que cada región estructural de los genes del locus hGH-hPL tiene participación en la regulación de los niveles de transcripción y el efecto depende de si el blanco es un gen hPL o hGH. Estudios extensivos con un sistema de cultivo primario de pituitaria o placenta, con un gen reportero diferente (pues se ha mostrado aquí que las unidades transcripcionales definitivamente pueden afectar los resultados), quizás puedan poner de manifiesto en forma más eficaz, la participación de cada región, poniendo incluso de manifiesto la acción de otros elementos de regulación.

CAPITULO VI

Conclusiones.

I Regiones promotoras y efecto sobre los niveles de transcripción:

- 1) Todas las versiones promotoras analizadas responden diferencialmente a la acción de diversos moduladores de la transcripción.
- 2) Ácido retinoico y AMPc, fueron los moduladores con un mayor efecto en la potenciación de los promotores hGH-N y hPL-2.
- 3) El análisis de la secuencia nucleotídica de los promotores con el software MatInspector, reveló la ausencia de algunas secuencias de respuesta en los promotores distales de los genes placentarios, que respondieron más débilmente a la acción de los moduladores.
- 4) El factor transcripcional hPLA-1, transactivó preferentemente a los promotores hPL en JEG-3, el factor Pit-1 transactivo principalmente a hGH-N en células GC y el factor Sp-1, activo casi exclusivamente al promotor de hGH-V. Pequeñas diferencias en secuencia en los promotores distales (deleciones o inserciones), así como el sinergismo con otras proteínas específicas de placenta o pituitaria; pueden conducir a un comportamiento particular de los promotores de los genes del locus hGH-hPL.
- 5) El análisis de los promotores distales, reveló secuencias con interacción a TEF-1 y TEF-5 en hPL-2 y ausente en hPL-1 y hPL-3. Estos factores están estrechamente relacionados con la actividad de estimulación por el potenciador de hPL-3.

II Análisis de la región 3' :

- 1) De las tres secuencias potenciadoras analizadas, solo la del gen hPL-3 es funcionalmente activa. Además, se detectó un efecto dependiente del promotor sobre el que interactúa.
- 2) La inhibición del efecto potenciador en células de pituitaria, comprueba la naturaleza tejido-específica en placenta de los potenciadores.
- 3) El potenciador hPL-3 fue el más activo, pero el nivel de activación fue casi el mismo número de veces en todos los promotores, por lo que las diferencias en los niveles de HGH detectados, se deben exclusivamente a las características de acción del potenciador sobre cada promotor.

III Estudio de la baja expresión de las unidades transcripcionales hGH-V y hPL-1.

- 1) El análisis de las quimeras mostró que las unidades transcripcionales de hPL-1 y hGH-V afectan la fuerza de su promotor natural y reprimen los niveles de su transcripción, respectivamente.
- 2) El efecto del primer intrón actúa sinérgicamente sólo en los promotores de los genes hPL en células derivadas de placenta, aumentando la potencia del promotor. El análisis de los elementos de respuesta contenidos en el primer intrón, revelan en el de los genes hGH la secuencia con unión al factor YY-1 relacionado con la represión de la transcripción del promotor largo de bGH en líneas celulares diferentes a pituitaria, pudiendo relacionarse como un elemento represor en placenta de los genes hGH y posiblemente, relacionarse con los bajos niveles de expresión de hGH-V en dicho tejido.
- 3) El primer intrón de hPL-1, favorece pobremente la transcripción de su promotor. El análisis del primer intrón ubica una secuencia de respuesta para TEF-1 en hPL-2 y hPL-3 pero ausente en hPL-1, esto se relaciona con la menor actividad tanto del promotor como de la primera mitad del gen hPL-1 comparada con la de los genes hPL-2 y hPL-3, en células JEG-3.

CAPITULO VII

Perspectivas

La construcción de los recombinantes, ha permitido analizar sistemáticamente regiones individuales de las secuencias reguladoras del complejo hGH-hPL con un gen perteneciente al locus, sin embargo el análisis de las unidades transcripcionales de los genes hPL, hGH-N y hGH-V nos revela que otros mecanismos de regulación presentes en los intrones son capaces de modular la tasa de transcripción, mediante la interacción con el promotor nativo; lo que vuelve al gen hGH-N un reportero no completamente eficiente para análisis de regiones reguladoras del locus, pues presenta efecto sobre ellas.

Los ensayos de transfección permitieron determinar que es posible hacer cuantificaciones de las respuestas de los elementos reguladores en células en cultivo y que las construcciones responden adecuadamente a los mecanismos de regulación, así como a los moduladores positivos o de represión. Por lo tanto se justifica un estudio más detallado en el que se incluyan nuevas construcciones utilizando un gen reportero que no interactúe con las regiones promotoras del complejo. Dicho estudio podría realizarse en cultivo celular humano no neoplásico (cultivo primario de pituitaria y placenta humana) y podría aportar nuevos datos acerca del efecto de los promotores o potenciadore. De igual manera, el análisis de una porción promotora de hGH-V mayor a la analizada en este estudio, quizás podría reproducir mejor el comportamiento observado en placenta, pudiendo quizás ubicar al elemento responsable de su represión en ese tejido.

REFERENCIAS

1. Zenklusen D, Stutz F Nuclear export of mRNA. 2001, *FEBS Lett*; 498(2-3):150-6
2. Hood LE. Tools of genetic manipulation. 1984, *Basic Life Sci*; 28:301-17
3. Rincon-Limas DE, Lu CH, Canal I, Calleja M, Rodriguez-Esteban C, Izpisua-Belmonte JC, Botas J. Conservation of the expression and function of apterous orthologs in *Drosophila* and mammals. 1999, *Proc Natl Acad Sci*; 96(5):2165-70.
4. Harder T, Kube E, Gerke V, Margot JB, Demers GW, Hardison RC. Complete nucleotide sequence of the rabbit beta-like globin gene cluster. Analysis of intergenic sequences and comparison with the human beta-like globin gene cluster. 1989, *J Mol Biol*; 205(1):15-40.
5. Martensson IL, Nilsson K, Leanderson T Transcriptional regulation of immunoglobulin expression in a chronic lymphocytic leukemia cell line. 1989, *Eur J Immunol*, 19(9):1625-9
6. Lefevre, C., Imagawa, I., Dana, S, Grindlay, J., Bodner, M. and Karin, M. Tissue specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific transacting factor. 1987, *EMBO J*; 6:971-981.
7. Barrera-Saldana HA. Growth hormone and placental lactogen: biology, medicine and biotechnology. 1998, *Gene*; 211(1):11-8.
8. Krawczak M, Chuzhanova NA, Cooper DN. Evolution of the proximal promoter region of the mammalian growth hormone gene. 1999, *Gene*; 237(1):143-51.
9. Dyck MK, Gagne D, Ouellet M, Senechal JF, Belanger E, Lacroix D, Sirard MA, Pothier F. Seminal vesicle production and secretion of growth hormone into seminal fluid. 1999, *Nat Biotechnol*; 17(11):1087-90.
10. Barrera-Saldana HA, Robberson DL, Saunders GF. Transcriptional products of the human placental lactogen gene. 1982, *J Biol Chem*; 257(20):12399-404
11. Seto MH, Harkins RN, Adler M, Whitlow M, Church WB, Croze E. Homology model of human interferon-alpha 8 and its receptor complex. 1995, *Protein Sci*. 4 (4):655-70
12. Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldana HA, Gelinas RE, Seburg. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. 1989, *Genomics*; 4(4):479-97.

REFERENCIAS

13. Harper ME, Barrera-Saldana HA, Saunders GF. Chromosomal localization of the human placental lactogen-growth hormone gene cluster to 17q22-24. 1982, *Am J Hum Genet*; 34(2):227-34.
14. Jimenez G, Ford AM, Enver T, Boronat A. Multiple changes in chromatin structure precede the transcriptional activation of the human growth hormone locus in placental cells. 1993, *Mol Cell Endocrinol*; 96(1-2):53-60.
15. Nickel BE, Cattini PA. Nuclease sensitivity of the human growth hormone-chorionic somatomammotropin locus in pituitary and placenta suggest different mechanisms for tissue-specific regulation. 1996, *Mol Cell Endocrinol*; 118(1-2):155-62.
16. Bodner, M., Castrillo, J. L., Thiell, L.E., Deernick, T., Ellisman, M. and Karin, M. The pituitary-specific transcription factor GHF-I is a homeobox-containing protein. 1988, *Cell*; 55, 505-518.
17. Ingraham HA, Chen RP, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn SE, Lin CR, Simmons DM, Swanson L, Rosenfeld MG. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. 1988, *Cell*; 55(3):519-29
18. Karim M, Castrillo JL, Thaeill LE. Growth hormone gene regulation: a paradigm for cell-type-specific gene activation. 1990, *Trends Genet*, 6(3):92-6
19. MacLeod JN, Lee AK, Liebhaber SA, Cooke NE. Developmental control and alternative splicing of the placentally expressed transcripts from the human growth hormone gene cluster. 1992, *J Biol Chem*; 267(20):14219-26
20. Barrera-Saldana HA, Seburg PH, Saunders GF. Two structurally different genes produce the same secreted human placental lactogen hormone. 1983, *J Biol Chem*; 258(6):3787-93.
21. Cooke NE, Ray J, Emery JG, Liebhaber SA. Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins. 1988, *J Biol Chem*; 263(18):9001-6.
22. Nickel BE, Kardami E, Cattini PA. Differential expression of human placental growth-hormone variant and chorionic somatomammotropin in culture. 1990, *Biochem J*; 267(3):653-8.
23. Martinez-Rodriguez HG, Guerra-Rodriguez NE, Iturbe-Cantu MA, Martinez-Torres A, Barrera-Saldana HA. Expression of human placental lactogen and variant growth hormone genes in placentas. 1997, *Arch Med Res*, 28 (4):507-12.

REFERENCIAS

24. Hu L, Lytras A, Bock ME, Yuen CK, Dodd JG, Cattini PA. Detection of placental growth hormone variant and chorionic somatomammotropin-L RNA expression in normal and diabetic pregnancy by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. 1999, *Mol Cell Endocrinol*; 157(1-2):131-42
25. Hill DJ, Freemark M, Strain AJ, Handwerger S, Milner RD. Placental lactogen and growth hormone receptors in human fetal tissues: relationship to fetal plasma human placental lactogen concentrations and fetal growth. 1988, *J Clin Endocrinol Metab*; 66(6):1283-90
26. Moshirpur J, Bennett A, McCarrick J, Allerhand J. hPL deficiency with normal estriol levels in a normal pregnancy. 1981, *Obstet Gynecol*; 57(6 Suppl):6S-8S.
27. Giampietro O, Ferdeghini M, Scatena P. Human placental lactogen (hPL) deficiency in a normal pregnancy. 1984, *Postgrad Med J*; 60(708):689-90.
28. Gonzalez-Rodriguez E, Jaramillo-Rangel G, Barrera-Saldana HA. Molecular diagnosis of deletions in the human multigene complex of growth and placental lactogen hormones. 1997, *Am J Med Genet*, 72(4):399-402.
29. Rygaard K, Revol A, Esquivel-Escobedo D, Beck BL, Barrera-Saldana HA. Absence of human placental lactogen and placental growth hormone (HGH-V) during pregnancy: PCR analysis of the deletion. 1998, *Hum Genet*; 102(1):87-92.
30. Handwerger S, Freemark M. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. 2000, *J Pediatr Endocrinol Metab*; 13(4):343-56
31. Selvanayagam CS, Tsai SY, Tsai MJ, Selvanayagam P, Saunders GF. Multiple origins of transcription for the human placental lactogen genes. 1984, *J. Biol Chem*; 259(23):14642-6.
32. Hirt H, Kimelman J, Birnbaum MJ, Chen EY, Seeburg PH, Eberhardt NL, Barta A. The human growth hormone gene locus: structure, evolution and allelic variations. 1987, *DNA*; 6(1):59-70.
33. Misra-Press A, Cooke NE, Liebhaber SA. Complex alternative splicing partially inactivates the human chorionic somatomammotropin-like (hCS-L) gene. 1994, *J Biol Chem*; 269(37):23220-9.
34. Liebhaber SA, Urbanek M, Ray J, Tuan RS, Cooke NE. Characterization and histologic localization of human growth hormone-variant gene expression in the placenta. 1989, *J Clin Invest*; 83(6):1985-91.

REFERENCIAS

35. Cooke NE, Ray J, Emery JG, Liebhaber SA. Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins. 1988, *J Biol Chem*; 263(18):9001-6.
36. Nickel BE, Kardami E, Cattini PA. The human placental growth hormone variant is mitogenic for rat lymphoma Nb2 cells. 1990, *Endocrinology*; 126(2):971-6.
37. Jones BK, Monks BR, Liebhaber SA, Cooke NE. The human growth hormone gene is regulated by a multicomponent locus control region. 1995, *Mol Cell Biol*; 15(12):7010-21.
38. Tjian R, Maniatis T. Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. 1994, *Cell*; 77(1):5-8.
39. BM, Cooke NE, Liebhaber SA. The human growth hormone locus control region mediates long-distance transcriptional activation independent of nuclear matrix attachment regions. 2001, *Nucleic Acids Res*; 29(16):3356-61.
40. Shewchuk BM, Asa SL, Cooke NE, Liebhaber SA. Pit-1 binding sites at the somatotrope-specific DNase I hypersensitive sites I, II of the human growth hormone locus control region are essential for in vivo hGH-N gene activation. 1999, *J Biol Chem.*; 274(50):35725-33.
41. Jin Y, Surabhi RM, Fresnoza A, Lytras A, Cattini PA. A role for A/T-rich sequences and Pit-1/GHF-1 in a distal enhancer located in the human growth hormone locus control region with preferential pituitary activity in culture and transgenic mice. 1999, *Mol Endocrinol*, 8:1249-66.
42. Su Y, Liebhaber SA, Cooke NE. The human growth hormone gene cluster locus control region supports position-independent pituitary- and placenta-specific expression in the transgenic mouse. 2000, *J Biol Chem*; 275(11):7902-9.
43. Schanke JT, Durning M, Johnson KJ, Bennett LK, Golos TG. SP1/SP3-binding sites and adjacent elements contribute to basal and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-stimulated transcriptional activation of the rhesus growth hormone-variant gene in trophoblasts. 1998, *Mol Endocrinol*; 12(3):405-17.
44. Wallis M. 1994. Variable evolutionary rates in the molecular evolution of mammalian growth hormones. *J Mol Evol*. 38:619-627.

