



**EXPRESION Y DISECCION FUNCIONAL IN VITRO
DE LAS HORMONAS LACTOGENICA PLACENTARIA
Y DEL CRECIMIENTO HUMANO.**

TESIS
QUE EN OPCION AL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR
E INGENIERIA GENETICA

PRESENTA

M.C. DIANA RESENDEZ PEREZ

MONTERREY, N.L. DICIEMBRE, 1991

M.C. DIANA RESENDEZ PEREZ

TD
QH447
.R4
1991
c.1

1991



1080125915



EXPRESION Y DISECCION FUNCIONAL IN VITRO
DE LAS HORMONAS LACTOGENICA PLACENTARIA
Y DEL CRECIMIENTO HUMANO.

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR
E INGENIERIA GENETICA

PRESENTA

M.C. DIANA RESENDEZ PEREZ

MONTERREY, N.L. DICIEMBRE, 1991

TD
QH 7
. 4
1991






EXPRESION Y DISECCION FUNCIONAL IN VITRO
DE LAS HORMONAS LACTOGENICA PLACENTARIA
Y DEL CRECIMIENTO HUMANO.

POR

M.C. DIANA RESENDEZ PEREZ


APROBADA:


Dr. Hugo A. Barrera Saldaña


Dra. Herminia Martínez Rodríguez


Dr. Julio Sepúlveda Saavedra


Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda


Dr. Mario César Salinas Carmona
Secretario Académico: Area Básica
Escuela de Graduados de la
Facultad de Medicina,
U.A.N.L.

**EXPRESION Y DISECCION FUNCIONAL IN VITRO
DE LAS HORMONAS LACTOGENICA PLACENTARIA
Y DEL CRECIMIENTO HUMANO.**

PRESENTA

M.C. DIANA RESENDEZ PEREZ

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG), del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León en Monterrey; bajo la dirección del Ph.D. Hugo A. Barrera Saldaña.

DEDICATORIA

A quienes han sido y seran siempre mi adoración:

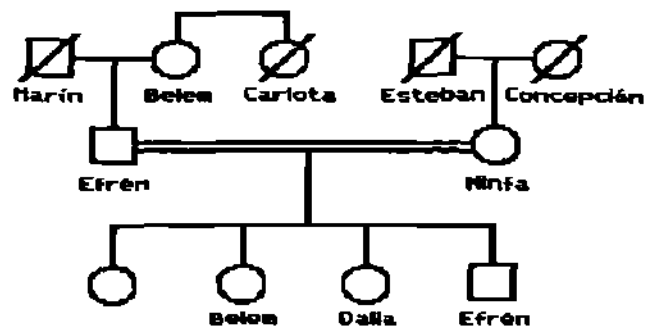


TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	ix
AGRADECIMIENTOS	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCION.....	1
I El complejo multigénico hGH-hPL.....	1
A Localización cromosómica.....	2
B Anatomía molecular.....	2
C Estructura génica.....	2
D Secuencia nucleotídica.....	3
E Evolución molecular.....	4
F Deleciones génicas.....	5
II Expresión de los genes hGH Y hPL.....	6
A Clonación molecular de los DNAs.....	6
B Productos a nivel de RNA.....	6
C Productos a nivel de proteínas.....	9
D Regulación génica.....	11
E Modelos <u>in vitro</u>	12
F hGH como gen de referencia.....	14
III Relaciones funcionales de hGH y hPL.....	15
A Estructura tridimensional.....	15
B Receptores somatogénicos y lactogénicos.....	15
C Actividades biológicas.....	17
D Bioensayos <u>in vitro</u>	18
E Estudios con digestiones enzimáticas.....	18
F Características estructurales de hGH y hPL relacionadas a actividades biológicas.....	19
G Análisis funcional de proteínas quiméricas.....	20
H Localización de regiones funcionales de hGH mediante mutagénesis dirigida.....	21
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	24
MATERIALES Y METODOS.....	25

^aSe emplea aquí el término in vitro para referirse a estudios realizados en cultivo celular, e in vivo para aquellos efectuados directamente en el organismo, órgano o tejido.

