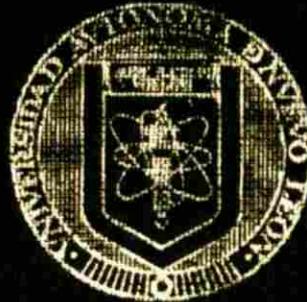


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



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

POR:

M.C. MARTIN CANIZALES ESPINOSA

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

Noviembre de 2002



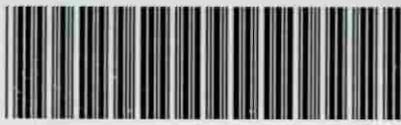
ANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

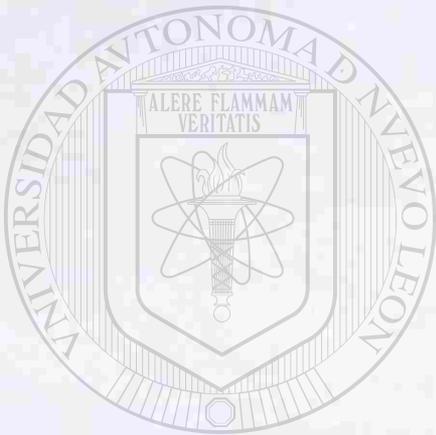
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD
QH511
.C3
2003
c.1



1080124497



UANL

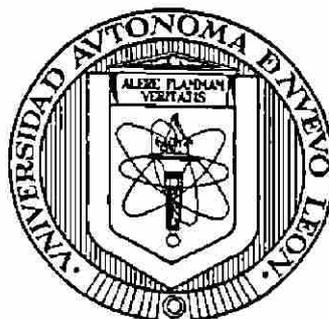
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



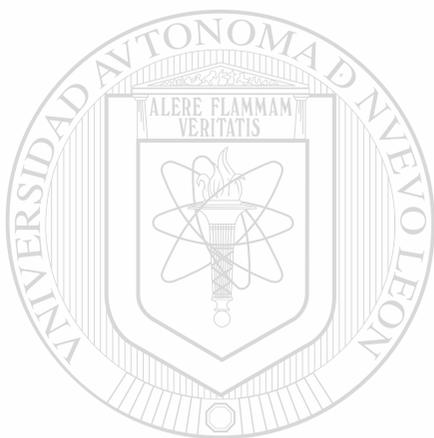
REGULACION DEL COMPLEJO MULTIGENICO hGH-hPL MEDIADO POR HORMONAS Y
FACTORES TRANSCRIPCIONALES

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
Por
M.C. MARTIN CANIZALES ESPINOSA
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

Febrero de 2003

TD
QH511
.C3
2003



UANL

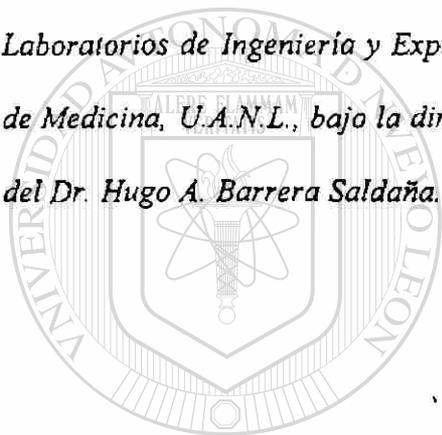
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

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

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

Dedicatorias

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

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

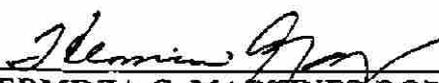
A mi compañera de vida, mi esposa **Alma, por toda ésta mitad de nuestra vida, vivida juntos. Por tí, mi estímulo de vida...**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

Aprobación de la Tesis:



DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Director de Tesis



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



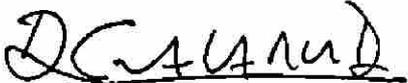
DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
1er. VOCAL



DRA. DIANA RESÉNDEZ PÉREZ
2do. VOCAL



DR. MARIO C. SALINAS CARMONA
3er. VÓCAL



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

RESUMEN

M.C. Martín Canizales Espinosa

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

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

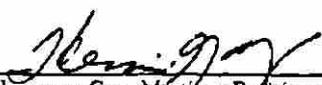
Número de páginas: 147 Candidato al grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

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

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

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

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


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

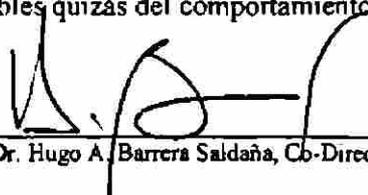

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, Co-Director de Tesis.

TABLA DE CONTENIDO

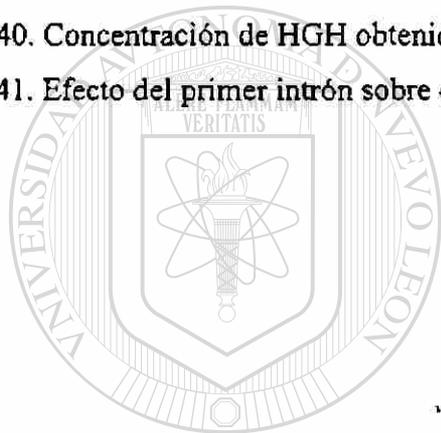
Capítulo	Página
I INTRODUCCION	1
1.1 Selección del sistema de estudio	1
1.2 El complejo multigénico hGH-hPL como modelo de regulación génica	1
1.3 Regulación de la transcripción en el complejo hGH-hPL	3
1.4 Control de la estructura de la cromatina del complejo hGH-hPL	4
1.5 Factores trans y moduladores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

3.4.1.2	<i>Cuantificación de hormona del crecimiento humano</i>	47
3.4.9	<i>Añadición del competidor al RT-PCR cuantitativo</i>	47
3.5	Análisis de resultados	50
IV. RESULTADOS		51
4.1	Análisis de regiones promotoras de los genes hGH-hPL	51
4.1.1	<i>Construcción de recombinantes</i>	51
4.1.2	<i>Comportamiento en cultivo celular</i>	52
4.1.3	<i>Análisis de moduladores de la transcripción</i>	55
4.1.4	<i>Análisis del efecto de factores de transcripción</i>	59
4.2	Análisis de la región 3' de los genes Lactógeno Placentario	62
4.2.1	<i>Clonación de potenciadores del locus hGH-hPL</i>	62
4.2.2	<i>Secuenciación de potenciadores</i>	65
4.2.3	<i>Sub-clonación de potenciadores en recombinantes con promotor 0.5 kb</i>	66
4.2.4	<i>Transfección de recombinantes con promotor 0.5 kb-potenciador</i>	66
4.3	Análisis de las unidades transcripcionales de hPL-1 y hGH-V	69
4.3.1	<i>Construcción de quimeras de hPL-1 y hGH-V con hGH-N</i>	69
4.3.2	<i>Detección de la expresión de las quimeras por RT-PCR semicuantitativo</i>	72
4.3.3	<i>Construcción del vector para determinar eficiencia de transfección</i>	74
4.3.4	<i>Expresión del vector pβactinahGHN21K en cultivo celular</i>	76
4.3.5	<i>Desarrollo del sistema de RT-PCR cuantitativo</i>	77
4.3.6	<i>Construcción de quimeras para análisis del 1^{er} intrón de genes hGH-hPL</i>	81
4.4	Pruebas estadísticas	83
4.4.1	<i>Análisis de varianza e inferencia estadística</i>	83
V. DISCUSION		84
5.1	Regulación en la región 5', comportamiento de los promotores del complejo hGH-hPL	85
5.1.1	<i>Regiones promotoras distales</i>	85
5.1.2	<i>Comportamiento de los promotores proximales en ambas líneas celulares.</i>	87
5.1.3	<i>Elementos represores activos en los promotores del complejo hGH-hPL</i>	88
5.2	<i>Respuesta a moduladores hormonales por las versiones promotoras largas</i>	91
5.3	<i>Respuesta de los promotores proximales a factores transcripcionales</i>	96
5.4	<i>Respuesta de los promotores proximales a potenciadores del locus</i>	99
5.5	<i>Análisis de las unidades transcripcionales de los genes hPL-1 y hGH-V</i>	102
5.6	<i>Análisis del efecto del intrón 1 en los niveles de transcripción de genes placentarios</i>	105
VI. CONCLUSIONES		108
VII PERSPECTIVAS		110
REFERENCIAS		111
ANEXOS		124
RESUMEN AUTOBIOGRAFICO		156

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura del complejo hGH-hPL	5
2. Alineamiento de regiones promotoras proximales	7
3. Moduladores en el locus hGH-hPL	11
4. Alineamiento del primer intrón de los genes del complejo hGH-hPL	12
5. Alineamiento de secuencias potenciadoras	14
6. Estrategia general para objetivos 1, 2, 3 y 4	19
7. Estrategia general para objetivos 5 y 6	20
8. Estrategia de análisis de las unidades transcripcionales de los genes hPL-1 y hGH-V	21
9. Obtención de los potenciadores del locus hGH-hPL	22
10. Construcción de vector intermediario para p β actinahGHN21K	37
11. Construcción y análisis del vector p β actinahGHN21K	38
12. Alineamiento de secuencias de los DNAs de hGH 20 K y hGH 20K δ Edr1	40
13. Estrategia general para obtener el competidor hGH 20K δ Edr1	41
14. Caracterización de recombinantes	52
15. Análisis de la potencia y especificidad de los promotores	53
16. Ubicación de elementos reguladores	55
17. Eficiencia de transfección y cuantificación de hGH en células JEG-3	56
18. Efecto de moduladores en los niveles de expresión en células JEG-3	57
19. Efecto de moduladores en los niveles de expresión en células GC	58
20. Efecto de factores transcripcionales en células JEG-3	60
21. Efecto de factores transcripcionales en células GC	61
22. Amplificación por PCR y clonación de los potenciadores hPL	63
23. Mapas de restricción de las secuencias potenciadoras de los genes hPL	64
24. Caracterización e identificación de los potenciadores clonados	65
25. Subclonación del potenciador hPL-3 en recombinantes con promotor proximal	66
26. Efecto de potenciadores sobre promotores proximales en células JEG-3	67
27. Efecto de potenciadores sobre promotores proximales en células GC	68
28. Mapas de restricción de quimeras de hPL-1, hGH-V/hGH-N	70
29. Caracterización de quimeras hPL1-hGHV/hGH-N con enzimas diagnósticas	71

30. Semi-cuantificación del efecto de unidades transcripcionales	72
31. Caracterización por PCR de pBShGHN21K	74
32. Construcción de p β actinahGHN21K	75
33. Caracterización de p β actinahGHN21K	76
34. Detección por RT-PCR de la expresión de p β actinahGHN21K en diferentes líneas celulares	77
35. Caracterización por PCR de pBShGH20K δ Edr1	78
36. Análisis del competidor para el sistema RT-PCR competitivo	79
37. RT-PCR cuantitativo de quimeras hPL-1, hGHV/hGHN	80
38. Cuantificación del número de átomos	80
39. Construcción de vectores para estudiar el efecto sinérgico promotor-primer intrón	82
40. Concentración de HGH obtenida con quimeras con de primer intrón	83
41. Efecto del primer intrón sobre el promotor de genes placentarios en JEG-3	83



UANL

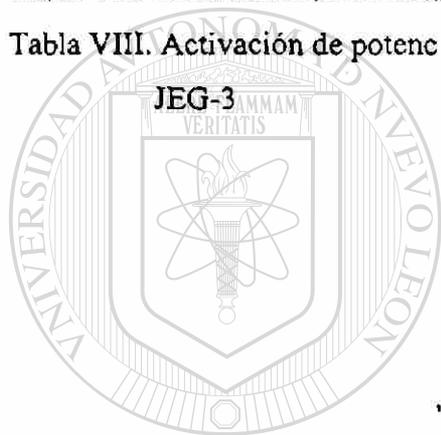
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I. Condiciones de digestión enzimática de promotores largos	27
Tabla II. Condiciones de digestión enzimática de promotores basales	28
Tabla III. Oligonucleótidos para amplificar los potenciadores hGH-hPL	30
Tabla IV. Niveles de HGH detectados en los ensayos con moduladores	58
Tabla V. Niveles de activación relativa por moduladores en JEG-3 y GC	59
Tabla VI. Concentración de HGH y veces de activación con factores transcripcionales en JEG-3	60
Tabla VII. Concentración de HGH obtenida por estímulo con factores transcripcionales en GC	62
Tabla VIII. Activación de potenciadores en los promotores del locus hGH-hPL en células	69



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

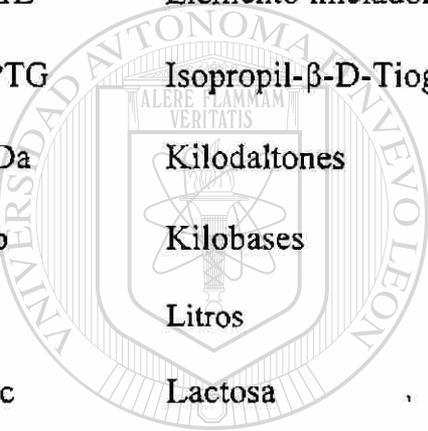


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Lista de abreviaturas

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

hCMV	Citomegalovirus humano
HGH	Hormona del crecimiento humano
HPL	Hormona lctogénica pacentaria humana
hGH-N	Gen de la hormona del crecimiento humano
hGH-V	Gen de la hormona variante del crecimiento humano
hPL	Gen de la hormona del lactógeno placentario humano
H ₂ O _{dd}	Agua bi-destilada
InrE	Elemento iniciador de la transcripción
IPTG	Isopropil- β -D-Tiogalactósido
kDa	Kilodaltones
kb	Kilobases
l	Litros
lac	Lactosa
LB	Medio de Luria Bertani
M	Molar
mg	Miligramos
min	minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
NEB	New England Biolabs
NF-1	Factor nuclear 1
ng	Nanogramos
nM	Nanomoles



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 Selección del sistema de estudio.

La expresión eficiente de genes requiere de múltiples pasos incluyendo transcripción, procesamiento del pre-RNA, transporte hacia el citoplasma y traducción (1). Las dos primeras etapas se llevan a cabo en el núcleo e involucran a complejos macromoleculares, los cuales han sido analizados en detalle por muchos años utilizando técnicas bioquímicas, genéticas, inmunológicas y moleculares, en ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* (2).

La selección de los modelos para el estudio de la transcripción debe ser cuidadosa y tratar de reproducir en lo posible las condiciones naturales. Entre otros se ha utilizado como modelo para este tipo de análisis, el embrión de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (3) el cual ha servido para establecer que muchos de esos procesos de regulación, se presentan también en otras especies.

En el humano muchas familias de genes han sido utilizadas para establecer las bases de los mecanismos transcripcionales, por ejemplo los estudios realizados con las hemoglobinas (4), inmunoglobulinas (5) y las hormonas del crecimiento (HGH) y lactógeno placentario (HPL) (6). Son varias las propiedades que hacen de esta última familia un buen modelo de estudio y han permitido caracterizarla desde muy variados enfoques, como el biomédico (7), evolutivo (8), biotecnológico (9) o en los aspectos básicos de su expresión (10).

1.2 El complejo multigénico hGH-hPL como modelo de regulación génica.

HGH es un miembro de la superfamilia de citocinas, que incluye interleucinas, factores de crecimiento, factor inhibidor de leucemia y factores neurotróficos (11). El gen GH se ha expandido mediante múltiples duplicaciones en los primates (12) y en el humano actualmente está localizado en un *locus* se constituye por cinco genes dos hGH y 3 hPLs arreglados de 5' a 3' hGH-N, hPL-1, hPL-2, hGH-V y hPL-3. Estos están incluidos en una región genómica de aproximadamente 50 kb entre las bandas q22-q23, del brazo largo del cromosoma 17 (13). Estos genes y parte de sus secuencias flanqueantes presentan más de 90% de similitud en secuencia

nucleotídica, sin embargo, a pesar de tan elevada similitud se expresan en tejidos diferentes (placenta y pituitaria) (12).

El primer gen del *locus*, el hGH-N se expresa mayormente en las células somatotrofas de la pituitaria anterior y el RNAm para esta hormona constituye aproximadamente el 3 % del RNAm total derivado de este linaje celular (18). En contraste, los otros cuatro genes del *locus* se expresan principalmente en la placenta y sus productos de transcripción representan en conjunto el 3.5% del RNAm placentario total (19). Los genes hPL-2 y hPL-3 a pesar de sus escasas diferencias nucleotídicas, acaban contribuyendo a una misma hormona madura, con peso molecular de 22 kD (20) mientras que el gen hGH-V dirige la síntesis de la hormona variante del crecimiento (21).

Diversos autores sugieren que los genes del complejo, solo presentan conformación de cromatina activa en aquellos tejidos en los cuales son expresados (hipófisis o placenta) (14,15), mientras otros sostienen que la expresión tisular específica es debida a la presencia y acción de factores transcripcionales exclusivos de tejido (16, 17).

Los niveles de transcripción de los cuatro genes placentarios (hPL-1, hPL-2, hGH-V y hPL-3) han sido determinados utilizando diferentes metodologías (22, 23, 24) encontrándonos que en general el orden de expresión es: hPL-2 > hPL-3 > hPL-1 > hGH-V. Tradicionalmente, se ha pensado que el papel fisiológico de HPL, producida en más de 1 g por día al término del embarazo y que representa el 5% de la producción proteica generada por la placenta, puede ser el control del crecimiento intrauterino, pues es antagonista de la insulina y esto provoca que los aminoácidos y los carbohidratos permanezcan mayor tiempo en circulación materna pudiendo ser captados más fácilmente por el feto (25).

Se han reportado casos con delección de los genes hPL, en donde la madre tuvo niveles basales o nulos de la hormona en la circulación y a pesar de ello, el embarazo llegó a término con un producto de talla y peso normal (26, 27, 28). Otro reporte describe un trastorno similar en la madre en donde el producto presentó bajo peso al nacer, aunque el cuadro clínico cursó también con ausencia del desarrollo de una arteria umbilical, por lo que no puede definirse si la falta de

HPL contribuyó al retraso de crecimiento observado (29). En resumen, hasta ahora no se tiene un consenso de la importancia de HPL durante el embarazo (30).

El gen lactógeno placentario 1 (hPL-1) que es el miembro del complejo con menor número de reportes de su actividad, no contribuye a la producción de HPL pero se sabe que su promotor basal es activo, al menos en ensayos *in vitro* (31). Se asume que su unidad transcripcional ha acumulado una serie de cambios nucleotídicos, principalmente una mutación en el sitio aceptor de splicing del segundo intrón, indispensable para el procesamiento del RNA inmaduro que lo imposibilita para generar una proteína activa, por lo que ha sido considerado un pseudogen (32). Más recientemente se han detectado diversos procesos de splicing alternativo, en los que predomina un transcrito carente del tercer exón y que conserva el marco de lectura para generar una proteína de tamaño molecular menor, pero se desconoce hasta el momento si en efecto se sintetiza y cual pudiera ser su actividad (23,33).

El gen hGH-V codifica para la hormona del crecimiento placentaria y fue detectada en este tejido por RT-PCR e inmunohistoquímica (34). La principal proteína codificada es de 22 KDa pero por procesos de splicing alternativo, se genera a partir del mismo RNA mensajero, una proteína de mayor peso molecular que se ancla en la membrana de las vellosidades placentarias y de la que se desconoce su función (35). La HGHV recombinante producida en bacterias tiene capacidad lactotrófica en cultivo de células NB2 y en ratas, lo que hace pensar que también tiene un papel importante en el crecimiento fetal (36), aunque su producción es mil veces más baja que la de HPL (12).

1.3 Regulación de la transcripción en el complejo hGH-hPL.

Los elementos de la transcripción basal, efectores y/o represores con actividad en este grupo de genes son muy variados y se han localizado en la región 5', en la región 3' y dentro de la unidad transcripcional. Como ya se mencionó, los genes hGH-hPL presentan elevada similitud tanto en sus secuencias codificantes como en sus regiones 5' y 3' proximales, pero ésta disminuye conforme se avanza hacia las regiones flanqueantes de los genes (12), hasta alcanzar los genes ubicados río arriba del locus de la hormona del crecimiento, un canal de sodio de

músculo estriado (SCN4A) y un receptor perteneciente al complejo de inmunoglobulinas de linfocitos (CD79D) (ver figura 1) donde se localizan diversas regiones de respuesta a Pit-1 (LCR) que efectan la conformación de cromatina e influyen en los niveles de expresión y especificidad tisular de los genes del locus (37).

En general, puede decirse que la transcripción de los genes del locus puede ser regulada en tres niveles: 1) Control de la transcripción basal, 2) Control de la especificidad tisular y 3) Control hormonal o potenciación (38). Estos puntos se describirán en las siguientes secciones.

1.4 Control de la estructura de la cromatina del complejo hGH-hPL.

La estructura cromatinica que parece funcionar en el nivel primario de regulación de la transcripción, esta íntimamente relacionada con elementos ubicados a decenas de kilobases del gen que regulan; tales elementos son denominados Regiones Controladoras de Locus, a las cuales nos referiremos como LCR por sus siglas en inglés. El papel de estos elementos, es estructurar dominios de DNA que sean competentes transcripcionalmente, modificando la conformación de la cromatina y confiriéndoles o no a las regiones reguladoras, la capacidad de interactuar apropiadamente con factores trans (38).

Se conoce que el LCR del locus hGH-hPL, se ubica en una región situada aproximadamente 55 kb antes del sitio de inicio de la transcripción del gen hGH-N (39) y está constituido por regiones hipersensibles a la enzima DNasa (HS) con respuesta a Pit-1 (40). Algunos grupos de investigación han aportado datos de la localización y especificidad de tales regiones por ensayos de transfección transitoria y en un modelo de ratón transgénico (41, 42). La figura 1 muestra la ubicación aproximada de las secuencias HS en el LCR del locus, ubicadas en genes situados río arriba del promotor de hGH-N, algunas de ellas tienen especificidad tisular en pituitaria otras en placenta de éstas últimas, unas se ubican en el primer intrón de hGH-N y hGH-V otras, en las secuencias potenciadoras de los genes hPL. El efecto combinado de las regiones del LCR y la acción de factores transcripcionales (potenciadores o represores) sobre cada una de las regiones génicas de respuesta, conduce a un comportamiento único para cada gen del locus (43).

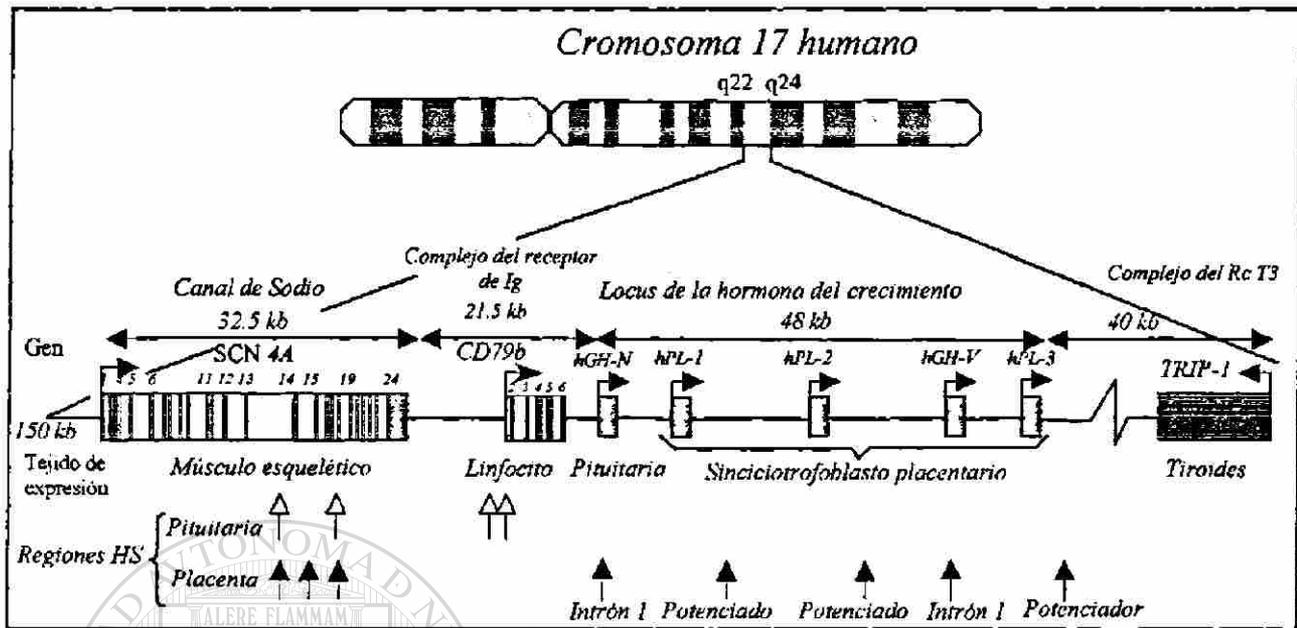


Figura 1. Estructura del complejo hGH-hPL. En la presente figura se esquematiza la localización cromosómica, elementos estructurales y genes vecinos del locus de hGH. Las flechas verticales en blanco indican regiones situadas fuera del locus ubicadas varias kb río arriba del gen hGH-N, representan las regiones hipersensibles a DNasa I (HS) que forman parte del elemento controlador del locus hGH-hPL (LCR) y son específicas de pituitaria, mientras otras en negro, se localizan en la unidad transcripcional (segundo intrón de los genes hGH-N ó hGH-V) o en potenciadores del locus y tienen actividad específica en placenta.

Se han usado diversas estrategias para determinar que otros elementos más cercanos al sitio de inicio de la transcripción pudieran estar implicados en la regulación tejido específica o en la tasa transcripcional de estos genes, tales elementos serán descritos a continuación.

1.5 Factores *trans* y moduladores con actividad en el locus.

Una vez obtenida una conformación cromatinica abierta y accesible, generada por las secuencias LCR, la matriz nuclear y seguramente enzimas y complejos remodeladores de la cromatina (43), las regiones reguladoras en esta porción de eucromatina, se vuelven sensibles a la acción de efectores o represores (segundo nivel de regulación), esto permite a la maquinaria basal de transcripción interactuar con otras proteínas codificadas en otras regiones cromosómicas (factores *trans*) y que actúan en los genes del complejo, participando en la regulación de la tasa transcripcional y la especificidad tisular.

La regulación del gen GH aparentemente se ha mantenido evolutivamente sin muchos cambios en mamíferos (44), específicamente en especies como rumiantes (45), rata (46) ó humano

(47); donde frecuentemente los estudios se centran en la acción de factores de transcripción en una porción relativamente pequeña que comprende aproximadamente 500 pb antes del sitio de inicio de la transcripción, en la cual se han descrito muchas de las secuencias con efecto positivo o negativo en la especificidad tisular o en los niveles de transcripción (48). Estos primeros elementos de DNA, sirvieron de modelo para localizar otros similares en las regiones distales del promotor, en algunos de los genes del complejo.

La maquinaria basal que reconoce las secuencias de transcripción en las regiones proximales del promotor, involucra la participación de diversos elementos generales del inicio de la transcripción, conformado por un complejo de preiniciación (RNA polimerasa II en conjunto con sus factores generales de transcripción TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE y TFIIH) y un elemento iniciador frecuentemente asociado con el sitio de inicio de la transcripción (49,50). El conjunto completo es usualmente suficiente para dirigir los niveles basales de la transcripción, pero es incapaz de reproducir la transcripción específica tisular de un gen y para lograrlo se necesita que el complejo interactúe con otros factores transcripcionales adicionales que confieran selectividad. Con base en lo anterior, se menciona que existen tres principales grupos de factores de transcripción (51):

- a) Factores basales de transcripción que entran en conjunto con la RNA pol II, formando un complejo y que determinan el punto de inicio de la transcripción.
- b) Factores potenciadores, presentes en la mayoría de las células eucariotes (ubícuos) que incrementan los niveles de la tasa de transcripción basal (ejemplo Sp1 y AP2). En esta misma clasificación están los expresados en un tipo celular exclusivo, denominados factores específicos de tejido (Pit-1 o PLA1).
- c) Factores inducibles, son capaces de regular los niveles de transcripción y responden a señales extra e intracelulares como hormonas o segundos mensajeros.

Una gran variedad de factores *trans* se sabe que interactúan en los promotores basales hGH-hPL, algunos de los sitios de unión de éstos se presentan en la figura 2, que ejemplifica el alineamiento de las regiones promotoras proximales (496 pb) de los genes del complejo.

La expresión de los genes del complejo, esta regulada en su promotor por varios factores de transcripción que incluyen las proteínas de unión a la caja TATA, el factor transcripcional ubicuo Sp1 (52), el factor estimulador río arriba o USF por sus siglas en inglés (53), el factor Zn-15 (54), el factor nuclear 1 (NF-1) (55) y la interacción con el factor pituitario Pit-1 (56) y el placentario PLA-1 (57) entre otros, esquematizados en la figura 2. Todos estos elementos no podrian dirigir la expresión génica sin la acción del elemento iniciador que determina el sitio donde inicia correctamente la transcripción, ya descrito para los genes hPL y cuya secuencia nucleotídica de unión, está ubicada justo antes del sitio de inicio de la transcripción (58).



Figura 2. Alineamiento de regiones promotoras proximales. Se presenta el alineamiento de la región promotora proximal (496 pb) de cada gen del complejo hGH-hPL, así como la ubicación de diferentes elementos de regulación basal y sitios de unión a activadores o represores descritos para los promotores y con efecto conocido sobre la transcripción, de las respectivas unidades transcripcionales.

Muchos de estos elementos conforman el nivel b) de transcripción mencionado en la clasificación de la página anterior y en la siguiente sección, se describirá la acción de algunos elementos activadores o represores, con expresión ubicua o específica de tejido, que se han caracterizado en las regiones proximales o distales de los promotores del complejo.

1.6 Factor transcripcional Sp1.

El factor de transcripción Sp1 es una proteína presente en todas las células de mamífero e interactúa con el DNA a través de cajas GC (GGGCGG) contenidas principalmente en los promotores, provocando la activación de la síntesis de RNA_m (52). El DNAc de esta proteína fue aislado por Kadonaga y Tjian en 1987, quienes caracterizaron la estructura del dominio de unión al DNA y determinaron que su capacidad estimuladora está conferida dentro de la posición aminoacídica 168 a 686. Esta región se encuentra constituida por tres motivos dedos de Zn contiguos asociados a cisteína (Cys₂,His₂-dedo de Zn), los que le permiten la capacidad de unión al DNA (59).

Cuando se estudió la capacidad del promotor hPL-3 para ser transactivado por Sp1, se detectó que este factor es indispensable para potenciar la transcripción del gen en células de placenta JEG-3, vía el potenciador de hPL-3, pues la delección del sitio de interacción con el factor (posición -129 a -112) acortando la longitud del promotor, redujo hasta ocho veces su actividad basal (60). Otros ensayos con el promotor de hPL-2, en donde se sustituyeron dos de las 6 bases que constituye la secuencia variante del sitio de unión a Sp1: GGGAGG (-137 a -131), usando mutagénesis sitio dirigida demostraron una disminución de la expresión del gen reportero hasta en un 50% con relación al promotor sin mutación (61), lo que evidencia su importancia en la regulación del promotor de los genes hPL activos en el locus, aunque se desconoce su participación en los promotores de hGH-N, hGH-V y hPL-1.

1.7 Control específico de tejido.

El factor de pituitaria 1 (Pit-1) también llamado factor 1 de hormona del crecimiento (GHF-1), es una proteína de expresión específica en la pituitaria (16,17). El gen Pit-1 posee una porción nucleotídica que codifica para un homeodominio con un papel crítico en la expresión específica de tipo celular del gen de hGH-N y desarrollo de la pituitaria (62). La interacción de Pit-1 en el promotor hGH-N se da en dos sitios (proximal y distal) (16,17), así como en los promotores de Prolactina (hPrl) y Triyodotironina (T3) (63). Se había considerado hasta hace poco que el único lugar de expresión de Pit-1 era en la pituitaria, pero más recientemente se le localizó en otros tejidos como placenta (64). Igualmente se han detectado diferentes niveles de los

transcritos de hGH-N y de los otros genes del complejo (hPL-2, hPL-3 y hGH-V) en testículos (65) u ovarios (66). Pit-1 es expresado en hipófisis desde muy tempranas etapas en el desarrollo (67), se sabe que interviene muy importantemente en la proliferación, diferenciación y especialización de las células somatotrofas, lactotrofas y tirotrofas de la glándula pituitaria en su porción anterior (68).

Aunque Pit-1 ha sido localizado en la placenta humana en muy bajos niveles (69), aún no es claro el efecto que tiene sobre los demás genes del complejo, por lo que algunos ensayos para estudiar este punto se han realizado en la línea celular GC (derivada de células somatotrofas de la pituitaria anterior de rata) que expresa el Pit-1 de rata. Los estudios por transfección de recombinantes con el promotor proximal de hGH-N, hPL-2 y hGH-V fusionados al gen reportero CAT y ensayos de proteínas unidas a DNA analizadas por retardo en gel, muestran que: 1) Pit-1 de rata puede unirse eficientemente a los sitios proximal y distal en los promotores de los genes hGH-N y hPL-2, pero no puede unirse al sitio proximal en el promotor de hGH-V, 2). Los niveles de expresión del gen reportero CAT demostraron que los promotores basales placentarios son activos en pituitaria y que el de hPL-2, tuvo mayor fuerza para estimular la transcripción que hGH-V e incluso que hGH-N (70). Estos experimentos sugirieron que otros mecanismos de regulación funcionando en regiones diferentes al promotor proximal, dirigen la especificidad tisular de estos genes en placenta y que pequeñas diferencias de secuencias en el promotor, los hacen responder en forma diferente a los factores de acción *trans*.

Se mencionó anteriormente que la similitud de los genes es menor al alejarse de las unidades transcripcionales o reguladoras proximales, acentuándose las diferencias en el promotor distal, en donde se localizaron secuencias presentes exclusivamente en los genes de expresión en placenta denominadas secuencia P ubicadas entre 1.7 y 2.1 kb antes del sitio de inicio de la transcripción (hPL-1:10290-10365, hPL-2: 25009-25085, hGH-V: 39780-39856 y hPL-3: 47529-47605, según la secuencia reportada por Chen y cols.) (12). Para analizar la especificidad tisular de la región, a los recombinantes con promotor proximal de hPL-2, hGH-V y hGH-N descritos en el párrafo anterior, se les fusionó la secuencia P del gen hGH-V (260 pb) y se ensayaron por transfección en células GC y JEG-3 (placenta humana), demostrándose un efecto inhibitor de la transcripción sólo en células de pituitaria con los recombinantes que tenían

el elemento P (71). Se ha propuesto entonces, que las regiones homólogas en el promotor distal de hPL-1, hPL-2 y hPL-3, tendrían un comportamiento similar, mientras que la posible presencia de una región opuesta a la secuencia P en hGH-N, combinado con los bajos niveles en placenta de Pit-1, generan la falta de expresión de HGH en este tejido. Otros reguladores en el promotor distal, en la unidad transcripcional o en la región 3,² permiten la descripción del tercer nivel de regulación: El control hormonal.

1.8 Control hormonal.

Las proteínas codificadas por los genes del complejo hGH-hPL y secretadas por la placenta, presentan un incremento diferencial en los niveles de sangre materna durante las diferentes etapas gestacionales. En un estudio de diversas placentas en edad gestacional de 8 a 39 semanas, se encontró un incremento de 10 veces en la cantidad de RNAm del gen hPL-3 y de hasta 30 veces en la cantidad de RNAm del gen hPL-2, aumentando la capacidad de síntesis por la placenta principalmente durante los periodos intermedio y final del embarazo (23).

La HGH-V (placentaria) presenta un comportamiento similar al observado para HPL en sus niveles de aparición durante el embarazo, aunque con concentraciones menores y aún así, hacia el final del período gestacional llega a sustituir casi completamente a la HGH producida por la pituitaria materna, cuyos niveles se ven disminuidos hasta en 70% al final del mismo (25). Estos datos sugirieron que los cambios hormonales y el acondicionamiento fisiológico en la madre durante este proceso de desarrollo, pueden influir en el control transcripcional de los genes del complejo, tanto en la placenta como en la pituitaria (72,73).

Un gran número de metabolitos, hormonas y otras sustancias del tipo de segundos mensajeros, se han examinado para dilucidar su papel en la regulación de la concentración de HPL, HGH placentaria o HGH hipofisiaria en sangre o en cultivos celulares. Se ha encontrado que pequeños cambios en las secuencias nucleotídicas de respuesta a tales elementos, puede alterar la transcripción de uno u otro gen del complejo (74).

Se han identificado varios efectores en los promotores del locus con importante influencia en la activación de la expresión. Dichos elementos tienen primero que unirse a sus respectivos receptores en las membranas celulares o nuclear y después, ser transportados al interior del núcleo hasta encontrar las secuencias nucleotídicas blanco en el DNA. Tales activadores pueden ser hormonales como tri-yodotironina (T3) (75) o ácido retinoico (AR) (76), elementos de respuesta a CREB que actúan mediante la proteína CBP y son dependientes de señales vía AMPc (77), citoquinas como IL6 (78) o vitaminas (79,80). En la figura 3, se resume la ubicación de algunos moduladores descritos en el promotor o unidad transcripcional de los genes del locus.

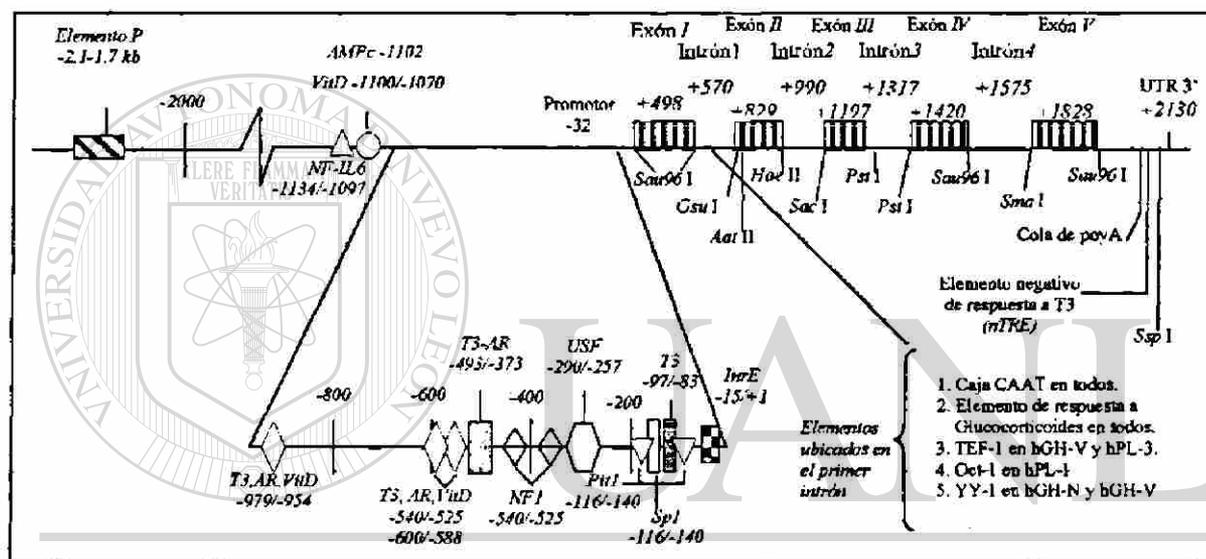


Figura 3. Moduladores en el locus hGH-hPL. La figura representa la estructura de un gen típico del locus hGH-hPL y la ubicación aproximada de algunos de los elementos basales de transcripción y de respuesta a moduladores hormonales, inhibidores o factores transcripcionales en la región promotora.