REFERENCIAS

45. Liang R, Limesand SW, Anthony RV. Structure and transcriptional regulation of the ovine placental lactogen gene. 1999, *Eur J Biochem*; 265(3):883-95.
46. Sugawara A, Yen PM, Chin WW. 9-cis retinoic acid regulation of rat growth hormone gene expression: potential roles of multiple nuclear hormone receptors. 1994, *Endocrinology*, 135(5):1956-62
47. Nickel BE, Nachtigal, M.W., Bock, M.E. and Cattini, P.A. (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. 1991, *Mol Cell Biochem*; 106(2):181-7.
48. Nickel BE, Cattini PA. Tissue-specific expression and thyroid hormone regulation of the endogenous placental growth hormone variant and chorionic somatomammotropin genes in a human choriocarcinoma cell line. 1991, *Endocrinology*; 128 (5):2353-9.
49. Tjian R. Molecular machines that control genes. 1995, *Sci Am*; 272(2):54-61
50. Brand NJ, Petkovich M, Chambon P. Characterization of a functional promoter for the human retinoic acid receptor-alpha (hRAR-alpha). 1990, *Nucleic Acids Res*; 18(23):6799-806
51. Sauer F, Tjian R. Mechanisms of transcriptional activation: differences and similarities between yeast, *Drosophila*, and man. 1997, *Curr Opin Genet Dev*; 7(2):176-81
52. Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. 1987, *Cell*; 51(6):1079-90
53. Lemaigre FP, Courtois SJ, Lafontaine DA, Rousseau GG. Evidence that the upstream stimulatory factor and the Sp1 transcription factor bind in vitro to the promoter of the human-growth-hormone gene. 1989, *Eur J Biochem*; 181(3):555-61
54. Lipkin SM, Naar AM, Kalla KA, Sack RA, Rosenfeld MG. Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1-dependent growth hormone gene expression. 1993, *Genes Dev*; 7 (9):1674-87.
55. Lemaigre FP, Courtois SJ, Durviaux SM, Egan CJ, LaFontaine DA, Rousseau GG. Analysis of *cis*- and *trans*-acting elements in the hormone-sensitive human somatotropin gene promoter. 1989, *J Steroid Biochem*; 34(1-6):79-83.
56. Theill LE, Castrillo JL, Wu D, Karin M. Dissection of functional domains of the pituitary-specific transcription factor GHF-1. 1989, *Nature*; 342(6252):945-8.

REFERENCIAS

57. Jiménez-Mateo O. Clonaje y caracterización del factor transcripcional específico de placenta PLA-1. Tesis doctoral, Mayo 1997. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CantoBlanco, Madrid, España.
58. Jiang Shi-Wen, Shepard, AR and Eberhard, NL. An initiator element is required for maximal human chorionic somatomammotropin gene promoter and enhancer function. 1995, *J. Biol Chem.* 270, 8: 3683-3692.
59. Kadonaga JT, Courey AJ, Ladika J, Tjian R. Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. 1988, *Science*; 242(4885):1566-70
60. Fitzpatrick, S.L., W.H., Walker and G.F., Saunders. DNA sequences involved in the transcription activation of a human lactogene gene. 1990, *Mol Endocrinol.* 4, 1815-1826
61. Barboza Cerda María del Carmen. Participación del factor transcripcional Sp-1 en la regulación del gen hPL-2. Tesis de maestría. 1997, ULIEG, Facultad de Medicina, UANL.
62. Castrillo JL, Theill LE, Karin M. Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation. 1991, *Science*; 253(5016):197-9
63. Cohen LE, Wondisford FE, Radovick S. Role of Pit-1 in the gene expression of growth hormone, prolactin, and thyrotropin. 1996, *Endocrinol Metab Clin North Am*, 25(3):523-40
64. Schanke JT, Conwell CM, Durning M, Fisher JM, Golos TG. Pit-1/growth hormone factor 1 splice variant expression in the rhesus monkey pituitary gland and the rhesus and human placenta. 1997, *J Clin Endocrinol Metab.* 82(3):800-7
65. Untergasser G, Kranewitter W, Schwazler P, Maderbacher S, Dirnhofer S, Berger P. Organ-specific expression pattern of the human growth hormone/placental lactogen gene-cluster in testis. 1997, *Mol Cell Endocrinol.* 1997, 130 (1-2):53-60.
66. Schwarzeler, P., Untergasser, G., Herman, M., Dirnhofer, S., Abendschein, B., Modersbacher, S., and Berger, P. Selective growth hormone /placental lactogen transcription and hormone production in pre- and post-menopausal human ovaries. 1997, *J. Clin. Endocrinol Metab.* 82:3337-3341.

REFERENCIAS

67. Kendall SK, Saunders TL, Jin L, Lloyd RV, Glode LM, Nett TM, Keri RA, Nilsson JH, Camper SA. Targeted ablation of pituitary gonadotropes in transgenic mice. 1991, *Mol Endocrinol*; 5:2025-36
68. Dasen, JS, Rosenfeld, MG. Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. 2001, *Annu Rev Neurosci*. 24: 327-355
69. Bamberger AM, Bamberger CM, Pu LP, Puy LA, Loh YP, Asa SL Expression of pit-1 messenger ribonucleic acid and protein in the human placenta. 1995, *J Clin Endocrinol Metab*. 80:7::2021-6.
70. Nachtigal MW, Nickel BE, Klassen ME, Zhang, W., Eberhardt NL and Cattini PA Human chorionic somatomammotropin and growth hormone gene expression in rat pituitary tumor cell is dependent on proximal promoter sequences. *Nucleic Acid Research*. 1989, 17:11:4327-4337.
71. Nachtigal MW, Nickel BE, Cattini PA. Pituitary-specific repression of placental members of the human growth hormone gene family. A possible mechanism for locus regulation. 1993, *J Biol Chem*; 268(12):8473-9.
72. Walker WH, Fitzpatrick SL, Barrera-Saldana HA, Resendez-Perez D, Saunders GF. The human placental lactogen genes: structure, function, evolution and transcriptional regulation. 1991, *Endocrinol Rev*; 12(4):316-28.
73. Frankenne, F., Scippo, M.L., Van Beeumen, J., Igout, A. and Hennen, G. Identification of placental human growth hormone as the growth hormone-V gene expression product 1990, *J. Clin. Endocrinol Metab*; 71:15-18.
74. Oury, C., Alsat, E., Jacquemin, P., Evain-Brion, D., Martial, J.A. and Muller, M. A one-nucleotide difference in a cAMP and phorbol ester response element leads to differential regulation of the human chorionic somatomammotropin A and b gene transcription. 1997, *J. Mol. Endocrinol*. 18:87-99.
75. Barlow, JW, Voz, LJ, Eliard PH, Mathy-Hartert, M, De Nayer, P, Economidis, IV, Belayew, A., Martial, J.A., and Rousseau, G.G. Thyroid hormone receptor bind to defined regions of the growth hormone and placental lactogen genes. 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:9021-9025.
76. Stephanou, A and Handwerger, S. Retinoic acid and thyroid hormone regulate placental lactogen expression in human trophoblast cells. 1995, *Endocrinology* 136:3:933-938.

REFERENCLAS

77. Dana, S. and Karin, M. Induction of human growth hormone promoter activity by the Adenosin 3', 5'-monophosphate pathway involves a novel responsive element. 1989, *Mol. Endocrinol.* 3, 815-821
78. Stephanou, A and Handwerger, S. Interleukin-6 stimulates placental lactogen expression by human trophoblast cells. 1994, *Endocrinol.* 135:2:719-723.
79. Garcia-Villalba, P., Jimenez-Lara A. M. and Aranda, A. Vitamin D interferes with transactivation of the growth hormone gene by thyroid hormone and retinoic acid. 1996, *Mol. Cell. Biol.*, 16:1:318-327.
80. Stephanou, A. and Handwerger, S. Regulation of human placental lactogen expression by 1, 25-dihydroxivitamin D3. 1994, *Endocrinol.*; 135:2651-2656.
81. Martial, J.A., Seburg, P.H., Guenzi, D., Goodman H.M., and Baxter, J.D. Regulation of growth hormone gene expression: synergistic effect of thyroid and glucocorticoid hormones. 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:4:293-4295.
82. Courtois SJ, Lafontaine DA, Rousseau GG. Characterization of an alternative promoter in the human growth hormone gene. 1992, *J Biol Chem*; 267(27):19736-19743
83. Selby MJ, Barta A, Baxter JD, Bell GI, Eberhardt NL. Analysis of a major human chorionic somatomammotropin gene. Evidence for two functional promoter elements. 1984, *J Biol Chem*; 10:259-264
84. Page, GS, Smith S, Goodman HM, DNA sequence of the rat growth hormone gene: location of the 5' terminus of the growth hormone mRNA and identification of an internal transposon-like element. 1981, *Nucleic Acids Res.*; 9 (9):2087-2104.
85. Kolb AF, Gunzburg WH, Brem G, Erfle V, Salmons B. A functional eukaryotic promoter is contained within the first intron of the hGH-N coding region. 1998, *Biochem Biophys Res Commun.*; 247 (2):332-337.
86. Davidson I, Xiao JH, Rosales R, Staub A, Chambon P. The HeLa cell protein TEF-1 binds specifically and cooperatively to two SV40 enhancer motifs of unrelated sequence. 1988, *Cell*; 54 (7):931-942.
87. Rogers BL, Sobnosky MG, Saunders GF. Transcriptional enhancer within the human placental lactogen and growth hormone multigene cluster. 1986, *Nucleic Acids Res*; 14 (19):7647-59.

REFERENCIAS

88. Jiang SW, Eberhardt NL. The human chorionic somatomammotropin enhancers form a composite silencer in pituitary cells in vitro. 1997, *Mol Endocrinol.* 11(9):1233-44
89. Walker WH, Fitzpatrick SL, Saunders GF. Human placental lactogen transcriptional enhancer. Tissue specificity and binding with specific proteins. 1990, *J Biol Chem.* 265(22):12940-8
90. Jiang SW and Eberhardt NL. Involvement of a protein distinct from transcription enhancer factor-1 (TEF-1) in mediating human chorionic somatomammotropin gene enhancer function through the GT-IIC enhancer in chorionic and COS cells. 1995, *J Biol Chem.* 270:23:9 13906-13915.
91. Jacquemin P, Oury C, Peers B, Morin A, Belayew A, Martial JA. Characterization of a single strong tissue-specific enhancer downstream from the three human genes encoding placental lactogen. 1994, *Mol Cell Biol.* 14(1):93-103.
92. Lytras, A., Rama-Mohan S., Feng-Zhang, J., Jin, Y. and Cattini, P.A. Repair of the chorionic somatommotropin-A enhancer region reveals a novel functional element in the chorionic somatommotropin-B enhancer. 1996, *Mol. end Cell. Endocrinol.* 119:1-10.
93. Jacquemin, P., Oury, A. E., Belayew, A., Muller, M., Evain-Brion, D. and Martial, J.A. The enhancers of the human placental lactogen B, A, and L genes: progressive activation during in vitro trophoblast differentiation and importance of the DF-3 element in determining their respective activities. 1996, *DNA Cell Biol.* 15:10:845-854.
94. Quandt, K. Frech, K. Karas, H. Wingender, E. and Werner, T. MatInd and MatInspector - New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. 1995, *Nucleic Acids Research* 23, 4878-4884.
95. Short Protocols in Molecular Biology 3rd edition. Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, JG Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl. 1999.
96. Digital Gel Documentation and Analysis Systems. A technical Guide o the GeneGenius, MultiGenius and ChemiGenius. 1999.
97. Bielefeld-Ohammannh, Fitzpatrick DR. High-efficiency T vector cloning of PCR products by forced A tagging and post-ligation restriction enzyme digestion. 1997, *Biotechniques*, 23 (5):4822-4826.
98. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd Ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

REFERENCIAS

99. Reséndez-Pérez D, Barrera-Saldaña HA. Expression studies of transfected multigene families by homologous DNA mutagenesis. 1990, *Biotechniques*, 9(3):281-6.
100. Chomczynski, P, and Sacchi, N. Single-Step method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. 1987, *Anal. Biochem*, 162:156-159.
101. Green MR, Roeder RG. Transcripts of the adeno-associated virus genome: mapping of the major RNAs. 1980, *J Virol.*, 36(1):79-92
102. Castro-Peralta F, Villarreal LP The use of oligonucleotide directed cleavage of DNA and homologous recombination in the production of large recombinant adenoviral vectors. 2000, *Gene Ther* (7):583-6
103. Cell Culture Catalogue. (1996). SIGMA BIO-SCIENCES.
104. Clewell, D.B., Helsinki, D.R., Purification of closed circular DNA by equilibrium centrifugation in CsCl-ethidium bromide gradient. 1972, *J. Bacteriol.* 110:1135
105. Instruction Manual, Cat. No. 18324-012. LipofectamineTM Reagent. Gibco-BRL, pp 1-2.
106. Ciccarone V, Chu Y, Schifferli K, Pichet JP, Hawley-Nelson P, Evans K, Roy L, Bennett S. 1999, *FOCUS* 21, 54.
107. Eustice, D.C., Feldman, P.A., Colberg-Poley, A.M., Buckery, R.M., and Neubauer, R.H. A sensitive method for the detection of β -Galactosidase in transfected mammalian cells. 1991, *Biotechniques*, 11(6):739-742.
108. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. 1976, *Anal Biochem* 72:248-254.
109. Carroll, MJ and Taichman BL. Characterization of the human involucrin promoter using a transient b-galactosidase assay. 1992, *J. of Cell Science*, 103:925-930.
110. Instruction Manual, Cat. No. 1-585-878. Colorimetric enzyme immunoassay for the quantitative determination of secreted human growth hormone (hGH). Boehringer Mannheim, pp1-1.