I	Enzimas, estuches comerciales, radioisótopos, bacterias y plásmidos.....	25
II	Construcción de moléculas recombinantes.....	25
III	Cultivo celular, expresión transitoria y marcaje de proteínas secretadas.....	27
IV	Aislamiento de RNA, hibridación en línea "slot dot" e hibridación tipo "Northern".....	28
V	Bioensayo de hGH en el modelo de diferenciación adipocítica.....	29
	RESULTADOS.....	31
I	Adaptación de un modelo <u>in vitro</u> para la expresión y análisis funcional de hGH.....	31
A	Construcción de un vector para la expresión de hGH en cultivo celular.....	31
B	Selección del vector de expresión mas eficiente.....	33
C	Expresión de los DNAs de hGH en cultivo celular.....	33
D	Detección de las hGHs secretadas por las células COS-7.....	36
E	Actividad adipogénica de las hGHs recombinantes producidas <u>in vitro</u>	37
II	Potencial de codificación <u>in vitro</u> de los genes hPL.....	41
A	Construcción de una nueva serie de vectores para la expresión de los genes hPL.....	41
B	Expresión de proteínas por los genes hPL.....	43
C	Producción diferencial de proteínas por los genes hPL-3 y hPL-4.....	43
D	Origen transcripcional de la expresión diferencial de los genes hPL-3 y hPL-4.....	46
E	Efecto de la mutación del segundo	

intrón de hPL-1 en la producción de proteínas.....	46
F Diferencias aparentes en los tamaños de hPL y hGH producidas por los genes.....	51
III <u>Diseción in vitro</u> de los genes hPL mediante mutagénesis por DNA homólogo.....	51
A Diferencias cuantitativas en la expresión de los genes hPL-3 y hPL-4.....	52
B Cuantificación del efecto de la mutación del gen hPL-1.....	55
DISCUSION Y CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFIA.....	65
ANEXOS.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
dCTP	Desoxicitidina trifosfatada
DNAC	DNA complementario al RNA mensajero
DHFR	Dihidrofolato reductasa
hCMV	Citomegalovirus humano
h	Hora (s)
hGH	Hormona del crecimiento humano
hPL	Hormona lactogénica placentaria
KDa	Kilodaltones
Kpb	Kilopares de bases
LTR	Repeticiones terminales largas
M	Concentración molar
MEM	Medio esencial mínimo de Eagle
MT	Metalotioneína
μ Ci	Microcuries
mg	Miligramos
ml	Mililitros
μ g	Microgramos
μ l	Microlitros
min	Minuto (s)
N	Concentración normal
pb	Pares de bases
Prl	Prolactina
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones H^+
RIA	Radioinmunoensayo
RNA _m	RNA mensajero
RNA _{shn}	RNAs heterogéneos nucleares
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFT	Suero fetal de ternera
SMC	Sitio múltiple de clonación
SV40	Virus del simio 40
VSM	Virus del sarcoma murino

LISTA DE FIGURAS

1. El complejo multigénico hGH-hPL.....	3
2. Comparación de las secuencias aminoacídicas de la proteínas de 22KDa codificadas por los genes hGH-N y hPL-3.....	9
3. Expresión de los genes hGH-hPL.....	11
4. Modelo tridimensional de hGH basado en la estructura de la hormona del crecimiento porcino.....	16
5. Bioensayo de hGH en el modelo de conversión adipocítica.....	30
6. Estrategia para la construcción de vector de expresión pAVE1hGH.....	32
7. Estructura de los vectores de expresión de hGH.....	34
8. Expresión transitoria de hGH en células COS-7 transfectadas con los diferentes vectores de expresión.....	35
9. Detección de proteínas secretadas por las células transfectadas.....	38
10. Detección de las hGHs de 20 y 22KDa en el medio de las células COS-7 transfectadas con los plásmidos recombinantes.....	39
11. Construcción de plásmidos de expresión para los genes hPL.....	42
12. Producción <i>in vitro</i> de proteínas secretadas derivadas de los genes hPL.....	44
13. Diversidad en tamaño y abundancia de las proteínas codificadas por los genes hGH y hPL.....	45
14. Expresión de los genes hPL-3 y hPL-4 a nivel de RNAm.....	47

15. Análisis de la expresión diferencial de los genes hPL-3 y hPL-4 mediante hibridación en línea "slot dot".....	48
16. Efecto de la mutación al inicio del segundo intrón del gen hPL-1 sobre la producción de proteínas secretadas.....	50
17. Organización de las construcciones génicas quiméricas.....	53
18. Comparación de la eficiencia de expresión de los plásmidos recombinantes híbridos hGH-hPL en células COS-7.....	54

LISTA DE TABLAS

I. Expresión transitoria de hGH en células COS-7 transfectadas.....	36
II. Conversión adipocítica de las hGHs secretadas por las células COS-7 transfectadas.....	40
III. Expresión de proteínas quiméricas hGH-hPL en células COS-7 transfectadas.....	55

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todas las personas que hicieron posible el desarrollo y culminación de este proyecto. Si intentara citar sus nombres, incluso en orden alfabético, temo que no podría reconocer con justicia la ayuda y apoyo de todos mis maestros, colegas, compañeros, estudiantes y amigos porque no sabría donde trazar la línea y lo que es peor, podría olvidar a alguno de ellos. Las contribuciones fueron numerosas, diversificadas y van desde individuales hasta institucionales y de colaboración por lo que me resisto a ordenar sus esfuerzos según estos criterios ya que todas fueron muy valiosas, sin excepción.