Muchas de las diferencias nucleotídicas en los genes de la familia pueden estar ubicadas en las regiones de unión a los co-activadores de la transcripción en el promotor proximal, otros a veces muy alejadas a cientos de pb en el promotor distal e incluso otras, dentro de la propia unidad transcripcional, como en hGH-N en cuyo primer intrón tiene una secuencia de respuesta a glucocorticoides (+86 a +115, 5'-TGTCCT-3') influyendo en sus niveles de expresión en la pituitaria (81). Este elemento está conservado en los demás genes placentarios pero se desconoce si tiene efecto en sus niveles de transcripción (figura 4).

Los moduladores no solo regulan el promotor proximal sino también sitios alternativos de inicio de la transcripción ubicados río arriba del sitio cap en el promotor de hGH-N (82), hPLs (83) y GH de rata (84) o en la segunda mitad del primer intrón de hGH-N (85). Este último es influenciado específicamente por el elemento de unión a glucocorticoides (figura 4), sin embargo a la fecha se desconoce la función de dichos promotores alternativos.

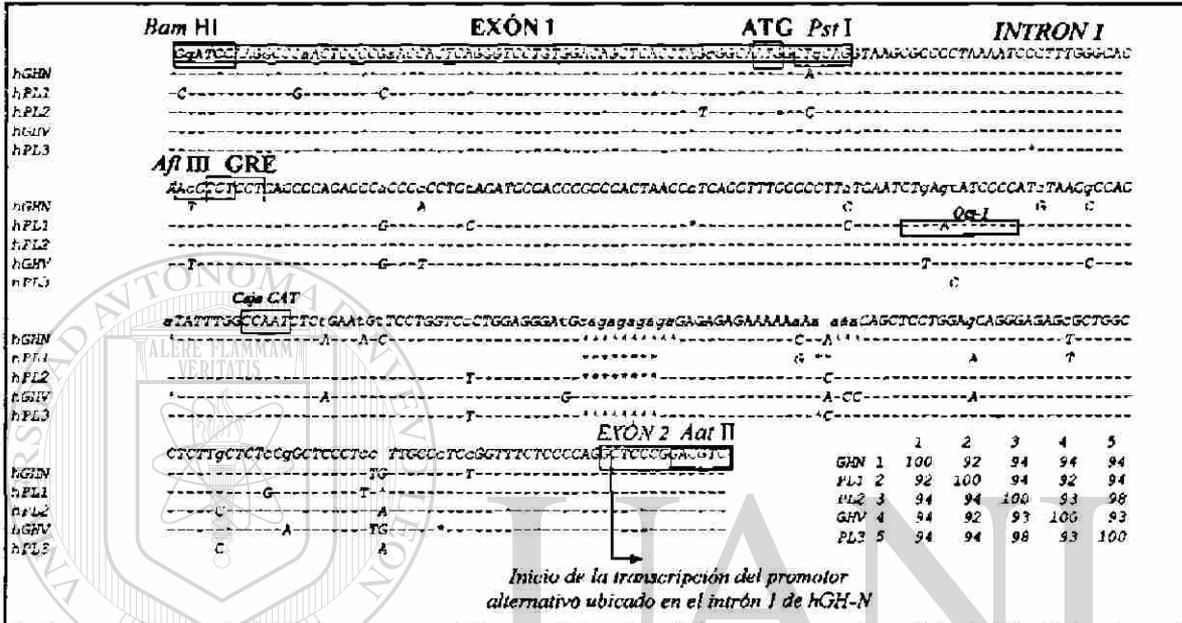


Figura 4 Alineamiento del primer intrón de los genes del complejo hGH-hPL. Las unidades transcripcionales después del inicio de la transcripción, fueron alineadas para identificar regiones de interés en esta zona: Exón I el sitio de inicio de la traducción (ATG), Intrón 1: la secuencia de respuesta a glucocorticoides (GRE) conservada en todos los genes, la caja CAT como elemento de unión a factores basales de la transcripción y genera el sitio alternativo de la transcripción, Oct-1 en hPL-1.

Estos argumentos apoyan la idea de que los moduladores pueden afectar otras regiones además del promotor y provocar un efecto importante en los diferentes niveles de transcripción del complejo en placenta e incluso, estar relacionados con la expresión específica de tejido.

1.9 Secuencias potenciadoras en el extremo 3' de los genes hPL.

Diversos mecanismos de regulación de la transcripción o de remoción de intrones, requieren elementos especiales de DNA denominados secuencias potenciadoras o "enhancer". Los potenciadores pueden funcionar a distancias considerables río arriba del promotor en el que actúan o estar localizados dentro de la unidad transcripcional o en la región 3', son activos independientemente de la orientación con respecto al promotor y tienen similitud con regiones virales ya reportadas (86).

En el *locus* hGH-hPL, solo un potenciador con actividad comprobada se ubicó 2.2 kb hacia el extremo 3' del gen hPL-3 (87). Esta región no tiene actividad en células derivadas de pituitaria GH-3 (88) o de cáncer cervicouterino humano (HeLa) (89) y es activo con promotores heterólogos en células de riñón de mono verde africano (COS 1), debido a la alta similitud con otros potenciadores virales ya descritos como el del virus de simio 40 (SV40) (90), pero aún así, su efecto se restringe principalmente a células derivadas de placenta (JEG-3 o BeWo) y por eso se piensa que tiene participación en la regulación específica de tejido de los genes hPLs (91).

El potenciador está en una porción genómica de 300 pb, aunque ahora se sabe que el centro de su actividad se restringe a un segmento de 138 pb, conformado por 4 sitios (DF-1, DF-2, DF-3 y DF-4) con unión a proteínas ubicuas y específicas de tejido (91). En el *locus* hay otras dos regiones similares en secuencia y ubicación en hPL-1 y hPL-2, pero no presentan actividad potenciadora debido al acúmulo de mutaciones en el elemento DF-3 (91). Los estudios anteriores determinan que los elementos DF-3 y DF-4 son las dos principales regiones estimuladoras de la transcripción en el potenciador de hPL-3, pues al intercambiarlas por las regiones correspondientes del potenciador de hPL-2, por un lado se inactivó el efecto estimulador de hPL-3 y por el otro lado, se recuperó el 98 % del efecto de hPL-2. Este mismo reporte ubica una región que denominaron AF-1 entre DF-3 y DF-4 la cual, participa también de la fuerza de potenciación (92). Lo anterior hace pensar que las mínimas diferencias en secuencia entre los potenciadores, pueden ser la razón de la inactividad de los potenciadores de hPL-1 y hPL-2 (93).

Al alinear la secuencias de los potenciadores del *locus* en la figura 5, se resaltan cambios importantes entre hPL-2 y hPL-3: un cambio en el sitio de interacción con el proto-oncogen ETS-1 (cambio de A [hPL-3] por G [hPL-2]), otro a un nucleótido de distancia del motivo de unión a TEF-1 (A en hPL-3 por T en hPL-2); ambos cambios presentes en el elemento DF-3, otros dos cambios en la región AF-1 (TC [hPL-3] por CG [hPL1 y 2]). Se ha sugerido que dichos cambios son los responsables de la inactividad del potenciador de hPL-2 (92). Estas mutaciones en la región DF-3 son homólogas en el potenciador de hPL-1 el cual presenta una extra ubicada a un nucleótido del sitio de acción a TEF-1 en el DF-4 (A [hPL-3 y 2] por C [hPL-1]), haciendo suponer que el potenciador del hPL-1 tiene un comportamiento similar o de menor actividad que el de hPL-2, sin embargo, estas cuestiones aún no han sido investigadas.

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

Los ensayos de actividad con promotores de hPL en pituitaria, la diferente interacción que tienen con Pit-1 y la capacidad del potenciador hPL-3 para activar específicamente en placenta, hacen suponer que los promotores del locus pueden tener un efecto sinérgico con los potenciadores para provocar efectos diferentes en la activación de la transcripción de cada gen en placenta. Por esto, se considera interesante realizar estudios donde se investigue la capacidad de los potenciadores para activar a cada uno de los promotores naturales del locus, en diferentes tipos celulares.

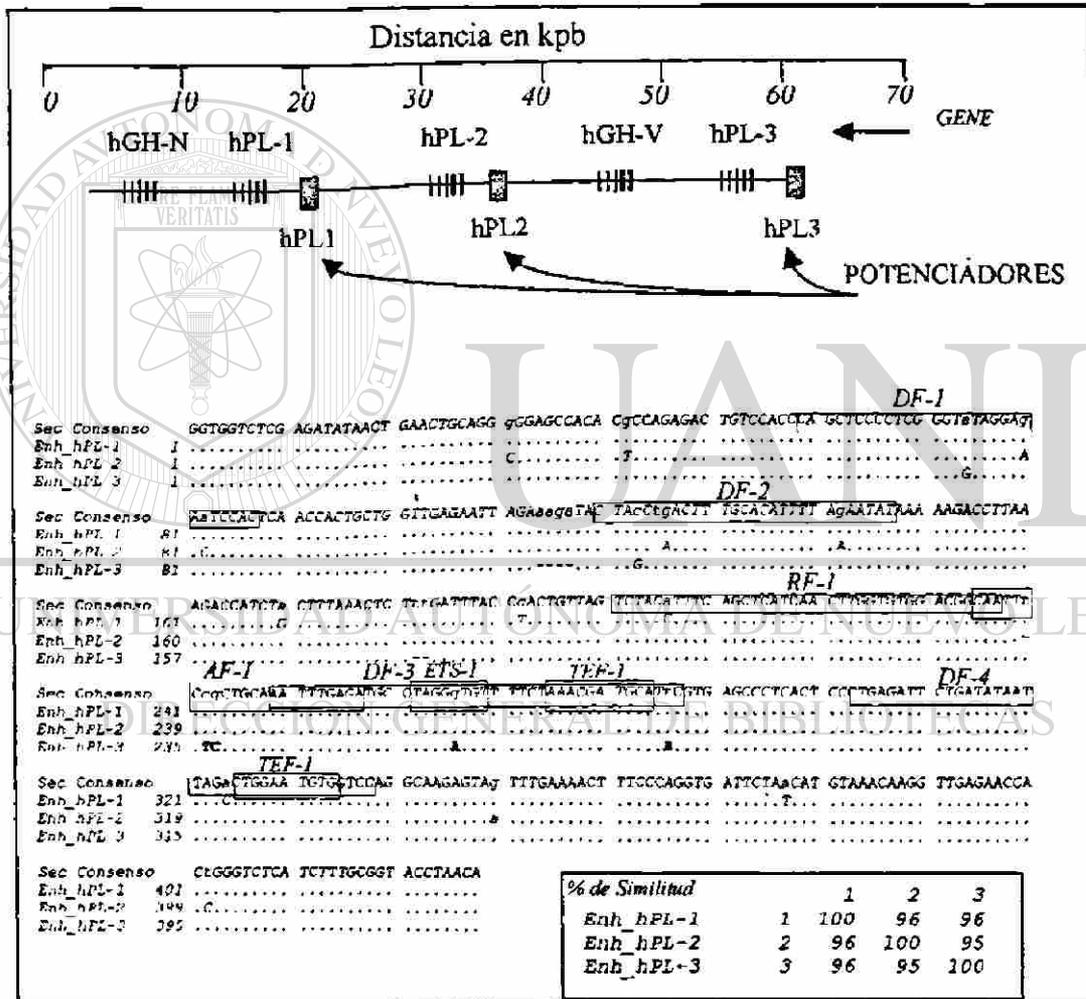
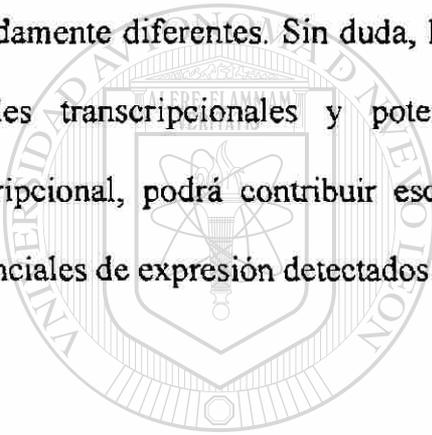


Figura 5. Alineamiento de secuencias potenciadoras. Secuencia nucleotídica de los diversos potenciadores del locus hGH-hPL, que presentan cerca de un 95% de similitud. Los diferentes elementos que identifican a esta región están encerrados en cuadros, los cuales presentan unión a proteínas específicas activadoras de la transcripción. Se presume que las mutaciones en los nucleótidos de adenina (unión a ETS y TEF-1) de la región DF-3 así como de timina o de citosina de AF-1, en los potenciadores de hPL-1 y hPL-2, provocan su inactivación.

El conjunto de todas las características mencionadas hasta ahora, nos hace considerar al complejo multigénico hGH-hPL como un excelente sistema para estudiar tanto los mecanismos que rigen la expresión específica de tejido, como los factores que determinan el nivel de esa expresión y responsables, de que genes tan parecidos, presenten patrones de expresión marcadamente diferentes. Sin duda, la combinación de estudiar la participación de promotores, unidades transcripcionales y potenciadores de los genes del locus en la regulación transcripcional, podrá contribuir esclarecer el comportamiento en la pituitaria y los niveles diferenciales de expresión detectados en placenta, lo cual fue el propósito del presente trabajo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.1 Justificación.

Existe escasa evidencia de ensayos comparativos de los genes del complejo en el estudio del efecto a moduladores o factores transcripcionales bajo las mismas condiciones experimentales. Un ensayo que estudie las tres regiones reguladoras de los genes del complejo (región promotora, unidad transcripcional y región 3'), aportaría evidencia valiosa acerca del comportamiento y respuesta de cada uno de los genes a los mismos estímulos en diferentes tipos celulares, lo que permitiría contrastar los resultados contra los observados normalmente en placenta.

2.2 Objetivo General.

Investigar la regulación de la familia multigénica hGH-hPL mediada por hormonas y factores transcripcionales.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.3 Objetivos particulares.

Para estudiar las diversas regiones de interés involucradas en la regulación de la transcripción este trabajo, se dividió en etapas según la región génica del locus a estudiar.

I. *Analizar el efecto de la región promotora en los niveles de transcripción de la familia génica hGH-hPL.*

- 1.- Construir una serie de recombinantes con deleciones de diferentes tamaños en los promotores de los miembros de la familia empleando al gen hGH-N como gen reportero.
- 2.- Medir los niveles de expresión de los diversos recombinantes en líneas de cultivo celular derivadas de placenta, hipófisis y de otros tejidos diferentes a los anteriores.
- 3.- Ensayar el efecto de la hormona T3 y los metabolitos AMPc, ácido retinoico y éster de forbol sobre las versiones largas de los promotores en los recombinantes construidos utilizando cultivos celulares.
- 4.- Co-transfectar las versiones promotoras de 496 pb en presencia de vectores codificantes de factores transcripcionales humanos (Pit-1, Sp1 y PLA-1) y cuantificar los niveles de expresión del gen reportero.

II. *Estudiar las causas de la inactividad del gen hPL-I.*

- 5.- Construir un recombinante conteniendo la primer mitad (exón 1 y 2) del gen hPL-1 fusionada a la segunda mitad del gen hGH-N (exones 3, 4 y 5) regulado por el promotor del gen hPL-1 (y su recíproco).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

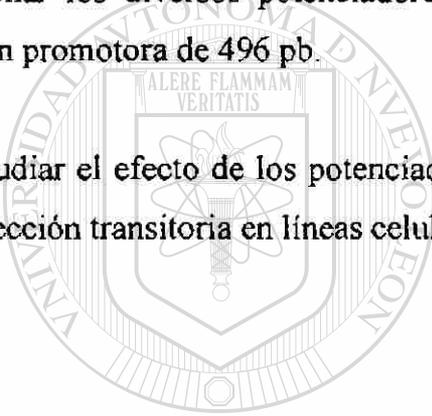
III. Estudiar las causas de la baja expresión del gen hGH-V.

6. Construir un recombinante conteniendo la primer mitad (exón 1 y 2) del gen hGH-V fusionada a la segunda mitad del gen hGH-N (exones 3, 4 y 5) regulado por el promotor del gen hGH-V (y su recíproco).

IV. Evaluar el efecto de los tres potenciadores presentes en el locus sobre los cinco promotores proximales del complejo hGH-hPL.

7. Clonar los diversos potenciadores del locus e introducirlos en los recombinantes con la versión promotora de 496 pb.

8. Estudiar el efecto de los potenciadores en la expresión de los recombinantes por ensayos de transfección transitoria en líneas celulares de placenta, hipófisis y fibroblastos.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.4 Estrategia General.

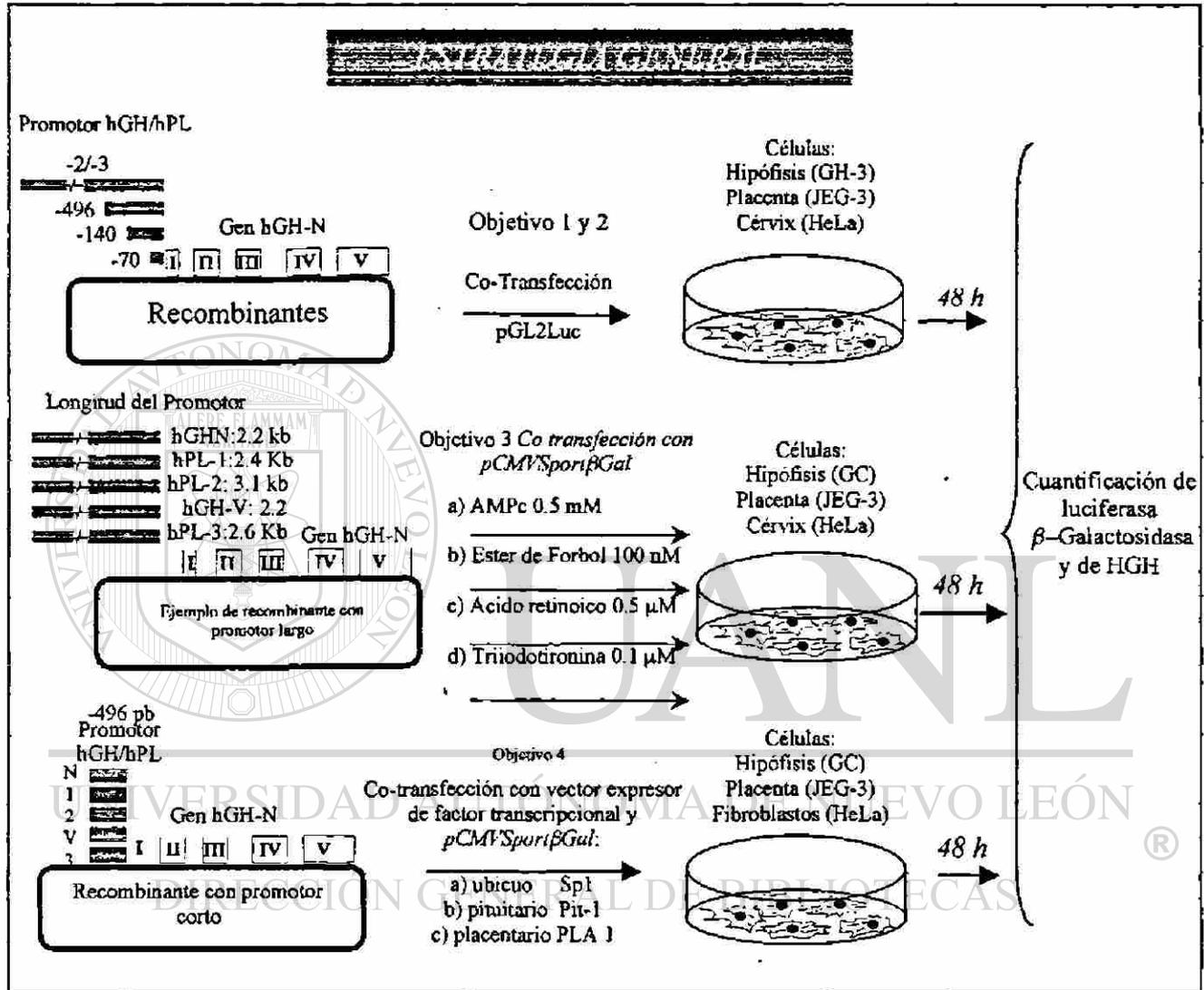


Figura 6. Estrategia general para objetivos 1, 2, 3 y 4. Para estudiar el efecto de la región 5' en la regulación de los genes del complejo, se construyeron diversos recombinantes con diferencias en la longitud de su secuencia promotora con tamaños entre 2-3 kb hasta 70 pb antes del sitio de inicio de la transcripción. Después de purificarlos por gradiente en CsCl, fueron ensayados por co-transfección con pGL2Luc o pCMVSPORTβGal en cultivo de líneas celulares derivadas de pituitaria de rata, de placenta humana y de cáncer cervicouterino humano. El gen codificante de la enzima luciferasa, se usó para evaluar y normalizar la eficiencia en la captación del DNA por las diferentes líneas celulares en el objetivo 1 y β-galactosidasa para los subsecuentes ensayos.

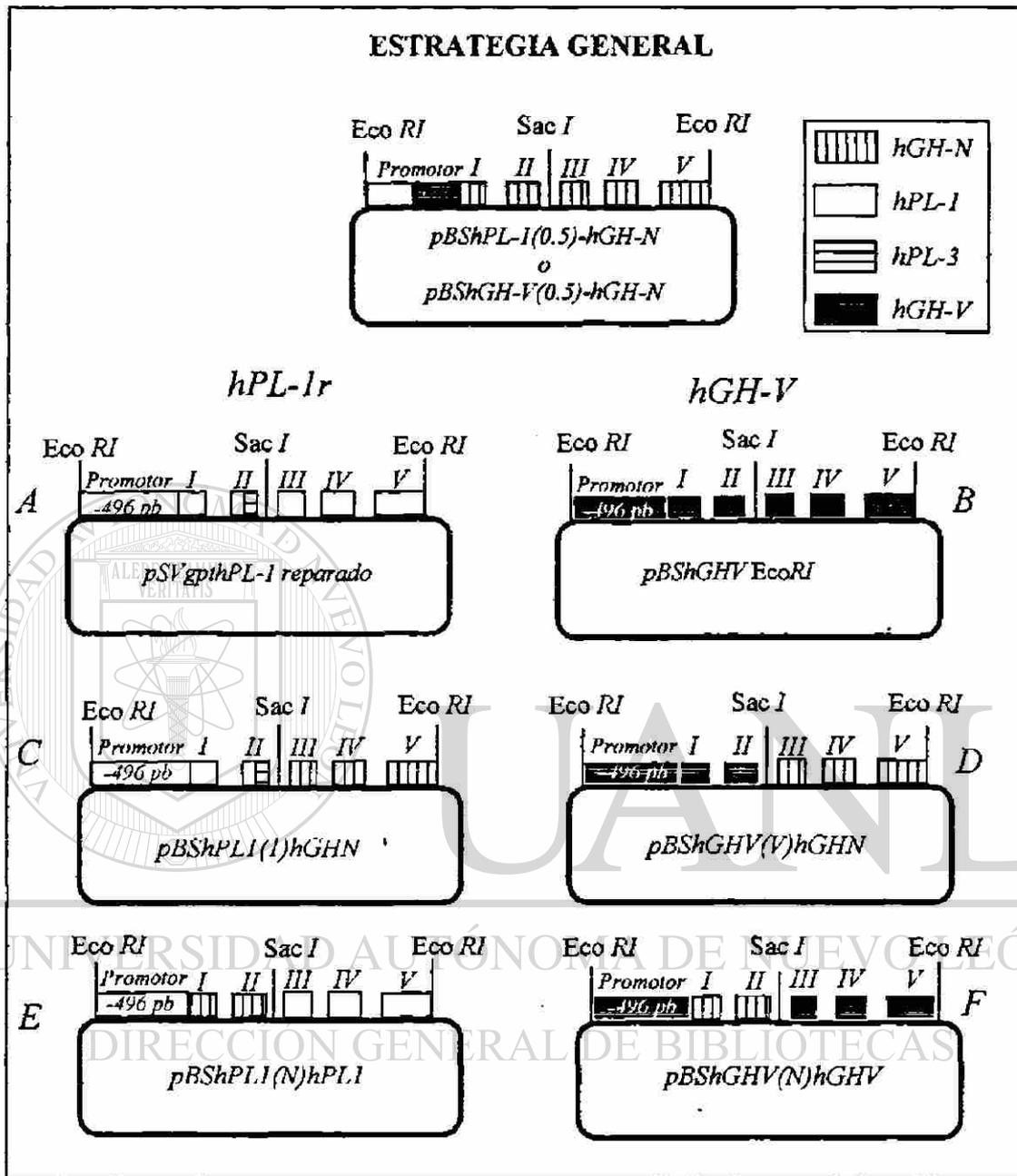


Figura 7 Estrategia general para objetivos 5 y 6. En un primer paso, los plásmidos con la unidad transcripcional de hPL-1 y hGH-V con su promotor nativo de 496 pb se digirieron con las enzimas Eco RI y Sac I, la digestión liberó dos fragmentos de interés: Uno conteniendo desde promotor a la mitad del segundo intrón y el otro, de la mitad del segundo intrón hasta el quinto exón de cada gen. En un segundo paso, se utilizaron los recombinantes con el promotor 0.5 kb de estos genes fusionados al gen hGHN y usando las mismas enzimas, se liberaron los fragmentos con promotor basal y primera o segunda mitad del gen hGH-N. Los fragmentos purificados se ligaron en diferentes combinaciones como se muestra en la figura, en el vector pBlueScript para generar los recombinantes de interés (C, D, E y F). El número o letra entre paréntesis, indica la longitud del promotor o la porción del gen ubicado en la primera mitad del recombinante en cuestión, respectivamente.

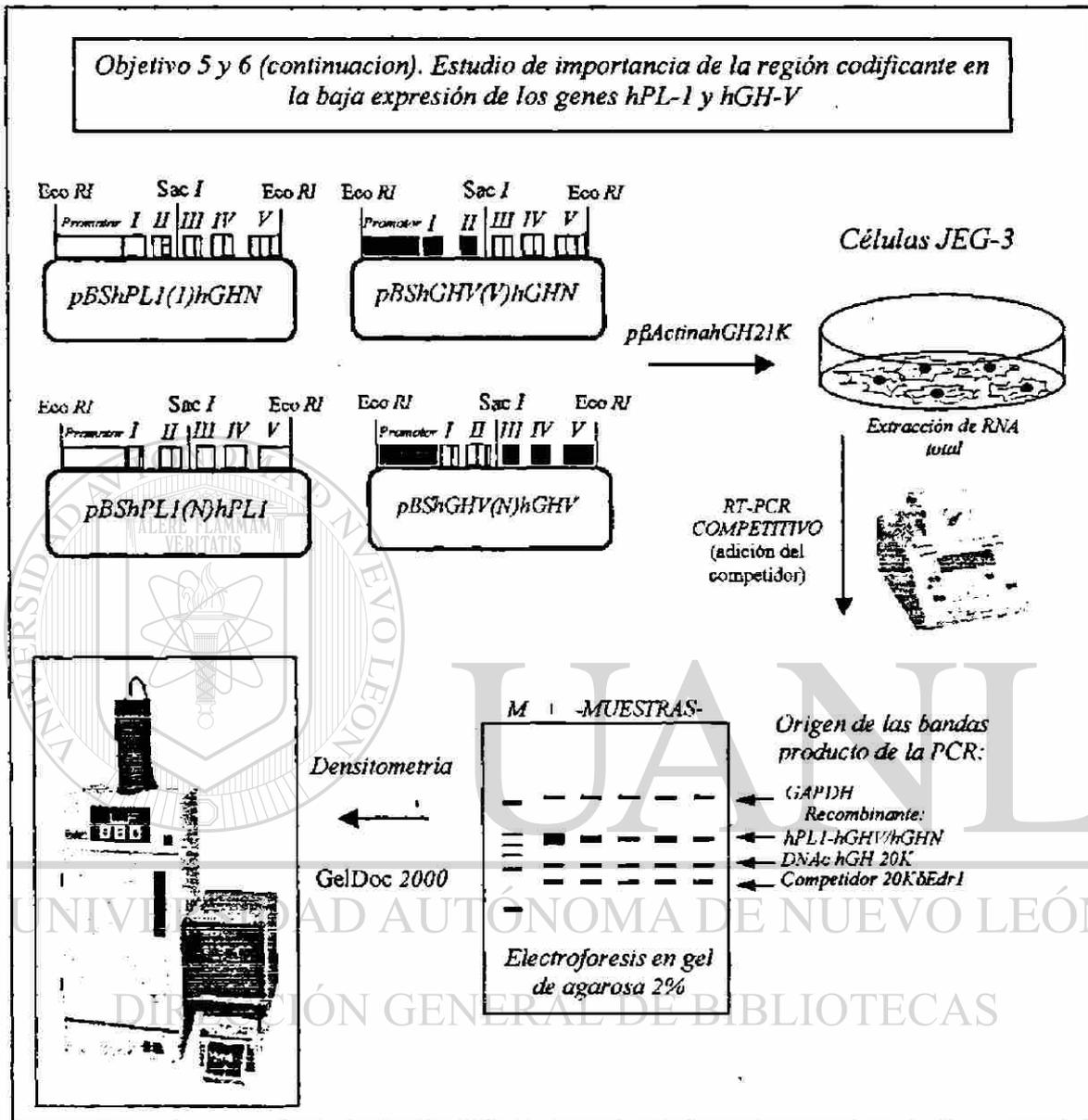


Figura 8. Estrategia de análisis de las unidades transcripcionales de los genes hPL-1 y hGHV. Una vez obtenidos los plásmidos híbridos portadores de las unidades transcripcionales de los genes hPL-1 y hGH-V, se purificaron por gradiente en CsCl y fueron co-transfectados en JEG-3, con un vector que expresa la variante hGH 20K regulado por el promotor de β -actina humano usado para determinar eficiencia de transfección. El análisis de la expresión se hizo por RT-PCR cuantitativo utilizando un competidor plasmídico derivado del DNAc hGH 20K (pBShGH20K δ E δ r1). Para normalizar la cantidad de RNA utilizada en la reacción, se amplificó también el DNAc de GAPDH. Después de separar los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa largo al 2%, se procedió a cuantificar los productos de PCR por densitometría, relacionando la intensidad de transmitancia de la banda correspondiente al competidor con la de las bandas de PCR derivadas de las quimeras, con el fotodocumentador GelDoc 2000 (BioRad) y un marcador de masa como referencia (Gibco-BRL).

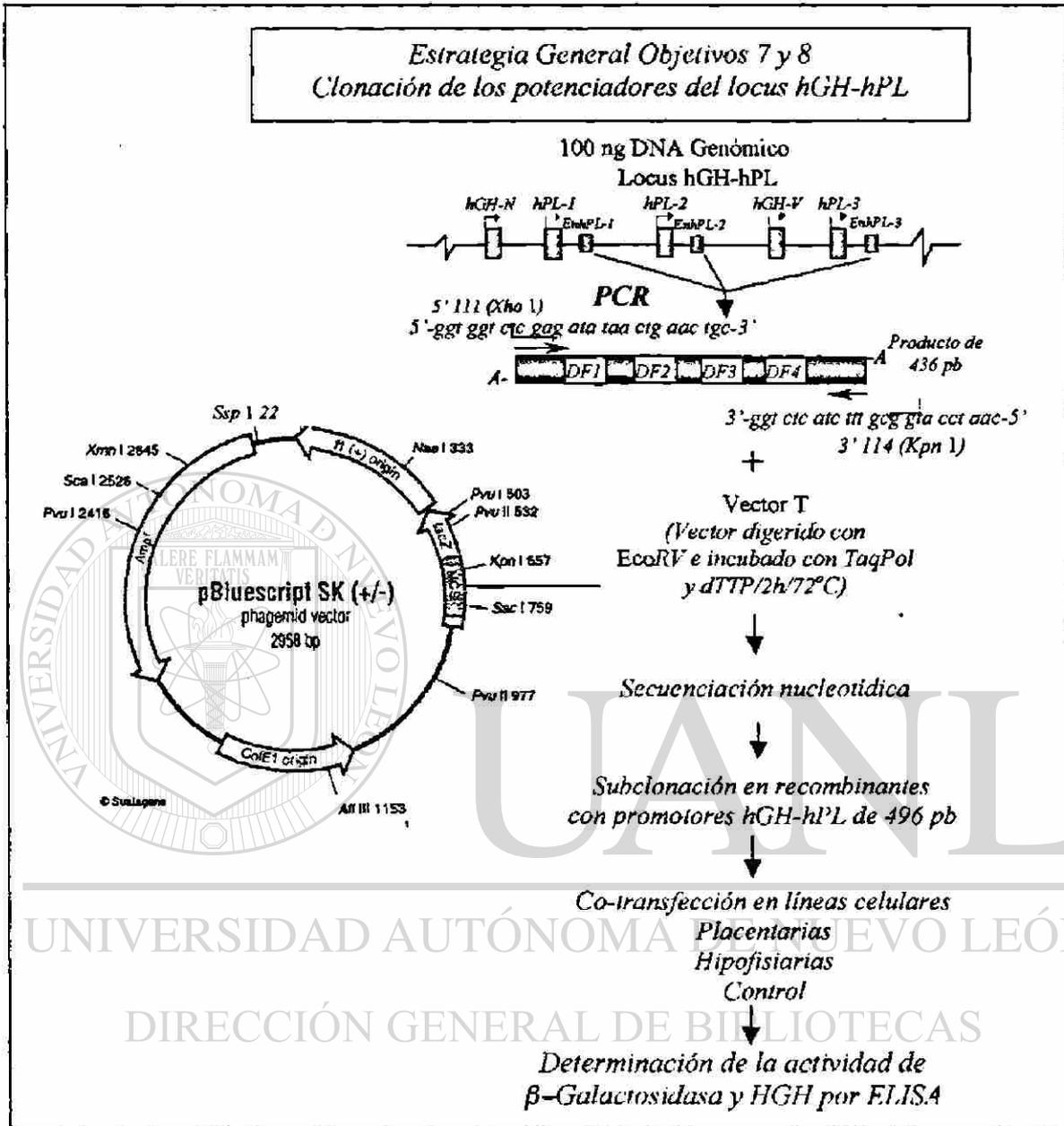


Figura 9. Obtención de los potenciadores del locus hGH-hPL. A partir de DNA genómico humano, se realizó una reacción de PCR utilizando oligonucleótidos consenso y diseñados con base en el alineamiento de las 3 secuencias potenciadoras de los genes hGH-hPL recuperadas de los reportes públicos en el GenBank. El producto amplificado (436 pb) se clonó en pBlueScript usando la metodología de "vector T" y se secuenció para verificar la fidelidad de la polimerización de la enzima *Taq*-polimerasa utilizada, el resultado se comparó contra la secuencia originalmente reportada (Número de acceso en GenBank: J03071). Los tres potenciadores clonados y secuenciados, fueron subclonados en los recombinantes que poseen la versión promotora de 496 pb de los genes hGH-hPL obtenidos en el objetivo 1 de este trabajo y ensayados en cultivo celular por co-transfección con pCMVSPORT β Gal.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1 Origen de los reactivos.

Las enzimas RNasa (No cat R-6513) y proteinasa K, necesarias para recuperar el DNA genómico humano de sangre periférica se adquirieron de Sigma (St Louis, MO, EU). De New England BioLabs (NEB, Beverly, MA, EUA) se compraron las enzimas de restricción y de modificación utilizadas para la subclonación de fragmentos del complejo hGH-hPL. La enzima nucleasa S1 (No cat. 818330) usada para obtener el competidor de PCR cuantitativa, se obtuvo de Lakeside-Roche (Boehringer Mannheim, Indianapolis IN, USA). Para la recuperación de los fragmentos de DNA necesarios para las construcciones plasmídicas, se empleó fibra de vidrio de 8 μ (No. cat. VWR32648-006) y en las ligaciones, a la enzima T4 DNA Ligasa y su amortiguador de Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA). Para la purificación del DNA plasmídico para ensayos de transfección, se utilizó el CsCl (C3032) de la casa comercial Sigma (St. Louis, MO, USA).

Las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR) se practicaron con la enzima TaqDNA polimerasa de Perkin Elmer con el MgCl₂ de Promega Corp. (Madison, WI, EUA), el amortiguador de reacción y los dNTPs de Gibco-BRL. De la misma compañía, se adquirió la enzima *Superscript* II (No. cat. 18064-022) para ensayos de transcripción reversa, la Lipofectamina (No. cat. 18324-012) y la Lipofectamina-PLUS (No cat 11524-015) para las transfecciones. El medio de cultivo Opti-MEM (No. cat. 22600-043) se usó para cultivar las células placentarias y el medio de cultivo DMEM (No. cat. 12100-038) para la línea de pituitaria y de cáncer cervicouterino, el suero bovino fetal inactivado fue de *Hyclone* (Logan UT, USA) y la tripsina pancreática bovina de *Difco* (No. cat. 215240, Detroit, MI USA). El material de plástico utilizado para la propagación y mantenimiento del cultivo celular como botellas estériles de 75 mm, placas de 60 mm y placas con 24 pocillos de fondo cóncavo (No. cat. 3077), fueron de la compañía *Falcon Co* (Becton Dickinson Company, Franklin Lakes, NJ, USA), placas de 6 pocillos (35 mm) de fondo plano de *Corning* (Lincoln Park, NJ, USA).

En la extracción del RNA de las células transfectadas, se usó el Isotiocianato de Guanidina (No de cat. 15535-016) de Gibco-BRL. La DNAsa y el inhibidor de RNAsa (RNAsin) para obtención y conservación del RNA, fueron de *Sigma* y *Ambion* (Woodward. Austin, TX), respectivamente. El estuche comercial para la cuantificación de la hormona del crecimiento humano (HGH) se adquirió de *Roche* (No. cat. 1585878) y la PCR cuantitativa se hizo con el estuche comercial “*One-step*” (No. cat. 10928-018) de *Ambion*.

Los moduladores empleados en la suplementación de los cultivos celulares:

AMPc: *Roche (Boheringer Mannheim)*, Fosfato de Clorofeniltio-AMPc; (sal sódica, No. de cat. 405647).

Ester de Forbol: *Sigma*, Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (No. cat P-8139).

Triiodotironina: *Sigma*, 3,3',5-Triiodo-L-Tironina (Sal de sodio, No. cat. T-5516).

Acido retinoico: *Sigma*, all-*trans* retinoic acid (Vitamin A acid; Tretinoin No. de cat. R-2625).

Marcadores de masa de alto [No. cat 10496-016] y bajo [No. de cat. 10068-013] peso molecular, se adquirieron de Gibco-BRL

3.2 Origen del material biológico.

Las líneas celulares empleadas en el estudio derivaron de coriocarcinoma humano (JEG-3), pituitaria de rata (GC y GH-3) y cáncer cervicouterino humano (HeLa), amablemente donadas por el Dr José Luis Castrillo del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de la Universidad Autónoma de Madrid, España. Las placentas humanas al término de gestación usadas en la normalización de la RT-PCR convencional y RT-PCR competitivo, fueron recuperadas del departamento de tococirugía del Hospital Universitario “José E. González”.

Las cepas bacterianas utilizadas en la construcción y propagación de los recombinantes y vectores de referencia, fueron *XL-1 Blue* y *Top 10F'* pertenecientes al cepario de la ULIEG. Los vectores pRSVhPit-1, pRSVhPLA-1 y la construcción conteniendo la unidad transcripcional del gen hGH-N con sus regiones flanqueantes, fueron donados también por el Dr José Luis Castrillo.

El vector de expresión del factor transcripcional Sp-1 (pCMVSp-1), fue amablemente donado por el Dr. Robert Tjian, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Stanford, CA, EUA. El resto de los vectores con los genes y regiones flanqueantes del locus hGH-hPL, utilizados para obtener la serie de recombinantes de este trabajo, así como los vectores pBSSK(+) y pAVEhGH-N, provienen de la plasmidoteca existente en nuestro departamento. El vector pCMVSPORT β Gal usado para normalizar la eficiencia de las transfecciones en análisis de moduladores, factores transcripcionales y potenciadores, fue proporcionado por el laboratorio del Dr. Luis Villarreal del Centro de Construcción de Vectores Adenovirales de la Universidad de California en Irvine, CA, EUA.