REFERENCIAS

111. MBI, Maxim Biotech Inc. Quantitative-Competitive PCR Protocol. TGB-7001 Instruction Manual. April, 2000. So, San Francisco CA, 94080, USA. (www.maxibio.com).
112. Competitive reverse-transcriptase PCR: a useful alternative to Northern blotting for quantitative estimation of relative abundances of specific mRNAs in precious samples. 1997, *Biochem. J.* 325, (565-567)
113. Finney DJ, Statistical method in biological assay. London, Charles Griffin abd Co, 1978.
114. Patel N, Alsat E, Igout A and Baron F. Glucose inhibit human placental GH secretion in vitro. 1995, *J Clin Endocrinol Metab*; 80(1):1743-46
115. Van De Weerd C, Peers B, Belayew A, Martial JA, Muller M. Far upstream sequences regulate the human prolactin promoter transcription. *Neuroendocrinology*. 2000 71(2):124-37.
116. Lemaigre, P.F., Lafontaine, A.D., Courtois, J.S., Durviaux, M.S. and Rousseau, G.G. Sp1 can display GHF-1 from Its distal binding site and stimulate transcriptionn from the growth hormone gene promoter. 1990, *Molecular and Cellular Biology*. 10:1811-1814
117. Bradford AW, Walynlyk Ch, Wasylynk B, Gutierrez-Hartmann A. Interaction of ETS-1 and the POU-homeodomain protein GHF-1/Pit-1 reconstitutes pituitary-specific gene expression. 1997, *Molecular and Cellular Biology*, 17:3:1065-1074.
118. Norquay LD, Jin Y, Surabhi RM, Gietz RD, Tanese N, Cattini PA. A member of the nuclear factor-1 family is involved in the pituitary repression of the human placental growth hormone genes. 2001, *Biochem J*; 354(Pt 2):387-395.
119. Larsen PR, Harney JW, Moore DD. Repression mediate cell-type-specific expression of the rat growth hormone gene. 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (21):8283-7.
120. Park KY, Roe JH. Negative regulation of bovine growth hormone gene by YY1 binding to NRE's. 1996, *Biochem Biophys Res Commun* 228 (3):745-751
121. Peritz, L.N., Fodor, E.J., Silversides, D.W., Cattini, P.A., Baxter, J.D., Eberhardt, N.L. The human growth hormone gene contains both positive and negative controls elements. 1988, *J. Biol. Chem.* 263-5005-5010
122. Chandran UR, Attardi B, Friedman R, Zheng Z, Roberts JL, DeFranco DB. Glucocorticoid repression of the mouse gonadotropin-releasing hormone gene is

REFERENCIAS

- mediated by promoter elements that are recognized by heteromeric complex containing glucocorticoid receptor. 1996, *J Biol Chem* 271(34):20412-20420.
123. Kakizawa T, Miyamoto T, Ichikawa K, Takeda T, Susuki S, Mori J, Kumagai M, Yamashita K, Hashizume K. Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors interacts with octamer transcription factor-1 and acts as a transcriptional repressor. 2001, *J Biol Chem* 276(13):9720-9725.
 124. Roy RJ, Vallieres L, Leclerc S, Guerin SL. The rat growth hormone proximal silencer contains a novel DNA-binding site for multiple nuclear proteins that repress basal promoter activity. 1994, *Eur J Biochem* 225(1):419-432.
 125. Cattini PA, Anderson TR, Baxter JD, Mellon P, Eberhardt NL. The human growth hormone gene is negatively regulated by triiodothyronine when transfected into rat pituitary tumor cells. *J Biol Chem*. 1986, 261(28):13367-72.
 126. Voz LM, Peers B, Belayew A, and Martial JA. Characterization of an unusual thyroid response unit in the promoter of the human placental lactogen gene. 1991, *J Biol Chem* 266 (20):13397-13408
 127. Brent GA, Harney JW, Moore DD, Larsen PR. Multihormonal regulation of the human, rat and bovine growth hormone promoters: differential effects of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate, thyroid hormone and glucocorticoids. 1988, *Mol Endocrinol* 2:9:792-798 ,
 128. Zhang W, Brook RL, Silverside DW, West BL, Leidig F, Baxter JD, Eberhard NL. Negative thyroid hormone control of human growth hormone gene expression is mediated by 3'-untranslated /3'-flanking DNA. 1992, *J. Biol. Chem.* 267 (21):15056-06
 129. Woyckik RP, Lyos RH, Post L, Rottman FM. Requirement for the 3' flanking region of the bovine growth hormone gene for the accurate polyadenylation. 1984, *Proc Natl Acad Sci USA*. 81(13):3944-3948.
 130. Kraft JC, Shepard T, Juchau MR. Tissue levels of retinoids in the human embryos/fetuses. 1993, *Reprod Toxicol*. 7(1):11-15.
 131. Means AL, Gudas LJ. The roles of retinoids in vertebrate development. 1995, *Annu Rev Biochem* 64:201-233.
 132. Lira SA, Kalla KA, Glass CK, Drolet DW, Rosenfeld MG. Synergistic interactions between Pit-1 and other elements are required for effective somatotroph rat growth hormone gene expression in transgenic mice. 1993, *Molecular Endocrinology*, 7:694-701.

REFERENCIAS

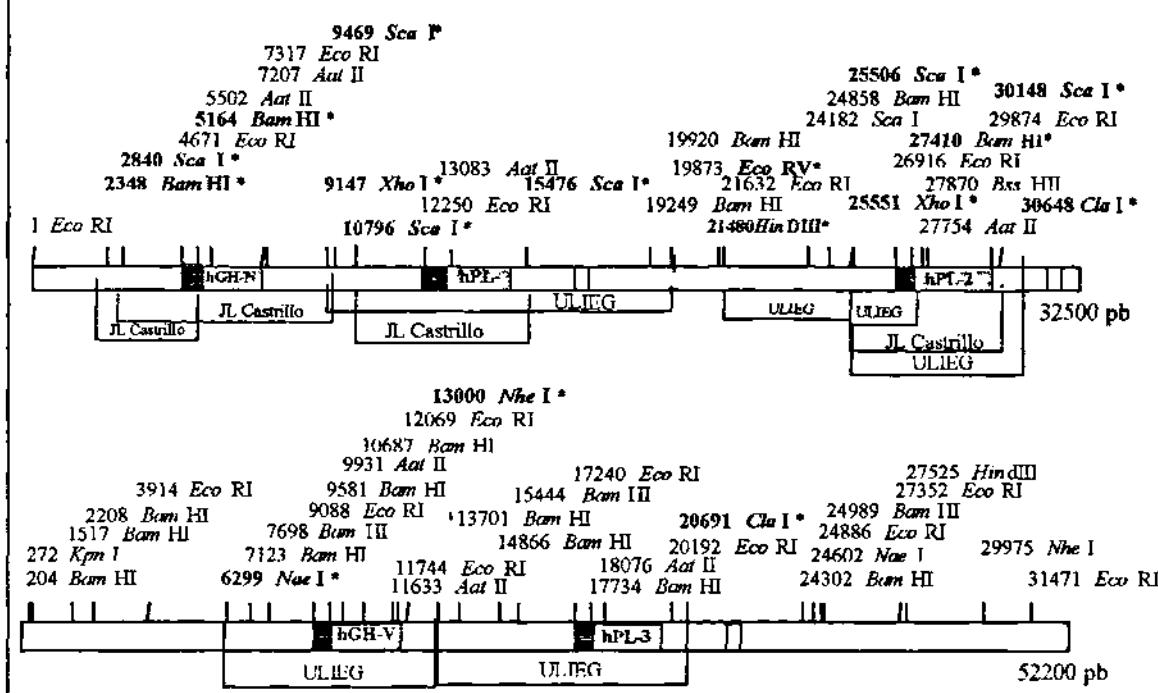
133. Ono M, Mochizuki E, Mori Y, Aizawa A, Harigai T. The regulatory region and transcription factor required for expression of rat and salmon pituitary hormone-encoding genes show cell-type and species specificity. 1995, *Gene*, 153:267-271.
134. Jacquemin P, Martial JA, Davidson I. Human TEF-5 es preferentially expressed in placenta and binds to multiple functional elements of the human chorionic somatomammotropin-B gene enhancer. 1997, *J Biol Chem*, 272(20):12928-12937.
135. Jiang SW, Wu K, Eberhardt NL. Human placental TEF-5 transactivates the human chorionic comatomammotropin gene enhancer. 1999, *Mol Endocrinol*, 13(6):879-889.
136. Pattillo RA, Gey GO. The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. 1968, *Cancer Res*, 28(7):1231-6.
137. Kohler PO, Bridson WE. Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. 1971, *J Clin Endocrinol*. 32:683-687.
138. Ramirez-Solis R, ¿Es el gen humano hPL-1 un pseudogene? Análisis de su expresión in vitro usando técnicas de Ingeniería genética y Cultivo celular. 1989, Tesis de maestría, Facultad de Medicina, ULIEG, UANL.
139. Reséndez-Pérez D. Expresión y disección funcional in vitro de las hormonas lactogénica placentaria y del crecimiento humano. 1991, Tesis doctoral, Facultad de Medicina, ULIEG, UANL.
140. Liebhhaber SA, Ray J, Cooke NE. Synthesis of growth hormone-prolactin chimeric proteins and processing mutants by the exchange and deletion of genomic exons. 1986, *J Biol Chem*, 261 (30):14301-6.
141. Bernardini S, Argenton F, Vianello S, Colombo L, Bortolussi M. Regulatory regions in the promoter and third introns of the growth hormone gene in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. 1999, *General and Comp Endocrinol*, 116:261-271.
142. Castillo-Ureta Hipólito, "Expresión del gen de la hormona del crecimiento humano (hGH-N) bajo el control de un promotor inducible con doxiciclina, en células hipofisiarias" tesis de maestría, Noviembre 2000.
143. Liu K, Sandgren EP, Palmiter RD, Stein A. Rat growth hormone gene introns stimulate nucleosome alignment in vitro and in transgenic mice. 1995, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(17):7724-7728.

ANEXOS.

MAPAS DE RESTRICCION DE SECUENCIAS Y VECTORES UTILIZADOS Y QUE FUERON GENERADOS DURANTE ESTE TRABAJO.

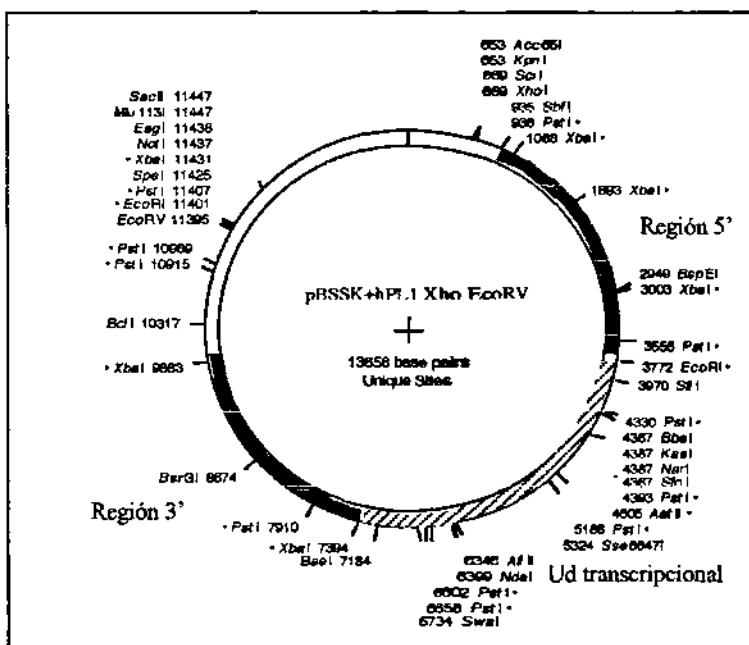
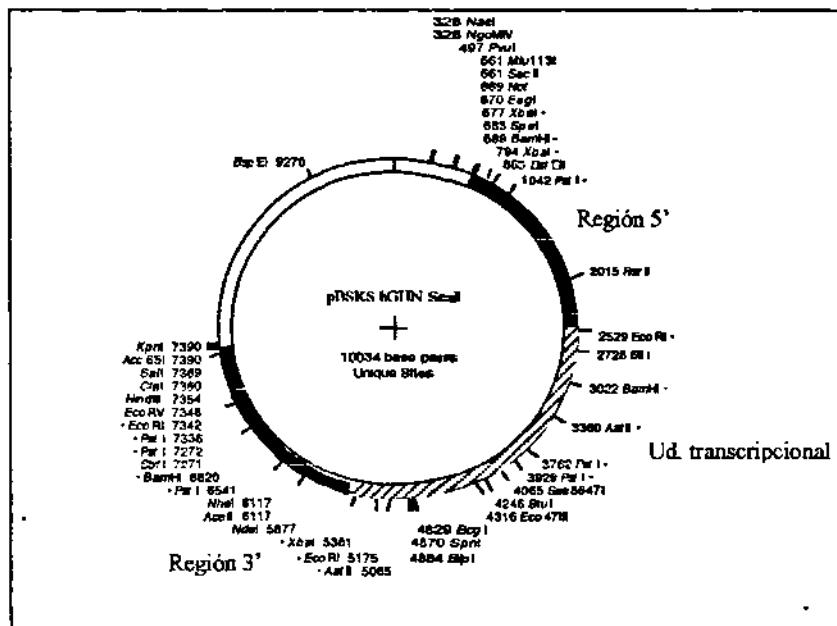
MAPA DE RESTRICCIÓN CON LAS ENZIMAS DE INTERES DEL LOCUS DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO

Chen Y et al 1989. Número de acceso GeneBank: J03071



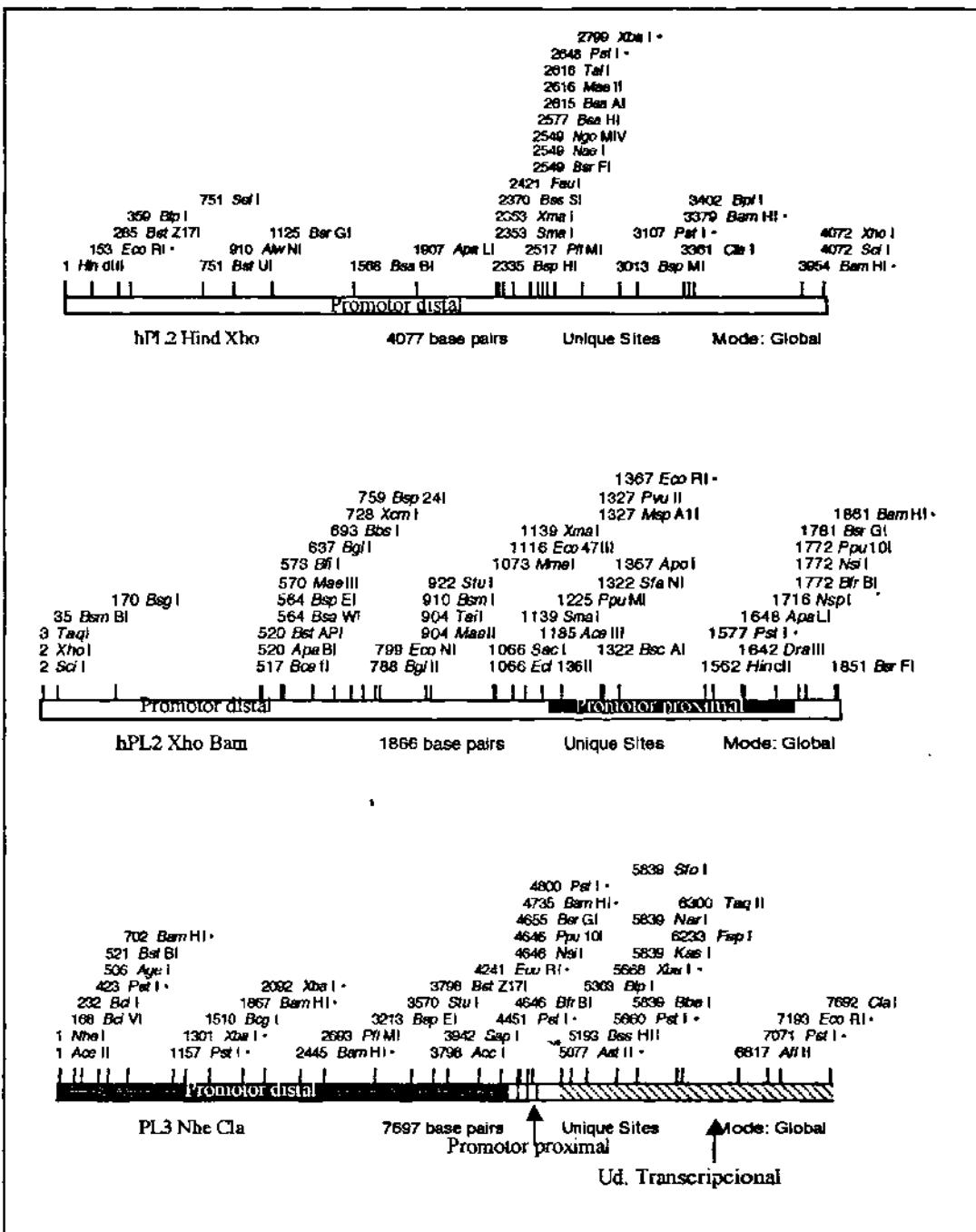
Complejo multigénico de hormona del crecimiento humano. Los cuadros negros representan la región promotora proximal de 500 pb, la unidad transcripcional (*Bam* HI-*Eco* RI) se presenta como un cuadro en color gris mientras el cuadro blanco, a la secuencia potenciadora de los genes hPL. Las enzimas de restricción marcadas en *negritas y asterisco*, fueron las utilizadas para subclonar los fragmentos del locus contenido cada gen así como sus regiones 5' y 3' flanqueantes a partir de los cósmidos, en los vectores pBlueScript SK(+) o pBlueScript KS(-).