Sin embargo, expreso aquí mi reconocimiento a:

- la excelente dirección del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.
- el apoyo siempre incondicional de la Dirección y el Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- la asesoría, consejos y amistad de la Dra. Herminia Martínez Rodríguez.
- las valiosas sugerencias y comentarios de la Comisión de tesis.
- el apoyo de SESIC-SEP, CONACYT y del Centro Internacional de Biología Molecular y Celular.
- la colaboración y facilidades del Dr. Federico Castro Muñoz Ledo del Depto. de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N.
- la amistad, apoyo y consejos de la Dra. Mireya de la Garza y del Dr. Manuel Ortega.
- las facilidades otorgadas por el Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario "Dr. José E. González".
- el trabajo gráfico y gran disposición del Dr. Antonio Luna.
- la cooperación e interés constante de las mejores secretarías del mundo.
- la entusiasta colaboración de mis compañeros del laboratorio y todo el equipo ULIEG.

Finalmente, deseo hacer constar que he aprendido mucho más de la que podría incluir en este trabajo, por lo que brindo mi sincera gratitud a todas las personas que compartieron conmigo este espacio-tiempo porque me permitieron la maravillosa oportunidad de integrar la diversidad del conocimiento y de la experiencia humanas.

RESUMEN

Los genes que codifican para la hormona del crecimiento (hGH) o somatotropina y para el lactógeno placentario (hPL) o somatomamotropina coriónica (hCS) constituyen en el humano un complejo multigénico localizado en las bandas q22-24 del cromosoma 17. El complejo multigénico hGH-hPL contiene dos genes para hGH y tres genes para hPL. Los productos de expresión mejor conocidos de estos genes son hormonas polipeptídicas de 22 Kilodaltones (KDa). Estas hormonas se sintetizan en diferentes tejidos bajo diferentes mecanismos de control.

Como un paso necesario para la realización del presente trabajo primeramente construimos y seleccionamos los vectores mas eficientes para la expresión de genes eucarióticos en cultivo de células y diseñamos un sistema para detectar proteínas secretadas como producto de la expresión de los genes introducidos transitoriamente a células en cultivo. Una contribución más de nuestro trabajo fué el desarrollo de una estrategia para cuantificar la expresión génica in vitro. Esta consistió en el intercambio de secuencias nucleotídicas entre los genes hGH y hPL; por lo que la denominamos *mutagénesis por DNA homólogo*.

En este trabajo establecimos las condiciones para detectar y cuantificar la expresión de hGH en cultivo celular. La actividad biológica de las hGHs producidas en cultivo celular fue verificada en el modelo de diferenciación de fibroblastos preadipocíticos hacia adipocitos. Una vez que estandarizamos las condiciones para la expresión funcional de hGH en nuestro modelo in vitro, determinamos que tanto hPL-3 como hPL-4 contribuyen a la producción de una misma hPL madura. La cuantificación de la expresión de los genes hPL-3 y hPL-4 a nivel de proteínas y RNA mostraron que la región codificante del gen hPL-3 presentó una mayor expresión que la del gen hPL-4. Interesantemente, encontramos que la abundancia de estas proteínas dependió del origen genético de los primeros dos exones. Además, las estrategias anteriormente descritas nos permitieron cuantificar el efecto de la mutación presente al inicio del segundo intrón del gen hPL-1. En estos experimentos detectamos una disminución total de la proteína codificada por el gen hPL-3 con esta mutación y no detectamos la reactivación de la expresión con el gen hPL-1 reparado.

Los resultados anteriores nos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

- Los genes hPL-3 y hPL-4 contribuyen a la producción de la hormona hPL madura en una relación de 4 a 1 en nuestro modelo in vitro.
- La expresión diferencial in vitro de los genes hPL-3 y hPL-4 depende de las diferencias nucleotídicas presentes en los dos primeros exones de estos genes.
- La mutación presente al inicio del segundo intrón del gen hPL-1 es una de las causas que afecta su falta de expresión.

El intercambio de secuencias homólogas entre estos genes nos permitió evaluar el efecto en la expresión de mutaciones sin modificación de la conformación nativa de la proteína codificada, produciendo así nuevas estrategias para el estudio de la expresión del genoma humano.

El modelo experimental que hemos desarrollado podría utilizarse en estudios de mutaciones existentes en genes que codifican para proteínas relacionadas genéticamente y para las que existen anticuerpos utilizando la conveniencia de la cuantificación de la proteína mediante RIA.