3.3 Equipo.

Para la separación de las muestras y precipitación del DNA ó RNA, se usó una microcentrífuga refrigerada de la marca Eppendorf. Para separar las muestras de digestiones o RNA en gel, se usaron cámaras de electroforesis horizontal y vertical con fuentes de poder de la marca *BioRad* (Hercules, CA, USA) y las imágenes fueron captadas en el fotodocumentador *GelDoc 2000* de la misma marca. Para medir la absorbancia en la cuantificación de HGH por ELISA, de proteínas y de β Galactosidasa, se utilizó el *Microlector reader 100 microwell system* (*Organon Technica, SA de CV Mex.*) con el cartucho-software versión 004 y filtros accesorios. Los ensayos de RT-PCR cuantitativo se realizaron en el termociclador *Mastercycler Gradient* de la compañía *Eppendorf* (préstamo de la compañía CTR, SA de CV, Mex.) con bloque de gradiente de temperatura y tapa térmica.

Las bacterias cultivadas en matraces de 1 L, se recuperaron en una centrífuga Beckman J2M1 de alta velocidad con rotor JA 10 y las construcciones se purificaron en una ultracentrífuga de mesa Optima™ TLX 120 marca Beckman (Palo Alto, CA) con rotor de alta velocidad (100,000 rpm) TLA 100.4 (S/N 96V 1407) y con tubos de polialómero *quick-seal* 13 x 51 mm con capacidad de 5.1 ml de la misma compañía.

Por la vía de internet a partir de las secuencias reportadas en el GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), se recuperaron las secuencias de vectores y genes, para analizarlos con programas bioinformáticos así como las secuencias de DNA y/o RNA usados en este proyecto. El análisis de secuencia de unión a elementos reguladores transcripcionales (moduladores hormonales y factores de transcripción) en las regiones estructurales de los genes del complejo (promotores y unidades transcripcionales), se analizaron vía Internet utilizando el programa MatInspector (94) de la compañía Genomatix. (www.genomatix.de).

Las Temperaturas de fusión (T_m) para ensayos de RT-PCR o microdelección de secuencias activadoras de la transcripción, se calcularon con las siguientes fórmulas (95):

T_m : $81.5 + 0.21(\%GC) - 645/N - (\% \text{ mismach})$: Para oligos de RT ó PCR introduciendo sitios de restricción.

T_m : $81.5 + 0.21(\%GC) - 645/N$: Inserciones o deleciones, donde N no incluye las bases insertadas o deletadas.

3.4 Métodos

3.4.1 Construcción de recombinantes (versiones promotoras largas).

Las recombinantes que contienen las versiones promotoras con longitud entre 2 y 3 kb se obtuvieron utilizando los siguientes vectores y condiciones de digestión enzimática para recuperar los fragmentos de interés:

- 1) pBSKS hGH-N *Sca* I (inserto de 6.6 kb)
- 2) pBSSK hPL-1 *Xho* I-*Eco* RV (inserto de 10.7kb)
- 3) pBSSK hPL-2 *Xho* I-*Hind* III (inserto de 4.0 kb)
- 4) pBSSK hPL-2 *Xho* I-*Bam* HI (inserto de 1.8 kb)
- 5) pBSSK hGH-V *Nhe* I-*Nae* I (inserto de 6.7 kb)
- 6) pBSSK hPL-3 *Nhe* I-*Cla* I (inserto de 7.7 kb)

Estos fragmentos contienen los genes de la familia hGH-hPL con sus regiones reguladoras flanqueantes, subclonados en la ULIEG en el vector pBlueScript SK o KS (+) a partir de un par de clonas aisladas de una biblioteca genómica humana hecha en vectores cosmidicos, donada por el laboratorio del Dr Grady Saunders, en Houston TX, EUA (H. Barrera, datos no publicados).

Tabla I. Condiciones de digestión enzimática de promotores largos*

Construcción	hPL-1 (2)	hPL-2 (3)	hPL-2 (4)	hGHV (5)	hPL-3 (6)
[DNA]	~ 5 µg	~ 5 µg	~ 5 µg	~ 5 µg	~ 5 µg
Buffer NEB # 2	10 µl #2	# 2	#2	#2	#2
Enzima 1	<i>Aat</i> II -20U	<i>Bam</i> HI 20U	<i>Xho</i> I -20U	<i>Bam</i> HI -15U	<i>Bam</i> HI -15U
Enzima 2	<i>Xho</i> I -20U	<i>Xho</i> I -20U	<i>Xba</i> I -20U	<i>Eco</i> RI -15U	<i>Eco</i> RI -15U
Enzima 3				<i>Xba</i> I -15U	<i>Xba</i> I -15U
H ₂ O dd	a 100µl	a 100µl	a 100µl	a 100µl	a 100µl

*Digestiones de las construcciones en pBS empleadas para recuperar las regiones promotoras proximal y distal de los genes de la familia. El número entre paréntesis, identifica la construcción en la lista presentada anteriormente. Para hGH-V y hPL-3, las digestiones *Bam*HI-*Eco*RI y *Eco*RI-*Xba* I se realizaron en tubos separados y todas se incubaron a 37°C por 5-12 h

3.4.2 Construcción de recombinantes versiones de 496, 140 y 70 pb.

Para obtener estos recombinantes, se usaron las construcciones en pBlueScript conteniendo las versiones promotoras de -496, -140 y -70 pb de cada uno de los genes del complejo, desde los sitios de restricción *Eco* RI (-496), *Nsp* I (-140) y *Rsa* I o *Nco* I (-70) hasta *Pvu* II (+462) en el segundo exón de cada unidad transcripcional, clonados entre los sitios *Eco* RI-*Hinc* II del vector pBS SK(+) (H Barrera, datos no publicados). A las construcciones se les adicionó la unidad transcripcional de hGH-N (usado como gen reportero en todos los ensayos) a partir de pBS hGH-N *Eco* RI recto, con el fragmento *Eco* RI clonado (2.6 kb) que posee el promotor de 496 pb, la unidad transcripcional, la señal de poliA y codón de terminación de la traducción de hGH-N.

La unidad transcripcional fue obtenida del vector pBS hGHN *Eco* RI con las enzimas *Apa* I y *Kpn* I en una digestión parcial para *Apa* I, donde primero se tuvo una digestión total con la enzima *Kpn* I de sitio único en la construcción (en el vector pBSSK hacia el extremo 3' del gen hGH-N) hasta linearizar. Después, se adicionó la enzima *Apa* I variando el número de unidades (de 0.2U a 1U/0.5µg) cuyo sitio de restricción esta ubicado a -23 pb en el promotor proximal de los genes hGH-hPL así como en el vector al final de la unidad transcripcional. Se eligió la digestión con suficiente fragmento liberado pero con producto sin digerir. Esta estrategia de

clonación, sustituye 23 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (unión del elemento iniciador [InrE], -15 a +1, descrito por Jiang y cols. en 1995[58]), de todos los promotores de los genes placentarios, por las correspondientes -23 pb del gen hGH-N.

Tabla II. Condiciones de digestión enzimática de promotores basales*.

Construcción	pBS hGH-N <i>Eco</i> RI (recto) Inserto (Digestión parcial)	pBS hPLs/hGH-V <i>Eco</i> RI- <i>Pvu</i> II Vectores (Digestión total)
Conc. DNA	5 µg	2 µg
Buffer # 1 NEB	10 µl	10 µl
Enzima <i>Kpn</i> I	10 µl (100 U: 1 U/50 ng DNA)	5 µl (50 U)/37 C/12h
H ₂ O dd	Hasta 100 µl	Hasta 100 µl
Temp. Incubación y tiempo	37°C/12 h	37°C/12 h
Enzima <i>Apa</i> I	1.5 µl (15 U: 0.15U/50 ng DNA)	5 µl (50 U: 0.5 U/20 ng DNA)
Temp. Incubación y tiempo	25°C/5 h	25°C/ 12 h

*Los vectores que contienen los promotores de 496, 140 y 70 pb y la unidad transcripcional del gen hGH-N, se digirieron con las concentraciones de enzimas y reactivos que se especifican en la tabla, así como los tiempos de incubación para cada reacción.

Transcurridos los tiempos de incubación, los productos se separaron por electroforesis en gel de agarosa 0.8 % y los fragmentos liberados (unidad transcripcional: 2.1 kb y vectores pBS conteniendo promotores hGH/hPL de 496, 140 y 70 pb) se purificaron por filtración a través de fibra de vidrio mediante el siguiente protocolo (95):

- 1) Después de separar las bandas por electroforesis en un gel de agarosa preparativo, se identificó la banda de interés por tinción con *BrEt* y visualización rápida en luz U.V.
- 2) Con la ayuda de una hoja de bisturí, se recuperó la banda de interés, delimitándola lo más posible mediante el corte y procurando contener el mínimo de matriz de gel.
- 3) Se perforó un tubo eppendorf de 0.5 ml por la parte inferior (fondo de su vértice) con una aguja calibre No. 16. Utilizando unas pinzas, se rellenó con fibra de vidrio compactándola aproximadamente hasta la marca de 200 µl y se introdujo la banda de agarosa cortada con el fragmento de DNA a purificar. Para obtener mejores resultados, el fragmento de agarosa se trituró utilizando la hoja de bisturí, antes de introducirlo al tubo Eppendorf conteniendo la fibra de vidrio.

- 4) El tubo de 0.5 ml con fibra de vidrio y agarosa, se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, el cual sería usado como reservorio de la agarosa licuada y se centrifugó a 12,000 rpm por 5-10 min.
- 5) A la agarosa licuada, se le adicionó un volumen de H₂O dd para evitar su solidificación, medio volumen de fenol e igual proporción de sevag, se agitó por inversión y se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm por 10 min.
- 6) La fase acuosa se recuperó, evitando "arrastrar" material de la interfase acuosa-fenólica y se transfirió a un tubo eppendorf de 2 ml. Para precipitar el DNA, se adicionaron dos volúmenes de etanol y una décima parte de acetato de sodio 5 M pH 5.5, se incubó a -70°C por 1 h, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min, se secó la pastilla de DNA y se resuspendió en 20-30 µl de H₂O milliQ estéril.
- 7) La concentración se estimó mediante gel de agarosa analítico a partir de 2 µl del volumen recuperado.

Una vez que se estimó la concentración y eficiencia de recuperación, se procedió a mezclar la reacción de ligación utilizando los siguientes parámetros:

Inserto (Unidad transcripcional hGH-N *Apa* I-*Kpn* I): ~300 ng

Vector (pBS con promotor hGH/hPL 0.5, 0.140 ó 0.70 kb *Apa* I-*Kpn* I): ~750 ng

Buffer de ligasa 10 X: 2 µl

Enzima T4 DNA Ligasa: 4 U (2 µl)

H₂O dd hasta 20 µl

La reacción se incubó a 16°C en baño de agua por 12 h, se estimó la eficiencia de ligación en electroforesis de agarosa 1% y se utilizó $\frac{1}{10}$ de la ligación para transformar bacterias *E. coli* cepa *XL-1Blue*, Ca⁺⁺ competentes.

3.4.3 Clonación de secuencias potenciadoras.

Para la obtención de las secuencias potenciadoras contenidas en el locus, se realizó una PCR a partir de DNA genómico utilizando la secuencia de oligonucleótidos mostrada en la tabla III. Los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando los programas para biología molecular *Oligo 4.0* y *Amplify 1.0* basados en la secuencia reportada en el Gene Bank de la que se obtuvo la secuencia consenso por alineamiento con el programa *Clustalw* (figura 5). La especificidad de los oligonucleótidos diseñados, fue verificada mediante alineamiento vía Internet con las bases de datos públicas utilizando el sistema *Blast*.

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

Secuencia	clave	
5'-ggtggtctcgagatataactgaactgc-3'	111	(28 nt, GC:48%, Tm: 60 °C)
5'-ggtctcatctttgcggtacctaac-3'	114	(24 nt, GC:50%, Tm: 57°C)

3.4.3.1 Extracción de DNA genómico por la técnica de TSNT.

Para obtener las secuencias potenciadoras por PCR, se recuperó el DNA genómico de sangre periférica de un voluntario mediante el siguiente protocolo (95):

- 1) En un tubo Falcon de 15 ml se colocaron 2.5 ml de sangre con E.D.T.A., se separó el paquete globular por centrifugación a 3000 rpm por 5 min y el plasma se eliminó.
- 2) Se adicionó 1 ml de buffer de lisis TSNT (2% Tritón 100X, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) al paquete globular y se mezcló por inversión hasta lisis total.
- 3) Se añadieron 2.5 ml de fenol y se mezcló en vórtex por 30 s.
- 4) Se agregaron 2.5 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló nuevamente en vórtex por 30 s.
- 5) Se centrifugó 5 min a 10,000 rpm y se recuperó la fase acuosa en otro tubo Falcon.
- 6) Se precipitó el DNA por adición de 2.5 volúmenes de etanol.
- 7) El DNA se recuperó por centrifugación (7000 rpm/5 min), se secó y finalmente se resuspendió en 100 µl de H₂O milliQ.

8) Para estimar la concentración, se colocaron 2, 3, 4 y 5 μl de las muestras en un gel de agarosa al 1%, se separaron por electroforesis y se usó el fotodocumentador *GelDoc 2000* para determinar la densidad de las bandas y de los marcadores de masa de alto peso molecular con el software *Molecular Analyst 1.5 (96)* para calcular la concentración.

3.4.3.2 Condiciones de amplificación por PCR de los potenciadores.

Para la reacción de PCR se utilizaron 100 ng del DNA genómico recuperado y las siguientes condiciones de amplificación:

100 ng DNA (2 μl)
Buffer 5X: 5 μl
MgCl ₂ : 3 μl (1.5 mM)
dNTPs 10 mM: 1.5 μl
Oligo 111 (5') y 114 (3') 5 μM : 1 μl
H ₂ O milliQ estéril: 35 μl
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerasa: 0.5 μl

Para la amplificación se usaron los siguientes parámetros:

1. 96°C/ 1 min	} 30 ciclos y después un último paso de extensión a 72°C/5 min
2. 62°C/1.5 min	
3. 72°C/1.5 min	

3.4.3.3 Clonación, secuenciación y caracterización de las clonas.

La clonación del producto amplificado de 432 pb el cual contiene una mezcla de los tres potenciadores, se realizó por la técnica de vector T (97); aprovechando la característica de la enzima *Taq* DNA polimerasa, de adicionar un residuo de adenilato al final de cada cadena de DNA recién sintetizada.

El vector pBS SK (5 μg) se digirió con la enzima de restricción *Eco* RV (20 U) en un volumen de 20 μl para linearizarlo. A la digestión total, se le adicionaron 200 μl de H_2O y se lavó con 50 μl de fenol y 50 μl de sevag, se recuperó la fase acuosa para precipitar el producto digerido con 2.5 volúmenes de etanol.

El DNA precipitado se resuspendió en 20 μl de H_2O *milliQ*, después se puso en presencia de la enzima *Taq*DNA polimerasa (1.5 U/2 μg / 20 μl de volumen) con 5 μl de buffer 5X (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8, 1.5 mM MgCl_2 y 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ABS), 2 mM dTTP en un volumen total de 40 μl . La mezcla fue incubada a 72°C por 2 h y el vector listo para la clonación de insertos derivados de PCR, fue utilizado directamente a partir de esta reacción sin modificaciones posteriores.

Reacción de ligación.

Para ligar los fragmentos, se mezclaron los siguientes volúmenes en un tubo de 0.5 ml:

Vector pBSSK(+) ("vector T")	2 μl (~250 ng).
Inserto (producto de PCR)	5 μl (~ 400 ng).
Buffer de ligación 5X	2 μl .
T4 DNALigasa 1 U/ml	2 μl .
H_2O <i>milliQ</i> estéril	8 μl .

La reacción fué incubada por 12 h a 16°C

Para estimar la eficiencia y concentración del producto de la ligación, se depositaron 5 μl en un gel de agarosa 1% y se separaron por electroforesis a 95 V por 40 min. La imagen fue recuperada en el sistema fotodocumentador *GelDoc* 2000 y se analizó tratando de apreciar un sistema de bandeo a lo largo del carril donde fue colocada la muestra, indicativo de que la ligación fue eficiente.

La ligación se transformó en bacterias XL1-Blue Ca⁺⁺ competentes en placas de petri con medio LB y antibióticos (ampicilina 50 µg/ml-tetraciclina 12 µg/ml). Brevemente, para preparar las bacterias Ca⁺⁺ competentes, la cepa XL1Blue fue crecida toda la noche en 4 ml de LB con 12 µg/ml tetraciclina, de aquí 1 ml se transfirió a 50 ml de medio LB-tet para incubarse por 2 h a 37°C. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a 4°C. Finalmente, la pastilla de bacterias se resuspendió en CaCl₂ 100 mM pre-enfriado y se incubaron por 2 h en hielo, después se centrifugaron nuevamente a 4°C 2500 rpm/10 min para finalmente resuspender en 3 ml de CaCl₂ 0.1 M pre-enfriado a 4°C, se colocaron en hielo y se hicieron alícuotas de 50 µl congelándose en hielo seco.

Las alícuotas se guardaron a -70°C y una de ellas se transformó por el protocolo convencional (98):

1. 5 µl de la ligación se mezclaron con 50 µl de bacterias Ca⁺⁺ competentes y se incubaron en hielo por 20 min.
2. La mezcla de bacterias y DNA se sometió a choque térmico de 42°C por 1 min y después se incubaron 3 min en hielo.
3. Las bacterias se recuperaron en medio LB sin antibiótico alguno a 37°C por 40 min, en agitación a 200 rpm. Después se centrifugaron a 3000 rpm, se eliminó el medio de cultivo dejando aproximadamente 50 µl en los que se resuspendió la pastilla de bacterias para plaquear en agar LB con antibióticos e incubación toda la noche a 37°C.

Minipreparación del DNA plasmídico. El plásmido recuperado a partir de las colonias por el método de lisis alcalina (98), se comparó primeramente por electroforesis en gel de agarosa 0.8% contra pBlueScript carente de inserto y las clonas que presentaron retraso en la migración, fueron caracterizadas primeramente con las enzimas de restricción *Xho* I ó *Kpn* I que determinan la orientación del inserto y posteriormente, con enzimas específicas que evidenciaban la identidad de los diferentes potenciadores clonados, como *Fok* I y *Afl* III para identificar al potenciador de hPL-3 y *Dra* I para discernir entre los potenciadores de hPL-1 y hPL-2.

Una vez seleccionadas las colonias y corroborada su identidad, se procedió a determinar su secuencia nucleotídica por el método de secuenciación cíclica por PCR para evidenciar si existían cambios nucleotídicos introducidos por la *Taq DNA* polimerasa, que pudieran afectar la funcionalidad de los potenciadores.

Después de seleccionar las clonas que no contenían cambios nucleotídicos en la secuencia de los potenciadores, se subclonaron hacia el extremo 3' del gen reportero hGH-N utilizando las enzimas *Xho* I y *Kpn* I (sitios de restricción presentes en el vector e introducidos artificialmente en los oligonucleótidos usados en la amplificación) en los recombinantes con versiones promotoras de -496 pb, mediante las siguientes condiciones de digestión.

pBS hGH-hPL (0.5 kb)hGHN: 3 µg (3µl)

Buffer NEB #1 : 5 µl

Kpn I NEB 10 U/ml : 5 µl

H₂O *milliQ* : 37 µl

Incubación a 37°C por 12 h.

Trás verificar por electroforesis en gel de agarosa que el producto fue digerido completamente, se adicionaron 5 µl de la enzima *Xho* I NEB (10 U/µl) y la reacción se incubó a 37°C por 12 h. El producto se purificó y se ligó con los potenciadores hPL-1, hPL-2 y hPL-3 digeridos con *Xho* I y *Kpn* I. Después se realizó el mismo procedimiento de evaluación de la ligación en gel y transformación en *E. coli* Top 10F' Ca⁺⁺ competentes.

Las clonas seleccionadas presentaban retardo en gel de agarosa al 0.8% comparadas contra uno de los recombinantes con promotor de 496 pb carente de potenciador. La caracterización se hizo con las enzimas *Eco* RI-*Kpn* I, que liberaban el promotor con la unidad transcripcional y el potenciador ó con *Xho* I-*Kpn* I que liberaban exclusivamente las regiones potenciadoras.

3.4.4 Estrategia de construcción de quimeras hPL-1 y hGH-V.

Se partió de construcciones previas realizadas en la ULIEG: pSVgpthPL-1 reparado (tesis de maestría del Dr. Ramírez-Solis), pBShGHV *Eco* RI y de pBShGH-V/hPL-1(0.5)hGH-N (estas últimas obtenidas en el objetivo número uno de este trabajo). Para la obtención de las quimeras, se utilizó el protocolo previamente descrito como mutagénesis por DNA homólogo (99) en donde los vectores se digirieron con *Eco* RI (-496 pb) y *Sac* I (+588), que liberan tres tipos de fragmentos en todas las construcciones:

- 1) El promotor hPL-1 o hGHV con sus exones I y II (derivados de pSVgpthPL-1 ó pBShGHV).
 - 2) Los mismos promotores pero con exones I y II de hGH-N (pBShPL1/hGHV(0.5)hGHN).
- El exón III, IV y V de hPL-1, hGH-V o hGH-N.

Los fragmentos se purificaron y se realizaron las combinaciones de ligación mostradas en la figura 7.

3.4.5 Construcción de vectores usados para PCR competitivo.

Para analizar las unidades transcripcionales de las quimeras de hPL-1 y hGH-V por RT-PCR cuantitativo, se construyó un vector de expresión de la variante HGH 20K. La construcción codifica la isoforma de la HGH con peso molecular 20K y consiste del gen hGH-N unido al DNAC de HGH 20K pero a partir del segundo exón, es decir, que conserva el primer intrón. La expresión del gen híbrido es regulada por el promotor mínimo de β actina humano (No. de acceso en GenBank: Y00474).

El vector p β actinahGHN21K fue desarrollado por dos principales razones:

- 1) Utilizarlo como control de eficiencia de transfección en los ensayos de RT-PCR cuantitativo, pues el producto de expresión compite con las quimeras por los oligonucleótidos 112 y 113.
- 2) Contar con un sistema de referencia de expresión del DNAc HGH 20K regulado por un promotor que no pertenece al locus hGH-hPL, de fuerza diferente a la de los promotores del complejo y poder comparar la fuerza de dicho promotor (β actina) con el sistema de expresión utilizando algunos de los promotores proximales hGH-hPL.

Para lograr esta construcción, primero se obtuvo el vector pBShGHN21K utilizando al vector pBShGHN *Eco Ssp* y pAVEhGH20K como es descrito en la estrategia general de la figura 10, y a partir de pBShGHN21K se obtuvo, como se describe en la misma figura, al vector intermediario pBSCMVhHN21K, necesario para conseguir el vector final p β actinahGHN21K, que sería utilizado para los ensayos de transfección y RT-PCR competitiva.

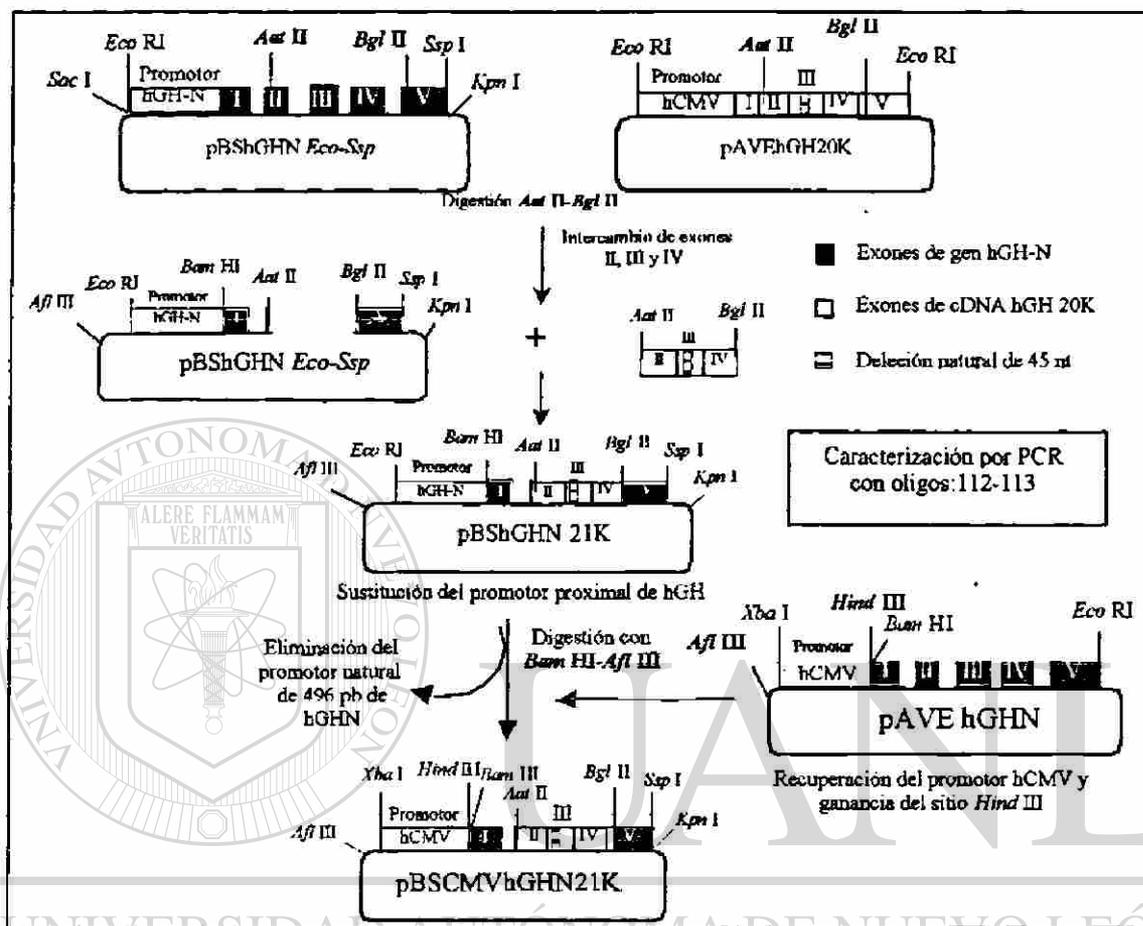


Figura 10. Construcción de vector intermediario para pβactinabGHN21K. Para la construcción de un vector intermediario (pBSCMVhGHN21K), necesario para obtener el vector de expresión ubicua de la variante hGH 20K regulado por el promotor de βactina humano, se utilizaron 4 plásmidos con las enzimas de restricción indicadas en negritas, se recuperaron los fragmentos de interés (promotor, exones o intrones) que después de ligar y transformar bacterias Ca⁺⁺ competentes, generaron al vector pBSCMVhGHN21K, que sería usado para obtener el vector final para evaluar eficiencia de transfección por RT-PCR.

En un segundo paso, para generar el vector definitivo, se utilizaron los plásmidos pBShGHN21K, pBSCMVhGHN21K y a pABO que dieron origen a pβactinabGHN21K, el cual fue co-transfectado con pBShGHN Eco-Ssp en diferentes tipos celulares y analizado por RT-PCR, como lo ejemplifica la estrategia en el esquema de la figura 11.

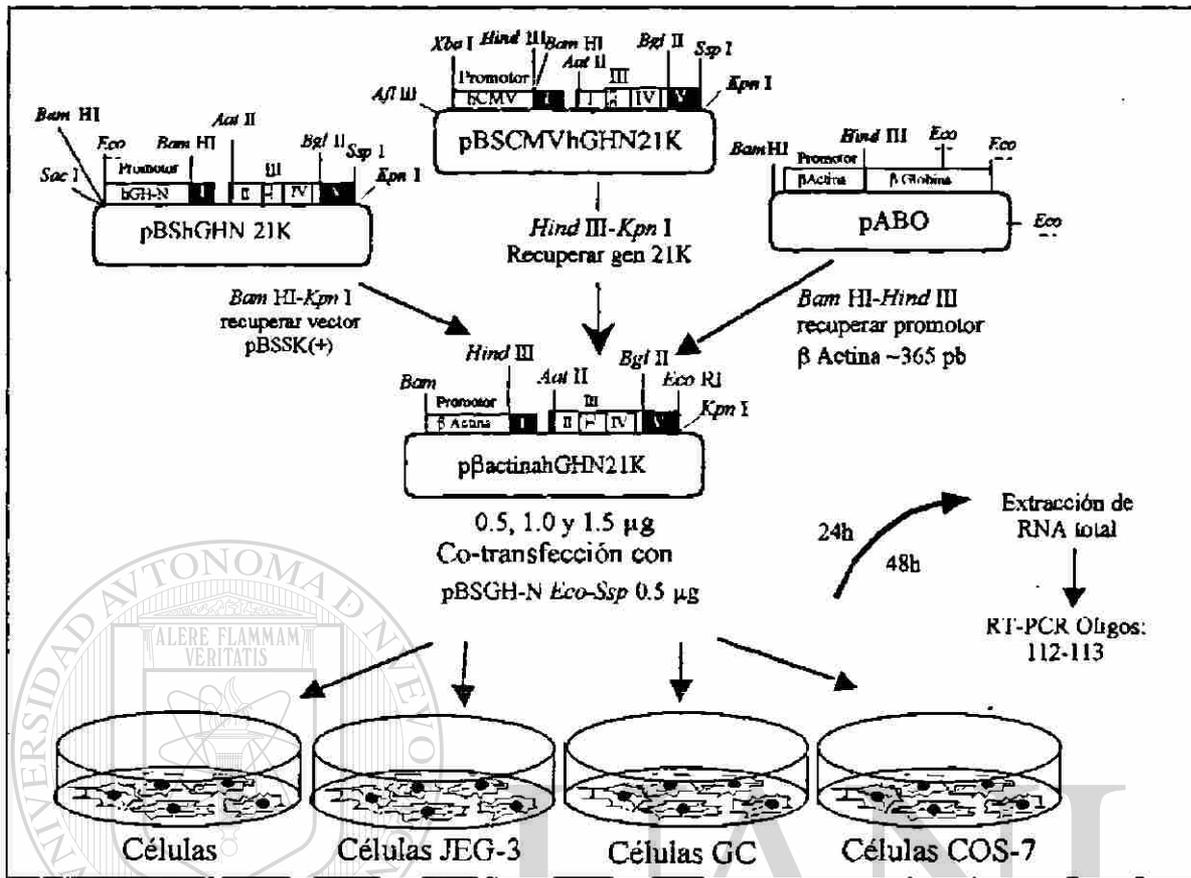


Figura 11. Construcción y análisis del vector pβactinahGHN21K. Tres vectores fueron usados para generar el vector definitivo pβactinahGHN21K. Para analizar la funcionalidad de su promotor, así como la concentración del plásmido que no saturara la reacción de RT-PCR después de introducirlo en células en cultivo, se co-transfectó en diferentes concentraciones con pBShGH-N Eco-Ssp (en concentración constante), por lipofección en cuatro líneas celulares. Para el análisis se utilizaron dos tiempos pos-transfección: 24 y 48 h para extraer el RNA total de las células y los niveles de expresión, se analizaron por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos 112-113. El producto de PCR se separó en gel de agarosa al 2 % y se detectaron las unidades de densidad relativa para cada banda (20K y 22K) en el fotodocumentador GelDoc 2000, normalizándose la concentración de RNA en las reacciones, con la banda de GAPDH.

3.4.5.1 Transfección de pβactinahGHN21K en diferentes líneas celulares.

Con la finalidad de demostrar que el plásmido pβactinahGHN21K podría ser usado para evaluar eficiencia de transfección y que los niveles de expresión no saturarían el sistema competitivo de RT-PCR, el vector fue co-transfectado en diferentes concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5 µg) en tres líneas celulares (COS-7, 3T3, HeLa, GC y JEG-3) con pBShGH-N Eco-Ssp que expresa HGH 22K y el cual se mantuvo en concentración constante de 0.5 µg. Los plásmidos fueron mezclados con 3 µl de Lipofectamina/2 µl de reactivo PLUS, en placas de 35 mm con 5×10^5 células (cada ensayo se realizó por triplicado).

3.4.5.2 Extracción de RNA de células transfectadas.

Para evaluar los niveles de expresión, después de 48 h las células fueron lisadas y el RNA se extrajo con solución D por el método de isotiocianato de guanidina (para 50 ml, $\text{CH}_3\text{N}_3\text{-HNCS}$ 23.66 g; citrato de Na 0.75 M pH 7.0, 1.66 ml; sarkosyl 0.25 g; justo antes de usarse, adicionar β -mercaptoetanol 0.36 ml) (100), brevemente:

1. Se extrajo el medio de cultivo de las células transfectadas y la monocapa se lavó una vez con pBS 1X estéril. Se adicionaron 200 μl de solución de lisis- β mercaptoetanol (solución D). Para una lisis total, la solución se distribuyó por la superficie raspando con la puntilla.
2. El lisado se recuperó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml en hielo y se adicionaron 50 μl de acetato de sodio 4M pH 4.0.
3. Se agregaron 100 μl de fenol saturado con H_2O DEPC y 20 μl de sevag, se agitó en vórtex y se centrifugó a 4°C/12000 rpm por 5 min.

La fase acuosa se recuperó y el RNA se precipitó por adición de dos volúmenes de etanol 100% e incubación ó toda la noche a -70°C. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C y la pastilla de RNA se secó en esterilidad, para resuspenderse en 50-80 μl de H_2O DEPC. El RNA se cuantificó por absorción en UV a 260 nm y colocando una alícuota de 2 μl en gel de agarosa 1%-isotiocianato de guanidina (60 mg iSTG/100 ml=1M), por densitometría con el fotodocumentador *GelDoc* 2000 (96); el resto de la solución de RNA se guardó a -70°C hasta su uso.

3.4.5.3 Construcción del competidor para RT-PCR cuantitativo.

Para obtener un sistema cuantitativo de PCR, se decidió construir un vector que además de competir con los templados blanco por los oligos 112-113 en la reacción de PCR, sirviera también como referencia estándar de la cantidad de DNA adicionado a la reacción y normalizar las cuantificaciones por densitometría en el fotodocumentador *GelDoc* 2000. Para la obtención del competidor, se partió de una construcción previa realizada en nuestro laboratorio el pBShGH20K, con el DNAC que codifica para la hormona del crecimiento 20K clonado entre los

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

sitios *Bam* HI y *Eco* RI. Con la técnica "D-Loop" (descrita por Green y col. en 1980 [101] y modificada por Castro-Peralta y col. 2000 [102]); utilizamos el oligonucleótido *Edr1* (hibridación específica en el exón II posición: +364 - +390) hibridado al vector pBSSKhGH20K y después se digirió con enzima nucleasa S1, (endonucleasa que digiere cadena sencilla de DNA). La figura 12, muestra el alineamiento de los DNAc de HGH 20K y 22K indicando el sitio de hibridación al oligo *Edr1*, así como la delección generada por acción de la nucleasa S1, para obtener HGH 20Kδ*Edr1*. El esquema de la estrategia general y la descripción del protocolo que permitió hacer una delección específica de 26 pb, se ejemplifican en la figura 13 y en el apartado 3.4.5.4, respectivamente.

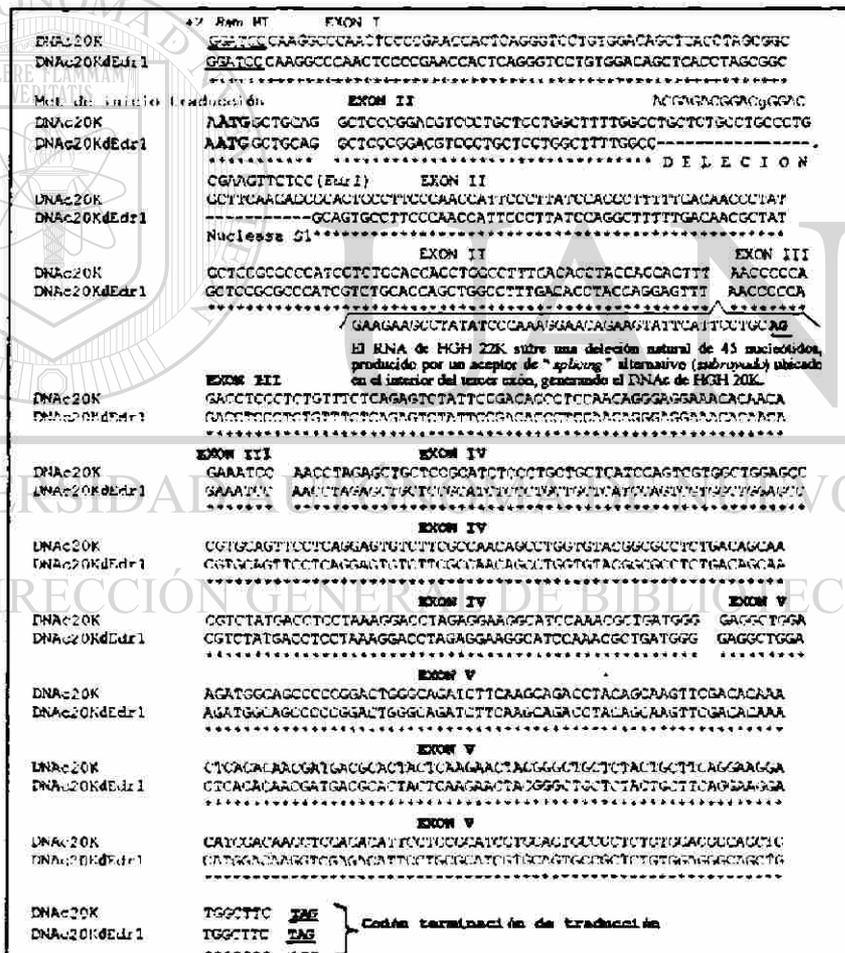


Figura 12. Alineamiento de secuencias de los DNAc de HGH 20K y hGH 20Kδ*Edr1*. En la presente figura, se muestra el alineamiento de secuencias del DNAc hGH 20 K y DNAc hGH20Kδ*Edr1*. En el alineamiento se identifican los cinco exones los cuales se separaron en la transición de cada exón. Se especifica también la delección natural de 45 nucleótidos que sufre el DNAc de HGH 22K para generar el DNAc de HGH 20K, así como el sitio de hibridación del oligo *Edr1* en el segundo exón del DNAc HGH 20K y que por acción de la nucleasa S1, es deletado en la correspondiente secuencia de hGH20Kδ*Edr1*.

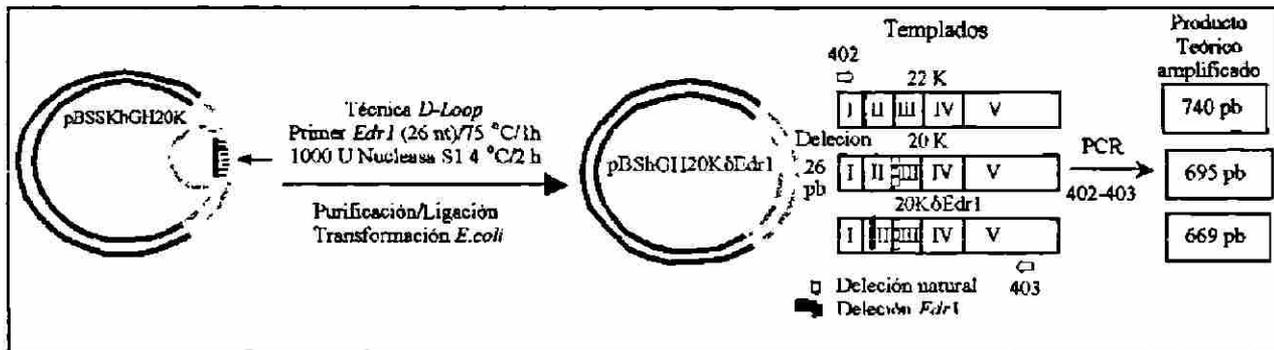


Figura 13. Estrategia General para obtener el competidor hGH 20KδEdr1. El vector pBShGH20K que tiene clonado el DNAc que codifica para HGH 20K, se utilizó para obtener el competidor plasmídico para el RT-PCR cuantitativo, utilizando la técnica *D-Loop*. La incubación a 75 °C permite la hibridación específica del oligo *Edr1* al segundo exón en la cadena codificante del DNAc de 20K, desplazando una de las cadenas de DNA complementario. La presencia de la enzima S1 digiere la cadena de DNA desplazada y al disminuir la temperatura gradualmente e hidrolizarse el oligo *Edr1* de la cadena del DNAc 20K, la enzima S1 digiere la cadena sencilla de DNA hibridizada primeramente al oligonucleótido. El producto de digestión se ligó y se transformó en *E. coli* XL1-Blue. Las colonias pBShGH20KδEdr1, se analizaron por PCR, después de 48 h para separar el producto amplificado en gel de agarosa 3% comparándose contra los productos de PCR de testigos (DNAc HGH 22K y DNAc HGH 20K).