- Promotor proximal
 - Unidad transcripcional
 - Región potenciadora

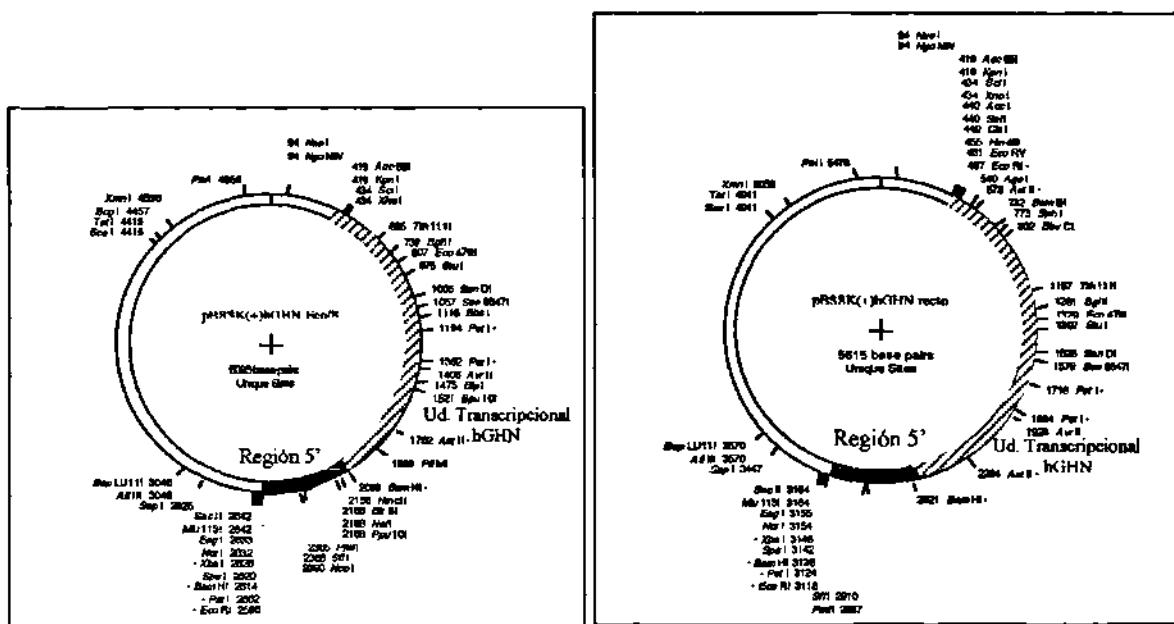


Secuencias clonadas de hGH-N y hPL-1 a partir de los cósvidos en pBlueScript KS(-) y pBlueScript SK(+), respectivamente

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

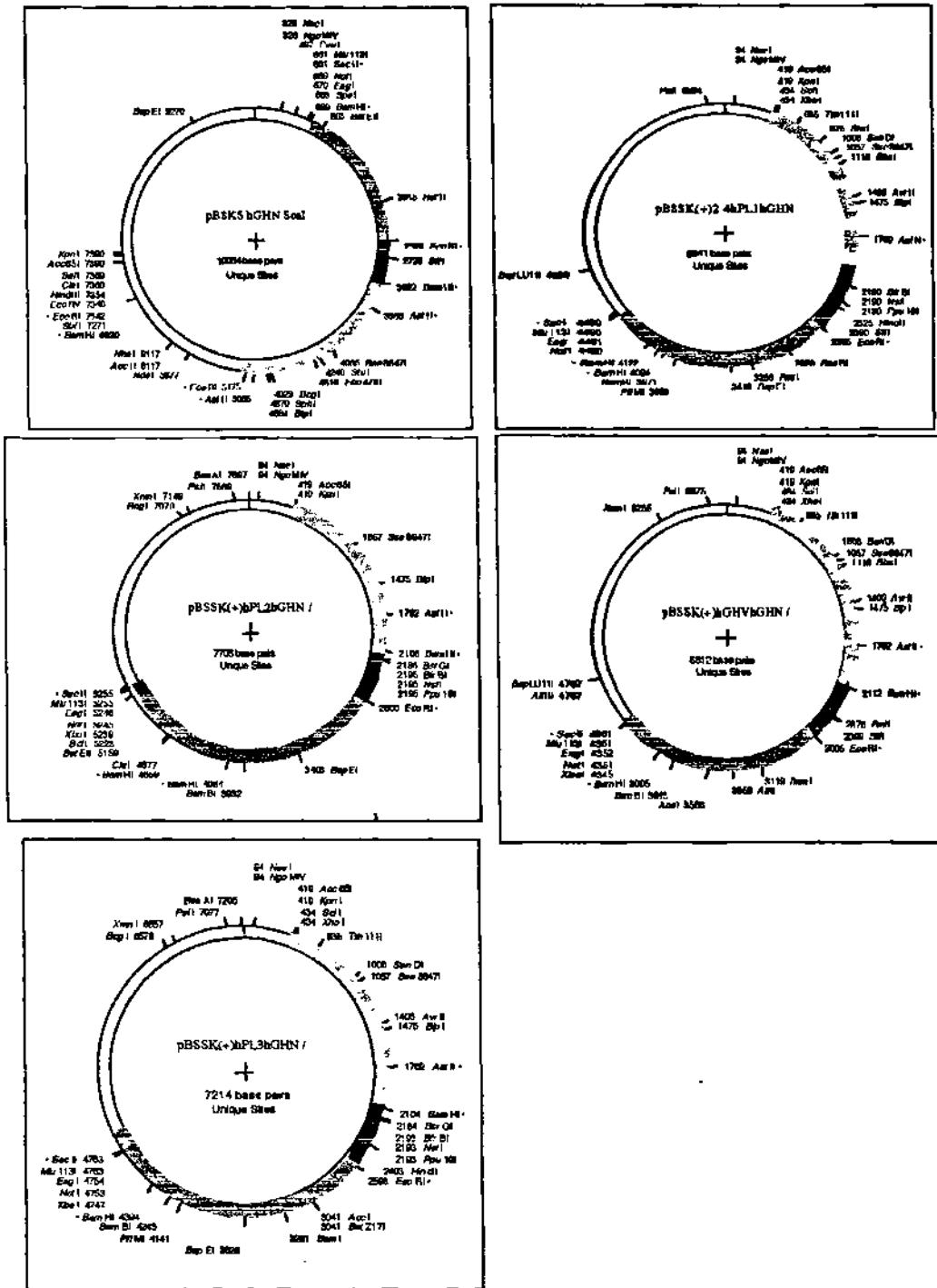


Las presentes secuencias están clonadas en el vector pBlueScript SK(+) y los promotores distales de este trabajo recuperadas utilizando las enzimas de restricción *Bam* HI, *Eco* RI (promotor proximal) y el sitio de restricción *Xba* I más cercano al sitio *Eco* RI de la región promotora proximal, como se describió en material y métodos.



Mapas de los vectores pBluescript conteniendo las regiones clonadas *EcoRI-SspI* de hGHN a la izquierda y el fragmento *EcoRI* a la derecha. El vector pBShGHN *EcoRI* fue utilizado para subclonar la unidad transcripcional completa de hGH-N en los vectores pBlueScript SK + con la versión promotora de 500 pb de los genes hGH-hPL. En las construcciones en pBlueScript con promotor proximal de los genes del complejo, se subclonaron los potenciadores entre los sitios *Xho I* y *Kpn I*. La construcción pBShGHN *Eco-SspI*, se utilizó para obtener al vector pBShGHN 21K del que derivo el vector pβactinahGHN21K usado para evaluar eficiencia de transfección en el RT-PCR cuantitativo y el mismo vector *Eco-Ssp* lo utilizamos para obtener los recombinantes con promotor de 500 pb reteniendo el exón I e intrón 1 de los genes de expresión placentaria utilizando los sitios de restricción *Aat II* (sitio único en esta construcción) y *Kpn I* (peteneciente al vector pBlueScript).

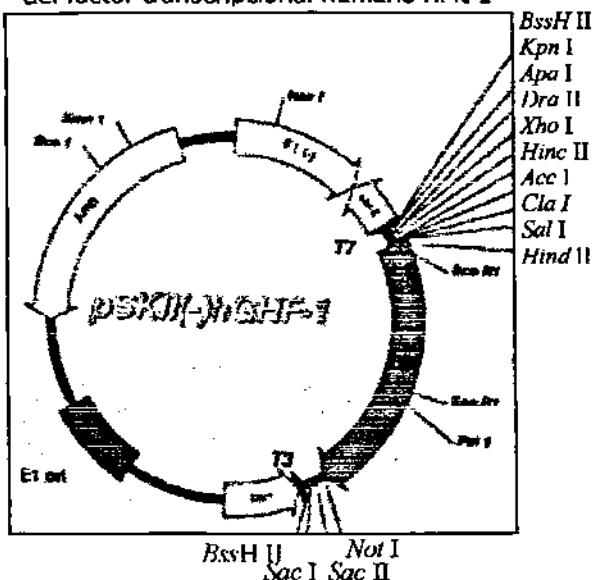
MAPAS DE RESTRICCIÓN DE RECOMBINANTES CON VERSIÓN PROMOTORA LARGA.



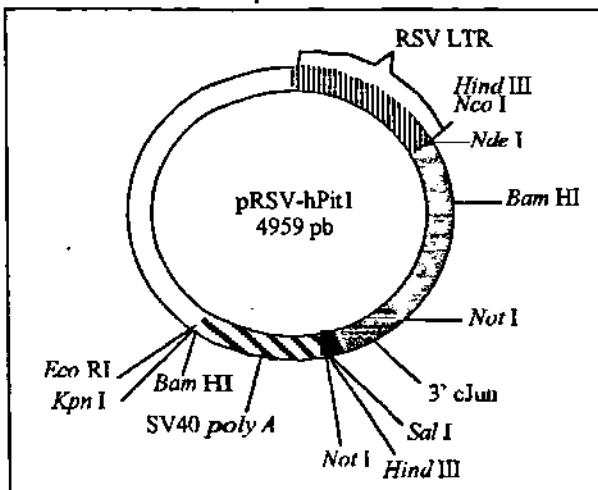
Las regiones de secuencias : □ identifican a la unidad transcripcional hGHN, ■ el promotor proximal y ▨ la región promotora distal.

MAPA DE VECTORES QUE EXPRESAN LOS FACTORES DE TRANSCRIPCION Y DEL VECTOR USADO PARA EVALUAR EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN β GALACTOSIDASA

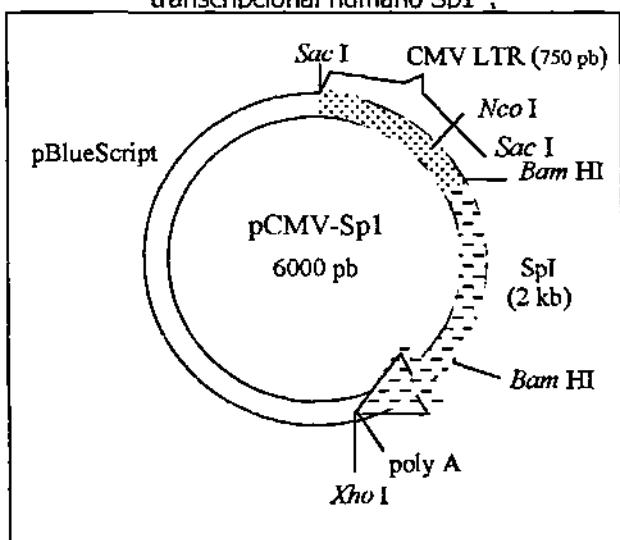
Mapa del vector conteniendo la secuencia del factor transcripcional humano hPit-1



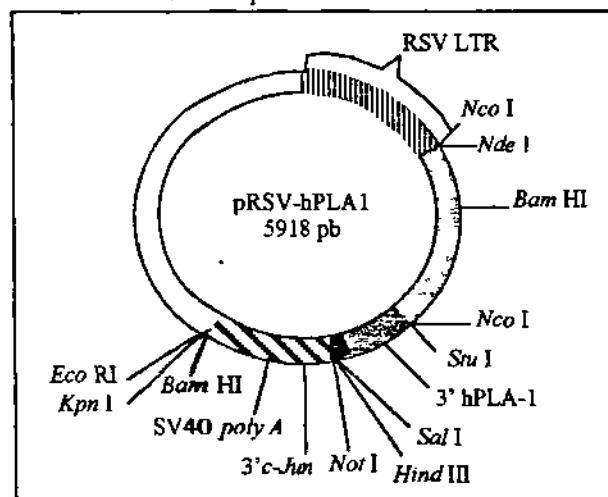
Mapa del vector expresor del factor transcripcional humano Pit-1



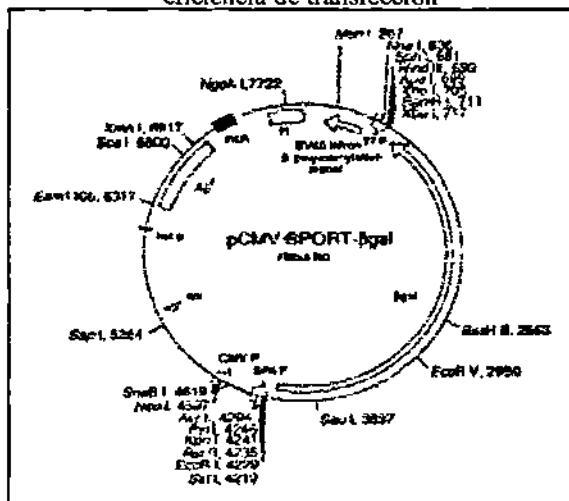
Mapa del vector expresor del factor transcripcional humano Sp1



Mapa del vector expresor del factor transcripcional humano PLA-1



Mapa del vector utilizado para evaluar eficiencia de transfección



Formulación de
medio RPMI 1640

Nivel de
Glucosa

Cell Culture Media		
RPMI 1640	Liquid	1L
Other Components		
Glucose	2,020.00	
Ammonium bicarbonate	1.00	
Phenol Red	0.00	
Amino Acids		
L-Arginine	24.35	
L-Cysteine-HCl	61.20	
L-Asparagine-HCl	20.00	
L-Cysteine	22.00	
L-Glutamine	20.35	
L-Glutamate	34.35	
Glycine	15.00	

File Edit View Go Bookmarks Communicator Help 5:09 PM NetScope Communications

NetScope: Invitrogen | UTECH ON-LINE | Minimum Essential Medium (MEM), powder

Locate: http://www.invitrogen.com/Products/CellCulture/Products/X1101/Media/MinimalEssentialMedium.htm

**OptiMEM basado en la
Formulación de Medio
Mínimo de Eagle.(MEM)**

Minimum Essential Medium (MEM) Medium, powder (61100)
Contains no sodium bicarbonate

Minimal Essential Medium was developed when Basal Media Eagle was not sufficient to support Hela cells. It was discovered that with certain media supplements, MEM could be made to grow a wider variety of cells. MEM incorporates these modifications, such as higher concentrations of amino acids into its formulation.

Catalogue Number: 61100

COMPONENTS	Molet. Weight (mg/l)	Conc. (mg/l)	Molarity (mM)
INORGANIC SALTS:			
Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	111	280.00	1.00
Potassium Chloride (KCl)	75	460.00	5.30
Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	370	47.62	0.614
Sodium Chloride (NaCl)	58	6800.00	117.24
Sodium Phosphate-H ₂ O (Na ₂ HPO ₄ -H ₂ O)	136	140.00	1.03
OTHER COMPONENTS:			
D-Glucose	160	1800.00	5.55
Phenol Red	390	10.00	0.0252
AMINO ACIDS:			
L-Arginine-HCl	211	126.44	0.600
L-Cysteine-HCl	313	31.00	0.100
L-Glutamine	146	297.00	2.00

Nivel
de
Glucosa

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

Tablas de ANOVA

Los datos que a continuación se muestran, corresponden al análisis de varianza realizado primero en las células de placenta (JEG-3) y posteriormente, se presentan los datos de ANOVA de los resultados obtenidos en pituitaria (GH-3 ó GC).

ANOVA DEL EFECTO DE MODULADORES EN LOS NIVELES DE TRANSCRIPCION EN JEG-3

ANOVA: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hGHN	3	25,76	8,586667	4,605233		
AMPe	3	157,57	52,52333	4,731833		
Total	6	183,33				
ANOVA						
source of Varia	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	2895,646	1	2895,646	620,2808	1,54E-05	7,70865
Within Gro	18,67373	4	4,668433			
Total	2914,32	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hGHN	3	25,76	8,586667	4,605233		
Eforbol	3	70,55	23,51667	8,746133		
Total	6	96,31				
ANOVA						
source of Varia	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	334,3574	1	334,3574	58,9105	0,001548	7,70865
Within Gro	22,70273	4	5,675683			
Total	357,0601	5				
ANOVA: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL1	3	55,656	18,552	6,238477		
AMPe	3	86,77	32,25667	14,10283		
Total	6	142,42				
ANOVA						
source of Varia	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	281,7268	1	281,7268	27,63983	0,006241	7,70865
Within Gro	40,68282	4	10,17071			
Total	322,4097	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL1	3	55,656	18,552	6,238477		
Eforbol	3	84,53	28,17867	6,062533		
Total	6	140,19				
ANOVA						
source of Varia	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	138,9513	1	138,9513	22,55518	0,008976	7,70865
Within Gro	24,64202	4	6,160506			
Total	163,5933	5				
ANOVA: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL2	3	74,258	24,75267	2,174401		
AMPe	3	199,1	66,36667	5,489433		
Total	6	273,36				
ANOVA						
source of Varia	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	2597,587	1	2597,587	677,8819	1,29E-05	7,70865
Within Gro	15,32767	4	3,831917			
Total	2612,915	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL2	3	74,258	24,75267	2,174401		
Eforbol	3	144,15	48,05	22,2313		
Total	6	218,41				
ANOVA						
source of Varia	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	814,1486	1	814,1486	66,7179	0,001223	7,70865
Within Gro	46,8114	4	12,20285			
Total	862,96	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL2	3	74,258	24,75267	2,174401		
T3	3	201,45	67,15	15,0969		
Total	6	275,71				
ANOVA						
source of Varia	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	2696,301	1	2696,301	312,229	6,03E-05	7,70865
Within Gro	34,5426	4	8,635651			
Total	2730,843	5				

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

ANOVA: Single Factor					
SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
hGHV	3	70,66	23,55333	5,659033	
AMPc	3	135,91	45,30333	14,96333	

ANOVA					
Varia	SS	df	MS	F	P-value
Between G	709,5938	1	709,5938	68,81788	0,001153
Within Gro	41,24473	4	10,31118		
Total	750,8385	5			

SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
hGHV	3	70,66	23,55333	5,659033	
Eforbol	3	96,21	32,07	17,8153	

ANOVA					
Varia	SS	df	MS	F	P-value
Between G	108,8004	1	108,8004	9,269734	0,038229
Within Gro	46,94867	4	11,73717		
Total	155,7491	5			

SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
GHV	3	70,66	23,55333	5,659033	
AR	3	153,64	51,21333	5,749033	

ANOVA					
Varia	SS	df	MS	F	P-value
Between G	1147,613	1	1147,613	201,1933	0,000143
Within Gro	22,81613	4	5,704033		
Total	1170,43	5			

SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
GHV	3	70,66	23,55333	5,659033	
T3	3	94,72	31,57333	3,426433	

ANOVA					
Varia	SS	df	MS	F	P-value
Between G	96,4806	1	96,4806	21,23945	0,009967
Within Gro	18,17093	4	4,542733		
Total	114,6515	5			

ANOVA: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL3	3	34,17	11,39	6,3124		
AMPc	3	84,57	28,19	6,4503		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	423,36	1	423,36	66,34333	0,001236	7,70865
Within Groups	25,5254	4	6,38135			
Total	448,8854	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL3	3	34,17	11,39	6,3124		
Eforbol	3	84,92	28,30667	27,19423		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	429,2604	1	429,2604	25,62241	0,007171	7,70865
Within Groups	67,01327	4	16,75332			
Total	496,2737	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL3	3	34,17	11,39	6,3124		
AR	3	198,02	66,00667	35,28443		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	4474,47	1	4474,47	215,1351	0,000126	7,70865
Within Groups	83,19367	4	20,79842			
Total	4557,664	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL3	3	34,17	11,39	6,3124		
T3	3	142,972	47,65733	16,74052		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	1972,979	1	1972,979	171,1696	0,000197	7,70865
Within Groups	46,10584	4	11,52646			
Total	2019,085	5				

ANOVA DEL EFECTO DE MODULADORES EN LOS NIVELES DE TRANSCRIPCION EN GC

ANOVA DE COMPORTAMIENTO EN CELULAS GC					
Sin estímulo					
	hGHN	AMPc	Eforbol	T3	AR
16,62	62,19	34,56	6,47	43,1	
19,95	54,9	31,023	6,97	36,91	
19,5	58,4	32,1	9,98	38,12	
18,69	58,49667	32,561	7,806667	39,37667	Media
1,806737	3,645961	1,813004	1,898693	3,280767	Desv.
					Standard

SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
hGHN	4	74,76	18,69	2,1762	
AMPc	4	233,9867	58,49667	8,862022	
Total	8	308,7537	38,59166	5,018644	

ANOVA					
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value
Between G	3169,141	1	3169,141	574,2123	3,47E-07
Within Gro	33,11457	6	5,519111		
Total	3202,256	7			

SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
hGHN	3	56,07	18,69	3,2643	
T3	3	23,42	7,806667	3,605033	
Total	6	79,50	13,25	3,434867	

ANOVA					
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value
Between Gro	177,6704	1	177,6704	51,72858	0,00198
Within Group	13,73867	4	3,434867		
Total	191,4091	5			

SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
GHN	3	56,07	18,69	3,2643	
AR	3	118,13	39,37667	10,76343	
Total	6	174,20	29,03	7,013867	

ANOVA					
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value
Between Gro	841,9073	1	841,9073	91,51974	0,000667
Within Group	28,05547	4	7,013867		
Total	869,9627	5			

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

ANOVA DEL EFECTO DE FACTORES DE TRANSCRIPCION EN JEG-3

ANOVA: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance	F	P-value
hGHN	3	55,9	18,63333	4,370533		
hPLA1	3	328,01	109,3367	53,63263		
Total		12457,05	4152,3183	37,53445		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	12340,54	1	12340,54	424,054	3,28E-05	7,70865
Within Gro	116,4063	4	29,10158			
Total	12457,05	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance	F	P-value
hGHN	3	55,9	18,63333	4,370533		
hPLA1	3	167,38	55,78333	37,53445		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	2071,298	1	2071,298	98,85694	0,000575	7,70865
Within Gro	83,80663	4	20,95248			
Total	2155,108	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance	F	P-value
hGHN	3	55,9	18,63333	4,370533		
SP1	3	119,19	39,73	63,4732		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	867,604	1	867,604	19,68084	0,011367	7,70865
Within Gro	135,8075	4	33,92187			
Total	903,2915	5				

ANOVA: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance	F	P-value
NPL1	3	37,13	12,37667	11,26013		
PLA	3	205,03	68,34333	66,26663		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	4698,402	1	4698,402	121,2072	0,000387	7,70865
Within Gro	156,0535	4	38,76338			
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance	F	P-value
NPL1	3	37,13	12,37667	11,26013		
PLA	3	354,71	118,2367	177,713		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	16809,51	1	16809,51	177,9037	0,000183	7,70865
Within Gro	377,9463	4	94,49558			
Total	17187,48	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance	F	P-value
NPL1	3	37,13	12,37667	11,26013		
Sp1	3	58,77	19,59	13,5772		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	78,04827	1	78,04827	6,284754	0,006273	7,70865
Within Gro	49,67467	4	12,41667			
Total	127,7229	5				

ANOVA: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance	F	P-value
HPL2	3	82,41	27,47	17,5693		
PL1	3	325,5	108,5	111,5239		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	9848,791	1	9848,791	152,5842	0,000247	7,70865
Within Gro	258,1864	4	64,5466			
Total	10106,98	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance	F	P-value
HPL2	3	82,41	27,47	17,5693		
PLA1	3	368,62	122,8733	125,4804		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	13652,69	1	13652,69	190,8804	0,000159	7,70865
Within Gro	266,0995	4	71,52487			
Total	13938,78	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance	F	P-value
HPL2	3	82,41	27,47	17,5693		
SP1	3	129,02	43,00667	101,6576		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	362,082	1	362,082	6,073829	0,069354	7,70865
Within Gro	238,4539	4	59,61347			

ANOVA: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance	F	P-value
HGHV	3	24,78	8,26	7,7596		
PL1	3	55,465	18,48667	12,48203		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	156,8771	1	156,8771	15,50044	0,017002	7,70865
Within Gro	40,48327	4	10,12062			
Total	197,3603	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance	F	P-value
HGHV	3	24,78	8,26	7,7596		
NPLA	3	67,92	22,66333	41,45583		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	311,184	1	311,184	12,64579	0,023669	7,70865
Within Gro	96,43067	4	24,60772			
Total	409,6149	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance	F	P-value
HGHV	3	24,78	8,26	7,7596		
Sp1	3	113,03	37,03333	51,07853		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	1298,599	1	1298,599	44,14133	0,002664	7,70865
Within Gro	117,6765	4	28,41912			
Total	1416,275	5				

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

SUMMARY						SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance		Groups	Count	Sum	Average	Variance	
hPL3	3	56,38	18,79333	9,038633		hPL3	3	56,38	18,79333	9,038633	
Pit	3	119,12	39,70667	57,24003		hPLA	3	232,95	77,65	89,7484	
<hr/>											
ANOVA						ANOVA					
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value
Between Gro	656,0513	1	656,0513	18,79676	0,011252	Between Gro	5196,161	1	5196,161	105,1892	0,000509
Within Gro	132,5573	4	33,13933			Within Gro	197,5741	4	49,39352		
Total	788,6086	5				Total	5393,735	5			
<hr/>											
SUMMARY						SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance		Groups	Count	Sum	Average	Variance	
hPL3	3	56,38	18,79333	9,038633		hPL3	3	56,38	18,79333	9,038633	
Sp1	3	70,42	23,47333	43,71403		Sp1	3	70,42	23,47333	43,71403	
<hr/>											
ANOVA						ANOVA					
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value
Between Gro	32,8536	1	32,8536	1,245571	0,326918	Between Gro	105,5053	4	26,37633		

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

ANOVA: EFECTO DE POTENCIADORES EN JEG-3

ANOVA: Single Factor					SUMMARY				
SUMMARY					ANOVA				
Groups Count Sum Average Variance					Groups Count Sum Average Variance				
bGHN	3	49,19	16,396667	10,572233	PL1	3	33,87	11,29	5,7973
GHNHPL1	3	73,05	24,35	24,3781	PL1GHNPL1	3	37,11	12,37	6,3729
ANOVA					ANOVA				
SS	df	MS	F	P-value	SS	df	MS	F	P-value
Between Gr.	1	94,883267	5,4296058	0,0802388	1,7496	1	1,7496	0,287522	0,6202432
Within Gro	4	17,475167			24,3404	4	6,0851		
Total	5				26,09	5			
Total 164,78392					Total 321,05535				
SUMMARY					SUMMARY				
Groups Count Sum Average Variance					Groups Count Sum Average Variance				
GHN	3	49,19	16,396667	10,572233	PL1GHN	3	33,87	11,29	5,7973
GHNHPL2	3	73,77	24,59	36,6748	PL1GHNPL2	3	37,76	25,92	27,1467
ANOVA					ANOVA				
SS	df	MS	F	P-value	SS	df	MS	F	P-value
Between G	1	100,6961	4,262535	0,107889	1	321,05535	19,490976	0,0115569	7,7086497
Within Gro	4	23,62352			65,888	4	16,472		
Total	5				386,94335	5			
SUMMARY					SUMMARY				
Groups Count Sum Average Variance					Groups Count Sum Average Variance				
GHN	3	49,19	16,396667	10,572233	PL1GHN	3	33,87	11,29	5,7973
GHNHPL3	3	1700,61	566,87	174,0293	PL1NPL3	3	1144,2	381,4	298,29
ANOVA					ANOVA				
SS	df	MS	F	P-value	SS	df	MS	F	P-value
Between G	1	454531,3	4924,486	2,47E-07	1	205472,1	1351,402	3,27E-06	7,70865
Within Gro	4	92,30027			608,1746	4	152,0437		
Total	5				206080,3	5			