3.4.5.4 Protocolo de digestión con nucleasa S1 para microdeleciones.

1. En un tubo Eppendorf de 0.5 µl se colocaron 10 µg de vector pBSSK hGHN20K.
2. Se agregaron 7 µg de oligonucleótido "*Edr1*" (5'-acgagacgggacgggaccgaagtctc-3' (26 nucleótidos, %GC=62) y llevó a un volumen de 50 µl con NaCl 0.2M (0.584 g/50 ml).
3. Se desnaturalizó a 95 °C por 3 min y después se incubó a 75°C/1h.
4. Se adicionaron 100 µl de H₂O destilada estéril y se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol 100% y se incubó a -20 °C 1 h
5. Se centrifugó a 12,000 rpm /4°C/ 10 min y la pastilla de DNA se secó al vacío.
6. El DNA se resuspendió en 100 µl de Buffer de *Nucleasa S1* (acetato de Na 33mM pH 4.6, NaCl 50mM, ZnCl₂ 1mM, 5 % glicerol) y se adicionaron 2 µl de *Nucleasa S1* (Boheringer) a 100 U/µl (2000 U/ml). La reacción se incubó 1 h a 4°C.
7. La digestión se separó por electroforesis en gel de agarosa preparativo al 1% en TBE 1X y el DNA linealizado se purificó por filtración a través de fibra de vidrio.
8. El DNA se resuspendió en 20 µl de H₂O dd y una _ parte del producto purificado, se sometió a ligación utilizando 2 U de T4DNA ligasa en 20 µl, a 37°C por 5 h.

9. La ligación se transformó en células *E. coli* TOP10F⁺ Ca⁺⁺ competentes por métodos convencionales, utilizando 1/4 parte del producto ligado.

Para el análisis de las clonas portadoras de la delección, el DNA plasmídico de 5 colonias se tamizaron por PCR incluyendo como controles de tamaño los productos amplificados a los vectores pBSSKhGH20K del que se partió y pAVEhGH22K que porta el DNAC de HGh 22 kDa.

Los oligonucleótidos usados en la PCR fueron 112 y 113 (también denominados 402 y 403, respectivamente) que cuentan con la siguiente secuencia nucleotídica:

5'-ctc agg atc ctg tgg aca gct cac cta-3' (27 bases, clave: 961111-112, Tm:56°C).

5'-tcg aat tcc agg aga ggc act ggg-3' (24 bases, clave: 961111-113, Tm:58°C).

Los productos fueron amplificados bajo las siguientes condiciones de PCR

Temp. Desnaturalización: 95°C/1 min Temp. alineamiento: 60°C/1 min Temp. extensión: 72°C por 1 min 30 ciclos	DNA plasmídico (clonas o vectores): 50 ng
	Oligo 112 (5 µM): 2 µl
	Oligo 113 (5 µM): 2 µl
	Buffer 5X: 2.5 µl
	dNTP's 10 mM: 1 µl
	Taq DNA polimerasa (5 U/µl): 0.5 µl/2.5 U.
	H ₂ O milli O: a 25 µl

3.4.6 Mantenimiento de las líneas celulares.

Las líneas celulares derivadas de placenta (JEG-3), pituitaria (GC o GH3) y cáncer cérvico-uterino (HeLa), fueron mantenidas en cultivo celular utilizando medio de cultivo Opti-MEM (línea placentaria) y DMEM (las otras líneas celulares), en presencia de 10 % SBF, a 37°C, en atmósfera de 5% CO₂/95% aire y con 95% de humedad relativa en botellas de 75 mm hasta alcanzar la confluencia y número celular necesario para las repeticiones en el ensayo de expresión.

Una vez obtenido el número de células, se incubaron en una solución de tripsina 1X (0.25 mg/ml) a 37 °C por 5 min. Las células despegadas del sustrato, fueron centrifugadas a 4000 rpm por 5 min, se eliminó rápidamente la solución y el botón celular fue resuspendido en 4 ml de

medio de cultivo fresco con 10 % SBF y posteriormente, se contaron utilizando una cámara de New Bauer (103).

Después de contar las células en los ocho cuadrantes de la cámara, se calculó el número de células por ml de medio de cultivo utilizando la siguiente ecuación (103):

Células por ml=(Media de la cuenta por cuadrante) (factor de dilución de la muestra) (10^4).

El número de células necesarias para los experimentos de transfección, se ajustó al área de superficie de la placa:

60 mm: 1.5×10^6 , 35 mm: 5×10^5 o placa de 96 pocillos: de 2×10^5 .

3.4.7 Transfección y condiciones óptimas del cultivo celular para ensayos de expresión.

Primero se utilizaron células GH-3 de pituitaria en objetivo 1, debido al tiempo para tener confluencia celular y a condiciones menormente exigentes (menor % de SBF), se utilizaron células GC también de pituitaria de rata, para los objetivos subsecuentes. Para transfectar las células GCy HeLa, con el plásmido purificado por gradiente en CsCl (104), se estimó una confluencia aproximada de 60 % (alcanzada un día después de adicionar la cuenta celular antes mencionada). Mientras en el caso de las células JEG-3, se realizó cuando se observaron regiones de monocapa con estado claro de diferenciación tipo sinciciotrofoblasto (dos días después), debido a que los promotores placentarios en estudio solo son activos en este tipo celular y no en la forma aislada de citotrofoblasto. Las células para transfección se prepararon el día anterior en placas de 35 mm o en placas de 12 pocillos. La mañana siguiente, se realizó un lavado con PBS 1X para eliminar las células no adheridas y estimar el porcentaje de confluencia.

3.4.7.1 Protocolo de transfección (105).

1. En una placa de 35 mm^2 , la cual presentaba la confluencia celular (dependiente del tipo celular a analizar), se realizó un lavado de las células con medio de cultivo Opti-MEM conteniendo 10% SBF y se incubaron a 37°C en la incubadora de CO_2 .

Solución A: Se diluyeron $1 \mu\text{g}$ del DNA a ensayar y $1 \mu\text{g}$ de pCMVSPORT β Gal en $100 \mu\text{l}$ de medio OPTMEM.

Solución B: En 100 μ l de medio de cultivo OPTIMEM carente de suero y de antibióticos, se depositaron 6 μ l lipofectamina con 2 μ l reactivo Plus para células JEG-3, mientras para células GC y HeLa: 4 con 2.

2. Después de incubar por 15 min a temperatura ambiente, se mezclaron ambas soluciones y se incubó por 20 min a esa temperatura (este periodo de incubación, permitió la formación de complejos entre el DNA y los lípidos catiónicos).
3. Se adicionaron 800 μ l de medio sin suero y se homogenizó por inversión del tubo.
4. Se vertió el ml de mezcla por goteo en la placa con células, procurando cubrir completamente la monocapa de células adheridas.
5. Se incubó 5 a 7 h a 37°C/5%CO₂-95% aire/95% humedad.

Nota: Este paso se trabajó en forma individual para cada línea celular, debido a las diferencias en la captación del DNA por las líneas celulares. En células JEG-3 y GC, se eliminó la mezcla de transfección por aspiración después de 5 h y se sustituyó por 2 ml de medio OPTIMEM con 10 % de SBF. En las células HeLa, se conservó el medio de transfección y sólo se adicionó 1 ml de medio OPTIMEM 10% SBF, incubando por 48 h a 37°C/5%CO₂-95% aire/95% humedad.

El tiempo de incubación para analizar los niveles de expresión del gen reportero en el estudio de promotores, unidad transcripcional, potenciador o activador (factor transcripcional[®] modulador), se especificó en la estrategia general propuesta para cada elemento regulador.

3.4.8 Ensayos de respuesta a moduladores de la transcripción.

Debido al número de repeticiones a ensayar para cada versión promotora, se emplearon placas de 96 pocillos con fondo plano en los ensayos con moduladores, potenciadores y factores de transcripción. Con las indicaciones reportadas para este tipo de procedimiento (106), se utilizaron las siguientes variaciones:

1. Número de células por pocillo: 3x10⁵.
2. Volumen de lipofectamina: 1 μ l combinado con 1 μ l de reactivo PLUS y 33 μ l de OPTIMEM.

4. Concentración de DNA. Para los ensayos con potenciadores se usó 0.1 μg del DNA de los recombinantes de las versiones con y sin potenciador/0.1 μg pCMVSPORT β Gal en 50 μl de OPTIMEM. Para los experimentos con factores transcripcionales, se utilizaron 0.2 μg del vector de expresión del factor transcripcional (pRSVhPit-1, pRSVhPLA-1, pCMVSp1), 0.1 μg del vector de expresión de hGH-N con versión promotora hGH-hPL de 496 pb y 0.1 μg de pCMVSPORT β Gal. La relación de 2:1 (transactivador: secuencia blanco) fue seleccionada de previos experimentos de optimización titulando relaciones de 1, 2, 3 y 4:1 (datos no mostrados).

Los diferentes moduladores empleados en este trabajo se prepararon de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial:

- a) AMPc: La presentación de 50 mg, se reconstituyó en 1 ml de medio de cultivo OPTIMEM quedando a una concentración final de 0.1 mM.
- b) Ester de forbol (EF): La presentación de 5 mg se resuspendió en 1 ml de DMSO, quedando a una concentración final de 7.9 μM . A partir de él, se prepararon diluciones de trabajo de 50 nM.
- c) Triiodotironina (T3): Disolución de la presentación comercial (1 mg) en 100 μl de NaOH 1N + 1400 μl de medio de cultivo OPTIMEM sin SBF ni antibióticos. (Concentración final 1.5 μM).
- d) Acido retinoico (AR): Se reconstituyó en 1 ml de DMSO y el stock quedó a una concentración de 166.5 μM (166 ng/ μl), a partir de la cual se prepararon soluciones de trabajo de 50 μM .

Todos los moduladores fueron disueltos bajo la menor iluminación posible, en condiciones de esterilidad y finalmente cubiertos con papel aluminio para protegerlos de la acción de la luz. Se guardaron a -20°C hasta su uso y se adicionó al cultivo de células transfectadas, se hizo también en oscuridad, en condiciones de esterilidad y a las siguientes concentraciones:

AMPc: 0.5 mM y EF: 100 nM (74), T3: 0.1 μM y AR: 0.5 μM (76). Las células fueron mantenidas en esas condiciones por período variable de 24 h.

3.4.8.1 Ensayo de β -Galactosidasa y normalización.

Las células co-transfectadas con pCMVSPORT β Gal, fueron lisadas con el fin de recuperar el extracto proteico para cuantificar la actividad de la enzima β -Galactosidasa, mediante un ensayo colorimétrico basado en el protocolo según Eustice y cols. (107):

- 1) Se removió el medio de cultivo (el cual se conservó a 4°C para posteriormente cuantificar hGH) y las células se lavaron una vez con PBS 1X.
- 2) Se adicionó buffer de lisis (Triton X100 al 0.1% en Tris-HCl 250 mM, pH 8.0), en un volumen que dependió del área de superficie transfectada y del número de células: 60 mm, 0.8 ml; 35 mm 0.5 ml y placa 96 pocillos, 50 μ l por pocillo.
- 3) La lisis se realizó raspando el fondo de la placa con un "gendarme" en el caso de placas 60 ó 35 mm y la con la micropipeta con la puntilla por aspiraciones repetidas, en placa de 96 pocillos.
- 4) Después de recuperar las células lisadas en un tubo de 0.5 ml (60 o 35mm), se sometieron a tres ciclos de congelamiento/descongelamiento (N_2 líquido/ 37°C) para favorecer el rompimiento celular mientras las placas de 96 pocillos se colocaron a -70°C por 30 min y en seguida se descongelaron a 37°C por 10 min.
- 5) Se cuantificaron las proteínas totales del extracto celular por el método de Bradford (108), y la reacción colorimétrica de β -Galactosidasa se realizó con 25 mg de proteína en 150 μ l de sustrato CPRG 1 mg/ml (CPRG 1 mg disuelto en 1 ml de buffer β -Gal: 1 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 50 mM β -mercaptoetanol, 60 mM Na_2HPO_4 , pH 8.0) y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 15 min ó hasta el desarrollo del color.

- 6) La reacción se detuvo por adición de 1/5 parte del volumen total de Na_2CO_3 1.5 M. La lectura de absorbancia se hizo en microlector de ELISA λ_{570} nm (filtro de referencia de λ_{600} nm) y la actividad de la enzima se calculó mediante la siguiente ecuación (109):

$$\text{Actividad de } \beta\text{-gal (u)} = [10^9 \times A_{570}] / [\text{No. de células} \times \text{tiempo de incubación en h}].$$

$$\text{Para la normalización U}/\mu\text{g de proteína} = \text{Actividad de } \beta\text{-gal (U)} / [\mu\text{g de proteínas totales}]$$

3.4.8.2 Cuantificación de hormona del crecimiento humano.

La concentración de HGH secretada en el medio de cultivo fue cuantificada con un estuche comercial inmunoenzimático (ELISA) de Boehringer-Lakeside^{MR}. El protocolo está basado en el sistema "sandwich" (110) descrito a continuación:

1. Preparación de curva de calibración estándar a partir del stock suplementado en el estuche y basado en la siguiente serie de diluciones: Con el stock de 10 ng/ml (solución 1) se preparó el estándar de 400 pg/ml y de él se realizó una serie de diluciones 1:2 en 7 tubos Eppendorf con buffer para muestra (solución 7), generando estándares de concentración 400, 200, 100, 50, 25 y 12.5 pg/ml. Se colocaron 200 μ l de las muestras y estándares, en tirillas de 8 pocillos que poseen un anticuerpo monoclonal anti-HGH fijado electrostáticamente en el fondo del pocillo.
2. Se incubó por 1h a 37°C y se realizaron 5 lavados con 250 μ l de solución 6.
3. Se adicionó el 1^{er} anticuerpo anti-HGH diluido (también monoclonal) unido a digoxigenina.
4. Se incubó por 1h a 37°C y se realizaron 5 lavados con 250 μ l de solución 6.
5. Se adicionó el 2^{do} anticuerpo anti-digoxigenina diluido, unido a la enzima peroxidasa.
6. Se incubó por 1h a 37°C y se realizaron 5 lavados con 250 μ l de solución 6.
7. Se agregaron 200 μ l de sustrato *o*-fenildiamina (POD) y se incubó 15 min en oscuridad para desarrollo del color. La reacción se detuvo por adición de H₂SO₄ 4N.
8. La lectura de absorbancia se realizó con microlector de ELISA a λ_{405} nm y filtro de referencia de λ_{490} nm.

3.4.9 Adición del competidor al RT-PCR cuantitativo.

La construcción del plásmido pBShGH20k δ 26 tiene una longitud de 4257pb, lo que en Daltons constituye un peso molecular de: 2,554,200 Da. La concentración del plásmido por densitometría comparada contra el marcador de referencia de masa molecular alto (Gibco BRL) fue de 277 ng que se ajustó por dilución a 50 fg (50 X 10⁻¹⁵g)/ μ l.

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

El tamaño de la construcción con el competidor = 4257 pb con PM= 2, 554, 200 Da.

No de moles= g/PM (en 1 μ l); 50×10^{-15} g/2, 554, 200 daltons= 1.9×10^{-20} moles/ μ l

No. de moléculas/ μ l= (No. de moles) (No. de Avogadro) (111)

$(1.9 \times 10^{-20}) (6.02 \times 10^{23}) = 1.2 \times 10^5$ moléculas/ μ l de competidor.

50 fg----- 1.2×10^5 moléculas (Por convención, 1 attomol =

X ----- 6×10^5 moléculas = 250 fg 6×10^5 moléculas [112]).

1.2×10^5 mol-----50 fg

6×10^5 mol----- X= X= 250 fg, 0.25 pg ó 1 attomol.

El siguiente paso fue realizar diluciones hasta obtener 6×10^5 moléculas/ μ l equivalente a 250 fg (5 μ l del stock de 50 fg/ μ l) de vector o 1 attomol.

Para determinar el rango óptimo de amplificación, se realizó una curva de diferentes concentraciones del competidor, adicionadas a 250 ng de RNA total de las células co-transfectadas con p β ActinahGHN21K (control de expresión ubicua) y pShGHNEcoSsp (control de especificidad tisular). El rango de concentraciones del competidor usadas fueron: 5, 10, 15, 20 y 25 atomoles que se mezclaron cada uno con 100 ng del RNA total. Las reacciones se hicieron en un termocilador *Mastercycler Gradient* marca *Eppendorf* con placa acoplada a gradiente de temperatura y tapa con temperatura controlada.

Una vez establecido el rango de linealidad, se co-transfectó 1 μ g del vector quimera de hPL-1 ó hGH-V con 0.5 μ g de p β actinahGH21K solamente en células JEG-3 en placas de 35 mm (debido a que el análisis de las unidades transcripcionales en estudio, son preferentemente sólo expresadas en células de placenta), usando las concentraciones ya descritas de lipofectamina en la sección de transfección y después de 48 h, el RNA total se extrajo por el método de Isotiocianato de Guanidina (100) para proceder a la reacción de RT-PCR cuantitativo.

La mezcla de reacción para RT-PCR se hizo con el estuche comercial *One-step RT-PCR* de BRL bajo las siguientes condiciones de análisis, en las que se mantuvo constante la concentración del RNA blanco.

1. Colocar en un tubo de pared delgada (200 μ l) 12.5 μ l de la mezcla de reacción 2x.
2. Del RNA problema (10 pg-1 μ g) en el caso específico, se utilizó 0.2 μ g.

3. El competidor (1-10 atomoles para ensayos de expresión interna, 10-50 attomoles en ensayos de expresión transitoria) (111,112).
4. 1 μ l oligo 112 (5 μ M).
5. 1 μ l oligo 113 (5 μ M).
6. 1 μ l oligo GAPDH 5' (5 μ M).
7. 1 μ l oligo GAPDH 3' (5 μ M).
8. 1 μ l de la mezcla RT/Taq.
9. Debido a que la concentración final de Mg^{+2} es 1.2 mM en la mezcla del estuche y se necesitaba de 1.8 mM para co-amplificar el competidor y GAPDH (ensayos de optimación en nuestro laboratorio), fue necesario adicionar $MgSO_4$ para complementar la reacción utilizando la solución de Mg^{+2} 4 mM incluida en el estuche, (3 μ l), así como H_2O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) hasta completar 25 μ l.

Las condiciones de transcripción reversa y amplificación se realizaron en un termociclador *Mastercycler gradient* Eppendorf con tapa de control de temperatura, en el cual las condiciones para ambos tipos de reacción se incluyeron en un solo programa, iniciando por la transcripción reversa. Dichas condiciones consistieron de los siguientes pasos y tiempos de incubación:

1. Desnaturalización del templado a 80 °C/ 10 min
2. Transcripción reversa a 42 °C 1 h.
3. Inactivación de RT a 95 °C 5 min.

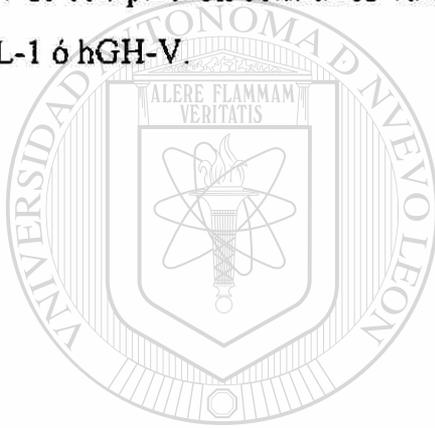
=====Inicio de PCR=====

4. Desnaturalización a 95 °C 1 min.
5. Alineamiento 60 °C 1 min.
6. Extensión 72 °C 1 min.

Se realizaron 20 ciclos a partir del paso 4 (El PCR puede ser de 15-20 ciclos, dependiendo de la abundancia del transcrito a detectar y la especificidad de los oligos utilizados) (112).

3.5 Análisis de resultados.

Después de realizar el número de repeticiones indicadas y a partir de los datos recuperados (densitometrías y concentraciones de HGH ó actividad de β Gal), se obtuvo la media, varianza y desviación estándar con las que se realizaron las pruebas estadísticas de análisis de varianza simple (ANOVA de factor único), comparando en forma individual para cada gen los resultados sin estímulo contra los obtenidos con estímulo inducidos por los moduladores, factores transcripcionales ó potenciadores, utilizando una $p= 0.5$ y tablas de contingencia (113). Igualmente, la media derivada de las unidades de densitometría para las quimeras de hPL-1 y hGH-V se compararon contra los valores obtenidos de la unidad hGH-N regulada por el promotor de hPL-1 ó hGH-V.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO IV

RESULTADOS.

4.1 Análisis de regiones promotoras de los genes hGH-hPL.

4.1.1 Construcción de recombinantes.

Para obtener los recombinantes con diferentes longitudes en el promotor, iniciamos por recuperar el DNA plasmídico de los vectores que habían sido construidos previamente en la ULIEG y en los que están subclonados las diferentes regiones del locus hGH-hPL. A la fecha, casi todo el locus de la HGH está clonado en fragmentos de restricción de diferentes tamaños en diversos vectores (cósmidos, pSVgpt, pBlueScript, Puc 18 ó 19, pAVE, pMal, NUT y pPIC9). De entre éstos, seleccionamos aquellos que podrían ser útiles para los estudios de regulación del complejo.

Debido a que muchas de las enzimas de restricción necesarias para obtener los promotores de estas construcciones liberan la región promotora proximal intacta, pero fragmentan la región promotora distal, unidad transcripcional o secuencia 3', decidimos utilizar una estrategia de ligación de tres fragmentos (promotor proximal, promotor distal y vector conteniendo la unidad transcripcional hGHN) con los genes hPL-2, hPL-3 y hGH-V. En el caso del promotor hPL-1, se pierde el sitio de restricción *Bam* HI en la posición +2 por un cambio nucleotídico, debido a lo cual se eligió el sitio de restricción *Aat* II, ubicado 6 nucleótidos hacia el extremo 3' del sitio aceptor de *splicing* en el exón II generando un recombinante con el exón I e intrón I de hPL1 fusionado a la unidad transcripcional de hGHN. En el caso de hGH-N, usamos una construcción que cuenta con la unidad transcripcional y regiones flanqueantes del gen, clonada en el sitio de restricción *Sma* I de pBlueScript KS(-).

La ligación generó construcciones con regiones promotoras de tamaño variable entre 2.2 y 3 kb, conservando la secuencia P inhibidora de la transcripción en células hipofisarias para los promotores placentarios (12), así como la mayoría de los elementos reguladores de la transcripción descritos al momento en los promotores de hPL-2 ó hPL-3 (22, 30, 32, 47, 48, 59). Las

clonas con promotor largo se caracterizaron digiriendo con *Aat* II-*Sac* II que libera el promotor largo de cada gen fusionado al exón I e intrón I de hGH-N, mientras que para las clonas con deleciones de promotor (-496, -140 y -70), se utilizaron a *Bam*HI-*Eco*RI que liberan los promotores deletados por un lado y la unidad transcripcional de hGH-N por el otro, en todos los casos (ver figura 14).

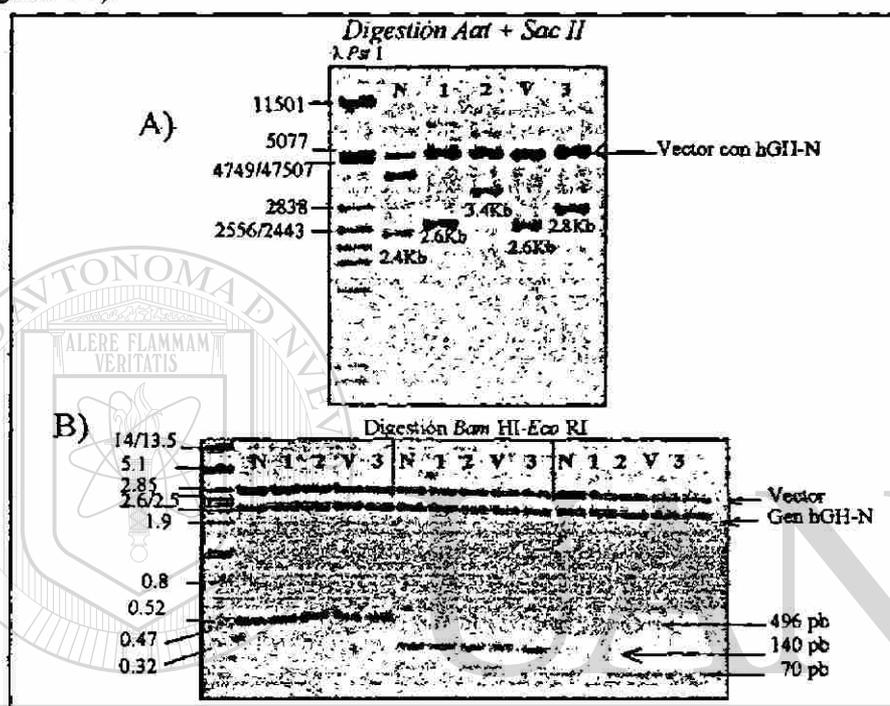


Figura 14. Caracterización de recombinantes. A) Las versiones largas de los promotores fueron liberadas en doble digestión con las enzimas *Aat* II y *Sac* II. B) Para los recombinantes con versiones promotoras cortas, se hizo doble digestión con *Bam* HI y *Eco* RI, apreciándose la liberación de los fragmentos en tamaños que varían entre 496, 140 y 70 pb.

4.1.2 Comportamiento en cultivo celular.

Después de purificar los recombinantes por gradiente en CsCl (104), éstos fueron co-transfectados en tres diferentes líneas celulares (JEG-3, GH3 y HeLa) por electroporación; usando al vector pGL2Luc usado como control de la eficiencia de captación del DNA. Se cuantificaron las unidades de luz por μ g de proteína utilizando un luminómetro y la concentración de HGH por RIA, que se normalizó por unidad de luz relativa por μ g de proteína total y los datos resultantes fueron graficados como se muestra en la figura 15. De estos resultados se pueden destacar 3 puntos:

a) La expresión diferencial de los genes quiméricos dependiendo del tipo de promotor hGH o hPL utilizado, b) La longitud del promotor afecto los niveles de expresión y c) La especificidad tisular de los promotores largos, se pierde al disminuir la longitud de los mismos. Los resultados son descritos en detalle a continuación.

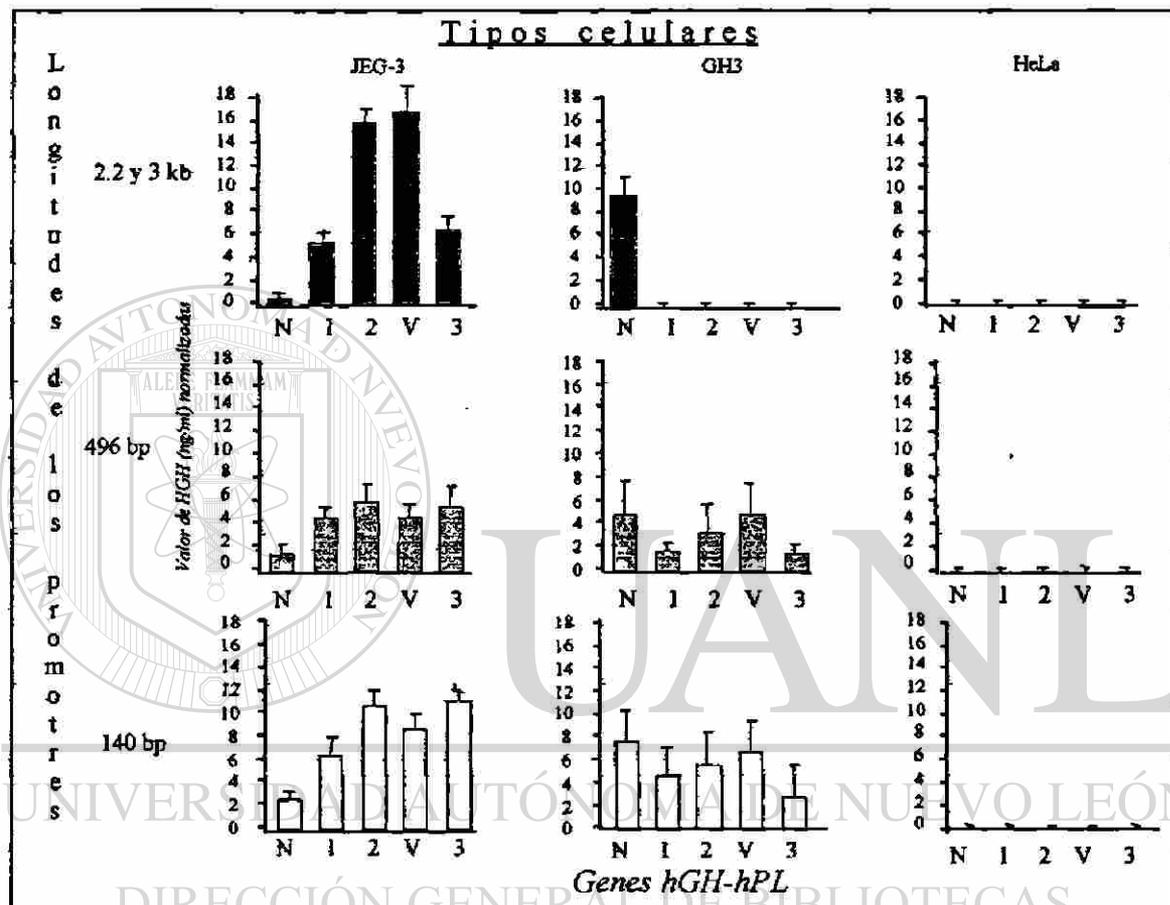


Figura 15. Análisis de la potencia y especificidad de los promotores. Después de purificar los plásmidos por CsCl, las diversas versiones promotoras fueron co-transfectadas con pGL2Luc en las líneas celulares indicadas para así cuantificar la proteína reportera HGH secretada por el método de RIA y normalizando los valores obtenidos al dividirlos entre las unidades relativas de luciferasa/ μ g de proteína total.

Promotores largos en JEG-3.

Los niveles de expresión alcanzados por los recombinantes fueron significativamente diferentes entre ellos ($p < 0.05$) en este tipo celular derivado de placenta. Una característica importante de resaltar, fue la capacidad del promotor hGH-V de expresar altos niveles de HGH a pesar de que en placenta se expresa mil veces por abajo de los otros genes de hecho, sus valores

de expresión resultaron comparables a los obtenidos con el promotor hPL-2, el que ha sido tradicionalmente considerado el más fuerte del complejo. El promotor de hPL-1 también produjo altos niveles de HGH y tuvo un comportamiento más similar al promotor de hPL-3, mientras el promotor hGH-N no presentó expresión significativa en estas células placentarias.

Promotores largos en GH3.

No se detectó expresión de la proteína HGH en células de pituitaria con los promotores placentarios largos, lo que era esperado debido a que conservan la secuencia con interacción con el elemento inhibidor de células de pituitaria (secuencia P) (12,71). El promotor de hGH-N tuvo niveles de expresión intermedio a los que se detectaron para hPL-2 y hPL-3 en placenta. Debido a esto consideramos que tiene un comportamiento similar al de los promotores placentarios de hPL-2 y hPL-3, pero con actividad solamente en pituitaria. Su fuerza para estimular la transcripción, aparentemente se ve reprimida en las células de origen placentario (JEG-3).

Promotores largos en HeLa.

En células HeLa, se detectaron niveles basales de expresión de HGH similares a los obtenidos con un vector control conteniendo el gen hGH-N pero carente de promotor, lo que demuestra que ninguna versión de ninguno de los promotores del complejo realmente fue activa en este tipo celular, esto valida la especificidad tisular de las regiones promotoras analizadas en las líneas celulares empleadas.

Promotores de 496 pb en células de pituitaria y placenta.

Al comparar los niveles obtenidos de HGH con las versiones de 496 pb, se encontró que:

1. Todos los promotores, tanto en JEG-3 como GH3, mostraron disminución de los niveles de HGH, sugiriendo que efectivamente los elementos de regulación ubicados en la región distal tienen efecto en los niveles de transcripción y expresión
2. Los promotores proximales placentarios presentaron actividad en células GH3, pues se detectó expresión de HGH, lo que se explica por la eliminación de elementos represores presentes en el promotor distal (secuencia P); además, la concentración de HGH fue ligeramente menor en este tipo celular hipofisiario comparado con la obtenida en JEG-3 (placentario).

Promotores de 140 pb en cultivo celular.

Estas versiones de promotor, en general mostraron repetidamente aunque de manera discreta, una fuerza ligeramente mayor para dirigir la transcripción que las versiones de 496 pb, lo que apunta a la acción de un elemento represor entre -496 pb y -140 pb, presente en todos los promotores, como ha sido sugerido previamente (60).

El comportamiento de los promotores en los ensayos presentados, permitió determinar la fuerza de los promotores respectivos bajo las condiciones *basales* en cultivo celular, pero aún desconocíamos su respuesta a hormonas y moduladores químicos, como lo representa el siguiente esquema.

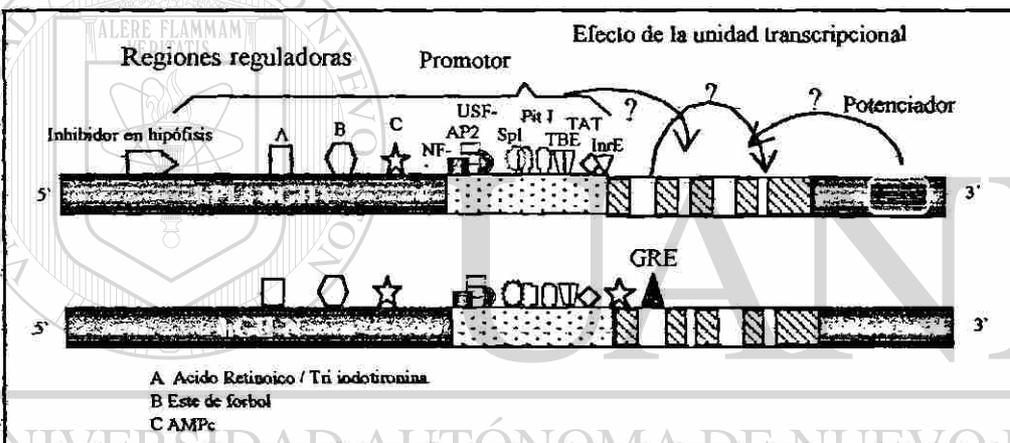


Figura 16. Ubicación de elementos reguladores. El locus hGH-hPL contiene muy variados elementos reguladores de la transcripción. Este esquema representa la posible ubicación de dichos reguladores y con una interrogante (?), se especula sobre el efecto que pueden tener estos sobre los niveles de expresión de las secuencias que regulan.

4.1.3 Análisis de moduladores de la transcripción.

Con el objetivo de responder a las interrogantes de la figura anterior, las construcciones con promotor largo fueron co-transfectadas con el vector pCMVSPORTβGal, en JEG-3, GC y HeLa. 12 horas después de la transfección, el medio de cultivo de las células se reemplazó por otro suplementado con moduladores hormonales: T3, ácido retinoico, AMPc o éster de forbol a las construcciones señaladas en material y métodos, para dejarse en incubación por 24 h más.

Para evaluar la eficiencia de transfección, se midió la actividad de la enzima β -Galactosidasa en el extracto celular con una reacción de color, generada por actividad de la enzima expresada, sobre el sustrato cromogénico CPRG, con modificaciones mínimas al método originalmente reportado (107). La concentración de HGH secretada al medio de cultivo se cuantificó por ELISA, que amplifica la señal de detección con digoxigenina, lo que proporcionó mayor sensibilidad al sistema. La figura 17, ejemplifica los resultados de la reacción de color obtenidos en los ensayos de β -Galactosidasa y ELISA.

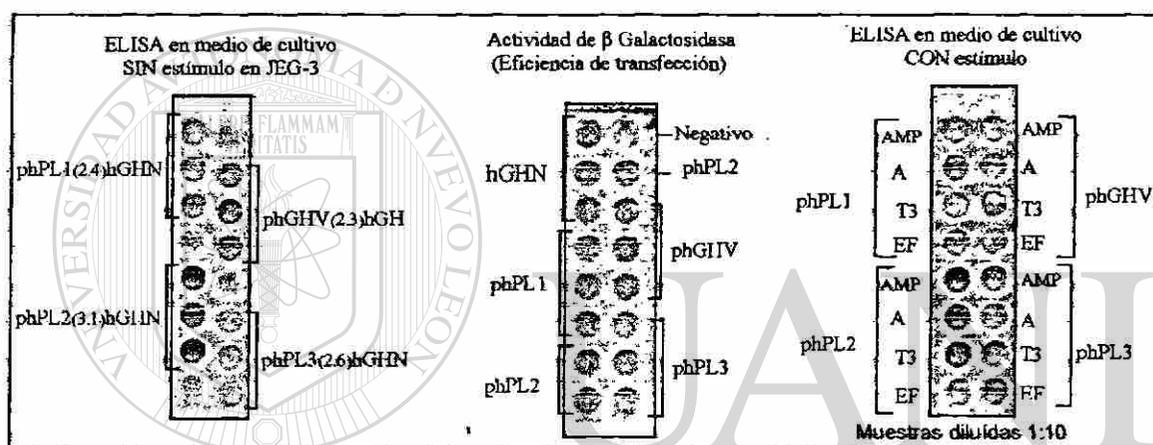


Figura 17. Eficiencia de transfección y cuantificación de HGH en células JEG-3. Las células transfectadas fueron lisadas después de 24 h y el medio de cultivo se recuperó. Se muestran las reacciones de color para la cuantificación de HGH por ELISA en el medio de cultivo de las muestras, en ausencia o presencia de moduladores (la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de HGH). Así mismo, se ilustra el ensayo de β -Gal en el extracto celular para determinar la eficiencia de transfección. La intensidad de color de β Gal fue muy similar en todas las transfecciones sin embargo, las reacciones de color en el ensayo ELISA demuestran diferencias de intensidad en los pocillos con y sin moduladores.

Después de obtener la concentración de HGH a partir de las unidades de absorbancia y la curva de calibración, se normalizó por unidad de β -Galactosidasa calculada y los resultados se graficaron como función de la concentración de HGH en ng/ml por Unidad de β Gal/ μ g de proteína total, la que se muestra a continuación.