SUMMARY				
Groups	Count	Sum	Average	Variance
PL2GHN	3	87,44	29,146667	11,440533
PL2GHNPL	3	97,09	32,36333	88,68003
ANOVA				
SS	df	MS	F	P-value
Between G	1	15,52042	0,310035	0,607341
Within Gro	4	50,06028		
Total	5			
SUMMARY				
Groups	Count	Sum	Average	Variance
PL2GH	3	87,44	29,146667	11,440533
PL2GHNPL2	3	187,08	62,36	81,6361
ANOVA				
SS	df	MS	F	P-value
Between Gr.	1	1654,6883	35,555396	0,0039719
Within Gro	4	46,538317		
Total	5			

SUMMARY				
Groups	Count	Sum	Average	Variance
GHVGHN	3	43,91	14,636667	18,743033
GHVGHNPL	3	57,962	19,320667	43,754761
ANOVA				
SS	df	MS	F	P-value
Between G	1	32,909784	1,0531502	0,3627865
Within Gro	4	31,248897		
Total	5			
SUMMARY				
Groups	Count	Sum	Average	Variance
GHVGHN	3	43,91	14,636667	18,743033
GHVGHNPL2	3	144,37	48,123333	34,592033
ANOVA				
SS	df	MS	F	P-value
Between Group	1	1682,0353	63,074273	0,0013611
Within Groups	4	26,667533		
Total	5			

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
PL2GHN	3	87,44	29,146667	11,440533	
PL2GHNPL3	3	2006,52	668,846667	449,32253	

ANOVA					
Source of Variati	SS	df	MS	F	P-value
Between Group	613824,14	1	613824,14	2664,3808	8,431E-07
Within Groups	921,52613	4	230,38153		
Total	614745,66	5			

SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
GHVGHN	3	43,91	14,636667	18,741033	
GHVGHNPL3	3	1256,17	418,72333	473,66563	

ANOVA					
Source of Variati	SS	df	MS	F	P-value
Between Group	244929,05	1	244929,05	994,82023	6,022E-06
Within Groups	984,81733	4	246,20433		
Total	245913,87	5			

SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
PL3GHN	3	64,48	21,493333	11,784233	
PL3GHNPL3	3	74,08	24,693333	33,376333	

ANOVA					
Source of Variati	SS	df	MS	F	P-value
Between Group	15,36	1	15,36	0,6802365	0,4558482
Within Groups	90,321533	4	22,580313		
Total	105,68153	5			

SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
PL3GHN	3	64,48	21,493333	11,784233	
PL3GHNPL2	3	205,97	68,656667	102,48373	

ANOVA					
Source of Variati	SS	df	MS	F	P-value
Between Group	3336,57	1	3336,57	58,399044	0,0015751
Within Groups	228,53593	4	57,133983		
Total	3565,106	5			

SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
PL3GHN	3	64,48	21,493333	11,784233	
PL2GHNPL3	3	1728,94	576,31333	460,80763	

ANOVA					
Source of Variati	SS	df	MS	F	P-value
Between Group	461737,85	1	461737,85	1954,066	1,5665E-06
Within Groups	945,18373	4	236,29959		
Total	462683,03	5			

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

ANOVA: EFECTO DE LA PRIMER O SEGUNDA MITAD DE hPL-I y hGH-V EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN (media de las unidades de transmitancia).

Anova: Single Factor					
SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
PL1GHN	3	13,31	4,436667	0,094033	
11N	3	20,2	6,733333	0,943333	
1N	3	8,1	2,7	1,24	
pSVhPL1	3	0,53	0,176667	0,005833	

ANOVA					
source of Vari	SS	df	MS	F	P-value F crit
Between G	69,04737	3	23,01579	40,32198	3,55E-05 4,06618
Within Gro	4,5664	8	0,5708		

Anova: Single Factor					
SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
VGHN	3	18,8	6,3	1,33	
VVN	3	7,4	2,466667	0,563333	
VNV	3	16,9	5,633333	0,443333	
VV	3	8,9	3,3	0,81	

ANOVA					
source of Vari	SS	df	MS	F	P-value F crit
Between G	30,22917	3	10,07639	13,67836	0,001626 4,06618
Within Gro	5,663333	8	0,733333		

Anova: Single Factor					
SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
11N	3	20,2	6,733333	0,943333	
1N	3	13,31	4,436667	0,094033	

ANOVA					
source of Vari	SS	df	MS	F	P-value F crit
Between G	7,912017	1	7,912017	15,25404	0,017458 7,70865
Within Gro	2,074733	4	0,518683		

Anova: Single Factor					
SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
VGHN	3	18,8	6,3	1,33	
VVN	3	7,4	2,466667	0,563333	

ANOVA					
source of Vari	SS	df	MS	F	P-value F crit
Between G	22,04167	1	22,04167	23,28345	0,00849 7,70865
Within Gro	3,786667	4	0,946667		

Anova: Single Factor					
SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
VGH	3	18,8	6,3	1,33	
VNV	3	16,9	5,633333	0,443333	

ANOVA					
source of Vari	SS	df	MS	F	P-value F crit
Between G	0,666667	1	0,666667	0,75188	0,434802 7,70865
Within Gro	3,546667	4	0,886667		

Anova: Single Factor					
SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
VVN	3	7,4	2,466667	0,563333	
VV	3	8,9	3,3	0,81	

ANOVA					
source of Vari	SS	df	MS	F	P-value F crit
Between G	1,041667	1	1,041667	1,775568	0,253536 7,70865
Within Gro	2,346667	4	0,586667		

Anova: Single Factor					
SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
VNV	3	16,9	5,633333	0,443333	
VV	3	8,9	3,3	0,81	

ANOVA					
source of Vari	SS	df	MS	F	P-value F crit
Between G	8,166667	1	8,166667	15,50833	0,018891 7,70865
Within Gro	2,106667	4	0,526667		

PARTICIPACION DEL PRIMER INTRON EN LOS NIVELES DE TRANSCRIPCION.

(Media de la concentración de HGH)

[IGH] para análisis del primer intrón hGII-hPL				
GHNG Sd	14,01	20,1	15,08	
PL1	12,63	11,35	15,7	
PL1 GHN	20,1	23,6	18,3	
PL2	33,5	30,6	38,26	
PL2 IGH	69,2	71,2	68,2	
GHV	14,45	10,96	9,88	
BHV IGH	14,87	9,17	9,4	
PL3	26,80	24,26	28,27	
PL3 IGH	46,59	43,36	48,81	
Average Dev St				
GHNG Sd	16,39667	3,251497		
PL1 GHN	13,22667	2,235539		
PL1 OHN	20,66667	2,695057		
PL2 OHN	34,12	3,867454		
PL2 IGHN	69,53333	1,527525		
GHV GHN	11,76333	2,388563		
GHV IGH	11,14667	3,226551		
PL3 OHN	26,70667	2,300346		
PL3 IGH	46,25333	2,740553		

SUMMARY				
Groups	Count	Sum	Average	Variance
PL1 GHN	3	39,68	13,226667	4,9976333
PL1 IGHN	3	102,36	34,12	14,9572

ANOVA

source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Gr	654,79707	1	654,79707	65,627916	0,0012621	7,7086497
Within Gro	39,09667	4	9,9774167			
Total	694,70673	5				

SUMMARY				
Groups	Count	Sum	Average	Variance
PL2 GHN	3	102,36	34,12	14,9572
PL2 IGHN	3	208,6	69,53333	2,333333

ANOVA

source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	1881,156	1	1881,156	217,5938	0,000123	7,70865
Within Gro	34,58107	4	8,645267			
Total	1915,737	5				

SUMMARY				
Groups	Count	Sum	Average	Variance
GHV GHN	3	35,29	11,763333	5,7052333
GHV IGH	3	33,44	11,145667	10,410633

ANOVA

source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Gr	0,5704163	1	0,5704167	0,0707894	0,0033421	7,7086497
Within Gro	32,231733	4	8,0579333			
Total	32,80215	5				

SUMMARY				
Groups	Count	Sum	Average	Variance
PL3 GHN	3	80,12	26,705667	5,571233
PL3 IGH	3	138,76	46,26333	7,510633

ANOVA

source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	573,1083	1	573,1083	87,61873	0,000725	7,70865
Within Gro	26,16373	4	6,640933			
Total	599,272	5				

Reporte del análisis vía internet de los elementos de respuesta en las secuencias promotoras analizadas en este trabajo con el software MatInspector

Search Results (183 matches) hGH-N 2240 bps MatInspector

Solution parameters:

Sequence file: hGH-N.seq (2240 bps)

Family matches: yes

MatInspector library: Matrix Family Library Version 2.3 February 2002

Selected groups
(core/matrix sim): • ALL vertebrates.lib (0.75/Optimized)**Inspecting sequence hGH-N (-2240 to +1):**

Further Information	Position	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
activator protein 1	58 - 68	(-)	1.000	1.000	ggTGACttaga
Epstein-Barr virus transcription factor R	63 - 83	(-)	1.000	0.830	ttaaccaggattatGGTGac
Muscle Initiator Sequence	99 - 119	(+)	0.921	0.863	aaggggagaCACTtocttgtcc
upstream stimulating factor	130 - 137	(+)	1.000	0.997	tcACCGtgt
Muscle Initiator Sequence	160 - 180	(+)	1.000	0.893	gacccatgcCACCCctgtgc
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	190 - 199	(+)	0.871	0.894	agtATGCag
serum response factor	204 - 217	(+)	0.972	0.860	ccCCAAatggggcc
NF-kappaB	312 - 321	(+)	0.904	0.882	GGGKtgctcc
signal transducers and activators of transcription	336 - 344	(+)	1.000	0.882	ttagaGGAA
octamer-binding factor 1	407 - 420	(+)	0.944	0.908	aaaaatttATATTt
nuclear factor 1	485 - 502	(+)	1.000	0.947	tctTGTCTaaaggccacc
apolipoprotein AI regulatory protein 1	640 - 655	(+)	0.826	0.842	tgtactCCtGaccica
Retinoic acid receptor, member of nuclear receptors	644 - 653	(+)	0.897	0.961	ttgtTCAGgag
CRE-binding protein 1/c-Jun heterodimer	648 - 655	(+)	0.769	0.885	tcACCLtca
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	656 - 665	(+)	0.871	0.851	atgtATCCac
My T1 zinc finger transcription factor involved in primary neurogenesis	681 - 691	(+)	1.000	0.982	ccuAAGTtugg
CCAAT/enhancer binding protein beta	738 - 751	(+)	1.000	0.950	aatgacGCAAgt
cAMP-response element binding protein	739 - 750	(+)	1.000	0.916	aaTGACgcaatg
upstream stimulating factor	870 - 879	(-)	0.863	0.930	gcCACTtgtc
Nuclear factor of activated T-cells	916 - 927	(+)	1.000	0.970	atcgTTAAAncc
nuclear factor 1	1043 -	(-)	1.000	0.946	ccTGCGcaacggcang

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

	1060				
octamer-binding factor 1	1183 - 1192	(-)	1.000	0.941	aATGCaaaa
RAR-related orphan receptor alpha1	1242 - 1254	(-)	1.000	0.933	atcaagaGGTCag
c-Ets-1 binding site	1357 - 1371	(+)	1.000	0.899	tgaGAGAAgagatca
c-Ets-1 binding site	1425 - 1439	(+)	1.000	0.908	ggAGGAAgagctgt
AP1 binding site	1634 - 1642	(-)	1.000	0.995	cTGAGTCAG
octamer-binding factor 1	1800 - 1813	(+)	1.000	0.909	gagaatgggATGTg
upstream stimulating factor	1899 - 1906	(+)	1.000	0.997	aC\CGTga
cAMP-responsive element binding protein	1972 - 1983	(+)	1.000	0.927	cggTGTACggtg
upstream stimulating factor	2021 - 2028	(-)	0.875	0.933	aCACATgc
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	2043 - 2052	(+)	0.871	0.966	aaattATCCat
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	2077 - 2086	(-)	0.871	0.953	aaattAIGCat
cellular and viral TATA box elements	2132 - 2146	(+)	1.000	0.990	gttA AAAAaggcccc
zinc finger with interaction domain	2156 - 2168	(+)	1.000	0.846	caGCTCaggata
nuclear factor YY1 binding factor)	2184 - 2197	(+)	0.777	0.828	cggAGCCACTcaggA
cellular and viral CCAAT box	2184 - 2195	(+)	0.826	0.913	cggaaCCACca
hepatic transcriptional initiator element	2186 - 2201	(-)	0.852	0.902	ggacccctgagTGGAtc

A total of 183 matches were found in 1 sequences!

MatInspector Release professional 5.2: hPL-1 2.5 kb, Search Results: (243 matches)

Solution parameters:

Sequence file: hPL1_1.seq (2490 bps)
Family matches: yes
MatInspector library: Matrix Family Library Version 2.3 February 2002
Selected groups
 (core/matrix sim): • ALL vertebrates.lib (0.75/Optimized)

Inspecting sequence hPL_1 (-2490 to +1):

Further Information	Position	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
octamer-binding factor 1	42 - 55	(-)	0.807	0.820	agGAATGaaatgt
c-Ets-1 binding site	43 - 57	(-)	0.881	0.907	ataGGATgigaalgc
PPAR/RXR heterodimers	49 - 68	(+)	0.807	0.696	acatcttaggcACACgggt
nuclear factor 1	78 - 95	(-)	1.000	0.946	tgtTGGCaccacatcg
c-Ets-1(p54)	253 - 262	(-)	0.851	0.936	tcTGGAaigc
octamer-binding factor 1	266 - 275	(+)	0.755	0.876	tATGGaaaaata
upstream stimulating factor	370 - 379	(+)	0.863	0.915	gcCACTtgcgc
CCAAT/enhancer binding protein beta	393 - 406	(+)	0.985	0.952	gaatgtt^A^A^A gaa
octamer-binding factor 1	419 - 428	(+)	0.755	0.826	tATUGuuaga
stimulating protein 1 SP1, ubiquitous zinc finger transcription factor	507 - 519	(+)	1.000	0.915	tggAA^RtCtgtgc
AP1 binding site	515 - 523	(-)	1.000	0.986	gTGAGTCAc
VDR/RXR heterodimer site	547 - 561	(+)	1.000	0.855	a^ggccaggGAGGtggt
CRE-binding protein 1/c-Jun heterodimer	569 - 576	(-)	0.763	0.882	tgcACTTta
Glucocorticoid receptor, C2C2 zinc finger protein binds glucocorticoid dependent to GREs	628 - 643	(-)	0.828	0.802	gtttttttTCTTAct
nuclear factor 1	1112 - 1129	(+)	1.000	0.956	tctTCKCtcaacgcaccc
c-Ets-1(p54)	1163 - 1172	(-)	1.000	0.944	tcCGGtAggtg
NF-kappaB (p65)	1178 - 1187	(+)	0.782	0.877	t^cggatTACC
SF1 steroidogenic factor 1	1256 - 1264	(-)	1.000	1.000	taAAGGccn
apolipoprotein AI regulatory protein 1	1262 - 1277	(+)	0.826	0.842	gttttCCtGacatca
Retinoic acid receptor, member of nuclear receptors	1266 - 1275	(-)	0.897	0.961	aggTCAGgag
CRE-binding protein 1/c-Jun heterodimer	1270 - 1277	(+)	0.769	0.885	tgcACCTca
sterol regulatory element-binding protein 1	1274 - 1284	(-)	1.000	0.931	gaTCACtttag
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	1278 - 1287	(+)	0.871	0.851	aggATCCac
upstream stimulating factor	1328 - 1335	(+)	1.000	1.000	tcCACGtac
octamer-binding factor 1	1450 - 1461	(+)	0.750	0.801	gtatgtAAAT
upstream stimulating factor	1489 - 1498	(-)	0.863	0.930	gcCACTtgtc
tumor suppressor p53	1510 - 1529	(+)	0.750	0.662	ggAA^tccacaggccccc
PPAR/RXR heterodimers	1638 - 1657	(+)	0.807	0.707	caatgtggagaAGAttttc