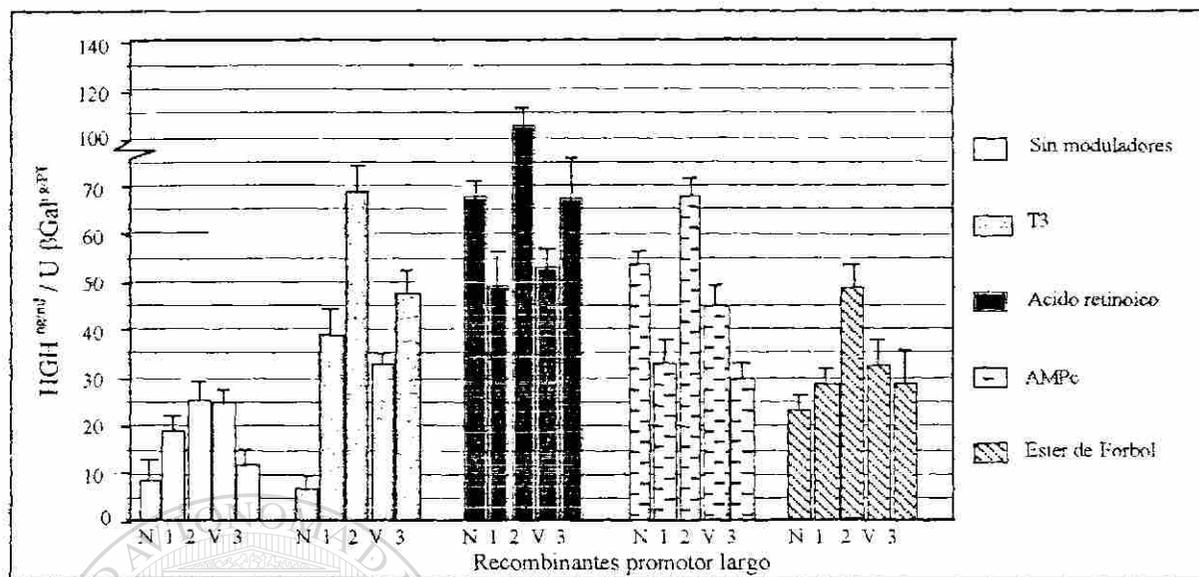


Figura 18. Efecto de moduladores en los niveles de expresión en células JEG-3. Células de placenta transfectadas con los recombinantes con promotor largo, se expusieron a moduladores hormonales y de tipo segundo mensajeros. Todos los moduladores activaron la expresión de los promotores excepto Triiodotironina sobre hGH-N, en el que aparentemente por efecto de la desviación estándar, no presentó ningún signo de activación. N=p(2.2)hGH-N, 1=pPL1(2.4)hGH-N, 2=pPL2(3.1)hGH-N, V=pGHV(2.3)hGH-N y 3=(2.6)PL3(2.6)hGH-N.

En resumen, el orden de activación de los datos en JEG-3 fueron de la siguiente manera:

T3: hPL-2>hPL-3>hPL-1=hGHV>hGHN.

Acido retinoico: hPL-2>hPL-3=hGHN>hPL-1=hGHV.

AMPc: hPL-2>hGHN>hGHV>hPL-1=hPL-3.

Ester de forbol: hPL-2>hPL-1=hPL-3=hGHV=hGHN

En general, el orden por modulador que mejor activo la expresión fue el siguiente: Acido retinoico>AMPc~T3>éster de forbol.

Al igual que en JEG-3, se analizó la respuesta de los recombinantes a los moduladores en células de pituitaria (GC), los datos recuperados también se normalizaron y graficaron. Sin embargo, en esta línea celular únicamente el promotor de hGH-N fue funcional y tuvo una respuesta más favorable a AMPc que a ácido retinoico; contrario a JEG-3, en donde la activación fue mejor con este último. Los datos numéricos se presentan en la tabla IV.

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

JEG-3	Actividad de β -Galactosidasa U/ μ g de proteína total	Sin Estímulo	T3	Acido retinoico	AMPc	Ester de forbol
hGHN	5.7	8.5 \pm 3.2	5.7 \pm 2.1	66.1 \pm 2.4	52.6 \pm 2.1	23.5 \pm 2.6
hPL-1	6.3	18.6 \pm 2.1	37.6 \pm 4.1	47.2 \pm 4.6	32.3 \pm 3.6	28.2 \pm 2.4
hPL-2	5.2	24.7 \pm 3.05	67.2 \pm 3.8	105.3 \pm 6.3	66.4 \pm 2.3	48.0 \pm 4.8
hGHV	6.6	23.5 \pm 2.03	31.6 \pm 1.8	51.2 \pm 2.3	45.3 \pm 3.87	32.1 \pm 4.2
hPL-3	6.1	11.3 \pm 2.8	47.6 \pm 4.1	66.01 \pm 5.9	29.49 \pm 2.9	28.3 \pm 5.1
GC						
hGHN	41	18.7 \pm 1.8	7.8 \pm 1.9	39.4 \pm 3.25	58.5 \pm 3.64	32.5 \pm 1.8
hPL's/hGHV	No se detectó expresión significativa con ninguno de los promotores placentarios					

*Los datos de concentración de HGH son los de las gráficas presentadas, las cuales están normalizadas a las unidades de β -Galactosidasa calculadas por μ g de proteína total. Los ensayos fueron por triplicado mismos de los que se presenta la media y desviación estándar.

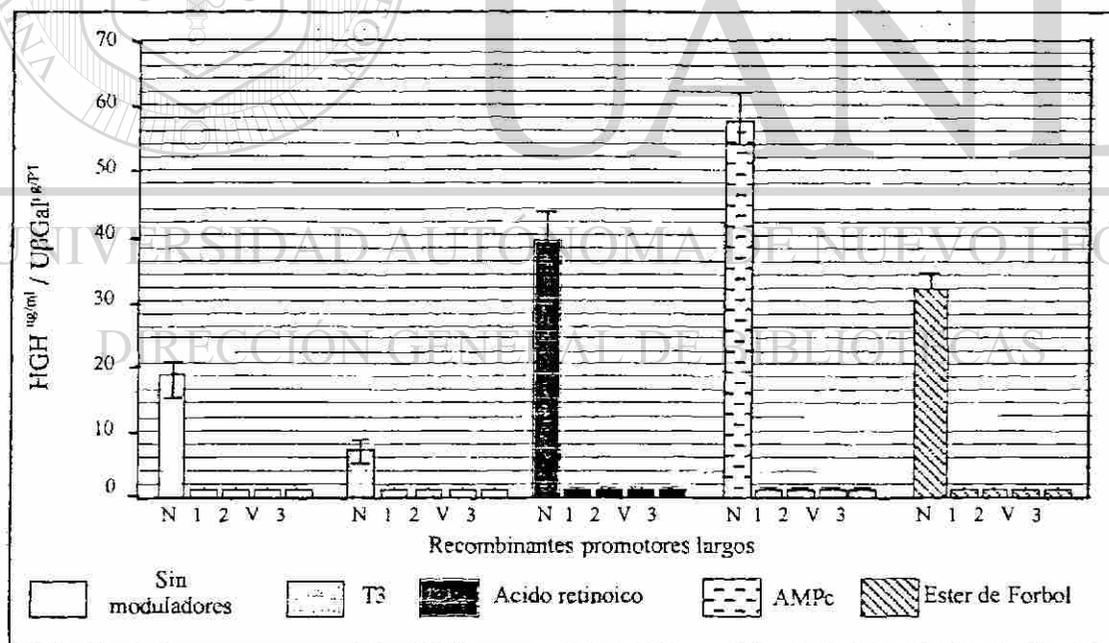


Figura 19. Efecto de moduladores en los niveles de expresión en células GC. Se analizó el efecto de cuatro moduladores de la transcripción en los recombinantes con promotor largo hGH-hPL transfectados en células derivadas de pituitaria y los niveles de expresión de HGH se compararon contra los obtenidos con los recombinantes en ausencia de moduladores. El valor de HGH fue normalizado por U de β Galactosidasa y se detectó expresión sólo con el promotor hGHN. La activación fue dependiente del modulador analizado aunque con T3 se detectó un claro efecto de represión de cerca de 60% de la expresión del gen reportero con respecto al control sin moduladores.

Los datos del número de veces de activación o represión que cada promotor sufre por acción de los moduladores en ambas líneas celulares, se resumen en la tabla V.

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

JEG-3	T3	Acido retinoico	AMPc	Ester de forbol
hGHN	Represión del 33%	7.8	6.2	2.8
hPL-1	2.03	2.5	1.74	1.52
hPL-2	2.72	4.26	2.7	1.9
hGHV	1.34	2.2	1.92	1.37
hPL-3	4.2	5.8	2.6	2.5
GC				
hGHN	Represión del 58%	2.1	3.13	1.7
hPL's/hGHV	<i>No se detectó expresión significativa con ninguno de los promotores placentarios</i>			

- Los valores sin estímulo se tomaron como igual a 1 y la activación relativa se calculó utilizando la siguiente relación: $([HGH]_{\text{moduladores}})/[HGH]_{\text{sinMod}}$, las veces de activación son relativos a la unidad.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.1.4 Análisis del efecto de factores de transcripción.

Se ha estudiado el efecto de factores transcripcionales endógenos sobre algunos de los promotores hGH-hPL (Pit-1 en hGH-N [62,63], hGH-V y hPL-2 [70], Sp-1 en hPL-2 [61] o en hPL-3 [60] y PLA-1 en hPL-3 y hGH-N [57]), aquí se presentan los resultados obtenidos al co-transfectar los recombinantes con versión promotora proximal de todos los genes del complejo y los vectores plasmídicos que expresan los factores de transcripción antes mencionados, en células derivadas de placenta y pituitaria.

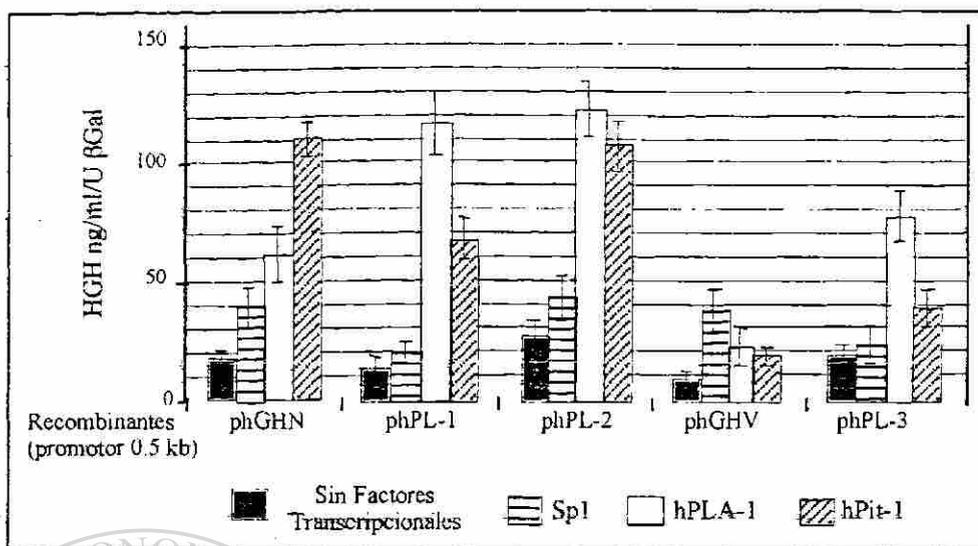


Figura 20. **Efecto de factores transcripcionales en células JEG-3.** Los recombinantes con promotor de 0.5 kb, fueron co-transfectados con vectores que expresan factores transcripcionales y pCMVβGal para normalizar la eficiencia de transfección, en las relaciones molares ya mencionadas en Material y Métodos. La concentración de HGH se normalizó a las U de β Gal/mg de proteína total y los resultados fueron graficados. El valor de barras corresponde al promedio de tres determinaciones derivadas de experimentos diferentes.

Los promotores respondieron diferencialmente a cada factor transcripcional, sin embargo el análisis sugiere que los promotores hPL-1 y hPL-3 responden preferentemente al factor transcripcional PLA-1, ya que presentaron casi el doble del nivel de activación por PLA que por Pit-1; mientras hPL-2 tuvo una activación sin diferencias significativas con Pit-1 y PLA-1. El caso del promotor de hGH-N respondió preferencialmente al factor Pit-1. El promotor de hGH-V, tuvo mejor efecto a Sp-1 que a los factores POU (PLA y Pit) ensayados. Los resultados de la respuesta en células placentarias, se presentan en la tabla siguiente, mostrando el número de veces de activación que sufren los promotores por cada factor transcripcional.

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

JEG-3	Actividad de β Gal U/μg de proteína total	HGH ng/ml Sin Estimulo	Sp-1	Veces de activación	PLA-1	Veces de activación	Pit-1	Veces de activación
hGHN	5.7 ± 1.01	18.6 ± 2.1	39.7 ± 7.9	2.1	55.8 ± 6.1	3.0	109.4 ± 7.3	5.8
hPL-1	6.3 ± 0.87	12.4 ± 3.4	19.7 ± 3.7	1.6	18.2 ± 13.3	9.4	68.2 ± 8.1	5.5
hPL-2	5.2 ± 1.1	27.5 ± 4.2	43.01 ± 10.1	1.6	122.8 ± 11.2	4.4	108.5 ± 10.6	3.94
hGHV	6.6 ± 1.3	8.2 ± 2.7	37.6 ± 7.1	4.6	22.6 ± 6.4	2.7	18.4 ± 3.5	2.2
hPL-3	6.1 ± 0.92	18.8 ± 3.0	23.5 ± 6.6	1.3	77.6 ± 9.5	4.1	39.7 ± 7.6	2.1

*En la tabla se resumen los datos de la figura 20.

También se ensayó el efecto de los factores de transcripción sobre los promotores en células de pituitaria de rata, los datos fueron graficados y se muestran en la figura número 21.

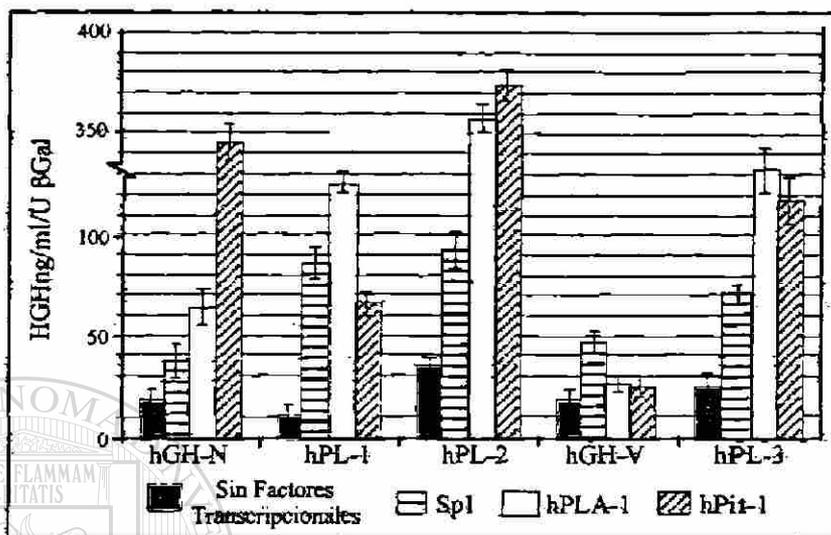


Figura 21. Efecto de factores transcripcionales en células GC. Los recombinantes con versión promotora de -496 pb, fueron co-transfectados con vectores de expresión de factores transcripcionales en proporciones 2:1 (factor transcripcional:recombinante) y pCMVSPORTβGal. El análisis pos-transfección se realizó por cuantificación de HGH en el medio de cultivo normalizado por unidad de β galactosidasa determinadas en el extracto proteico de las células transfectadas.

Al igual que el análisis en JEG-3, el factor transcripcional PLA-1 activó adecuadamente en la línea celular GC, aumentado los niveles de expresión de los promotores placentarios y hGH-N, pues en general, éstos respondieron mejor a los factores POU, alcanzando mayores niveles de concentración del gen reportero; mientras que el promotor de hGH-V nuevamente tuvo mejor respuesta a la acción de Sp-1 que a la de los factores POU. Interesantemente, al comparar los datos de concentración de HGH en ambas líneas celulares obtenidos por estímulo con los factores transcripcionales, fue mayor en células GC para hGH-N, hPL-2 y hPL-3 por la transactivación de Pit-1, lo cual esperabamos para el promotor de hGH-N pero no para hPLs. Además, la respuesta de hGH-N a Pit-1 fue mayor que la obtenida con PLA-1, mientras hPL-1 presentó el mismo nivel de activación por estos factores en ambas líneas celulares.

En el caso de la respuesta de hPL-2 y hPL-3 al factor PLA-1 en la misma línea celular, también fueron mayores que en JEG-3 y el comportamiento de respuesta fue muy similar a la obtenida con Pit. El mismo efecto observado para Pit y PLA se obtuvo con SP-1 en los promotores hPL-1, hPL-2 y hPL-3, pues también fueron más favorablemente transactivados por este factor transcripcional ubicuo en células de pituitaria que en células de placenta. También los datos graficados se resumieron en la tabla VII, que presenta la concentración de HGH obtenida sin o con estímulo y en la VIII, el número de veces en que cada promotor fue transactivado por los factores de transcripción.

Tabla VII. Concentración de HGH obtenida y veces de estímulo con factores transcripcionales en células GC.*

GC	Actividad de β Gal U/ μ g de proteína total	HGH ng/ml Sin Estímulo	Sp-1	Veces de activación	PLA-1	Veces de activación	Pit-1	Veces de activación
hGHN	20.7 \pm 1.1	20.2 \pm 3.57	38.2 \pm 2.1	1.89	55.8 \pm 6.3	2.8	344.6 \pm 8.36	17.4
hPL-1	21.5 \pm 1.3	11.3 \pm 3.1	82.1 \pm 2.4	7.2	128.4 \pm 5.4	11.4	68.7 \pm 3.87	6.07
hPL-2	19.8 \pm 0.7	35.3 \pm 1.2	91.6 \pm 3.5	2.6	389.3 \pm 7.5	11.03	374.4 \pm 6.8	10.5
hGHV	22.2 \pm 0.9	19.2 \pm 1.8	48.3 \pm 1.8	2.5	28.3 \pm 2.1	1.5	23.4 \pm 5.1	1.3
hPL-3	18.4 \pm 1.5	26.2 \pm 2.4	71.5 \pm 3.6	2.7	134.8 \pm 9.2	5.14	118.6 \pm 11.12	4.5

*En la tabla se resumen los datos presentados en la figura 21 de la concentración de HGH en ng/ml (normalizados por U de β galactosidasa) y el número de veces de activación de los promotores por los factores transcripcionales.

4.2 Análisis de la región 3' de los genes del lactógeno placentario.

4.2.1 Clonación de potenciadores del locus hGH-hPL.

Para analizar la participación de la región 3' en la regulación de los genes de lactógeno placentario, las tres regiones potenciadoras reportadas para el locus fueron selectivamente co-amplificadas por PCR a partir de DNA genómico humano, con oligonucleótidos consenso. El producto generado fue clonado en el vector pBlueScript SK(+) por la técnica de "vector T" y las clonas resultantes fueron caracterizadas con enzimas de restricción para determinar su identidad y proceder a secuenciar sus insertos para finalmente, transferirlos a los recombinantes con versión promotora de 496 pb.

La figura 22 ejemplifica la estrategia usada para la clonación, así como algunas de las clonas positivas conteniendo el inserto. La selección de las clonas plasmídicas candidatas se hizo primero por presentar su DNA retraso en la migración electroforética en gel de agarosa 1 %, comparado contra pBlueScript carente de inserto. Las clonas elegidas fueron adicionalmente caracterizadas con las enzimas *Xho* I y *Kpn* I (las que actúan sobre sitios de restricción introducidos artificialmente en la secuencia de los oligonucleótidos) para liberar el fragmento clonado, además de permitir conocer la orientación de los insertos pues también están presentes en el sitio múltiple de clonación en el vector pBluescript.

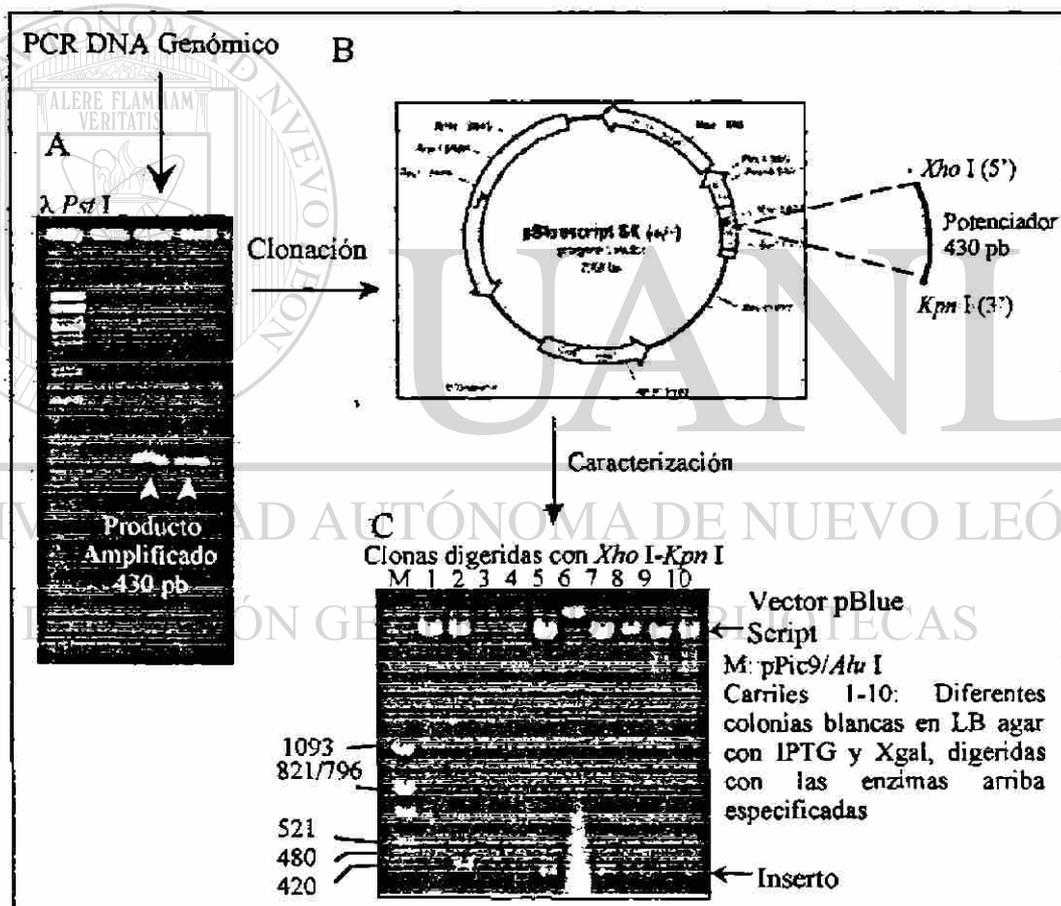


Figura 22. Amplificación por PCR y clonación de los potenciadores de locus hGH-hPL. Los productos amplificados (A), fueron clonados mediante la metodología de vector T (B) y las clonas portadoras de inserto se caracterizaron en un primer paso con las enzimas *Xho* I y *Kpn* I, que liberan el inserto (C).

Las clonas con inserto se caracterizaron con otras enzimas que determinaron la identidad de cada potenciador. Los mapas de restricción de las tres secuencias potenciadoras amplificadas (oligonucleótidos incluidos) generados con el programa DNA Strider 1.3, se muestran en la figura 23. Se usaron las enzimas *Fok* I y *Afl* III, cuyos sitios de restricción están presentes exclusivamente en el potenciador de hPL-3 y *Dra* I con dos sitios de restricción en el potenciador de hPL-2 y uno en hPL-1, para diferenciar a estos últimos. Una vez identificadas las clonas, se secuenciaron y la secuencia se comparó con la reportada originalmente (12), para finalmente subclonarlos en los recombinantes con la versión promotora de 496 pb obtenidos en el objetivo 1 de este trabajo.

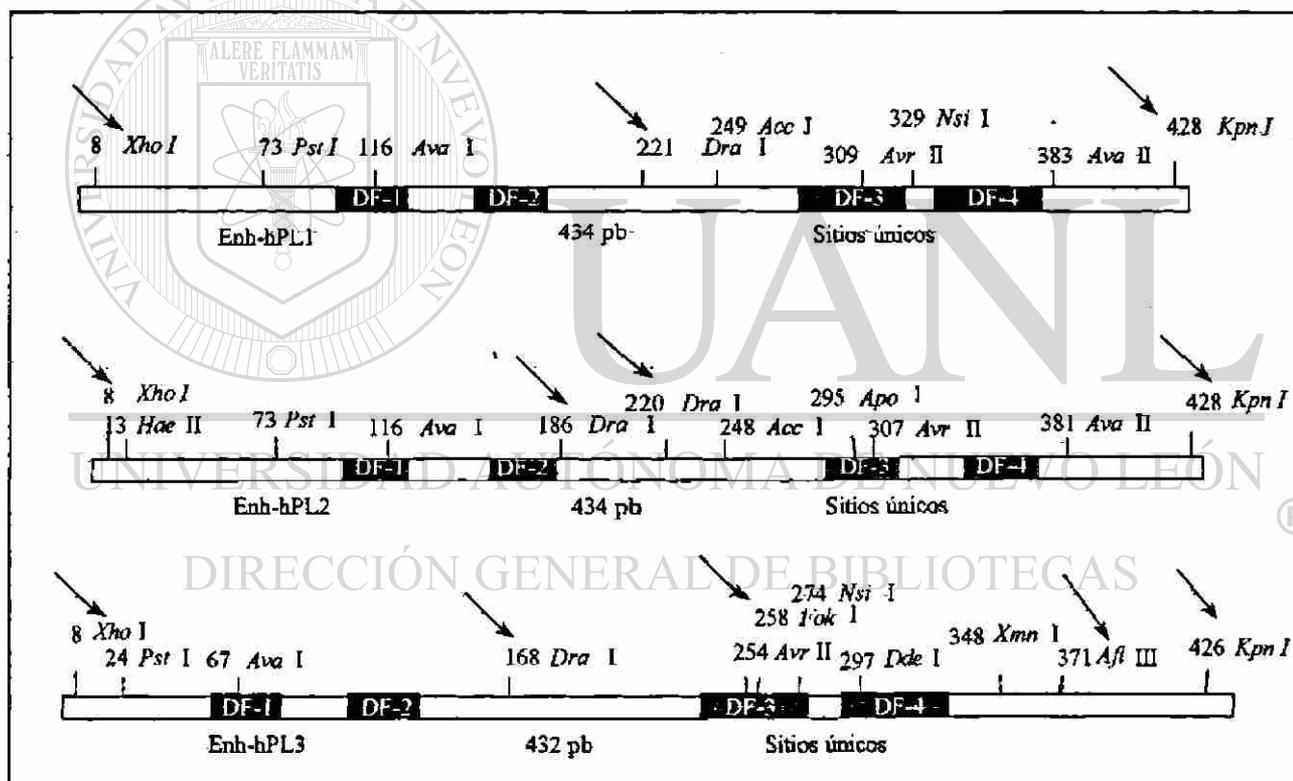


Figura 23. Mapas de restricción de las secuencias potenciadoras de los genes hPL. A partir de la secuencia nucleotídica reportada en las bases de datos públicas del complejo hGH-hPL en el GenBank, se simuló la amplificación con el programa Amplify 1.0 utilizando los oligonucleótidos diseñados. La secuencia "amplificada" con el programa computacional fue analizada en el software DNAstrider 1.3. Las enzimas indicadas con flechas, permitieron determinar la orientación e identidad del inserto en cada construcción.

Varias colonias conteniendo el inserto de tamaño deseado, fueron seleccionadas y digeridas con las enzimas señaladas en los mapas de restricción de los productos amplificados por PCR, de los tres potenciadores del locus hGH-hPL como lo muestra la figura 23. La figura 24 muestra el análisis representativo de 3 clonas con el patrón de restricción esperado para cada uno de los potenciadores de los genes hPL. El número y tamaño de los fragmentos obtenidos, corresponden al patrón de digestión diagnóstico esperado para cada potenciador.

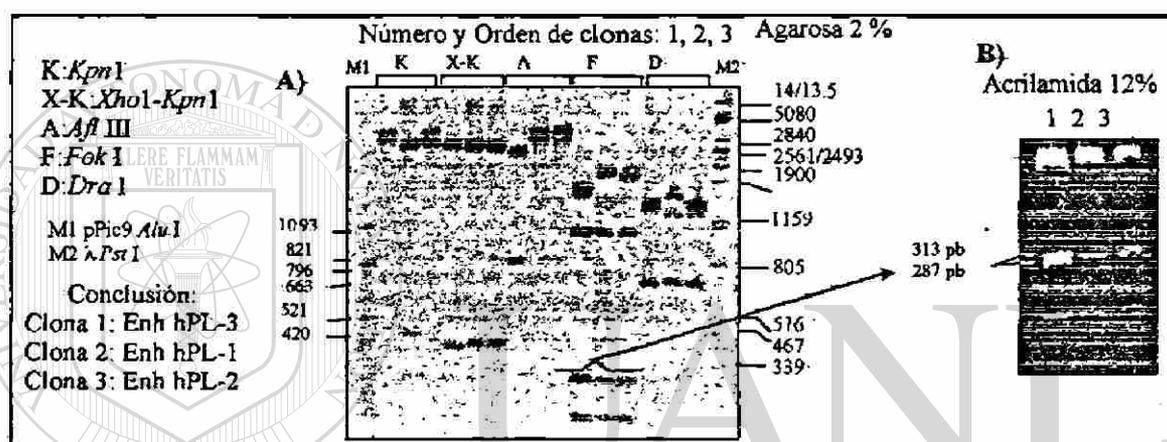


Figura 24. Caracterización e identificación de los potenciadores clonados. Las posibles clonas conteniendo los potenciadores, se caracterizaron con las enzimas de restricción señaladas. A) Los fragmentos generados se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 2%, B) En el caso específico de la digestión con *Fok* I específica para identificar al potenciador de hPL-3, fue necesario separar las bandas de interés diagnósticas en un gel de acrilamida al 12%.

4.2.2 Secuenciación de potenciadores.

Los insertos de las clonas analizadas en la figura anterior se secuenciaron. La lectura de la secuencia comparada contra la originalmente reportada por *Chen Y. y cols.* reveló un cambio nucleotídico en el potenciador de hPL-2 (C por G, posición 31944); dos más en el potenciador de hPL-3 (A por G posición 54075 y T por C en 54260), mientras el potenciador de hPL-1 no presentó cambios nucleotídicos. Los cambios en los potenciadores hPL-2 y hPL-3 se ubicaron en los extremos de las regiones DF y de acuerdo a los reportes de literatura sobre su funcionalidad (87,92,93), no afectarían la actividad de los potenciadores durante los ensayos de expresión.

4.2.3 Sub-clonación de potenciadores en recombinantes con promotor 0.5 kb.

Una vez corroborada la secuencia, se subclonaron los potenciadores en un vector conteniendo el promotor proximal de 496 pb y la unidad transcripcional de hGHN, usando *Xho* I y *Kpn* I, las clonas resultantes se caracterizaron por doble digestión con *Eco* RI-*Kpn* I, que liberan la unidad transcripcional con promotor hGH-hPL de 496 pb y el potenciador, dichas digestiones son mostradas en la figura 25.

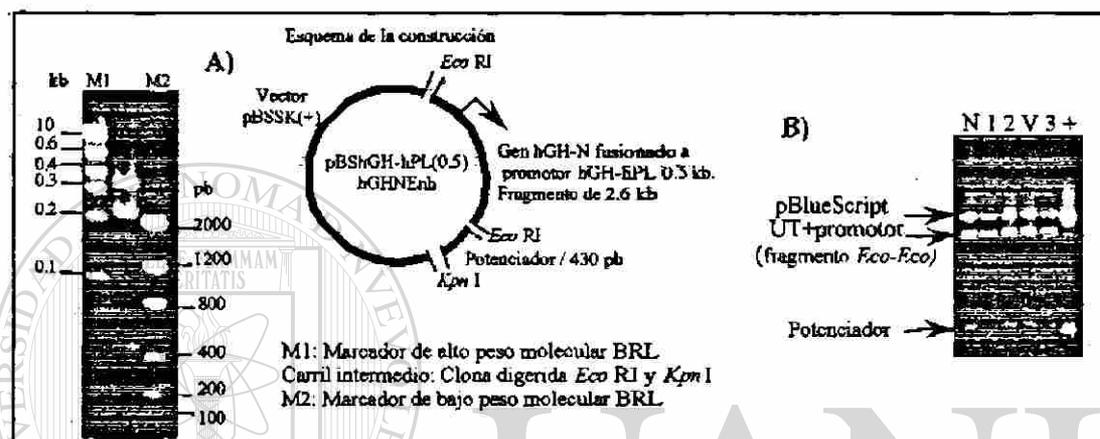


Figura 25. Subclonación del potenciador hPL-3 en los recombinantes con promotores proximal. A). Se subclonó el potenciador de hPL-3 en una de las construcciones de versión promotora de 496 pb y se caracterizó utilizando *Eco* RI y *Kpn* I. Esta clona fue usada para subclonar los potenciadores restantes con una estrategia de tipo "cambio de cassette". B) Digestión con las mismas enzimas de las 5 construcciones con promotor hGH-hPL de 496 pb liberando el potenciador de hPL-3. (+) = pBSSKenhhPL digerido con *Xho* I-*Kpn* I, liberando uno de los potenciadores subclonados, el cual se usó como testigo de tamaño molecular (se observa la ausencia de la banda correspondiente a la unidad transcripcional hGH-N unida a promotor).

4.2.4 Transfección de recombinantes con promotor 0.5 kb-potenciadores.

Las 15 nuevas construcciones, se crecieron en un litro de medio LB/ampicilina y el DNA plasmídico se recuperó por lisis alcalina y se purificó por ultracentrifugación en gradiente de CsCl (104). La concentración y calidad del DNA se evaluó por lectura de absorbancia a λ_{260} y por la relación de $\lambda_{260}/\lambda_{280}$, respectivamente.

Una vez obtenida la calidad y concentración del DNA, los plásmidos se co-transfectaron con pCMVSPORT β Galactosidasa, como control de la captación del DNA en células JEG-3 y GC. De la reacción de color que se obtuvo por ELISA en el sobrenadante se determinaron los niveles de absorbancia y se calculó la concentración de HGH. La actividad de la enzima β -Galactosidasa

se determinó en el extracto de las células transfectadas para normalizar la concentración de HGH previamente determinada (109).

Debido a que el medio de cultivo de células transfectadas con los recombinantes con potenciador de hPL-3, presentaron elevados niveles de expresión y excedieron la lectura del estándar de concentración máxima de la curva de calibración, fue necesario diluirlas 1:100 con medio de cultivo de células no transfectadas. Los datos de las determinaciones de muestras diluidas se normalizaron con las unidades de β -Galactosidasa y se graficaron, los resultados se presentan en la figura 26, donde se muestra claramente que el efecto de potenciación se observa principalmente con el potenciador del gen hPL-3, el cual activó de manera significativa a cualquiera de los promotores comparado con los potenciadores de hPL-1 o hPL-2. En los resultados obtenidos con estos dos últimos, el derivado de hPL-2 tuvo mayor fuerza que el de hPL-1 para activar a los promotores del complejo de expresión en JEG-3, mientras hGH-N fue mínimamente transactivado por ellos.



Figura 26. Efecto de potenciadores sobre promotores proximales en células JEG-3. Los datos de la concentración media de HGH se normalizaron por U de β Galactosidasa/mg de proteína total y fueron graficados. La actividad de potenciación se centra principalmente en el potenciador de hPL-3 y aunque el de hPL-2 aumentó los niveles de expresión de las quimeras que lo contenían al doble o más, la mayor actividad estimuladora es evidente en el de hPL-3 (Las muestras con potenciador de hPL-3 fueron diluidas en un factor de 100).

Los resultados de expresión de la gráfica 26 de células JEG-3 se sintetizan en la tabla VIII, en donde de igual forma se calcularon las veces de activación que cada potenciador activó la fuerza transcripcional de los promotores hGH-hPL. El potenciador de hPL-1 mostró actividad estimuladora mínima, mientras el de hPL-2 aumentó la expresión de los promotores placentarios al doble pero no activó la transcripción del promotor de hGH-N. Los resultados con el potenciador hPL-3 derivan de multiplicar por el factor de dilución (100) de las muestras y a partir de los datos de la dilución, se calcularon las veces de activación. El número de veces de activación por este potenciador fue casi el mismo en todos los promotores del complejo, con la excepción del efecto que presentó sobre el promotor de hPL-1, al cual activó cuatro veces menos (comparado con el efecto que tuvo en los otros promotores del complejo).

Los datos de esta sección, muestran que evidentemente se presentan diferencias de activación por los potenciadores en los promotores del complejo, principalmente el efecto es evidente sobre uno de los promotores más débiles, como el caso de hPL-1 y en el más fuerte específicamente, el potenciador de hPL-3.

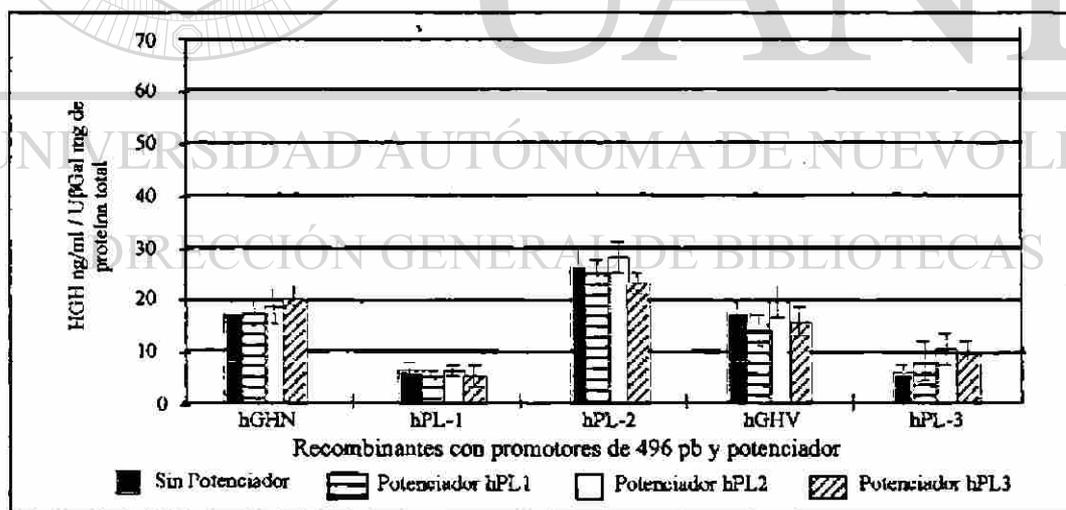


Figura 27. Efecto de potenciadores sobre promotores proximales en células GC. La concentración media de HGH en células GC transfectadas, se normalizó por U de β Galactosidasa/mg de proteína total. En esta línea celular, ningún potenciador transactivó a los promotores hGH-hPL en forma significativa y el comportamiento de los mismos, presenta una tendencia de fuerza transcripcional: hPL-2>hGH-N/hGH-V>hPL-3/hPL-1.

Tabla VIII. Activación de potenciadores en los promotores del locus hGH-hPL en células JEG-3.*

JEG-3	Sin estímulo	PL1	PL2	PL3
hGHN	16.6	0.48	0.31	33
hPL-1	11.3	0.1	1.3	32
hPL-2	29.1	0.1	1.1	22
hGHV	14.6	0.3	2.3	27.7
hPL-3	21.4	0.15	2.2	26

*Los valores de hGH de la columna sin potenciador corresponden al valor de la unidad y las veces de activación calculadas están relacionados a este valor.

4.3 Análisis de las unidades transcripcionales de hPL-1 y hGH-V.

4.3.1 Construcción de quimeras de hPL-1 y hGH-V con hGH-N.

Utilizando la estrategia de clonación ya mencionada en la sección de material y métodos, los plásmidos: pSV_{gpt}hPL1wt, pBShPL1-hGHV(0.5)hGHN y pBShGHV Eco RI, fueron digeridos con las enzimas Eco RI y Sac I, para generar las construcciones como lo muestra la figura 7 de la sección de estrategia general. Las quimeras resultantes después de la transformación, se caracterizaron al digerir con las enzimas de restricción mostradsimultaneamente mostradas en los mapas de la figura 28, utilizando una enzima presente en la porción correspondiente de los genes hPL-1 o hGH-V y otra enzima ubicada solo en la porción de hGH-N que conforman la quimera (poner atención en los mapas gráficos), el resultado de la digestión se muestra en la figura 29.

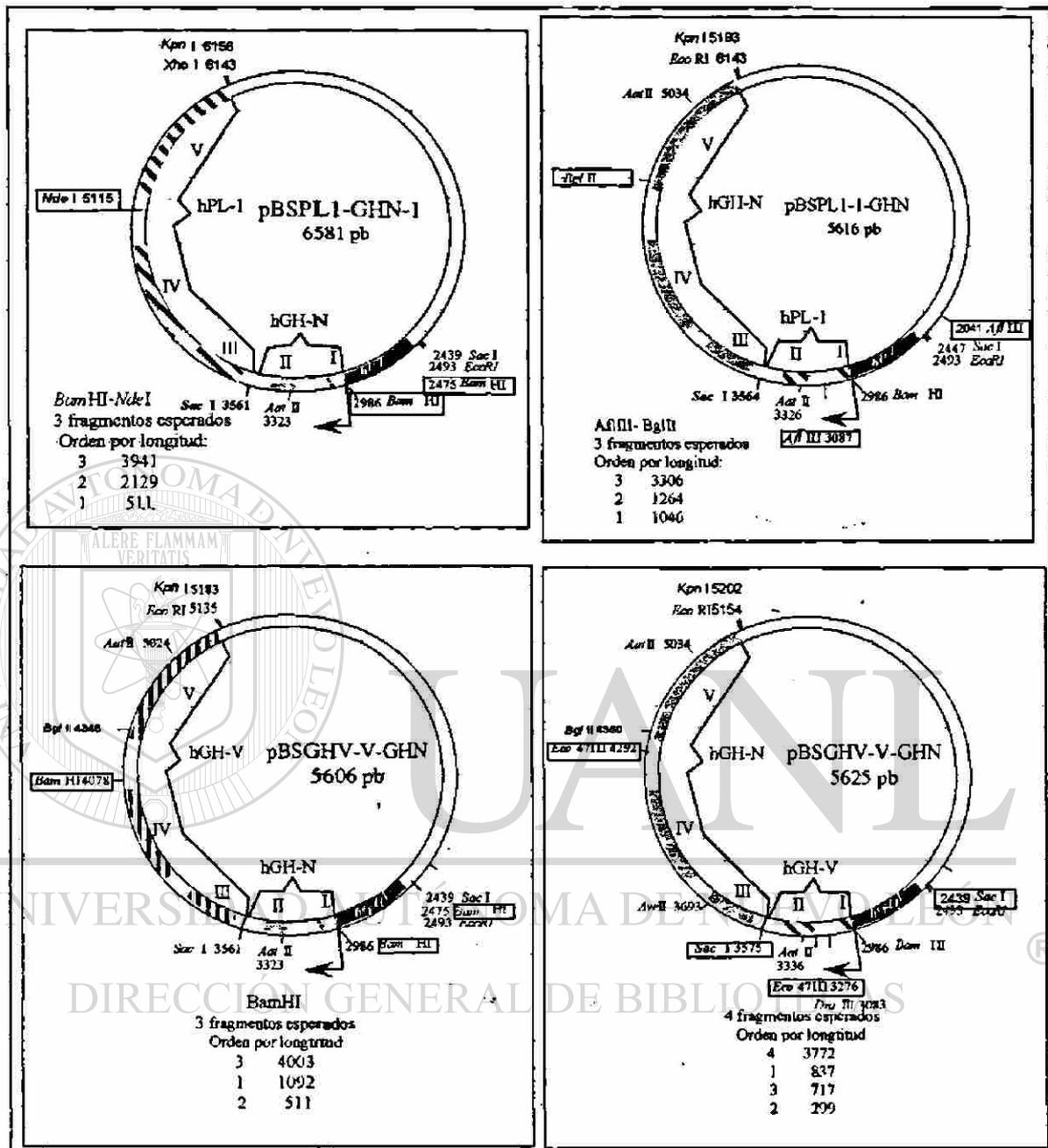


Figura 28. Mapas de restricción de quimeras hPL1,hGHV/hGH-N. Los mapas mostrados representan las quimeras de hGH-V y hPL-1 con hGH-N (pVVGHN y pPL11GHN) clonados en el vector pBSSK(+). Para identificar cada quimera, se utilizaron las enzimas encerradas en un recuadro y los productos de digestión se separaron en gel de agarosa 1%. La fotografía del gel de agarosa en la figura 29, muestra el producto de digestión de dos clonas quimera de hGH-V o hPL1 con hGH-N y donde el número y tamaño de los fragmentos liberados, corresponde a los mostrados en esta figura.

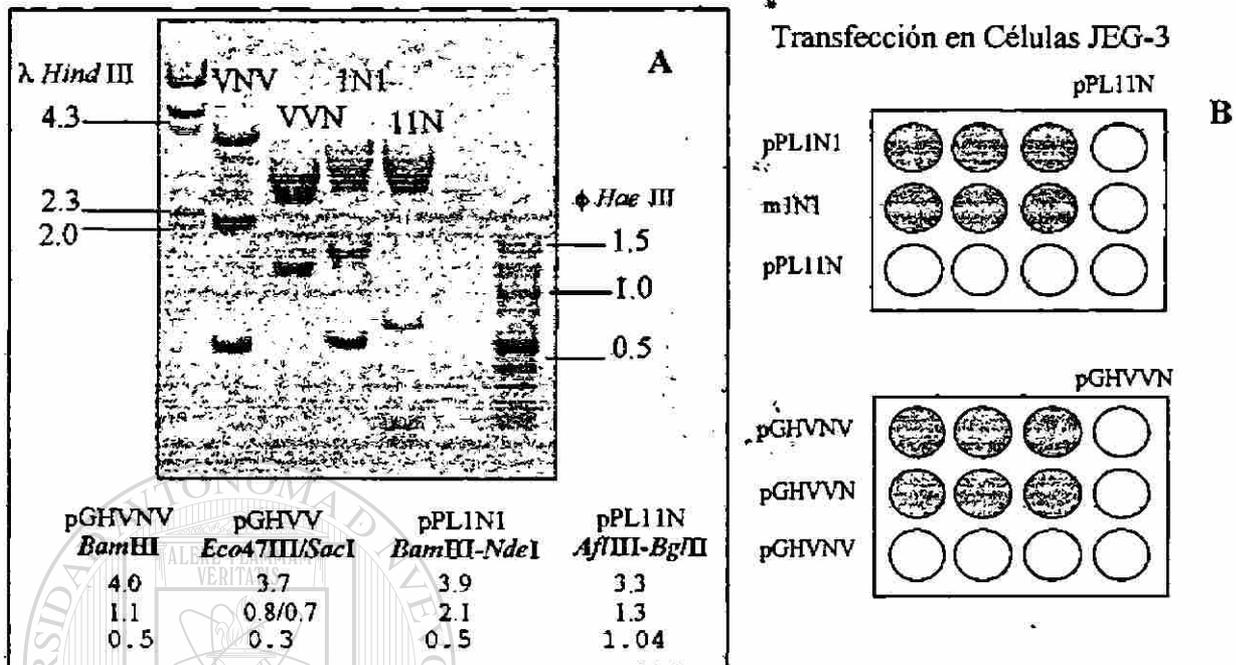


Figura 29. Caracterización de quimeras hPL1-hGHV/hGH-N con enzimas diagnósticas. A). Los mapas de las quimeras mostrados en la figura anterior, representan las construcciones de hGH-V y hPL-1 que conservan su promotor y donde sus unidades transcripcionales están combinadas con la primera o segunda mitad del gen hGHN, fragmentos clonados en el vector pBSSK(+). Para identificar a cada quimera, se utilizaron las enzimas mencionadas en la figura 28, las digestiones se separaron en gel de agarosa 1%. La fotografía del gel de agarosa en A, muestra el mencionado producto de digestión de las clonas quiméricas denominadas pGHV-V-GHN, pGHV-GHN-V, pPL1-1-GHN y pPL1-GHN-1 las cuales contienen el promotor proximal (496 pb) de hGH-V o hPL1 fusionado a la primera o segunda mitad de los genes hPL-1 o hGH-V, combinados a la primera o segunda mitad del gen hGH-N, según sea el caso. B) Las clonas identificadas en A, se co-transfectaron en placas de 12 pocillos con pCMVSPORT β Gal, un grupo de pocillos fue usado para extraer proteínas para ensayo de β -Galactosidasa (O) y otro grupo, para extracción de RNA (⊙) para RT-PCR semicuantitativo. Una tercera placa fue utilizada para los controles respectivos (pSVgpthPL1 reparado, pPL1(0.5)hGHN, pGHV(0.5)hGHN y pGHV(0.5)hGHV).

Las construcciones positivas en la caracterización, se purificaron por gradiente en CsCl y se co-transfectaron por triplicado (dos veces, pues una serie de pocillos sería usada para extracción de proteínas y el otra, para extracción de RNA total) en una placa de 12 pocillos (35 mm de diámetro) con el vector pCMVSPORT β Gal. El análisis de expresión se realizó en el RNA extraído de una serie de pocillos de células transfectadas y se usó la segunda serie de los pocillos para obtener el extracto proteico para el ensayo de β -Galactosidasa con el que se normalizó la transfección.

4.3.2 Detección de la expresión de las quimeras por RT-PCR semicuantitativo.

El análisis de expresión relativa fue por RT-PCR amplificando los transcritos derivados de las quimeras y el DNAc de GAPDH. Las bandas en gel y los datos de densitometría, se muestran en la figura 30.

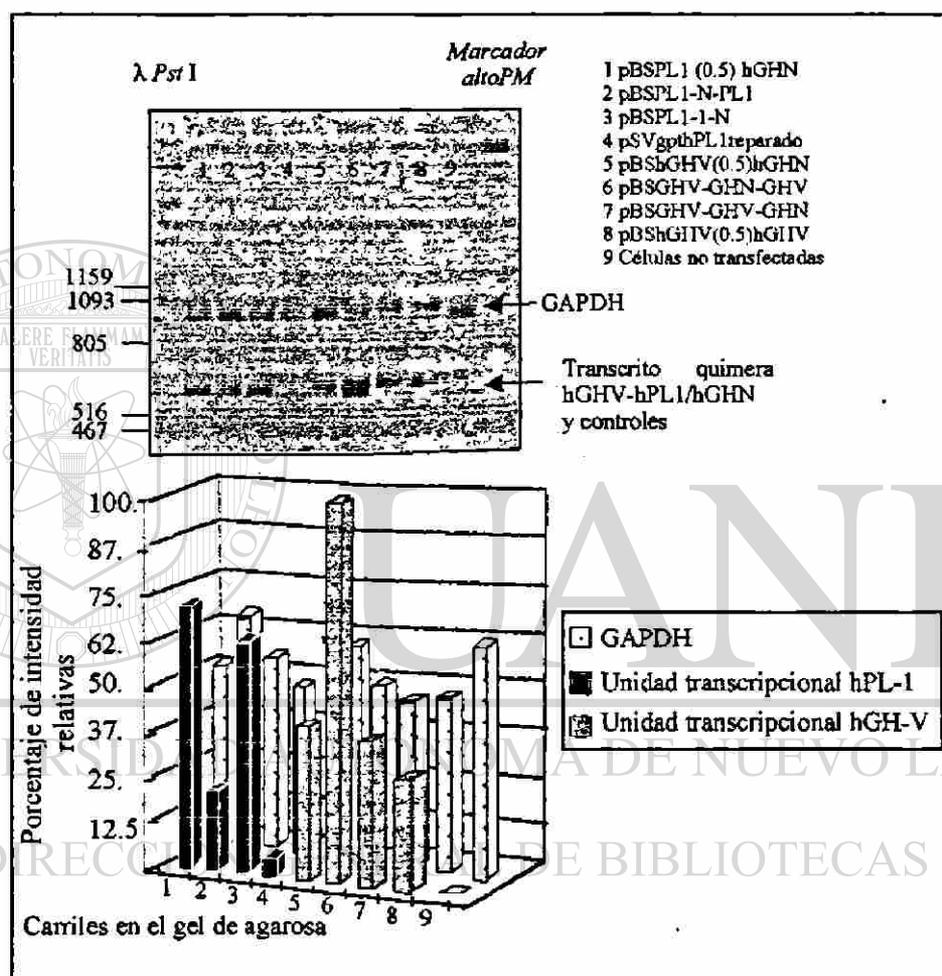


Figura 30. Semi-cuantificación del efecto de unidades transcripcionales. Después de transfectar las construcciones quimera de hPL-1 y hGH-V (por triplicado), se extrajo el RNA total de las células y se analizó por RT-PCR para co-amplificar las quimeras y al DNAc de GAPDH éste último, como control de la cantidad de RNA utilizado en la reacción. El gel muestra la banda del producto amplificado derivado de la quimera hPL-1-hGHV/hGHN que presenta intensidad variable. LA PCR de pSVgpthPL-1 reparado, no mostró banda detectable de tamaño molecular correspondiente a hPL-1. La banda derivada de GAPDH presenta una intensidad muy similar en todas las muestras analizadas. La densidad de la banda del carril número 6, pGHV-GHN-GHV, se usó para obtener los porcentajes relativos de intensidad de las bandas restantes. La gráfica muestra diferencias relativas entre las diferentes quimeras y que no son debidas a la ineficiencia de la retrotranscripción o calidad de RNA, pues la banda de GAPDH presentó valores muy similares de densidad en todos los ensayos.

Los resultados relativos de expresión mostraron que la primera mitad de hPL-1 presumiblemente cuenta con elementos que activan la transcripción mientras que en hGH-V, aparentemente es la segunda mitad la que tiene este efecto, mientras que pSVgpthPL-1 reparado, no mostró banda detectable por PCR pero la banda de GAPDH presentó una intensidad muy similar a la de las otras muestras analizadas. La densidad de la banda del carril número 6 (pGHV-GHN-GHV) se usó para obtener los porcentajes relativos de intensidad de las bandas restantes. La gráfica muestra diferencias relativas entre las diferentes quimeras y que no son debidas a la ineficiencia de la retrotranscripción o cantidad de RNA, pues la banda de GAPDH tiene valores similares en todos los ensayos. Sin embargo, el ensayo presentaba dos principales problemas que interferían con el análisis:

- 1) La evaluación de la eficiencia de transfección se hizo en el extracto proteico (β galactosidasa), mientras que los niveles de expresión de las quimeras derivaron de valores de bandas de retrotranscripción amplificadas por PCR.
- 1) El análisis no permitió obtener valores absolutos de niveles de expresión para cada quimera, pues aunque se hizo por triplicado, la eficiencia de transcripción reversa, amplificación y normalización de la concentración del RNA por muestra, se estimó co-amplificando la banda del transcrito GAPDH, con oligonucleótidos de diferente especificidad, pureza, concentración y T_m a los usados para amplificar las quimeras de hPL-1 y hGH-V. Debido a esto, decidimos repetir el experimento también por triplicado, pero con un sistema que permitiera evaluar el análisis de eficiencia de transfección en el mismo nivel de RNA.

Por lo anterior, se construyó un vector que al co-transfectarlo con las quimeras, su producto de transcripción compitiera por los oligonucleótidos con las quimeras en un sistema de RT-PCR competitivo. Para el sistema cuantitativo, construimos otro competidor por los oligonucleótidos, que al adicionarlo al inicio de la PCR en concentración conocida, permitiría cuantificar la concentración de la banda del competidor (discernible en tamaño de las bandas de quimeras) y a partir de él, calcular el número de atomoles de los recombinantes.

4.3.3 Construcción del vector para determinar eficiencia de transfección.

Para obtener el vector para evaluar eficiencia de transfección p β actinahGHN21K, fue necesario obtener primero dos vectores intermedios, cuya estrategia de construcción ya fue presentada en las figuras 10 y 11 de la sección de Material y Métodos. La idea fue obtener un vector que al transfectarlo, su producto de transcripción difiriera en tamaño por RT-PCR del originalmente transfectado. Para lograr lo anterior, al gen hGHN conteniendo el primer intrón se le fusionó del segundo al quinto exón del DNac codificante de HGH 20K. Una de las clonas positivas por digestión con enzimas, se caracterizó por PCR con los oligonucleótidos 112 y 113 como lo muestra la figura 31.

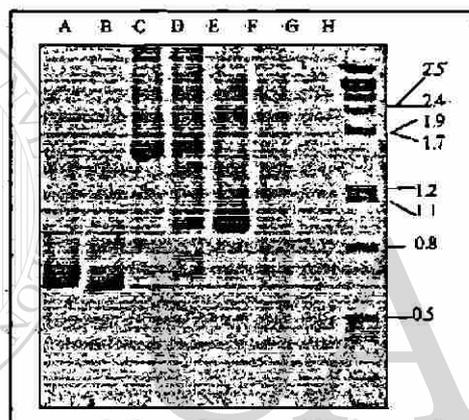


Figura 31. Caracterización por PCR de pBShGHN21K. Una clona positiva del vector pBShGHN 21K caracterizada con enzimas de restricción, fue analizada por PCR usando los oligonucleótidos 112 y 113. La figura muestra los controles de tamaño del producto de PCR: A) DNac 22K (pAVE22K), B) DNac 20K (pAVE20K), C) gen hGHN (vector pBShGHN *Eco-Ssp*) y E) Clona positiva con migración intermedia entre los productos de PCR mostrados en los carriles B y C. El carril D) muestra los productos de PCR obtenidos después de mezclar los diferentes templados analizados individualmente en los carriles A, B, C y E; que evidenció competencia positiva por los oligonucleótidos. F) Control negativo de amplificación y G) RT-PCR con los mismos oligonucleótidos de RNA extraído de células JEG-3, H) Marcador de peso molecular λ Pst I.

La construcción obtenida aún conservaba el promotor proximal de hGH-N que presenta una fuerza muy similar a la de los promotores proximales de hPL-1 y hGH-V en JEG-3, debido a ello fue necesario sustituirlo por otro no relacionado con el sistema estudiado de fuerza transcripcional diferente, que no saturara los límites de la RT-PCR para poder detectar diferencias entre las quimeras en análisis. Al vector pBShGHN21K se le sustituyó el promotor proximal de hGHN por el de hCMV del vector pAVE, dando origen a pBSCMVhGHN21K ganando el sitio de restricción *Hind* III en el extremo 5' del gen 21 K (ver detalles en la figura 10), necesario para la construcción del vector final p β actinahGHN21K.

El vector intermedio pBSCMVhGH21K, se digirió con (5') *Hind* III y *Kpn* I (3') para liberar el "gen 21 K" y purificarlo. El promotor humano de β actina se recuperó del vector pABO, que forma parte de la plasmidoteca de la ULIEG; con las enzimas (5')*Bam* HI-*Hind* III(3') como lo muestra la figura 32 y los fragmentos purificados (gen-DNAc hGH 21K y promotor humano de β actina) se ligaron al vector pBlueScript abierto en los sitios *Bam* HI-*Kpn* I, para obtener finalmente el vector p β actinahGHN21K.

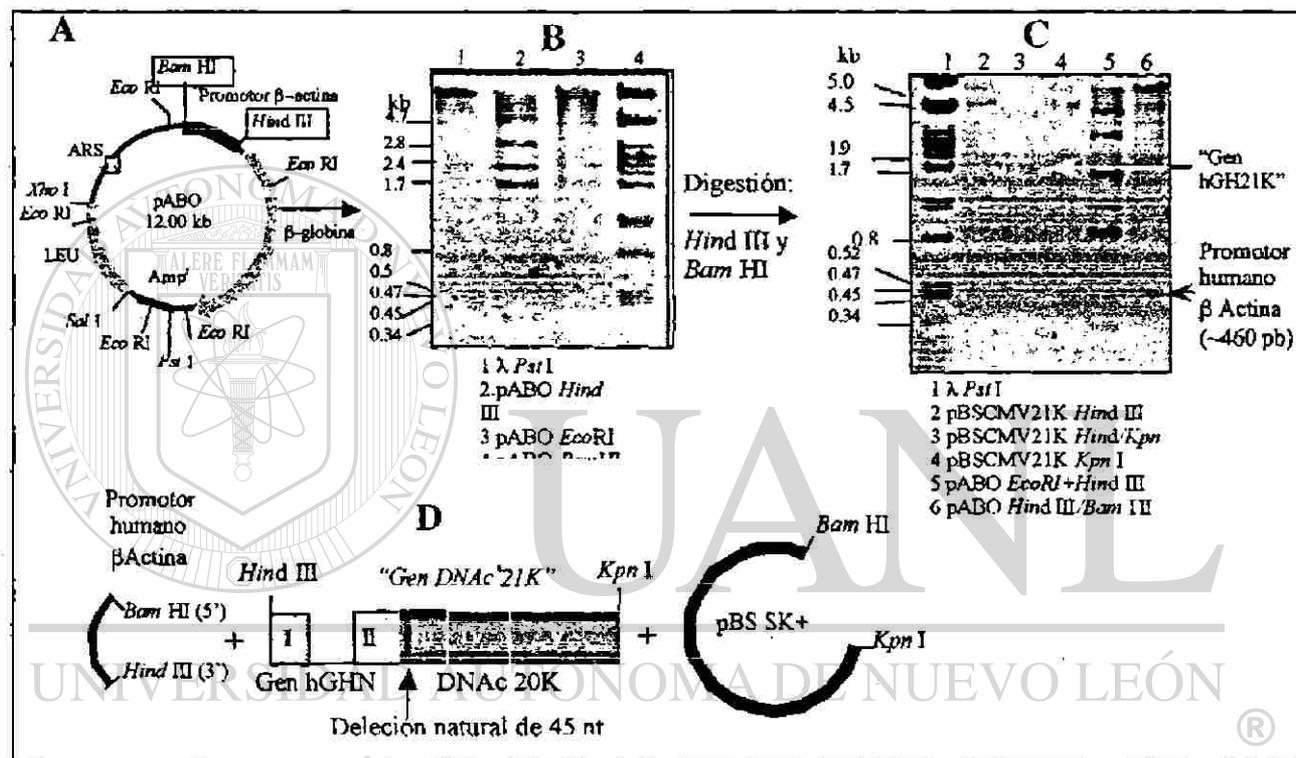


Figura 32. Construcción de p β ActinahGHN21K. Para construir este vector se utilizaron 3 plásmidos, A. Del plásmido pABO se recuperó el promotor de β Actina humano, se presenta el mapa de pABO, B Caracterización del vector pABO con las digestiones utilizando las enzimas *Hind* III, *Eco* RI y *Bam* HI el número de fragmentos obtenidos corresponde a los esperados. C Se purificó el promotor de β Actina del plásmido pABO digerido con las enzimas *Bam* HI y *Hind* III. D Fragmentos sometidos a ligación, promotor de β actina humano derivado del plásmido pABO con las enzimas *Bam* HI y *Hind* III, la unidad transcripcional hGH "21K" del vector pBSCMV21K digerido con *Hind* III-*Kpn* I y el vector pBlueScript abierto en los sitios de restricción *Bam* HI-*Kpn* I.

Se ejemplifica en la figura 33 una clona positiva, identificada por digestión con enzimas de restricción diagnósticas donde los fragmentos liberados corresponden a los esperados, según el mapa del plásmido y leyenda, mostrados en la mencionada figura.

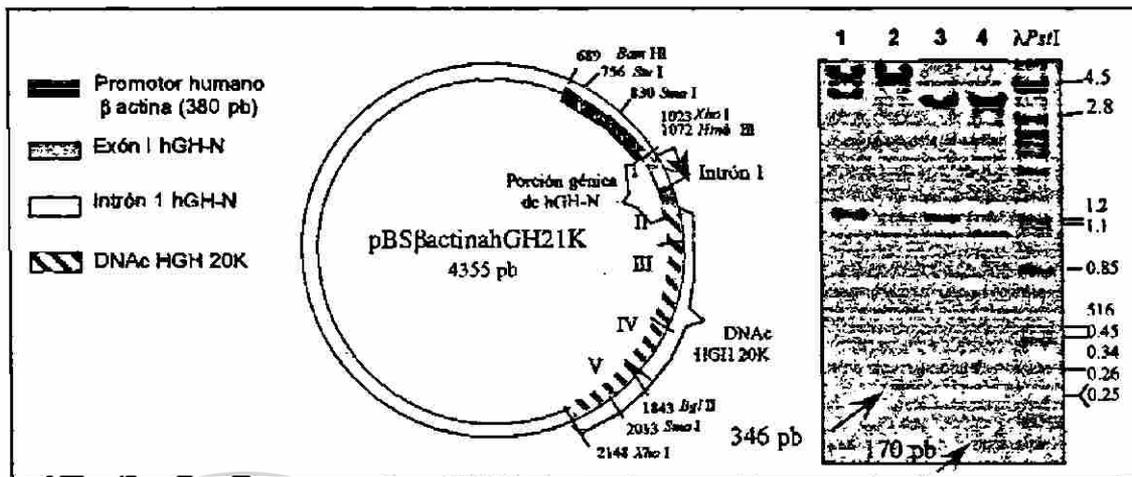


Figura 33 Caracterización de pβactinahGHN21K. El mapa representa la construcción de pβactinahGHN21K la cual fue caracterizada con diversas enzimas de restricción. El producto de digestión se separó en gel de agarosa 0.8%, en donde el número y tamaño de los fragmentos liberados corresponden a los esperados de acuerdo al marcador de peso molecular λ Pst I, carriles 1: *Sma* I= 1171-3164, 2: *Hinc* III-*Stu* I= 4009 y 346, 3: *Xho* I= 1113 y 3242, 4: *Bgl* II-*Sma* I= 3184, 1001 y 170.

4.3.4 Expresión del vector pβactinahGHN21K en cultivo celular.

Una vez obtenido el vector, se analizó su capacidad de expresar al gen 21K correctamente por lo que se co-transfectó en cinco líneas celulares con pBShGHN *Eco*RI-*Ssp* I que tiene el promotor proximal de hGH-N (0.5 kb). El co-transfectar pβactinahGHN21K con pBShGHN*Eco*-*Ssp* en varias líneas celulares, permitiría obtener los datos de: 1. niveles de expresión de HGH 20K para comparar la fuerza del promotor βactina contra la de un promotor del complejo hGH-hPL por RT-PCR competitivo, 2. Evidenciar que no existe saturación de la reacción de PCR por el transcrito derivado de pβactinahGHN21K y 3. Comprobar la naturaleza de expresión ubicua del promotor βactina teniendo como control de expresión tejido específica en células GC y JEG-3, al promotor proximal de hGH-N (contenido en el plásmido pBShGHN *Eco*-*Ssp*).

La figura 34 muestra los productos amplificados por RT-PCR de las células HeLa, JEG-3, GC, 3T3 y COS-7, 48 h después de co-transfectar pBShGHN *Eco*-*Ssp* con pβactinahGHN21K. Sólo se detectó transcrito de HGH 22K (proveniente del plásmido pBShGHN *Eco*-*Ssp*) en células JEG-3 y GC, mientras que los transcritos de HGH 20K (derivados del plásmido pβactinahGH21K), se detectaron en

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 linealidad de la RT-PCR, se corroboró la naturaleza ubicua del promotor β actina humano y además, su fuerza de transcripción no fue mayor a la del promotor proximal de hGH-N.

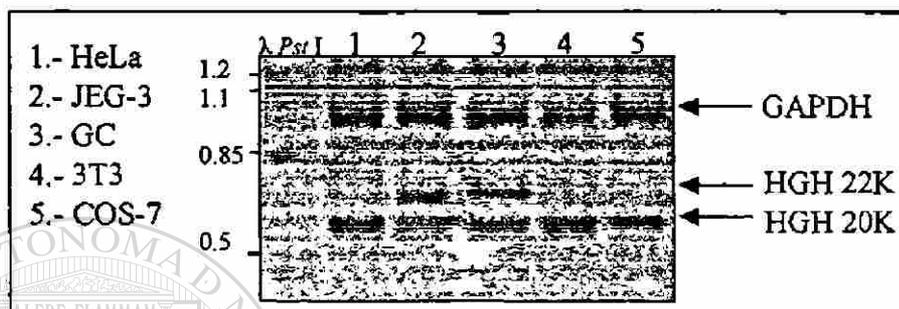


Figura 34. Detección por RT-PCR de la expresión β actinahGHN21K en diferentes líneas celulares. Cinco líneas celulares fueron utilizadas para analizar la expresión del vector de β actinahGHN21K (producto de expresión: 20K) cotransfectado con pBShGHEco-Ssp (producto de expresión: 22K) en una relación 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.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

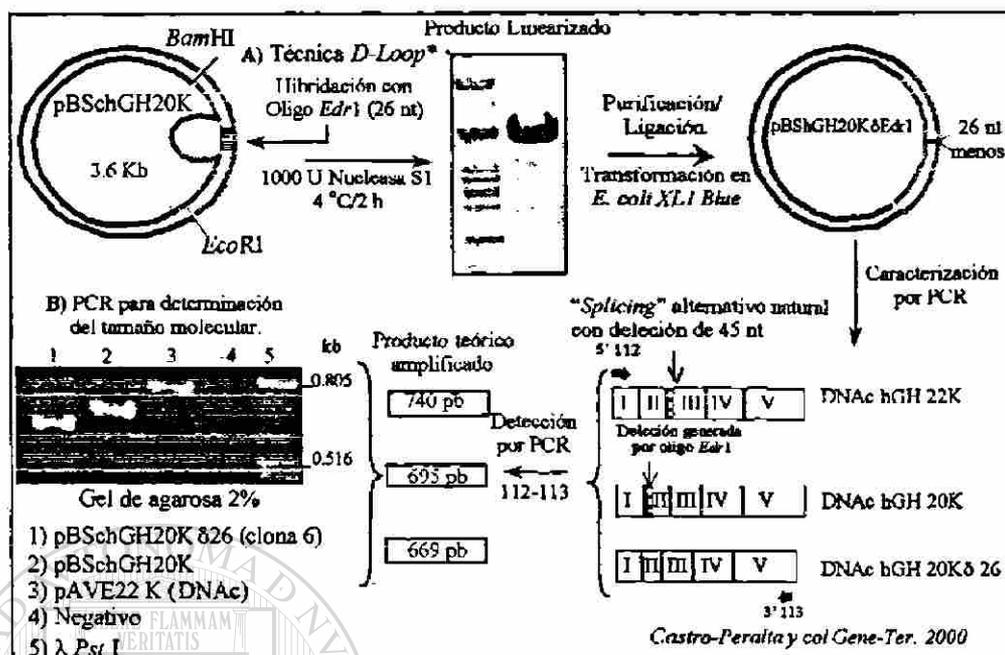


Figura 35. Caracterización por PCR de pBSchGH20KδEdr1. Una de las clonas derivada del producto de la digestión con nucleasa S1, ligación y transformación, se analizó por PCR con los oligonucleótidos 112-113. Como controles de tamaño se utilizaron a los vectores pAVEhGH22K que tiene clonado el DNAc de hGH 22K y pBSchGH20K 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 transcrito 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.

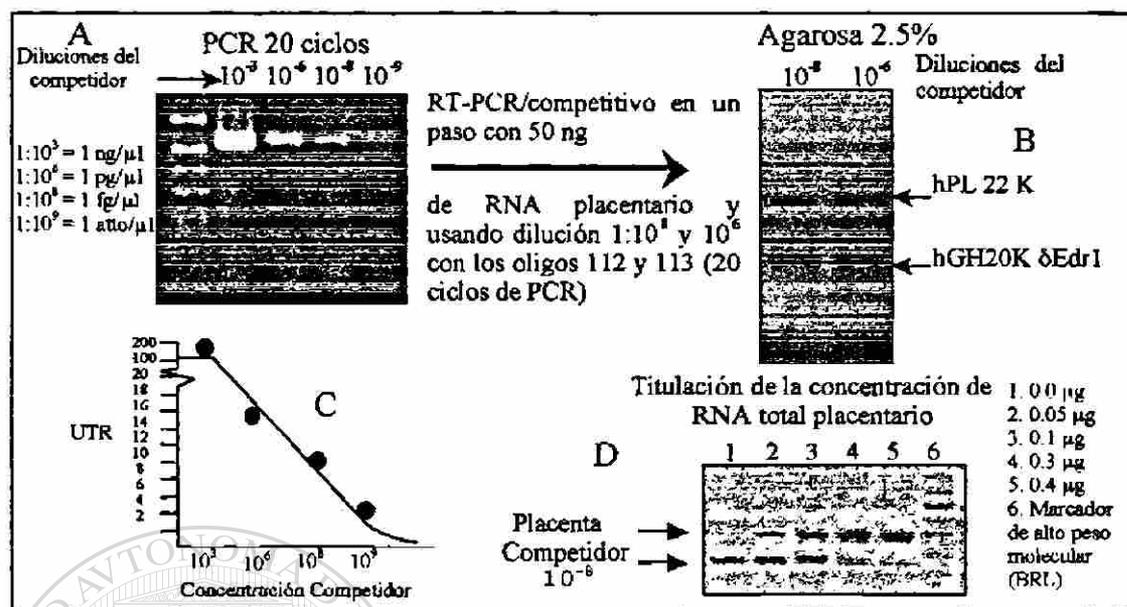


Figura 36. Análisis del competidor para el sistema RT-PCR competitivo. Para estudiar la concentración en que el competidor debía ser agregado a la PCR, A: primero se hicieron diluciones del competidor (en órdenes de 1000 veces) B: Gel de agarosa donde se separaron las bandas de los genes hPL a partir del RNA total de placenta humana, del competidor adicionado en dos diluciones al RNA comaplificados 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^{-6} ($1 \text{ pg}/\mu\text{l}$) 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 $0.1 \mu\text{g}$ 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-transfectaron las quimeras de las unidades transcripcionales de hGH-V o hPL-1/hGH-N en JEG-3 con p β actin 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 optimación 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

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.

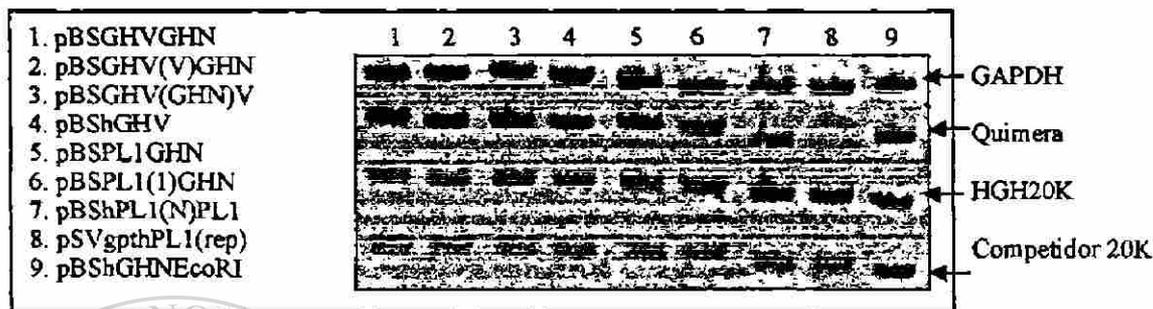


Figura 37. RT-PCR cuantitativo de quimeras hPL-1, hGH-V/hGHN. La figura muestra el patrón de bandas obtenidas al separarlas en gel de agarosa 2% producto de la RT-PCR cuantitativa. Las bandas de la parte superior a la inferior, corresponden a los productos: GAPDH, quimera hGH-hPL1/hGH-N, HGH 20 K derivada de p*lactinahGHN21K* y 20K Δ Edr1 (competidor adicionado). Las bandas fueron cuantificadas utilizando densitometría con el fotodocumentador *GelDoc 2000*.

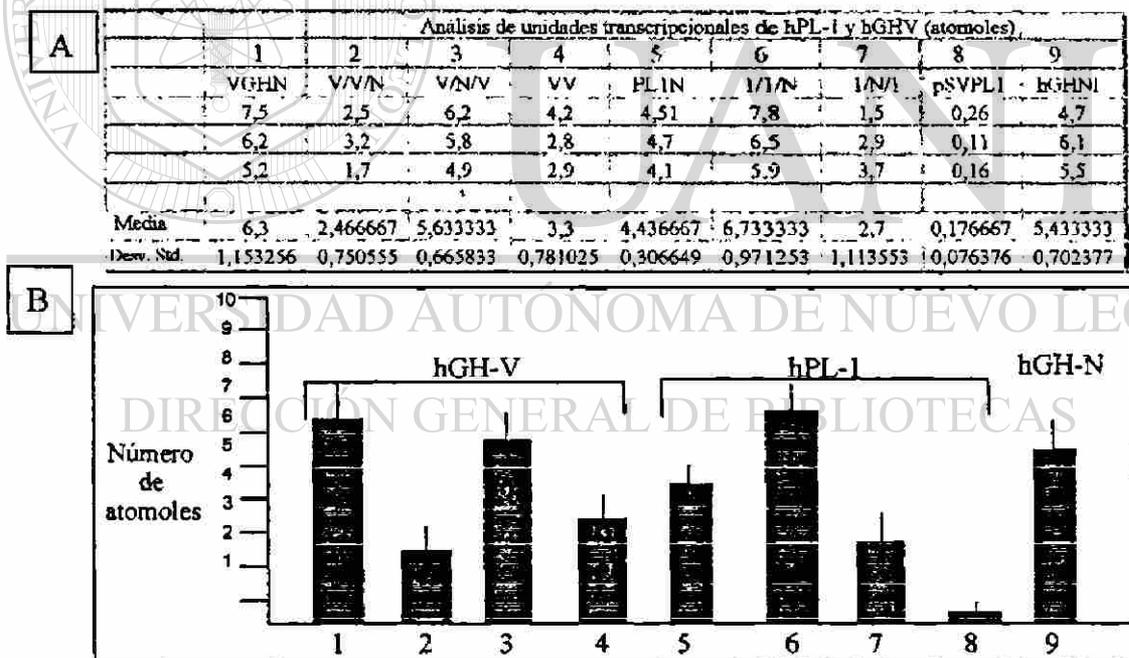


Figura 38. Cuantificación del número de atomoles A: Las bandas del gel anterior fueron cuantificadas por densitometría con los valores de transmitancia y se calculó el número de atomoles, al relacionar la transmitancia de las bandas de las quimeras contra la del competidor adicionado (de concentración conocida 10 atomoles, relación de cálculo presentada en *Material y Métodos*). B: Los valores se graficaron y los datos sugieren que la primer mitad de hGH-V no presenta efecto para activar la expresión de la quimera, mientras la primer 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 transfectamos 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).

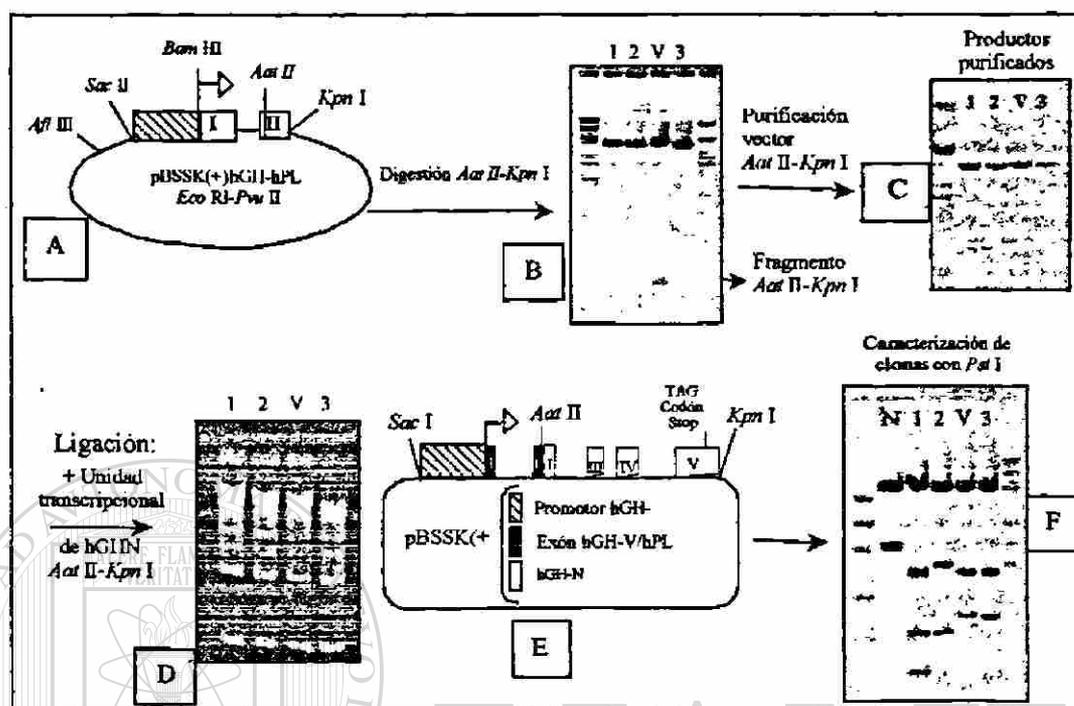


Figura 39. Construcción de vectores para estudiar el efecto sinérgico promotor-primer intrón. Se obtuvieron cuatro diferentes recombinantes a partir de las construcciones en pBlueScript hGH-hPL Eco-Pvu II (A), los cuales se digirieron con las enzimas de restricción *Aat* II y *Kpn* I (B). Los vectores 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-transfectaron con pCMVSPORTβGal 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.