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales



octamer-binding factor 1	1650 - 1664	(+)	1.000	0.832	agagatcAAATcc
c-Ets-1 binding site	1712 - 1726	(+)	1.000	0.921	ggatGAAgcgttgt
VDR/RXR heterodimer site	1821 - 1835	(-)	0.833	0.875	aggactGGGtaaag
Retinoic acid receptor, member of nuclear receptors	1826 - 1835	(-)	1.000	0.977	aggTCACtgg
NF-kappaB (p50)	1837 - 1846	(+)	1.000	0.927	GAGGagccaa
octamer-binding factor 1	1897 - 1910	(-)	0.833	0.906	cacacttgATCTc
AP1 binding site	1953 - 1961	(-)	1.000	0.995	cTGAGTCAG
cAMP-responsive element binding protein	1973 - 1984	(-)	1.000	0.925	ctgcTGAC'gact
POU-factor Oct-1	1984 - 1998	(-)	1.000	0.909	cctgAAIccatcc
AP1 binding site	2000 - 2008	(-)	0.917	0.961	aTGATTCAg
cAMP-responsive element binding protein	2290 - 2301	(+)	1.000	0.927	cggTGACgggg
upstream stimulating factor	2339 - 2346	(-)	0.875	0.933	aCACATgc
GC box elements	2344 - 2357	(+)	0.876	0.909	tgtGGAGgagtt
zinc finger with interaction domain	2247 - 2259	(+)	1.000	0.894	caGCTCca gata
transcriptional repressor CDP	2359 - 2373	(+)	0.795	0.877	caatATCCattag
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	2361 - 2370	(+)	0.871	0.966	attATCCat
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	2395 - 2404	(-)	0.871	0.953	attATGCCat
cellular and viral TATA box elements	2451 - 2465	(+)	1.000	0.990	gtATAAaggcc

243 matches found.

A total of 243 matches were found in 1 sequences!

hPL-2 MatInspector 3.4 kb

308 secuencias reguladoras

Solution parameters:

Sequence file: hPL_2.seq (-3420 to + 1 bps)
 Family matches: yes
 MatInspector library: Matrix Family Library Version 2.3 February 2002
 Selected groups (core/matrix sim): • ALL vertebrates.lib (0.75/Optimized)

Inspecting sequence hPL_2 (-3420 to +1):

Further Information	Position	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequenfce
NF-kappaB	111 - 122	(+)	0.780	0.836	atGGTAATccca
NF-kappaB	132 - 141	(+)	0.904	0.923	GtttKaaacc
PPAR/RXR heterodimers	141 - 160	(+)	1.000	0.729	caatcgaaatcAAAUtttt
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	174 - 183	(-)	1.000	0.876	tatcATTCCat
CCAAT/enhancer binding protein beta	194 - 207	(-)	1.000	0.960	gccttgaGCAAtgg
activator protein 1 AP-1	341 - 351	(-)	1.000	1.000	ggTGACTcagg

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

heterodimer					
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou transcription factor	2164 - 2173	(+)	0.871	0.851	aggATCCac
tumor suppressor p53	2205 - 2224	(-)	1.000	0.666	agcATggatcgatgcgt
tumor suppressor p53	2215 - 2234	(+)	1.000	0.662	aaATgggggttgtt
Se-Cys tRNA gene transcription activating factor	2243 - 2264	(-)	1.000	0.777	tttCCAtatgggttttttt
CCAAT/enhancer binding protein beta	2244 - 2257	(+)	1.000	0.950	aaatgacGCAatgt
cAMP-response element binding protein	2245 - 2256	(+)	1.000	0.916	aaTCACgcaatgt
sterol regulatory element-binding protein 1	2347 - 2357	(-)	0.750	0.791	taTCATccat
RAR-related orphan receptor alpha1	2380 - 2392	(+)	1.000	0.941	agtgcataatTTcag
tumor suppressor p53	2397 - 2416	(+)	0.750	0.662	aggAAAGcacaggggggc
serum response factor	2482 - 2499	(+)	0.757	0.705	atgcgtGATAccccc
Progesterone receptor binding site	2498 - 2524	(+)	1.000	0.862	tttttggggggatTTTcttgcgttt
c-Ets-1 binding site	2599 - 2613	(+)	1.000	0.921	ggatTTAAgcgcgttg
signal transducer and activator of transcription 1	2620 - 2640	(-)	1.000	0.838	cagaatccggatGAAcaga
CREB complex	2697 - 2711	(+)	0.750	0.758	tgcgtttTCCttcccc
NF-kappaB (p50)	2722 - 2731	(+)	1.000	0.927	GGGGggcccc
stimulating protein 1 SP1, ubiquitous zinc finger transcription factor	2735 - 2747	(-)	1.000	0.914	ttggGGCGggggc
signal transducers and activators of transcription	2750 - 2758	(+)	1.000	0.960	tcagGGAA
TEF-1	2763 - 2774	(-)	1.000	0.830	cat ATTgttcc
AP1 binding site	2819 - 2827	(-)	1.000	0.995	cTGAGTCAG
POU-factor Oct-1	2850 - 2864	(-)	1.000	0.902	ccgtAAjTccatctt
cellular and viral CCAAT box	2893 - 2904	(-)	1.000	0.923	cacagLCAAtag
CCAAT/enhancer binding protein beta	2912 - 2925	(-)	0.985	0.952	gtgtttGAATAggg
Ras-responsive element binding protein 1	2917 - 2930	(+)	1.000	0.796	tCCCAacacacacaca
Ets-like transcription factor identified in lymphoid B-cells	2940 - 2955	(+)	1.000	0.862	gtgggtGGAAgtaaaa
TEF-5 stimulator factor	2987 - 2998	(-)	1.000	0.887	ccCATTccacttc
estrogen receptor	3042 - 3060	(-)	1.000	0.897	ttttTCAacccgtggcc
Transcription activator protein 2	3185 - 3196	(-)	0.976	0.901	ttCCCTCctgggt
upstream stimulating factor	3205 - 3212	(-)	0.875	0.933	acACATgc
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	3227 - 3236	(+)	0.871	0.939	aaatA1CCac
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	3261 - 3270	(-)	0.871	0.953	attATGCat
sterol regulatory element-binding protein 1	3285 - 3295	(-)	0.750	0.838	ctTGACccccac
zinc finger with interaction domain	3342 - 3354	(+)	1.000	0.936	cgGCTCaggata

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

cellular and viral TATA box elements	(+)	1.000	0.990	gtTAAAaggccc
zinc finger with interaction domain	(+)	1.000	0.894	cattCTCtagatc

A total of 308 matches were found in 1 sequences!

hGHV 2730 bps (279 matches)

MatInspector Release professional 5.2

Sat Jan 23 15:46:03 2002

Solution parameters:

Sequence file: bGHV.seq (2730 bps)

Family matches:

MatInspector library: Matrix Family Library Version 2.3 February 2002

Selected groups

- #### • All vertebrates lib (0.75/Optimized)

Inspecting sequence hGHV (-2730 to +1)

Further Information	Position	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
NF-kappaB	65 - 74	(+)	0.904	0.882	tcGtGgtcccc
activator protein 4	78 - 87	(-)	1.000	0.985	gttCAGCtgg
signal transducers and activators of transcription	89 - 97	(+)	1.000	0.882	tggaaGGAA
Se-Cys tRNA gene transcription activating factor	90 - 111	(-)	1.000	0.780	cggCCCCAccatccctccca
VDR/RXR heterodimer site	189 - 203	(+)	0.840	0.901	acggggaaGTGttGta
activator protein 1	199 - 209	(+)	1.000	0.967	ggtGtACtccac
Progesterone receptor binding site	281 - 307	(-)	1.000	0.830	cacttgtcgatgtggatGTTttccaggc
signal transducers and activators of transcription	351 - 359	(+)	1.000	0.911	ttttcatGAA
TEF-1 related muscle factor	352 - 363	(-)	1.000	0.855	atCATtttgtaa
zinc finger with interaction domain	368 - 380	(-)	1.000	0.856	gttttCTttttttcc
sterol regulatory element-binding protein 1	398 - 408	(-)	0.750	0.884	caTCTtccccc
Se-Cys tRNA gene transcription activating factor	412 - 433	(+)	1.000	0.808	ggggCCCCAgtttccatctca
c-Ets-1 binding site	420 - 434	(-)	0.881	0.907	ctatxtATgtggatgc
RAR/RXR heterodimers	426 - 445	(+)	0.807	0.696	acatccatggccACAGgttt
nuclear factor 1	455 - 472	(-)	1.000	0.946	tgttttttttaccacatgt
X-box binding protein RFX1	461 - 478	(-)	1.000	0.906	cgttgttgttgGCAAcca
T3 factor-1 (TFI1) binding site	527 - 540	(+)	1.000	0.948	aaagtTAAttgtata
CCAAT/enhancer binding protein beta	564 - 577	(-)	0.985	0.944	tatgggtGAAAat
Retinoic acid receptor, member of nuclear receptors	622 - 631	(-)	1.000	0.984	aggTCACaaag
RAR-biding site	625 - 637	(-)	1.000	0.943	atctggaaGtGtac
Ras-responsive element binding protein 1	728 - 741	(+)	0.790	0.813	cCACAAggccccc
upstream stimulating factor	744 - 753	(+)	0.863	0.915	gttGACtgcgc
CCAAT/enhancer binding protein beta	767 - 780	(+)	0.985	0.952	gaattgtGAAGaa

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

Androgen receptor binding site	771 - 797	(-)	1.000	0.911	ccatangggcagatGTTCtttc
serum response factor	786 - 799	(-)	1.000	0.831	ttCCAAIaagggeca
octamer-binding factor 1	793 - 802	(+)	0.755	0.826	IATGtaaaaga
Avian C-type LTR TATA box	858 - 867	(+)	0.793	0.827	aTATAGAacc
CREB complex	889 - 903	(+)	0.784	0.813	atggeeICAUgcgaag
VDR/RXR heterodimer site	922 - 936	(+)	1.000	0.855	aaecccggIACUcggtg
cAMP-responsive element binding protein 1	939 - 946	(+)	0.766	0.801	tcACCTaa
CRE-binding protein 1/c-Jun heterodimer	944 - 951	(-)	0.763	0.882	IgACTTta
T3 factor-1 (TF1) binding site	945 - 958	(+)	1.000	0.944	aaagtCAAIagttic
octamer-binding factor 1	1002 - 1016	(+)	1.000	0.863	aaaaagtgAAATctt
growth factor independence 1 zinc finger protein acts as transcriptional repressor	1003 - 1026	(+)	1.000	0.943	aaatggcaAATCttggccggcat
VDR/RXR heterodimer site	1057 - 1071	(+)	1.000	0.880	gegaggttGA(r)Gcca
serum response factor	1085 - 1098	(+)	0.972	0.832	actCCAAGatggccgg
AP 1	1139 - 1149	(+)	1.000	0.962	ggI(t)ACatgtat
Avian C-type LTR TATA box	1188 - 1197	(-)	0.812	0.842	IATITTAgtc
sterol regulatory element-binding protein 1	1211 - 1221	(+)	0.750	0.791	taGCACccac
nuclear factor 1	1309 - 1326	(+)	1.000	0.956	tctTCTttCtcacggcaacc
CREB complex	1375 - 1389	(+)	0.830	0.824	ctggcaTTACgggt
upstream stimulating factor	1386 - 1395	(-)	1.000	0.910	ggI'AC'Gcccc
estrogen receptor	1389 - 1407	(-)	1.000	0.893	gttgttTCAtggggcaca
Retinoic acid receptor, member of nuclear receptors	1467 - 1476	(-)	0.897	0.961	aggTCAGgg
RAR- receptor alpha 1	1470 - 1482	(-)	1.000	0.936	cacttaatGTCgg
CRE-binding protein 1/c-Jun heterodimer	1471 - 1478	(+)	0.769	0.885	IgACCTta
cAMP-responsive element binding protein 1	1476 - 1483	(-)	0.766	0.801	tcACCTaa
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	1479 - 1488	(+)	0.871	0.851	atgtgATCtac
CCAAT/enhancer binding protein beta	1559 - 1572	(+)	1.000	0.950	aaa gacGCAAtgtl
cAMP-response element binding protein	1560 - 1571	(+)	1.000	0.916	aaTtIAIcaatgt
upstream stimulating factor	1691 - 1700	(-)	0.863	0.930	gcCATCTtac
tumor suppressor p53	1712 - 1731	(+)	0.750	0.662	ggggAAIicacggggggcc
GC box elements	1778 - 1791	(+)	0.876	0.899	aaatgttACttgggtt
serum response factor	1794 - 1811	(+)	0.757	0.705	atggatgtttAAatgggtt
Progesterone receptor binding site	1810 - 1836	(+)	1.000	0.866	tctttggcggtgtgtGTTtgtgggtt
c-Ets-1 binding site	1911 - 1925	(+)	1.000	0.921	ggatntrAAatgggtt
signal transducer and activator of transcription 1	1932 - 1952	(-)	1.000	0.838	cggaaatccggGGAAcagaca
CREB complex	2009 - 2023	(+)	0.750	0.758	gggtttTTCGtcccc
NF-kappaB (p50)	2034 - 2043	(+)	1.000	0.927	tGCGtgcgtcc

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

hPI-3 2730 bps (279 matches)

Solution parameters

Sequence file: hPL-3.seq (2730 bps)

Family matches:

Matrix Family Library Version 2.3 February 2002

- ALL vertebrates.lib (0.75/Optimized)

Inspecting sequence hPL-3 (1 - 2720):