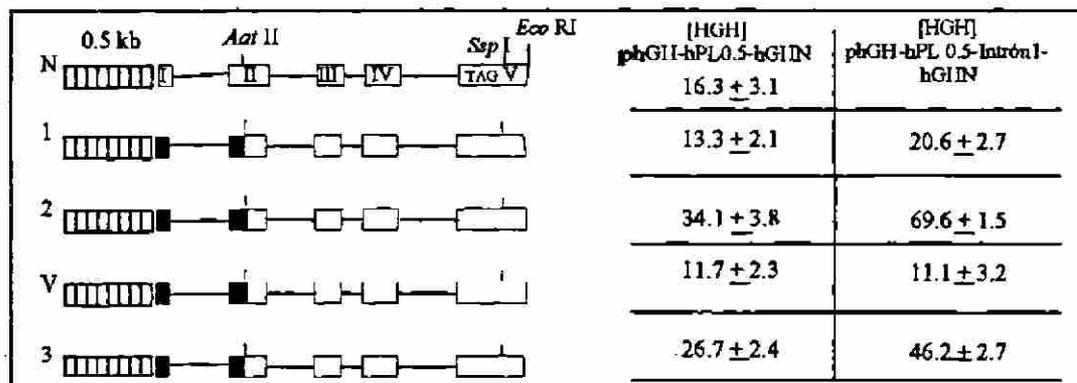


Figura 40. Concentración de HGH obtenida con quimeras de primer intrón. La tabla resume los obtenidos después de cuantificar la proteína reportera HGH. Es importante remarcar la activación positiva que sufren las construcciones con el primer intrón de cada gen hPL que retienen su promotor proximal, pero 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.

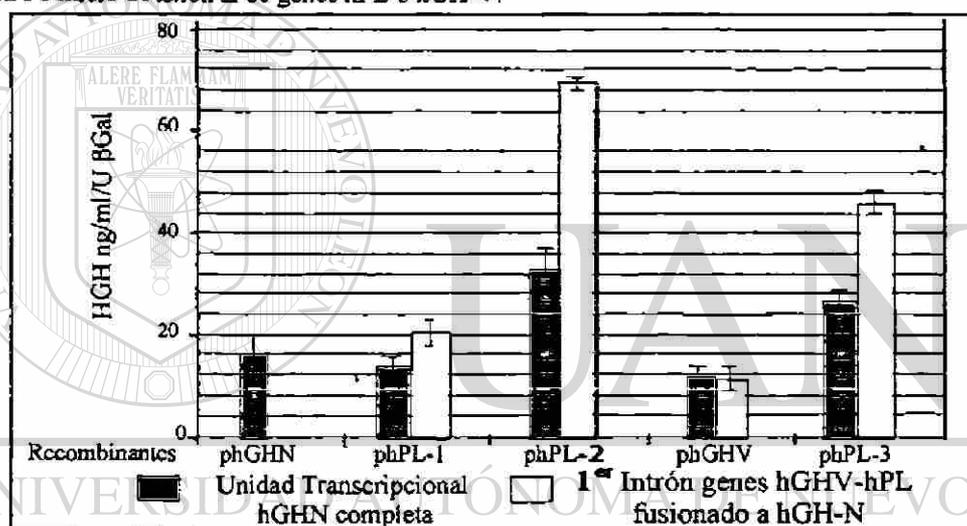


Figura 41. Efecto del primer intrón sobre el promotor de genes placentarios en células JEG-3. Los recombinantes obtenidos en el paso anterior, se analizaron en células de placenta por triplicado y los niveles de HGH demuestran que en el caso del primer intrón de los genes hPL-2 y hPL-3 combinado con 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 estudio 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 transfectado, pues algunos grupos han demostrado que HGH-V secretada *in vitro*, es inhibida por los niveles de glucosa (114).
- 3) Quizás las regiones cromatínicas del promotor de hGHV en el DNA genómico se encuentran hipermetiladas, lo que provoca que los factores transcripcionales no puedan acceder 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).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 susituye 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 deleción 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 estándar 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 DNAsa 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).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 Bacs 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

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 sincitiotrofoblasto 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 ò 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 debía 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 Weerdts y cols. en

2000 en el promotor largo de prolactina humano, 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 incluidas 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' rio 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 transcrito (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 *Scα* 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 fue 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 excluidos 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 favorecer 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 transfectado (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 sobreexpresado. Quizás el co-transfectar las construcciones 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 interactuar 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 transcritos 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 quien propuso que la inhabilidad del potenciador hPL-3 para activar en células GC, se debe que el factor GT-IIIC presente en 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 placentas de diferentes estadios derivadas del embarazo tanto normales como con anomalías patológicas como diabetes e hipertensión o bien, en neoplasmas 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 transcrito 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 transcritos o proteína (99). Por otro lado, Misra y cols en 1994 (33), detectaron por RT-PCR, procesamientos alternativos del transcrito 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).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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-I 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 β actina 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 oligonucleótidos 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*HI (+2) a *Eco*R1 (+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 influida 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 Liebhaber y cols. con quimeras de los genes hGH-N y prolactina (141), los análisis en el tercer intrón del gen GH de la trucha arcoiris (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

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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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 debilmente 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 primer 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 potenciadores. 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-Saldaña 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, Seeburg. 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., Thiehl, L.E., Deernick, T., Ellisman, M. and Karin, M. The pituitary-specific transcription factor GHF-1 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, Seeburg 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 B.E., 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. Kadenaga 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-I. 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 EE, 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., Abendsyein, 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, Nillson 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.

REFERENCIAS

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., Seeburg, 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 enhanson 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 Cartini, P.A. Repair of the chorionic somatomammotropin-A enhancer region reveals a novel functional element in the chorionic somatomammotropin-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 3th edition. Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kington, 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. Lipofectamine™ 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. Carrol, 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 and 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., Durvieux, M.S. and Rosseau, G.G. Sp1 can display GHF-1 from its distal binding site and stimulate transcription from the growth hormone gene promoter. 1990, *Molecular and Cellular Biology*. 10:1811-1814
117. Bradford AW, Walylyk Ch, Wasylyk 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 lactogene gen. 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, Leiding F, Baxter JD, Eberhardt 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. Woycik 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.

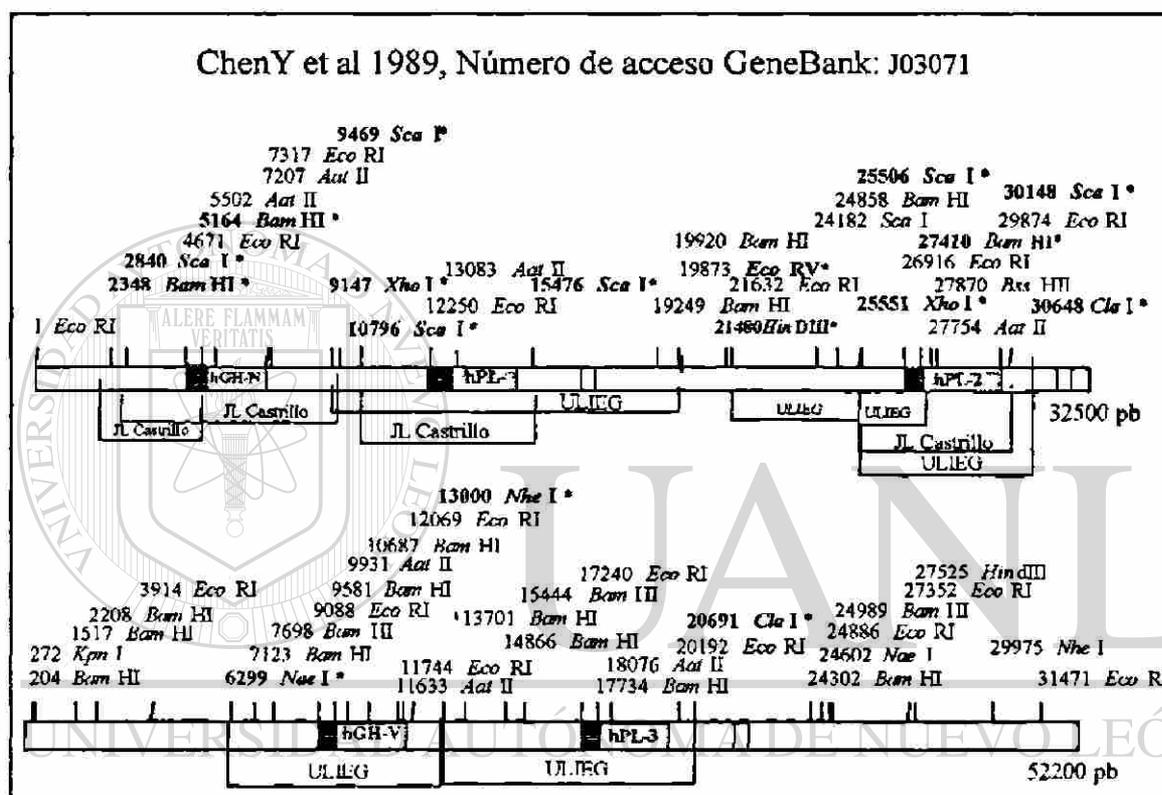
REFERENCIAS

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 somatomammotropin 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. Ramírez-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. Liebhaber 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 hipofisarias" 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 RESTRICCIÓN DE SECUENCIAS Y VECTORES UTILIZADOS Y QUE FUERON GENERADOS DURANTE ESTE TRABAJO.

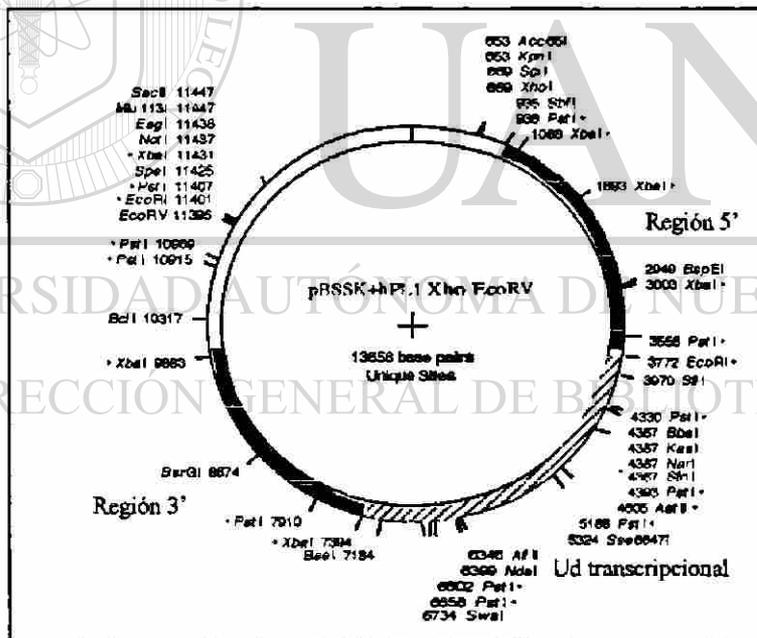
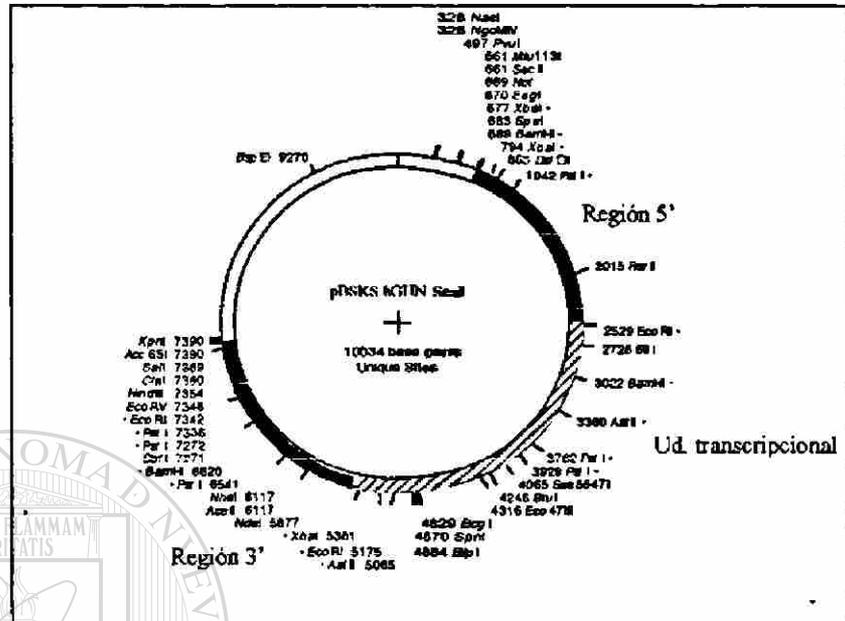
MAPA DE RESTRICCIÓN CON LAS ENZIMAS DE INTERÉS DEL LOCUS DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO



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 conteniendo cada gen así como sus regiones 5' y 3' flanqueantes a partir de los cósmidos, en los vectores pBlueScript SK(+) o pBlueScript KS(-).

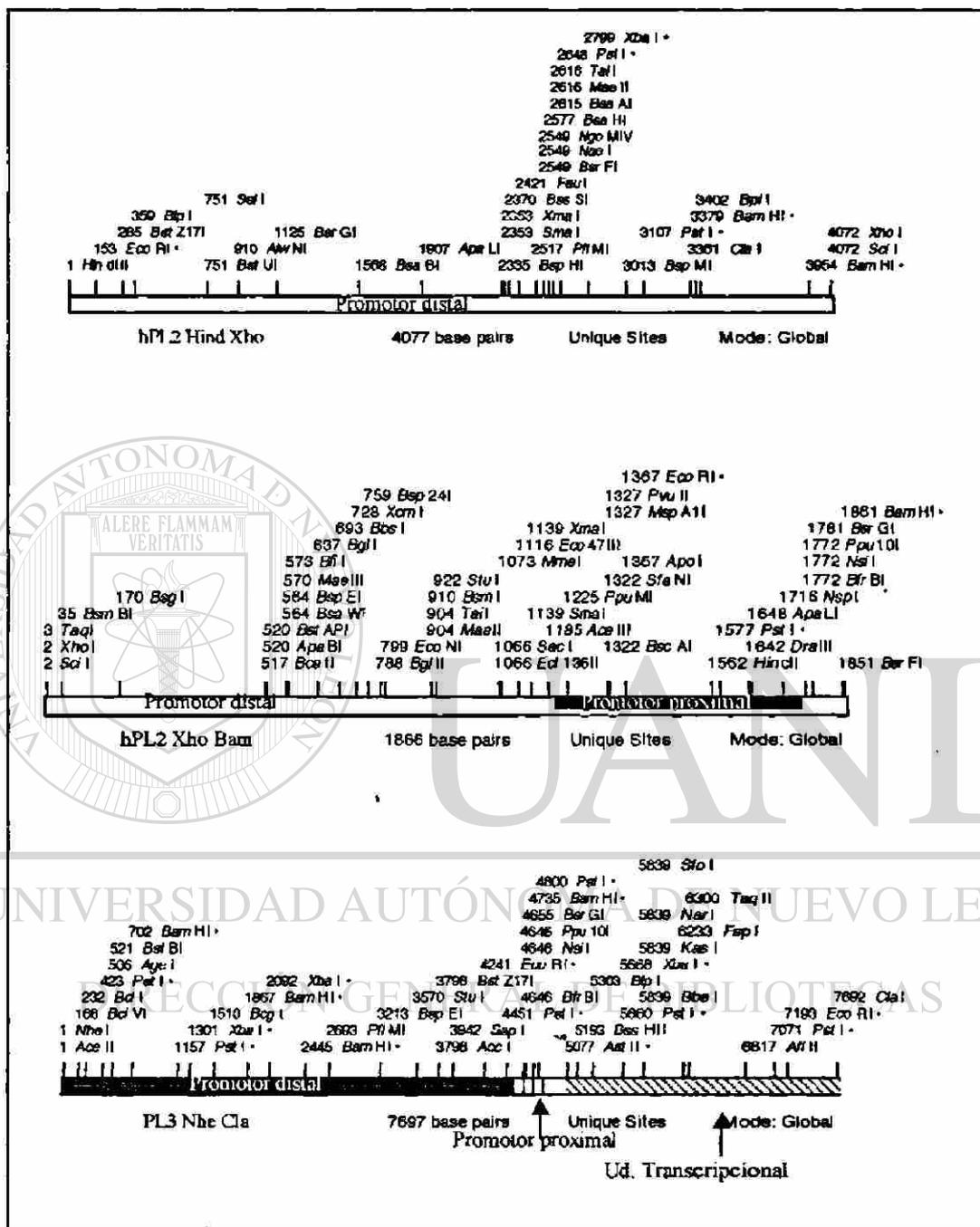
- Promotor proximal
- Unidad transcripcional
- Región potenciadora

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



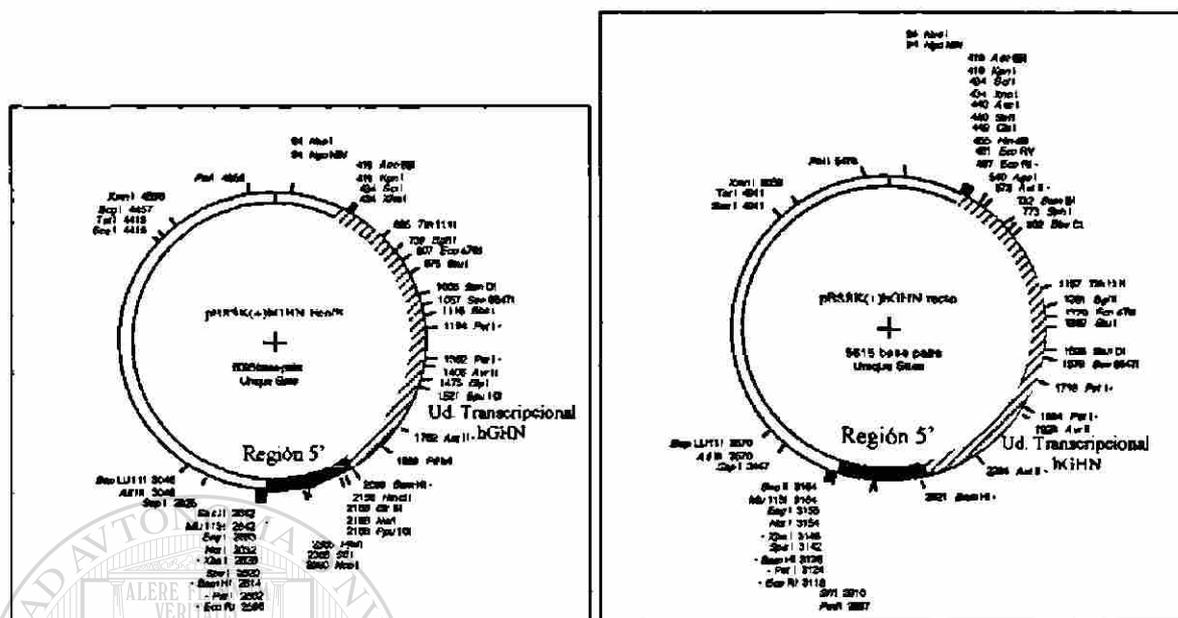
Secuencias clonadas de hGH-N y hPL-1 a partir de los cósmidos en pBlueScript KS(-) y pBlueScript SK(+), respectivamente

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



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

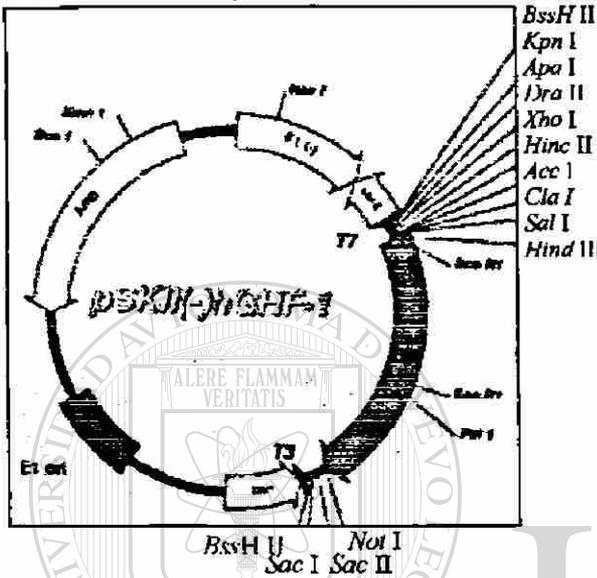
Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales



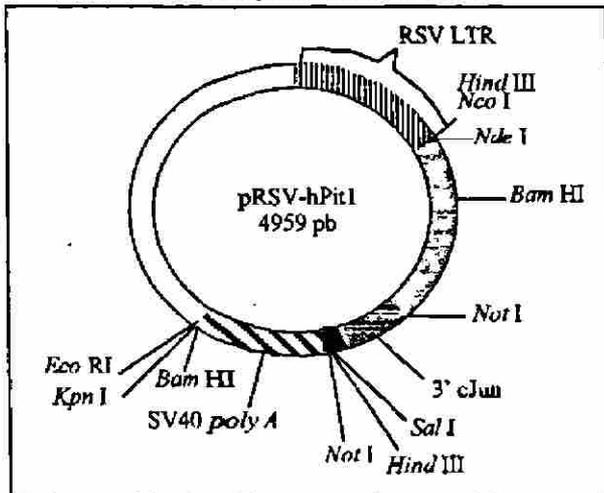
Mapas de los vectores pBlueScript conteniendo las regiones clonadas *EcoRI*-*SspI* de hGH-N a la izquierda y el fragmento *EcoRI* a la derecha. El vector pBShGHN *EcoRI* fue utilizado para subclonar la unidad transcripcional completa de hGH-N en los vectores pBlueScript SK + con la versión promotora de 500 pb de los genes hGH-hPL. En las construcciones 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 derivó el vector pβactinahGHN21K usado para evaluar eficiencia de transfección en el RT-PCR cuantitativo y el mismo vector *Eco-SspI* 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).

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

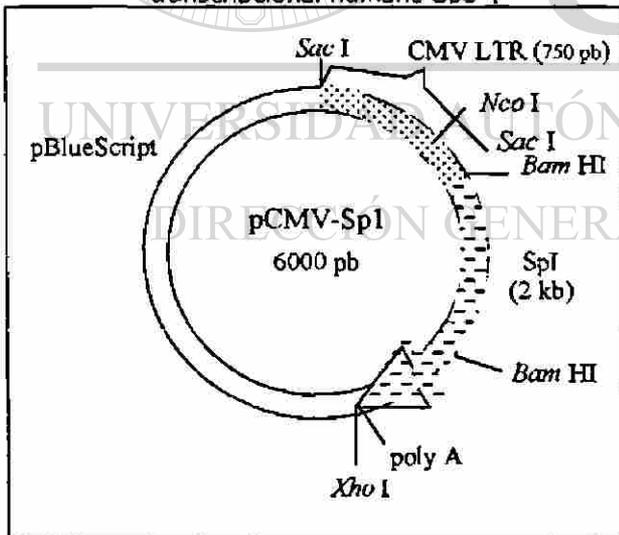
Mapa del vector conteniendo la secuencia del factor transcripcional humano hPit-1



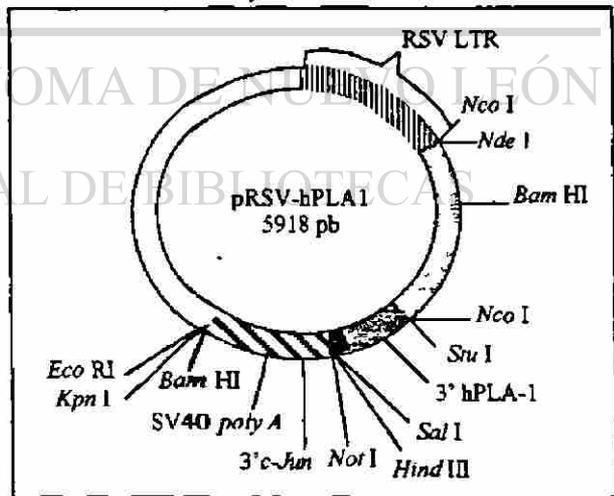
Mapa del vector expresor del factor transcripcional humano Pit-1



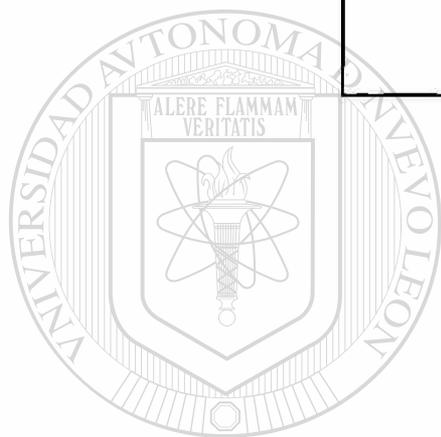
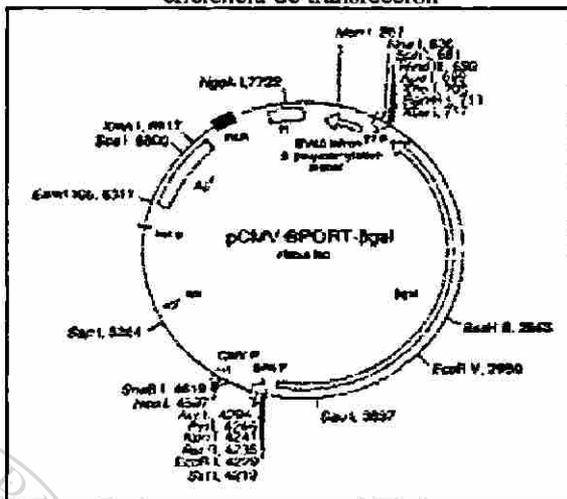
Mapa del vector expresor del factor transcripcional humano Sp1



Mapa del vector expresor del factor transcripcional humano PLA-1



Mapa del vector utilizado para evaluar eficiencia de transfección



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 TRANSCRIPCIÓN EN JEG-3

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hGHN	3	25,78	8,59667	4,605233		
AMPc	3	157,57	52,52333	4,731533		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	2895,648	1	2895,648	820,2606	1,54E-05	7,70865
Within Gro	18,67373	4	4,668433			
Total	2914,32	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hGHN	3	25,78	8,59667	4,605233		
Etorbol	3	70,55	23,51667	6,748133		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	334,3574	1	334,3574	58,9105	0,001549	7,70865
Within Gro	22,70273	4	5,675683			
Total	357,0601	5				

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hGHN	3	25,78	8,59667	4,605233		
AcRetinoc	3	198,42	66,14	6,0624		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	4968,579	1	4968,579	931,5242	8,87E-06	7,70865
Within Gro	21,33527	4	5,333817			
Total	4989,915	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hGHN	3	25,78	8,59667	4,605233		
T3	3	17,29	5,763333	4,432433		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	11,95682	1	11,95682	2,645998	0,179139	7,70865
Within Gro	18,07533	4	4,518833			
Total	30,03215	5				

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL1	3	55,658	18,552	6,238477		
AMPc	3	86,77	28,92333	14,10293		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	281,7268	1	281,7268	27,80983	0,000241	7,70865
Within Gro	40,68282	4	10,17071			
Total	322,4097	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL1	3	55,658	18,552	6,238477		
Etorbol	3	84,53	28,17667	6,082533		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	138,9513	1	138,9513	22,55518	0,000976	7,70865
Within Gro	24,84202	4	6,190505			
Total	163,5933	5				

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL1	3	55,658	18,552	6,238477		
AR	3	141,55	47,18333	21,89213		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	1229,63	1	1229,63	87,11323	0,000734	7,70865
Within Gro	58,46122	4	14,61531			
Total	1288,091	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL1	3	55,658	18,552	6,238477		
T3	3	112,93	37,64333	17,46583		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	548,7185	1	548,7185	46,12819	0,002454	7,70865
Within Gro	47,40862	4	11,85216			
Total	594,1271	5				

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL2	3	74,258	24,75267	2,174401		
AMPc	3	189,1	63,03333	5,489433		
ANOVA						
Source of Vari	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		
Etorbol	3	144,15	48,05	22,2313		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	814,1486	1	814,1486	68,7179	0,001223	7,70865
Within Gro	48,8114	4	12,20285			
Total	862,96	5				

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL2	3	74,258	24,75267	2,174401		
AR	3	315,92	105,3067	40,70263		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	9733,42	1	9733,42	454,0156	2,87E-05	7,70865
Within Gro	85,75407	4	21,43852			
Total	9819,174	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL2	3	74,258	24,75267	2,174401		
T3	3	201,45	67,15	15,0968		
ANOVA						
Source of Vari	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						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	709,5938	1	709,5938	68,81788	0,001153	7,70865
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						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	108,8004	1	108,8004	9,269734	0,038229	7,70865
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						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	1147,613	1	1147,613	201,1933	0,000143	7,70865
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						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	96,4806	1	96,4806	21,23845	0,009967	7,70865
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		
Etiorbol	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 TRANSCRIPCIÓN 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	8,802022		

ANOVA						
Source of Variat	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	3169,141	1	3169,141	574,2123	3,47E-07	5,987374
Within Gro	33,11467	6	5,519111			
Total	3202,256	7				

SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
hGHN	3	56,07	18,69	3,2643	
Eforbol	3	87,683	29,22767	3,286983	

ANOVA						
Source of Variat	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	286,607	1	286,607	68,107	0,000718	7,70885
Within Gro	13,10257	4	3,275642			
Total	301,7095	5				

SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
hGHN	3	56,07	18,69	3,2643	
T3	3	23,42	7,806667	3,605033	

ANOVA						
Source of Variat	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Gro	177,6704	1	177,6704	51,72858	0,00188	7,70885
Within Group	13,73867	4	3,434667			
Total	191,4091	5				

SUMMARY					
Groups	Count	Sum	Average	Variance	
hGHN	3	56,07	18,69	3,2643	
AR	3	118,13	39,37667	10,76343	

ANOVA						
Source of Variat	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Gro	641,9073	1	641,9073	91,51974	0,000667	7,70885
Within Group	28,05547	4	7,013867			
Total	669,9627	5				

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



ANOVA DEL EFECTO DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN JEG-3

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hGHN	3	55,9	18,63333	4,370533		
hPL1	3	328,01	109,3367	53,63263		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	12340,64	1	12340,64	424,064	3,28E-06	7,70865
Within Gro	116,4063	4	29,10158			
Total	12457,05	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hGHN	3	55,9	18,63333	4,370533		
hPLA1	3	167,38	55,79333	37,53443		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	2071,299	1	2071,298	98,65694	0,000575	7,70865
Within Gro	83,90663	4	20,97666			
Total	2155,108	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hGHN	3	55,9	18,63333	4,370533		
SP1	3	110,19	36,73	63,4732		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	967,604	1	967,604	19,69064	0,011367	7,70865
Within Gro	135,0075	4	33,92107			
Total	1102,611	5				

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL1	3	37,13	12,37667	11,26013		
PL1	3	205,03	68,34333	66,26663		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	4698,402	1	4698,402	121,2072	0,000367	7,70865
Within Gro	185,0535	4	46,26338			
Total	4883,455	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL1	3	37,13	12,37667	11,26013		
PLA	3	354,71	118,2367	177,713		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	18809,51	1	18809,51	177,9037	0,000183	7,70865
Within Gro	377,9463	4	94,48658			
Total	19187,46	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL1	3	37,13	12,37667	11,26013		
SP1	3	58,77	19,59	13,5772		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	76,04827	1	76,04827	6,284754	0,066273	7,70865
Within Gro	49,67467	4	12,41867			
Total	125,7229	5				

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL2	3	82,41	27,47	17,5693		
PL1	3	325,5	108,5	111,5239		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	9648,791	1	9648,791	152,5842	0,000247	7,70865
Within Gro	258,1664	4	64,5416			
Total	10106,96	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL2	3	82,41	27,47	17,5693		
PLA1	3	368,62	122,8733	125,4804		
ANOVA						
Source of Vari	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	66,52487			
Total	13918,78	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL2	3	82,41	27,47	17,5693		
SP1	3	129,02	43,00667	101,6576		
ANOVA						
Source of Vari	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			

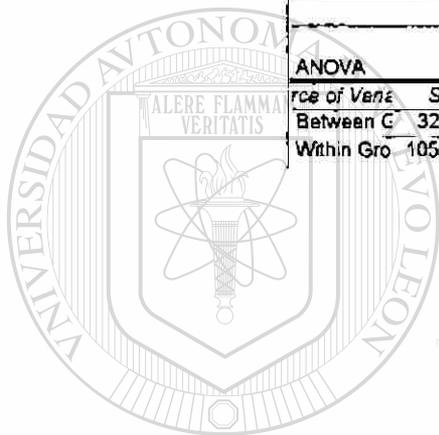
Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hGHV	3	24,78	8,26	7,7596		
PL1	3	55,45	18,48333	12,46203		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	158,6771	1	158,6771	15,50044	0,017002	7,70865
Within Gro	40,48327	4	10,12082			
Total	199,1603	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hGHV	3	24,78	8,26	7,7596		
hPLA	3	67,69	22,56333	41,45683		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	311,184	1	311,184	12,64579	0,023686	7,70865
Within Gro	98,43067	4	24,60772			
Total	409,6149	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hGHV	3	24,78	8,26	7,7596		
SP1	3	113,05	37,68333	51,07663		
ANOVA						
Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	1296,569	1	1296,569	44,14133	0,002064	7,70865
Within Gro	117,6765	4	29,41912			
Total	1414,245	5				

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

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL3	3	56,38	18,79333	9,038633		
PR	3	119,12	39,70667	57,24003		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	656,0513	1	656,0513	18,79676	0,011252	7,70865
Within Gro	132,5573	4	33,13933			
Total	788,6086	5				

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL3	3	56,38	18,79333	9,038633		
hPLA	3	232,95	77,65	89,7484		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	5196,161	1	5196,161	105,1862	0,000509	7,70865
Within Gro	197,5741	4	49,39352			
Total	5393,735	5				

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL3	3	56,38	18,79333	9,038633		
Sp1	3	70,42	23,47333	43,71403		
ANOVA						
Source of Variance	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	32,8536	1	32,8536	1,245571	0,326918	7,70865
Within Gro	105,5053	4	26,37633			



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

ANOVA: EFECTO DE POTENCIADORES EN JEG-3

ANOVA: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hGHN	3	49,19	16,39667	10,57223		
hGHNhPL1	3	73,05	24,35	24,3781		
ANOVA						
Source of Variat	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Gr	94,883267	1	94,883267	5,4296058	0,0802388	7,7086497
Within Gro	69,900667	4	17,475167			
Total	164,78393	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
GHN	3	49,19	16,39667	10,57223		
GHNhPL2	3	73,77	24,59	36,6748		
ANOVA						
Source of Variat	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Gr	100,6961	1	100,6961	4,262535	0,107889	7,70865
Within Gro	94,49407	4	23,62352			
Total	195,1901	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
GHN	3	49,19	16,39667	10,57223		
GHNhPL3	3	1700,61	566,87	174,0293		
ANOVA						
Source of Variat	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Gr	454531,3	1	454531,3	4924,486	2,47E-07	7,70865
Within Gro	369,2011	4	92,30027			
Total	454900,5	5				

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
hPL1	3	33,87	11,29	5,7973		
PL1GHPL1	3	37,11	12,37	6,3729		
ANOVA						
Source of Variat	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Gr	1,7496	1	1,7496	0,287522	0,6202432	7,7086497
Within Gro	24,3404	4	6,0851			
Total	26,09	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
PL1GHN	3	33,87	11,29	5,7973		
PL1GHhPL2	3	77,76	25,92	27,1467		
ANOVA						
Source of Variat	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Gr	321,05535	1	321,05535	19,490976	0,0115569	7,7086497
Within Gro	65,888	4	16,472			
Total	386,94335	5				
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
PL1GHN	3	33,87	11,29	5,7973		
PL1NPL3	3	1144,2	381,4	298,29		
ANOVA						
Source of Variat	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Gr	205472,1	1	205472,1	1351,402	3,27E-06	7,70865
Within Gro	608,1746	4	152,0437			
Total	206080,3	5				

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
PL2GHN	3	87,44	29,14667	11,44053		
PL2GHNP	3	97,09	32,36333	86,68003		
ANOVA						
Source of Variat	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Gr	15,52042	1	15,52042	0,310035	0,607341	7,70865
Within Gro	200,2411	4	50,06028			
Total	215,7616	5				

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
GHVGHN	3	43,91	14,63667	18,74303		
GHVGHhPL	3	57,962	19,32067	43,754761		
ANOVA						
Source of Variat	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Gr	32,909784	1	32,909784	1,0531502	0,3627865	7,7086497
Within Gro	124,99559	4	31,248897			
Total	157,90537	5				

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
PL2GH	3	87,44	29,14667	11,440533		
PL2GHPL2	3	187,08	62,36	81,6461		
ANOVA						
Source of Variat	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Gr	1634,6883	1	1634,6883	35,555396	0,0039719	7,7086497
Within Gro	186,15127	4	46,538317			
Total	1840,8415	5				

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
GHVGHN	3	43,91	14,63667	18,743033		
GHVGHhPL	3	144,37	48,123333	34,592033		
ANOVA						
Source of Variat	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Group	1682,0353	1	1682,0353	63,074273	0,0013611	7,7086497
Within Groups	106,67013	4	26,667533			
Total	1788,7054	5				

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

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
PL2GHIN	3	87.44	29.146667	11.440533		
PL2GHNPL3	3	2006.54	668.84667	449.32253		
ANOVA						
Source of Variati	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Gr	613824.14	1	613824.14	2664.3808	8.431E-07	7.7086497
Within Gr	921.52613	4	230.38153			
Total	614745.66	5				

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
GHVGHIN	3	43.91	14.636667	18.743033		
GHVGHNPL3	3	1256.17	418.72333	473.66563		
ANOVA						
Source of Variati	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Group	244929.05	1	244929.05	994.82023	6.022E-06	7.7086497
Within Groups	984.81733	4	246.20433			
Total	245913.87	5				

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
PL3GHIN	3	64.48	21.493333	11.784233		
PL3GHNPL1	3	74.08	24.693333	33.376833		
ANOVA						
Source of Variati	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Group	15.36	1	15.36	0.6802365	0.4558482	7.7086497
Within Groups	90.321533	4	22.580383			
Total	105.68153	5				

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
PL3GHIN	3	64.48	21.493333	11.784233		
PL3GHINPL3	3	1728.94	576.31333	460.80763		
ANOVA						
Source of Variati	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Group	463.93785	1	463.93785	1954.066	1.566E-06	7.7086497
Within Groups	945.18373	4	236.29593			
Total	1409.12158	5				

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
PL3GHIN	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	F crit
Between Group	3336.57	1	3336.57	58.399044	0.0015751	7.7086497
Within Groups	228.53593	4	57.133983			
Total	3565.106	5				

UNIVERSIDAD DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANOVA: EFECTO DE LA PRIMER O SEGUNDA MITAD DE hPL-1 y hGH-V EN LOS NIVELES DE EXPRESION (media de las unidades de transmitancia).

Anova: Single Factor

Groups	Count	Sum	Average	Variance
PLIGHN	3	13,31	4,436667	0,094033
11N	3	20,2	6,733333	0,943333
1N1	3	8,1	2,7	1,24
pSVhPL1	3	0,53	0,176667	0,005833

Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	60,04737	3	20,01579	40,32198	3,55E-05	4,06618
Within Gro	4,5064	8	0,5708			
Total	73,61377	11				

Anova: Single Factor

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

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	5,893333	8	0,736667			
Total	36,1225	11				

Anova: Single Factor

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

Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	7,912017	1	7,912017	15,26404	0,017458	7,70865
Within Gro	2,074733	4	0,518683			
Total	9,98675	5				

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
VGHN	3	18,9	6,3	1,33
VVN	3	7,4	2,466667	0,563333

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	3,766667	4	0,941667			
Total	25,82833	5				

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
1N1	3	8,1	2,7	1,24
1N	3	13,31	4,436667	0,094033

Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	4,524017	1	4,524017	6,782484	0,056776	7,70865
Within Gro	2,680667	4	0,670167			
Total	7,192083	5				

SUMMARY

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

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			
Total	4,213333	5				

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
VVN	3	7,4	2,466667	0,563333
VV	3	9,9	3,3	0,81

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			
Total	3,388333	5				

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
VNV	3	16,8	5,633333	0,443333
VV	3	9,9	3,3	0,81

Source of Vari	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	8,166667	1	8,166667	15,50833	0,018991	7,70865
Within Gro	2,106667	4	0,526667			
Total	10,27333	5				

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PARTICIPACION DEL PRIMER INTRON EN LOS NIVELES DE TRANSCRIPCION.

(Media de la concentración de HGH)

[TIGI] para análisis del primer intrón hGH-hPL

GHV0.5GH	14,01	20,1	15,08
PL1	12,63	11,35	15,7
PL1GHN	20,1	23,6	18,3
PL2	33,5	30,6	38,26
PL2 1GH	69,2	71,2	68,2
GHV	14,45	10,96	9,88
3HV 1GH	14,87	9,17	9,4
PL3	26,80	24,26	28,27
PL3 1GH	46,59	43,36	48,81
Average		Dev St	
GHV0.5GH	16,39667	3,251497	
PL1GHN	13,22667	2,235539	
PL1GHN	20,66667	2,695057	
PL2GHN	34,12	3,867454	
PL2 1GHN	69,53333	1,527525	
GHVGHN	11,76333	2,388563	
GHV 1GH	11,14667	3,226551	
PL3GHN	26,70667	2,300346	
PL3 1GHN	46,25333	2,740533	

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
PL1GHN	3	39,68	13,22667	4,9976333		
PL2 1GHN	3	102,36	34,12	14,9572		
ANOVA						
Source of Variat	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Gr	654,79707	1	654,79707	65,627916	0,0012621	7,7086497
Within Gro	39,909667	4	9,9774167			
Total	694,70673	5				

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
GHVhGHN	3	35,29	11,763333	5,7052333		
GHV1hGH	3	33,44	11,146667	10,410633		
ANOVA						
Source of Variat	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Gr	0,5704167	1	0,5704167	0,0707894	0,80133421	7,7086497
Within Gro	32,231735	4	8,0579333			
Total	32,80215	5				

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
PL2GHN	3	102,36	34,12	14,9572		
PL2 1GHN	3	208,6	69,53333	2,333333		
ANOVA						
Source of Variat	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between G	1881,156	1	1881,156	217,5838	0,000123	7,70865
Within Gro	34,58107	4	8,645267			
Total	1915,737	5				

SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
PL3GHN	3	80,12	26,70667	5,571233		
PL3 1GHN	3	138,76	46,25333	7,510633		
ANOVA						
Source of Variat	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	6,540933			
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) hGHN 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	ggTGACtcga
Epstein-Barr virus transcription factor R	63 - 83	(-)	1.000	0.830	ttgaccagattatGGTGac
Muscle Initiator Sequence	99 - 119	(+)	0.921	0.863	aagggggaCACTccctgcc
upstream stimulating factor	130 - 137	(+)	1.000	0.997	cCACGigt
Muscle Initiator Sequence	160 - 180	(+)	1.000	0.893	gagcctegoCACcctgtgtc
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	ccCCAAcTggggcc
NF-kappaB	312 - 321	(+)	0.904	0.882	GGGrgtcc
signal transducers and activators of transcription	336 - 344	(+)	1.000	0.882	ttggaGGAA
octamer-binding factor 1	407 - 420	(+)	0.944	0.908	aaaartrAATt
nuclear factor 1	485 - 502	(+)	1.000	0.947	ttTTCtcaaggcaacc
apolipoprotein AI regulatory protein 1	640 - 655	(+)	0.826	0.842	tgactCCtGaccca
Retinoic acid receptor, member of nuclear receptors	644 - 653	(+)	0.897	0.961	aggTCAGgag
CRE-binding protein 1/c-Jun heterodimer	648 - 655	(+)	0.769	0.885	tgACCtca
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	656 - 665	(+)	0.871	0.851	agtATCCac
MyT1 zinc finger transcription factor involved in primary neurogenesis	681 - 691	(+)	1.000	0.982	ccnAAGTtgg
CCAAT/enhancer binding protein beta	738 - 751	(+)	1.000	0.950	aaagacGCAAtgt
cAMP-response element binding protein	739 - 750	(+)	1.000	0.916	aaTGACgcaatg
upstream stimulating factor	870 - 879	(-)	0.863	0.930	gcCACTgtc
Nuclear factor of activated T-cells	916 - 927	(+)	1.000	0.970	aaactgTAAAngc
nuclear factor 1	1043 -	(-)	1.000	0.946	ccTTGtCaaacagagcaag

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	atcaccgaGGTCag
c-Ets-1 binding site	1357 - 1371	(+)	1.000	0.899	tgacGAAAgagactca
c-Ets-1 binding site	1425 - 1439	(+)	1.000	0.908	ggcGGAAAgagctgt
AP1 binding site	1634 - 1642	(-)	1.000	0.995	cTGAGTCAg
octamer-binding factor 1	1800 - 1813	(+)	1.000	0.909	gagaaigggATGTg
upstream stimulating factor	1899 - 1906	(+)	1.000	0.997	acACGTca
cAMP-responsive element binding protein	1972 - 1983	(+)	1.000	0.927	caggTcACagtg
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	aaATTCat
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	2077 - 2086	(-)	0.871	0.953	nttAIGCat
cellular and viral TATA box elements	2132 - 2146	(+)	1.000	0.990	gtzIAAAaaggccc
zinc finger with interaction domain	2156 - 2168	(+)	1.000	0.846	caTCTCaa ggatc
nuclear factor YY1 binding factor	2184 - 2197	(+)	0.777	0.828	ccgaACCACTcaggA
cellular and viral CCAAT box	2184 - 2195	(+)	0.826	0.913	ccgnaCTACca
hepatic transcriptional initiator element	2186 - 2201	(-)	0.852	0.902	ggacccctgagTGTGtc

A total of 183 matches were found in 1 sequences!

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

octamer-binding factor 1	1650 - 1664	(+)	1.000	0.832	agagatcAAATct
c-Ets-1 binding site	1712 - 1726	(+)	1.000	0.921	ggatcGAAgcgctgt
VDR/RXR heterodimer site	1821 - 1835	(-)	0.833	0.875	aggcactcCtCtKta.g
Retinoic acid receptor, member of nuclear receptors	1826 - 1835	(-)	1.000	0.977	atgTCACgg
NF-kappaB (p50)	1837 - 1846	(+)	1.000	0.927	cttKkagcc
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	ctgcTGACgact
POU-factor Oct-1	1984 - 1998	(-)	1.000	0.909	cctgAAIccacttc
AP1 binding site	2000 - 2008	(-)	0.917	0.961	atGATTCag
cAMP-responsive element binding protein	2290 - 2301	(+)	1.000	0.927	ctggTGACggg
upstream stimulating factor	2339 - 2346	(-)	0.875	0.933	aCACATgc
GC box elements	2344 - 2357	(+)	0.876	0.909	tgatGGAGgagctt
zinc finger with interaction domain	2247 - 2259	(+)	1.000	0.894	cttGCTCca gactc
transcriptional repressor CDP	2359 - 2373	(+)	0.795	0.877	caaatATCCatag
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	2361 - 2370	(+)	0.871	0.966	aatATCCat
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	2395 - 2404	(-)	0.871	0.953	attATGCat
cellular and viral TATA box elements	2451 - 2465	(+)	1.000	0.990	gtatAAAaagggccc

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.	Sequence
NF-kappaB	111 - 122	(+)	0.780	0.836	atcGtACTtc.ca
NF-kappaB	132 - 141	(+)	0.904	0.923	cttKkaniicc
PPAR/RXR heterodimers	141 - 160	(+)	1.000	0.729	caagtciaatcAAAAtca
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	174 - 183	(-)	1.000	0.876	aatcATTCCat
CCAAT/enhancer binding protein beta	194 - 207	(-)	1.000	0.960	gccttgaGCAAtgg
activator protein 1 AP-1	341 - 351	(-)	1.000	1.000	ggTGACtcags

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

upstream stimulating factor	413 - 420	(+)	0.875	0.935	cCACATgt
signal transducer and activator of transcription 1	414 - 434	(-)	1.000	0.760	ggtttctgcccGGAAcattg g
NF-kappaB	594 - 603	(+)	0.904	0.882	CCCTGgcgcc
activator protein 4	607 - 616	(-)	1.000	0.985	gtCAUcAgg
Se-Cys tRNA gene transcription activating factor	619 - 640	(-)	1.000	0.780	ctccCXXAaccatctctcc a
VDR/RXR heterodimer site	724 - 738	(+)	0.840	0.901	aggggana GTGGrta
activator protein 1	734 - 744	(+)	1.000	0.967	ggTtGAtccac
Progesterone receptor binding site	816 - 842	(-)	1.000	0.831	ccactgtcgtgagcTGTtct ccaggc
cAMP-response element binding protein	893 - 904	(+)	1.000	0.882	aaTGACygcaga
Androgene receptor binding site	903 - 929	(+)	0.750	0.806	gaanaagca gctctgTITt tgctctg
octamer-binding factor 1	954 - 967	(-)	0.807	0.820	agGATCctaatgt
c-Ets-1 binding site	955 - 969	(-)	0.881	0.907	ataGGATgtgaatgc
PPAR/RXR heterodimers	961 - 980	(+)	0.807	0.696	acatccagaccACAAGgg t
nuclear factor 1	990 - 1007	(-)	1.000	0.946	tgtTGGCcaaccacattg
CCAAT/enhancer binding protein beta	1099 - 1112	(-)	0.985	0.944	tggtgtGAAAta
serum response factor	1133 - 1146	(-)	0.847	0.870	ccCLAGngatgcca
Retinoic acid receptor, member of nuclear receptors	1157 - 1166	(-)	1.000	0.984	aggTCACaag
RAR-related orphan receptor alpha1	1160 - 1172	(-)	1.000	0.943	actggaGtTLa c
upstream stimulating factor	1279 - 1288	(+)	0.863	0.915	gcCACTgagc
CCAAT/enhancer binding protein beta	1302 - 1315	(+)	0.985	0.952	gaattgaGAAAga
Androgene receptor binding site	1306 - 1332	(-)	1.000	0.911	ccataagggccagatTGTt ttctca
serum response factor	1321 - 1334	(-)	1.000	0.831	ttLCATaagzcca
VDR/RXR heterodimer site	1457 - 1471	(+)	1.000	0.855	aggccaggtaATctgtg
cAMP-responsive element binding protein 1	1474 - 1481	(+)	0.766	0.801	taACCTaa
CRE-binding protein 1/c-Jun heterodimer	1479 - 1486	(-)	0.763	0.882	tgACtTta
Avian C-type LTR TATA box	1531 - 1540	(-)	0.812	0.833	cTTTtTAAgt
MyT1 zinc finger transcription factor involved in primary neurogenesis	1543 - 1553	(-)	1.000	0.894	gctAAGTttg
B-cell-specific activating protein	1587 - 1614	(+)	0.842	0.746	actaggagggtgatTCCt gtaatcnc
growth factor independence 1 zinc finger protein acts as transcriptional repressor	1601 - 1624	(+)	1.000	0.936	gggggggAATCactgg accag
X-box binding protein/RXR	1632 - 1648	(-)	1.000	0.890	ttgcctcaatGCAact
nuclear factor 1	1997 - 2014	(+)	1.000	0.947	ttTGGCtaaccgaacc
activator protein 2	2048 - 2059	(+)	0.857	0.892	caCCC Tcggag
apolipoprotein AI regulatory protein 1	2148 - 2163	(+)	0.826	0.842	tgactCCTTactca
Retinoic acid receptor, member of nuclear receptors	2152 - 2161	(-)	0.897	0.961	aggTCAgag
CRE-binding protein 1/c-Jun	2156 - 2163	(+)	0.769	0.885	tgACCTaa

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	agtgATCCac
tumor suppressor p53	2205 - 2224	(-)	1.000	0.666	aggCATGtggaacatgacct
tumor suppressor p53	2215 - 2234	(+)	1.000	0.662	gaccATGgacggctggagc
Se-Cys tRNA gene transcription activating factor	2243 - 2264	(-)	1.000	0.777	tcttCCCAcaatggttcattta
CCAAT/enhancer binding protein beta	2244 - 2257	(+)	1.000	0.950	aatgacGCAAtgt
cAMP-response element binding protein	2245 - 2256	(+)	1.000	0.916	aaTCACgcaatg
sterol regulatory element-binding protein 1	2347 - 2357	(-)	0.750	0.791	taTCATcccat
RAR-related orphan receptor alpha1	2380 - 2392	(+)	1.000	0.941	agtgaacATTCa g
tumor suppressor p53	2397 - 2416	(+)	0.750	0.662	gagAAATGaacagggcagcc
serum response factor	2482 - 2499	(+)	0.757	0.705	atgctcGATAgccactc
Progesterone receptor binding site	2498 - 2524	(+)	1.000	0.862	tctttcggcgtgagcTATTCc
c-Ets-1 binding site	2599 - 2613	(+)	1.000	0.921	ggatATrAAgcgcttgt
signal transducer and activator of transcription 1	2620 - 2640	(-)	1.000	0.838	cagaaatcccgATrAAcaga
CREB complex	2697 - 2711	(+)	0.750	0.758	tgagtttTTCcttccc
NF-kappaB (p50)	2722 - 2731	(+)	1.000	0.927	GTGTGgcgcacc
stimulating protein 1 SP1, ubiquitous zinc finger transcription factor	2735 - 2747	(+)	1.000	0.914	ttggGGCGgagggc
signal transducers and activators of transcription	2750 - 2758	(+)	1.000	0.960	ccagGGAA
TEF-1	2763 - 2774	(-)	1.000	0.830	cat ATTgctctc
API binding site	2819 - 2827	(-)	1.000	0.995	ctGAGTCag
POU-factor Oct-1	2850 - 2864	(-)	1.000	0.902	cccgAAJccacctt
cellular and viral CCAAT box	2893 - 2904	(-)	1.000	0.923	cacagLCAAtag
CCAAT/enhancer binding protein beta	2912 - 2925	(-)	0.985	0.952	gtgtggCAAAagg
Ras-responsive element binding protein 1	2917 - 2930	(+)	1.000	0.796	tCCCAacacacaca
Ets-like transcription factor identified in lymphoid B-cells	2940 - 2955	(+)	1.000	0.862	gtgggGGAAgctaaa
TEF-5 stimulator factor	2987 - 2998	(-)	1.000	0.887	ccCATTCcactc
estrogen receptor	3042 - 3060	(-)	1.000	0.897	gttctTCAacctgaacgcp
Transcription activator protein 2	3185 - 3196	(-)	0.976	0.901	tgCCCCagggct
upstream stimulating factor	3205 - 3212	(-)	0.875	0.933	at'ALATgc
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	3227 - 3236	(+)	0.871	0.939	aatTAJCCac
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	cttGACccccc
zinc finger with interaction domain	3342 - 3354	(+)	1.000	0.936	cgGCTC'gggactc

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

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

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: hGHV.seq (2730 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 hGHV (- 2730 to +1):

Further Information	Position	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
NF-kappaB	65 - 74	(+)	0.904	0.882	(C)(C)Ggtcc
activator protein 4	78 - 87	(-)	1.000	0.985	gtLACGcgg
signal transducers and activators of transcription	89 - 97	(+)	1.000	0.882	ttggaGGAA
Se-Cys tRNA gene transcription activating factor	90 - 111	(-)	1.000	0.780	ctccCCCAaccaccttcccca
VDR/RXR heterodimer site	189 - 203	(+)	0.840	0.901	aggggaaGTCGTga
activator protein 1	199 - 209	(+)	1.000	0.967	ggTGCACtccac
Progesterone receptor binding site	281 - 307	(-)	1.000	0.830	cactctgctgtggcTGTTCccagg
signal transducers and activators of transcription	351 - 359	(+)	1.000	0.911	tttcaGGAA
TEF-1 related muscle factor	352 - 363	(-)	1.000	0.855	atCATTccTgaa
zinc finger with interaction domain	368 - 380	(-)	1.000	0.856	gmCTLenttnc
sterol regulatory element-binding protein 1	398 - 408	(-)	0.750	0.884	caTCTLccacc
Se-Cys tRNA gene transcription activating factor	412 - 433	(+)	1.000	0.808	gggcCCCAgcaatccactacta
c-Ets-1 binding site	420 - 434	(-)	0.881	0.907	ctatTATgtgatgc
RAR/RXR heterodimers	426 - 445	(+)	0.807	0.696	acatccaggccALAGgust
nuclear factor 1	455 - 472	(-)	1.000	0.946	tgtTCRRLsaccaacttg
X-box binding protein RFX1	461 - 478	(-)	1.000	0.906	ctgtgtgtgtTCAAcca
T3 factor-1 (TF1) binding site	527 - 540	(+)	1.000	0.948	agagTAAAtgcta
CCAAT/enhancer binding protein beta	564 - 577	(-)	0.985	0.944	tgtggTGAAtct
Retinoic acid receptor, member of nuclear receptors	622 - 631	(-)	1.000	0.984	aggTCACag
RAR-binding site	625 - 637	(-)	1.000	0.943	atctggaGtTca c
Ras-responsive element binding protein 1	728 - 741	(+)	0.790	0.813	cCACAAaggaccccc
upstream stimulating factor	744 - 753	(+)	0.863	0.915	gcCACtTgggc
CCAAT/enhancer binding protein beta	767 - 780	(+)	0.985	0.952	gaattgaGAAA gaa

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

SPI, ubiquitous zinc finger transcription factor	2089 - 2101	(-)	1.000	0.993	egggtGGCCgggg
stimulating protein 1 SP1, ubiquitous zinc finger transcription factor	2101 - 2113	(-)	1.000	0.956	tggGGCCGgggg
activator protein 2	2106 - 2117	(+)	0.976	0.903	cgCCU.Caagget
cAMP-responsive element binding protein 1	2117 - 2124	(-)	0.766	0.806	ttACCTg
API binding site	2238 - 2246	(-)	0.917	0.961	a.ttATTLAg
Ras-responsive element binding protein 1	2247 - 2260	(+)	1.000	0.792	gCCCAgaaaccccg
RAR/RXR heterodimers	2273 - 2292	(-)	1.000	0.724	ggaaaagggtccca.cccaca
CCAAT/enhancer binding protein beta	2285 - 2298	(-)	0.985	0.952	gtgtggTAAAagg
upstream stimulating factor	2456 - 2463	(+)	1.000	0.997	ccACGTga
upstream stimulating factor	2577 - 2584	(-)	0.875	0.933	acACATgc
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	2599 - 2608	(+)	0.871	0.966	caATCCat
cellular and viral TATA box elements	2689 - 2703	(+)	1.000	0.990	gtTAAAgggggcc
ectopic viral integration site 1 encoded factor	2704 - 2712	(+)	0.750	0.827	acaAGACac
zinc finger with interaction domain	2713 - 2727	(-)	1.000	0.870	gggtc.cccg

A total of 279 matches were found in 1 sequences: sequences searched: 1 (2730 bps).

hPL-3 2730 bps (279 matches)

Solution parameters:

Sequence file: hPL-3.seq (2730 bps)
 Family matches: yes
 MatInspector library: Matrix Family Library Version 2.3 February 2002
 Selected groups: ALL vertebrates.lib (0.75/Optimized)
 (core/matrix sim):

Inspecting sequence hPL-3 (1 - 2720):

Further Information	Position	Strand	Core sim	Matrix sim	Sequence
NF-kappaB	65 - 74	(+)	0.904	0.882	GGGttgctccc
activator protein 4	78 - 87	(-)	1.000	0.985	gtCAATctgg
signal transducers and activators of transcription	89 - 97	(+)	1.000	0.882	tggatctTAA
Se-Cys tRNA gene transcription activating factor	90 - 111	(-)	1.000	0.780	ctcccCCAAccmctctcca
VDR/RXR heterodimer site	189 - 203	(+)	0.840	0.901	atgggaaaGTCTGtg
Progesterone receptor binding site	281 - 307	(-)	1.000	0.830	cactgtgctggggcTGTctccaggc
myoblast determination gene product	314 - 325	(+)	1.000	0.952	cagCATctgatg
neuron-restrictive silencer factor	321 - 341	(-)	1.000	0.692	accAGCAccccagatccca
signal transducers and activators of transcription	351 - 359	(+)	1.000	0.911	ttcactTAA
TEF-1 related muscle factor	352 - 363	(-)	1.000	0.855	atCATTctgaa
zinc finger with interaction domain	368 - 380	(-)	1.000	0.856	ggtCTCctttc

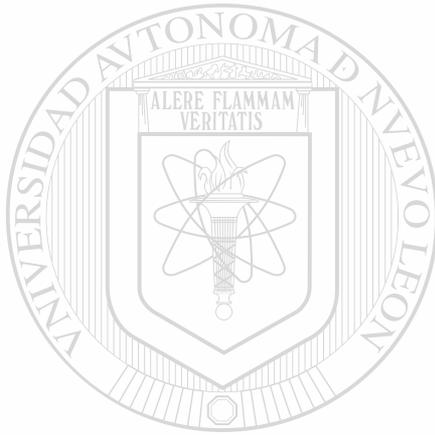
Regulación del complejo multigénico hGH-hPL mediado por hormonas y factores transcripcionales

sterol regulatory element-binding protein 1	398 - 408	(-)	0.750	0.884	caTCTCccac
Se-Cys tRNA gene transcription activating factor	412 - 433	(+)	1.000	0.808	gggcCCA gca tcaactca
octamer-binding factor 1	419 - 432	(-)	0.807	0.820	agGAlUlnaigt
c-Ets-1 binding site	420 - 434	(-)	0.881	0.907	caGGAl ggaatgc
PPAR/RXR heterodimers	426 - 445	(+)	0.807	0.696	acatcc taggcACAUgggt
nuclear factor 1	455 - 472	(-)	1.000	0.946	tgtTCCcaccacatg
Octamer binding site (OCT1/OCT2 consensus)	494 - 506	(-)	1.000	0.804	acaaGCAAAtgct
T3 transcription factor-1 (TF1) binding site	527 - 540	(+)	1.000	0.948	agagtCAACtgcta
CCAA1/enhancer binding protein beta	564 - 577	(-)	0.985	0.944	tagtggGAAAat
Retinoic acid receptor, member of nuclear receptors	622 - 631	(-)	1.000	0.984	aggTCACag
RAR- receptor alpha 1	625 - 637	(-)	1.000	0.943	atctggcGTCa c
upstream stimulating factor	744 - 753	(+)	0.863	0.915	gcCAC Tgggc
CCAAT/enhancer binding protein beta	767 - 780	(+)	0.985	0.952	gnaatgGAAA gaa
octamer-binding factor 1	793 - 802	(+)	0.755	0.826	lATGtGaaag
CREB complex	889 - 903	(+)	0.784	0.813	agtggcTCAC gcaag
C/EBP binding site	891 - 908	(+)	0.991	0.850	tgctccacGCAAGtatic
VDR/RXR heterodimer site	922 - 936	(+)	1.000	0.855	agccca ggGAGGgig
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	*tgACTTta
octamer-binding factor 1	1002 - 1016	(+)	1.000	0.863	aaagtcCAATct
growth factor independence 1 zinc finger protein acts as transcriptional repressor	1003 - 1026	(+)	1.000	0.943	aaagtca AATC ttagcccggt
VDR/RXR heterodimer site	1057 - 1071	(+)	1.000	0.880	ggtaggctGACGga
TCF11/MafG heterodimers, binding to subclass of AP1 sites	1268 - 1289	(-)	1.000	0.837	coctga TGACagacgagtca
nuclear factor 1	1309 - 1326	(+)	1.000	0.956	actTGTcTccagccacc
CREB complex	1375 - 1389	(+)	0.830	0.824	ctgga TACggtct
upstream stimulating factor	1386 - 1395	(-)	1.000	0.910	ggCACGgccc
Retinoic acid receptor, member of nuclear receptors	1467 - 1476	(-)	0.897	0.961	aggTCAGng
RAR-receptor alpha 1	1470 - 1482	(-)	1.000	0.936	cactaatGTCa g
CRE-binding protein 1/c-Jun heterodimer	1471 - 1478	(+)	0.769	0.885	tgACCt ta
cAMP-responsive element binding protein 1	1476 - 1483	(-)	0.766	0.801	tcACTTaa
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	1479 - 1488	(+)	0.871	0.851	agtgAICCa c
CCAAT/enhancer binding protein beta	1559 - 1572	(+)	1.000	0.950	aaatgaccCAAtgt
cAMP-response element binding protein	1560 - 1571	(+)	1.000	0.916	aaTGACgcaatg
upstream stimulating factor	1691 - 1700	(-)	0.863	0.930	gcCACTgtc
tumor suppressor p53	1712 - 1731	(+)	0.750	0.662	gagAATccacagcagccc
serum response factor	1794 - 1811	(+)	0.757	0.705	atggcgGATAggagctc
c-Ets-1 binding site	1911 - 1925	(+)	1.000	0.921	ggaGGAAgagctgt
CREB complex	2009 - 2023	(+)	0.750	0.758	tgatgtaTCCtccc
GC box elements	2069 - 2082	(-)	0.872	0.922	tgggtcGTGggag
SPI, ubiquitous zinc finger transcription factor	2089 - 2101	(-)	1.000	0.993	eggcGGCCgpggg
SPI, ubiquitous zinc finger transcription factor	2101 - 2113	(-)	1.000	0.956	ttggGTCGgggc
cAMP-responsive element binding protein 1	2117 - 2124	(-)	0.766	0.806	tcACTgtt
API binding site	2238 - 2246	(-)	0.917	0.961	aTGATTCa g

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

Ras-responsive element binding protein 1	2247 - 2260	(+)	1.000	0.792	gCCCAgaaccoccg
RAR/RXR heterodimers	2273 - 2292	(-)	1.000	0.724	ggaaagggzocAAA(-)ca
CCAAT/enhancer binding protein beta	2285 - 2298	(-)	0.985	0.952	gtgtgg'sAAAagg
upstream stimulating factor	2456 - 2463	(+)	1.000	0.997	cCACGTca
transcriptional repressor CDP	2597 - 2611	(+)	0.795	0.883	taattAIC Ccttg
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	2599 - 2608	(+)	0.871	0.966	aa'tA'CCat
Pit1, GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	2633 - 2642	(-)	0.871	0.953	attATGCat
zinc finger with interaction domain	2713 - 2725	(+)	1.000	0.846	caGCTC an ggatc
cellular and viral TATA box elements	2689	(+)	1.000	0.990	gt,TAS :aaagac

279 matches found.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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 family/matrix	Further information	Position	Strand	Core sim	Matrix sim	Sequence
V\$GREF/GRE.01	Glucocorticoid receptor, C2C2 zinc finger protein binds glucocorticoid dependent to GREs	25 - 40	(+)	0.923	0.964	ggcaca atgTGT Cctg
V\$MZF1/MZF1.01	MZF1	39 - 46	(+)	1.000	0.975	tga G G r u a
V\$MEF3/MEF3.01	MEF3 binding site, present in skeletal muscle-specific transcriptional enhancers	82 - 94	(+)	1.000	0.832	cccTCA Ggtttg
V\$E2F/E2F.02	E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	90 - 97	(-)	1.000	0.849	ggcc CAAA
V\$SRF/SRF.02	serum response factor	125 - 138	(-)	0.972	0.822	ggc C r Aatac tgg
V\$PCAT/CAAT.01	cellular CCAAT box	132 - 143	(+)	1.000	0.910	tttg C C AAtc
V\$NFYA/NFY.02	nuclear factor Y (Y-box binding factor)	134 - 144	(+)	1.000	0.940	tga C C AAtc t
V\$HSP1/HSF1.01	heat shock factor 1	145 - 154	(+)	1.000	0.924	AGA Aagctcc
V\$NOLE/OLE1.01	olfactory neuron-specific factor	152 - 173	(+)	1.000	0.863	tctctg T T T C t g _ a _ g g a t g g a
V\$FKHD/HFH3.01	HNF-3/Fkh Homolog 3 (= Frsac-6)	180 - 192	(+)	1.000	0.966	aaa c A A C a g c t
V\$AREB/AREB6.04	AREB6 (Atp1a1 regulatory element binding factor 6)	182 - 190	(-)	1.000	0.976	aGTTT g t t
V\$PAX1/PAX1.01	Pax1 paired domain protein, expressed in the developing vertebral column of mouse embryos	236 - 253	(+)	0.750	0.616	CTC T g c c c t c t g g t t c

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

Name of family/matrix	Further information	Position	Strand	Core sim	Matrix sim	Sequence
V\$GREF/GRE.01	Glucocorticoid receptor, C2C2 zinc finger protein binds glucocorticoid dependent to GREs	25 - 40	(+)	0.923	0.955	ggcaca atgTGT Cctg
V\$EBOX/ARN1.01	AhR nuclear translocator homodimers	25 - 40	(+)	1.000	0.887	ggcaca n C G I G t c t g t
V\$NOLE/OLE1.01	olfactory neuron-specific factor	30 - 51	(+)	0.806	0.812	aac t g t C C T g a n g g a g a g g c
V\$MZF1/MZF1.01	MZF1	39 - 46	(+)	1.000	0.975	tga G G r u a
V\$MEF3/MEF3.01	MEF3 binding site, present in skeletal muscle-specific transcriptional enhancers	81 - 93	(+)	1.000	0.832	cccTCA Ggtttg
V\$E2F/E2F.02	E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	89 - 96	(-)	1.000	0.849	ggcc CAAA
V\$OCT/OCT1P.01	octamer-binding factor 1, POU-specific domain	102 - 116	(-)	0.980	0.904	ggcga ATT C a c a t t
V\$SRF/SRF.03	serum responsive factor	114 - 128	(+)	0.819	0.907	g T A C t g g c c a g g
V\$SRF/SRF.01	serum response factor	123 - 140	(-)	0.773	0.652	ttggcca AA T A c t g g c c
V\$MTB/MTBF.01	Muscle-specific Mt binding site	127 - 135	(+)	1.000	0.900	a a t A T T t g
V\$PCAT/CAAT.01	cellular CCAAT box	132 - 143	(+)	1.000	0.910	tttg C C AAtc
V\$HSP1/HSF1.01	heat shock factor 1	145 - 154	(+)	0.867	0.951	T c a A t g t t c c
V\$NOLE/OLE1.01	olfactory neuron-specific factor	152 - 173	(+)	1.000	0.863	tctctg C C T t g a g g a t g g a
V\$E2F/E2F.01	E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	173 - 187	(+)	1.000	0.746	a g a g g a t _ A A A a a g a
V\$EVI1/EVI1.04	Ectopic viral integration site 1 encoded factor	175 - 189	(+)	0.760	0.798	a t A G A g _ a a a a a a a
V\$STAT/STAT1.01	signal transducer and activator of transcription 1	188 - 208	(+)	1.000	0.802	a a c a g c t c t G G A a c g g g a

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

Sequence file: hPL2_Intron1.seq (266 bps)

Inspecting sequence hPL2_Intron1 (1 - 266): 18 matches found

Name of family/matrix	Further Information	Position	Strand	Gene sim.	Matrix sim.	Sequence
V\$GREF/GRE_01	Glucocorticoid receptor, C/2C2 zinc finger protein binds glucocorticoid dependent to GREs	25 - 40	(+)	0.923	0.955	ggccacaacgTGT Cct g
V\$EBOX/ARNT_01	AhR nuclear translocator homodimers	25 - 40	(+)	1.000	0.887	ggccacaCCG Tct cct g
V\$NOLE/OLF1_01	olfactory neuron-specific factor	30 - 51	(+)	0.806	0.812	aacggtg tcc t ga agc ggg ggg g
V\$MZF1/MZF1_01	MZF1	39 - 46	(+)	1.000	0.975	tga Gc t ca
V\$MEF3/MEF3_01	MEF3 binding site, present in skeletal muscle-specific transcriptional enhancers	82 - 94	(+)	1.000	0.832	ccctc A c g t t t g g
V\$E2F/E2F_02	E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	90 - 97	(-)	1.000	0.849	g a CAAA
V\$TEAF/TEF1_01	TEF-1	97 - 108	(-)	1.000	0.863	caCATTca taag
V\$SRF/SRF_03	serum responsive factor	115 - 129	(+)	0.819	0.907	gC CAT C t a g a c c a g
V\$SRF/SRF_01	serum response factor	124 - 141	(-)	0.773	0.652	tcggcaAATAct ggcc
V\$MH1B/MH1B_01	muscle-specific Mt binding site	128 - 136	(+)	1.000	0.900	aaatatt t g
V\$PCAT/CAAT_01	cellular CCAAT box	133 - 144	(+)	1.000	0.910	tggCCAAt
V\$HEAT/HSF1_01	heat shock factor 1	146 - 155	(+)	0.867	0.951	TGAAtgttc
V\$GREF/GRE_01	Androgene Rc binding site	180 - 206	(-)	1.000	0.795	gctccagcaactgtt TGT T t t t t c t
V\$FKHD/HFH3_01	HNF-3/Fkh Homolog 3 (= Frcac-6)	186 - 198	(+)	1.000	0.966	aaacAA_Cagct
V\$AREB/AREB6_04	AREB6 (element binding factor 6)	188 - 196	(-)	1.000	0.976	aGTTTgt
V\$TF/TF/NRF2_01	nuclear respiratory factor 2	222 - 231	(-)	1.000	0.877	tgaGcAAc agt
V\$PAX5/PAX5_01	B-cell-specific activating protein	228 - 255	(-)	0.952	0.830	ccggagGGL Antcga g g a g c c g a g a g
V\$AREB/AREB6_04	AREB6	253 - 261	(+)	1.000	0.988	cg t t t c t c

Sequence file: hGHV_Intron1.seq (272 bps) Inspecting sequence hGHV_Intron1 (1 - 272): 15 matches found

Name of family/matrix	Further Information	Position	Strand	Gene sim.	Matrix sim.	Sequence
V\$GREF/GRE_01	Glucocorticoid receptor, C/2C2 zinc finger protein binds glucocorticoid dependent to GREs	25 - 40	(+)	0.923	0.964	ggccaca atg TGT Cct g
V\$MZF1/MZF1_01	MZF1	39 - 46	(+)	1.000	0.975	tga ca
V\$CREB/TAX/CREB_02	Tax/CREB complex	42 - 56	(+)	0.750	0.703	ggccacaC t c t t c a t
V\$MEF3/MEF3_01	MEF3 binding site, present in skeletal muscle-specific transcriptional enhancers	82 - 94	(+)	1.000	0.832	c c t c a c g t t g g
V\$E2F/E2F_02	E2F, involved in cell cycle regulation,	90 - 97	(-)	1.000	0.849	g a C A A
V\$TEAF/TEF1_01	TEF-1	97 - 108	(-)	1.000	0.846	ac AT c t t a g
V\$SRF/SRF_02	serum response factor	125 - 138	(-)	0.972	0.822	gg' LAA t a c t g g
V\$PCAT/CAAT_01	cellular CCAAT box	132 - 143	(+)	1.000	0.910	tggCCAAt
V\$NFY/NFY_02	nuclear factor Y (Y-box binding factor)	134 - 144	(+)	1.000	0.940	tgtc c t c t a
V\$HEAT/HSF1_01	heat shock factor 1	145 - 154	(+)	0.867	0.951	TGAAtgttc
V\$NOLE/OLF1_01	olfactory neuron-specific factor	152 - 173	(+)	1.000	0.833	taactgttcc t g a a a g a g a g a g
V\$IRF1/IRF1_01	interferon regulatory factor 1	188 - 200	(+)	0.777	0.863	gaaa aaAAAacc
V\$STAT/STAT1_01	signal transducer and activator of transcription 1	198 - 218	(+)	1.000	0.802	accgcgcac GCAAcgagg
V\$ET/ET/ETS/ETSP54_01	c-ets-1(p54)	253 - 262	(-)	1.000	0.945	acCGcAgcca

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/matrix	Family information	Position	Score	Sequence
→ V\$GREF/GRE.01	Glucocorticoid receptor, C2C2 zinc finger protein binds glucocorticoid dependent to GREs	24 - 39	(+)	ggcaaacg!G!Cctg
V\$EBOX/ARNT.01	AhR nuclear translocator homodimers	24 - 39	(+)	ggcaaacCGTGctcg
V\$NOLF/OLEF1.01	olfactory neuron-specific factor	29 - 50	(+)	aactg!CC!gaggagagggc
V\$MZF1/MZF1.01	MZF1	38 - 45	(+)	tgca!K!K!a
V\$MEF3/MEF3.01	MEF3 binding site, present in skeletal muscle-specific transcriptional enhancers	81 - 93	(+)	ccctcAGgntgg
V\$E2F/E2F.02	E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	89 - 96	(-)	gcacAAA
→ V\$TEAF/TEF1.01	TEF-1	96 - 107	(-)	ca!ATTca!ang
V\$SRFF/SRF.03	serum responsive factor	114 - 128	(+)	gCA!C!angccag
V\$SRFF/SRF.01	serum response factor	123 - 140	(-)	!ggca!AT!A!ctggcc
V\$MTB/MTBF.01	muscle-specific Mt binding site	127 - 133	(+)	agatATTTg
→ V\$PCAT/CAAT.01	cellular CCAAT box	132 - 143	(+)	llgg!CC!A!A!cl
V\$HEAT/HSE1.01	heat shock factor 1	145 - 154	(+)	TGA!Agttcc
V\$GREF/ARE.01	Androgen receptor binding site	178 - 204	(-)	gctccagngctg!T!G!T!ttctc
V\$FKHD/HEH3.01	HNF-3/Fkh Homolog 3 (= Freac-6)	184 - 196	(+)	aaaa!cAA!C!gct
V\$AREB/AREB6.04	AREB6 (Atp1a) regulatory element binding factor 6	186 - 194	(-)	ctGTT!g!

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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:

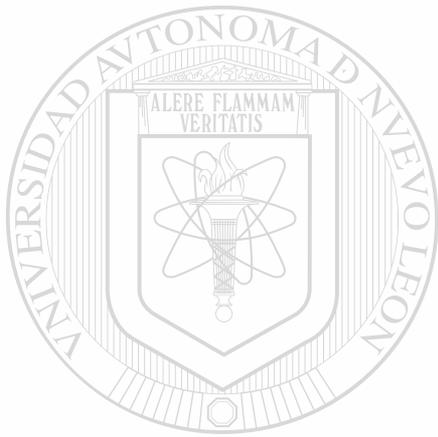
Asistente de investigación en el laboratorio de Biología Celular en la ULIEG del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, 1998.

Maestro de Tiempo parcial, materia Genética 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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