Further Information	Position	Strand	Core sim	Main sim	Sequence
NF-kappaB	65 - 74	(+)	0.904	0.882	GGG[Gtgttcc
activator protein 4	78 - 87	(-)	1.000	0.985	gtCA[TCgtgg
signal transducers and activators of transcription	89 - 97	(+)	1.000	0.882	tggat[tttAA
Se-Cys tRNA gene transcription activating factor	90 - 111	(-)	1.000	0.780	c[tccCCCACcccccttcata
VDR/RXR heterodimer site	189 - 203	(+)	0.840	0.901	aggggaaa[GTr[Gtga
Progesterone receptor binding site	281 - 307	(-)	1.000	0.830	cacttgttgtgtggc[GTG]tccccggc
myoblast determination gene product	314 - 325	(+)	1.000	0.952	cagCAT[tttgtatg
neuron-restrictive silencer factor	321 - 341	(-)	1.000	0.692	accAGt[Accccgactca
signal transducers and activators of transcription	351 - 359	(+)	1.000	0.911	tttc[GtGA
TEF-1 related muscle factor	352 - 363	(-)	1.000	0.855	atCATT[tttgtaa
zinc finger with interaction domain	368 - 380	(-)	1.000	0.856	gatn[TCatttde

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

sterol regulatory element-binding protein 1	398 - 408	(-)	0.750	0.884	cattCTCccac
Se-Cys tRNA gene transcription activating factor	412 - 433	(+)	1.000	0.808	gggcLCCAGcaatcacatcta
octamer-binding factor 1	419 - 432	(-)	0.807	0.820	atGATGttatgtct
c-Ets-1 binding site	420 - 434	(-)	0.881	0.907	cttGGATgtgtatgc
PPAR/RXR heterodimers	426 - 445	(+)	0.807	0.696	acatcttagccACAUggt
nuclear factor 1	455 - 472	(-)	1.000	0.946	tgtTtttttaccacatcg
Octamer binding site (OCT1/OCT2 consensus)	494 - 506	(-)	1.000	0.804	aaaaGCAAAgt
T3 transcription factor-1 (TTF1) binding site	527 - 540	(+)	1.000	0.948	agagtCAAttgtata
CCAAT/enhancer binding protein beta	564 - 577	(-)	0.985	0.944	tagtgtGAAAat
Retinoic acid receptor, member of nuclear receptors	622 - 631	(-)	1.000	0.984	aggTCACang
RAR-receptor alpha1	625 - 637	(-)	1.000	0.943	atcggatGGTCatc
upstream stimulating factor	744 - 753	(+)	0.863	0.915	gcCACTtagcc
CCAAT/enhancer binding protein beta	767 - 780	(+)	0.983	0.952	gaatgttAAAaaa
octamer-binding factor 1	793 - 802	(+)	0.755	0.826	tATGttatgt
CREB complex	889 - 903	(+)	0.784	0.813	agggtTCACgtcaag
C/EBP binding site	891 - 908	(+)	0.991	0.850	tggctcacGCAAGgtatc
VDR/RXR heterodimer site	922 - 936	(+)	1.000	0.855	aggccaggGAGGgttg
cAMP-responsive element binding protein 1	939 - 946	(+)	0.766	0.801	tcACCTta
CRE-binding protein 1/c-Jun heterodimer	944 - 951	(-)	0.763	0.882	*tpACTTta
octamer-binding factor 1	1002 - 1016	(+)	1.000	0.863	aaaaatgcAAATtta
growth factor independence 1 zinc finger protein acts as transcriptional repressor	1003 - 1026	(+)	1.000	0.943	aaatgtcaAAATcttagccggcat
VDR/RXR heterodimer site	1057 - 1071	(+)	1.000	0.880	gcggatgttAcGccga
TCF11/MafG heterodimers, binding to subclass of AP1 sites	1268 - 1289	(-)	1.000	0.837	cctggTGACagacggatgtata
nuclear factor 1	1309 - 1326	(+)	1.000	0.956	tctTGUtcaacagcaacc
CREB complex	1375 - 1389	(+)	0.830	0.824	ctgggtTACgtggct
upstream stimulating factor	1386 - 1395	(-)	1.000	0.910	ggCAGGcccc
Retinoic acid receptor, member of nuclear receptors	1467 - 1476	(-)	0.897	0.961	aggTCAGggag
RAR-receptor alpha1	1470 - 1482	(-)	1.000	0.936	cactttatGtGtGag
CRE-binding protein 1/c-Jun heterodimer	1471 - 1478	(+)	0.769	0.885	tgACCTta
cAMP-responsive element binding protein 1	1476 - 1483	(-)	0.766	0.801	tcACCTta
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	1479 - 1488	(+)	0.871	0.851	atgtGAICCCac
CCAAT/enhancer binding protein beta	1559 - 1572	(+)	1.000	0.950	aaaaatgttCtAgtt
cAMP-response element binding protein	1560 - 1571	(+)	1.000	0.916	aaTtGtALgtatgt
upstream stimulating factor	1691 - 1700	(-)	0.863	0.930	gcCACTtgttc
tumor suppressor p53	1712 - 1731	(+)	0.750	0.662	gapAATtcaacaggaucc
serum response factor	1794 - 1811	(+)	0.757	0.705	atggatgtGATAgggatgc
c-Ets-1 binding site	1911 - 1925	(+)	1.000	0.921	ggatGAAAGgtttgtt
CREB complex	2009 - 2023	(+)	0.750	0.758	tgggtttTTGtcc
GC box elements	2069 - 2082	(-)	0.872	0.922	tgggttGTGgtgggg
SP1, ubiquitous zinc finger transcription factor	2089 - 2101	(-)	1.000	0.993	cgggtGGCGgggg
SP1, ubiquitous zinc finger transcription factor	2101 - 2113	(-)	1.000	0.956	tggGGCGgggg
cAMP-responsive element binding protein 1	2117 - 2124	(-)	0.766	0.806	ttACCTgt
API binding site	2238 - 2246	(-)	0.917	0.961	aTGATTCAg

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

Ras-responsive element binding protein 1	2247 - 2260	(+)	1.000	0.792	gCCCAggccccccg
RAR/RXR heterodimers	2273 - 2292	(-)	1.000	0.724	ggaaaggggggcAAAGccca
CCAAT/enhancer binding protein beta	2285 - 2298	(-)	0.985	0.952	gttgtgggtAAAagg
upstream stimulating factor	2456 - 2463	(+)	1.000	0.997	cCAC GTta
transcriptional repressor CDP	2597 - 2611	(+)	0.795	0.883	ttttttAATCCTatcg
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	2599 - 2608	(+)	0.871	0.966	aaattAATCCat
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	2633 - 2642	(-)	0.871	0.953	attATGCCat
zinc finger with interaction domain	2713 - 2725	(+)	1.000	0.846	cAGCTCaggatc
cellular and viral TATA box elements	2689	(+)	1.000	0.997	tttTAACTaaatgc

279 matches found.

Análisis con el mismo software de: Elementos reguladores presentes en Intrón I de los genes hGH-hPL

Selected groups (core/matrix sim):

- ALL vertebrates.lib (0.75/Optimized)

Sequence file: hGHN_Intron1.seq (260 bps) Inspecting sequence hGHN_Intron1 (1 - 260): 12 matches found.

Name of binding motif	Further Information	Position	Strand	Cover- age (%)	Matrix sim	Sequence
VSGREF/GRE_01	Glucocorticoid receptor, C2C2 zinc finger protein binds glucocorticoid dependent to GRE	25 - 40	(+)	0.923	0.964	ggccatgtTGTGcg
VSMZF1/MZF1_01	MZF1	39 - 46	(+)	1.000	0.975	tgaGoruua
VSMERF3/MEF3_01	MEF3 binding site, present in skeletal muscle-specific transcriptional enhancers	82 - 94	(+)	1.000	0.832	cccTCAGgtttgg
V1E2FF/E2F_02	E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	90 - 97	(-)	1.000	0.849	gcgcCAAA
VSSRF1/SRF_02	serum response factor	125 - 138	(-)	0.972	0.822	ggCCrAatactgg
VSPCAT/CAAT_01	cellular CCAAT box	132 - 143	(+)	1.000	0.910	tttgtCC'AAtd
VSECAT/NFY_02	nuclear factor Y (Y-box binding factor)	134 - 144	(+)	1.000	0.940	tttgtCA'Attc
VSHSF1/HSF1_01	heat shock factor 1	145 - 154	(+)	1.000	0.924	AGAAngetcc
VSNOLF/OLE_01	olfactory neuron-specific factor	152 - 173	(+)	1.000	0.863	tcctggTTT'Ctg_Aaggatca
VSEKHD/HFH3_01	HNF-3/Fkh Homolog 3 (= Freac-6)	180 - 192	(+)	1.000	0.966	aaaae^A\ACactc
V\$ARLB/ARLB_04	AREB6 (Atplab regulatory element binding factor 6)	182 - 190	(-)	1.000	0.976	atGTTTgtt
V\$PAX1/PAX1_01	Pax1 paired domain protein, expressed in the developing vertebral column of mouse embryos	236 - 253	(+)	0.750	0.616	CTCTTgcccccttagttc

Sequence file: hPL1_Intron1.seq (262 bps) Inspecting sequence hPL1_Intron1 (1 - 262); 17 matches found

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

Sequence file: hPL2_IntronL.seq (266 bps)

Inspecting sequence hPL2_Intron (1 - 266): 18 matches found

Sequence file: hGHV_IntronI.seq (272 bps) Inspecting sequence hGHV_IntronI (1 - 272): 15 matches found

Name of family/matrix	Further Information	Position	Stand.	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
V\$GREB/GRE_01	Glucocorticoid receptor, C2C2 zinc finger protein binds glucocorticoid dependent to GREs	25 - 40	(+)	0.923	0.964	gacaca atg TGT Ctg
V\$MZF1/MZF1_01	MZF1	39 - 46	(+)	1.000	0.975	tga Gs
V\$CREB/TAXCREB_02	Tax/CREB complex	42 - 56	(+)	0.750	0.703	ggccaa C G G G G G
V\$MEF3/MEF3_01	MEF3 binding site, present in skeletal muscle-specific transcriptional enhancers	82 - 94	(+)	1.000	0.832	c c TCA Ugg m g
V\$E2F/E2F_02	E2F, involved in cell cycle regulation,	90 - 97	(-)	1.000	0.849	puu C A A
V\$TEF1/TEF1_01	TEF-1	97 - 108	(-)	1.000	0.846	u u C A T . C t a g
V\$SRF/SRF_02	serum response factor	125 - 138	(+)	0.972	0.822	gg' C A A - t a c g g
V\$PCAT/CAAT_01	cellular CCAAT box	132 - 143	(+)	1.000	0.910	m g g C C A A d
V\$NFKY/NFY_02	nuclear factor Y (Y-box binding factor)	134 - 144	(+)	1.000	0.940	t g g C n t d A
V\$HSF1/HSF1_01	heat shock factor 1	145 - 154	(+)	0.867	0.951	T T A A t g t t c
V\$ONF1/ONF1_01	olfactory neuron-specific factor	152 - 173	(+)	1.000	0.831	t o c g T C C L C t p x x g g g g
V\$IRF1/IRF1_01	interferon regulatory factor 1	188 - 200	(+)	0.777	0.863	g a u a a u A A A A c c
V\$STAT/STAT1_01	signal transducer and activator of transcription 1	198 - 218	(+)	1.000	0.802	a c c o g a c o o G G A A c i g g a
V\$ETS1/CETS1/P54_01	c-Ets-1(p54)	253 - 262	(-)	1.000	0.945	a c C G G A g g c a

Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

Sequence file: hPL3_Intron1.seq (264 bps)

Inspecting sequence hPL3_Intron1 (1 - 264): 15 matches found

Name of family/motif	Further Information	Start	End	Score	Sequence
V\$GRE/GRE_01	Glucocorticoid receptor, C2C2 zinc finger protein binds glucocorticoid dependent to GREs	24 - 39		(+)	gcaacaacgtGTCatcg
V\$EROX/ARNT_01	AhR nuclear translocator homodimers	24 - 39		(+)	ggcacaaCGTGtcctcg
V\$NOL/HOLF1_01	olfactory neuron-specific factor	29 - 50		(+)	aacgttgGCCgaggggggggc
V\$MZF1/MZF1_01	MZF1	38 - 45		(+)	tgttRRCGta
V\$MEF3/MEF3_01	MEF3 binding site, present in skeletal muscle-specific transcriptional enhancers	81 - 93		(+)	ccCTCAAGgtttgg
V\$E2F/E2F_02	E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	89 - 96		(-)	gcgcCAAA
V\$TEAF/TEF1_01	TEF-1	96 - 107		(-)	caCATTCattag
V\$SREF/SRF_03	serum responsive factor	114 - 128		(+)	gCTATCTaggccag
V\$SREF/SRF_01	serum response factor	123 - 140		(-)	ttggccAAATAcgtggcc
V\$HMTB/MTBF_01	muscle-specific Mt binding site	127 - 135		(+)	agaATTtg
V\$PCAT/CAAT_01	cellular CCAAT box	132 - 143		(+)	ttggCCAAtc
V\$HEAT/HSF1_01	heat shock factor 1	145 - 154		(+)	TGAAtgtcc
V\$GRE/ARE_01	Androgen receptor binding site	178 - 204		(-)	gtcccaagggttgtTGTtttttc
V\$FKHD/HFH3_01	HNF-3/Fkh Homolog 3 (= Frsc-6)	184 - 196		(+)	aaaaaAAAACgtct
V\$AREB/AREB_04	AREB6 (Atp1a1) regulatory element binding factor 6)	186 - 194		(-)	cGTTTgt

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO**MARTIN CANIZALES ESPINOSA**

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Tesis: REGULACION DEL COMPLEJO MULTIGENICO hGH-hPL MEDIADO POR HORMONAS Y FACTORES TRANSCRIPCIONALES.**Campo de Estudio: Ciencias Básicas****Biografía:**

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 14 de Diciembre de 1968, hijo de Sr. Liborio Canizales-Cisneros y Sra. Irene Espinosa-Canizales.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Clínico Biólogo en Diciembre de 1992.

ULIEG, Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido: Maestro en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética, Diciembre de 1996.

Experiencia Profesional:

Asistente de investigación en el laboratorio de Biología Celular en la ULIET del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, 1998.

Maestro de Tiempo parcial, materia Génetica impartida a estudiantes de Biología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León período 1999-2000.

Investigador posdoctoral asociado, Escuela de Medicina de la Universidad de Texas, en Houston TX, USA, Departamento de Farmacología y Biología Integrativa, involucrado en los proyectos:

a. Estudio del análisis de mutaciones en las secuencias de DNA de alfa y beta tubulina, que confieren resistencia a drogas anti-cancer (Taxol, Vinblastina, Colcemida, Estrasbustina y Colchicina).

b. Estudio de la alteración dinámica de microtubulos en células resistentes a drogas desestabilizantes de microtubulos, mediante proteínas de fusión con la proteína verde fluorescente y motivos fluorescentes tetracisteína, por microscopía fluorescente y confocal. Inicio de actividades Abril 2001 a la fecha.



