

INTRODUCCION

El nacimiento de la tecnología del DNA recombinante a principios de la década de los 70's, marcó el inicio de una nueva era en Biología Molecular. Con la ayuda de esta tecnología ha sido posible iniciar el análisis, a nivel molecular, del altamente complejo genoma eucariote. Actualmente se están llevando a cabo numerosos estudios con el propósito de analizar la estructura molecular y organización de genes para entender su función, regulación y origen.

La regulación de la expresión genética, implica la formulación de múltiples interrogantes y la consideración de los diferentes niveles por los cuales ésta información, depositada en un pequeño segmento cromosómico, pasa antes de alcanzar su manifestación final, reflejada en la estructura y función de la proteína en estudio.

La presencia de mutaciones en genes eucarióticos pueden afectar los niveles de su expresión debido a una alteración en los diferentes pasos de la ruta de expresión génica: transcripción, procesamiento del RNA, estabilidad del RNA y traducción (1). Los efectos de mutaciones puntuales en la expresión de los genes estructurales estudiados requieren métodos analíticos altamente selectivos para detectar estos cambios.

Los genes que codifican para la hormona del crecimiento humano (hGH) o somatotropina y para el lactógeno placentario humano (hPL) o somatomamotropina coriónica (hCS) constituyen en el humano un complejo multigénico constituido por cinco genes (1-3). El aislamiento y caracterización de los genes del complejo multigénico han permitido estudiar su expresión y regulación. Los productos de expresión mejor conocidos de este complejo génico son los polipéptidos hGH y hPL de 191 aminoácidos, producidos en hipófisis y placenta respectivamente. Algunos polipéptidos codificados por estos genes son hormonas cuya función no ha sido descrita. Por lo que el complejo multigénico hGH-hPL es sin duda un modelo excelente para investigar los mecanismos moleculares mediante los cuales estos genes, con un alto grado de similitud, expresan hormonas relacionadas en tejidos diferentes.

I El complejo multigénico hGH-hPL.

El advenimiento de la tecnología del DNA recombinante y la clonación molecular de genes de

organismos superiores, ocasionaron una revolución en los laboratorios dedicados al estudio de la expresión y regulación genética. Los trabajos experimentales con el complejo hGH-hPL se iniciaron con el estudio de la forma madura de las proteínas y se prosiguió en la dirección del origen de la información genética responsable de la síntesis, estructura y función de estas hormonas.

A Localización cromosómica.

La localización subcromosómica de los genes fué determinada en estudios de hibridación in situ utilizando un fragmento del DNA complementario al RNA mensajero (DNAC) de hPL (ver sección IIA). Estos experimentos demostraron que los genes que codifican para hGH y hPL constituyen en el humano un complejo multigénico localizado en las bandas q22-24 del brazo largo del cromosoma 17 (3). Además, cuando los DNAC de hGH o hPL fueron utilizados para buscar secuencias específicas en bancos de DNA genómico humano, determinaron la presencia de cinco genes diferentes en el complejo hGH-hPL(1-3).

B Anatomía molecular.

El orden físico de los genes del complejo multigénico hGH-hPL fué determinado mediante digestión con enzimas de restricción de clonas sobrepuestas de fagos y cósmidos recombinantes conteniendo DNA humano y aislados por hibridación con sondas del DNAC de hGH o de hPL (1,2). Estos genes se encuentran arreglados partiendo del extremo 5' al 3'(ver figura 1) de la siguiente manera: primeramente hGH normal (hGH-N), luego hPL-1, también llamado hPL-like (hPL-L o hCS-L), posteriormente hPL-4 (también denominado hCS-A), al cual le sigue hGH variante (hGH-V) y finalmente hPL-3 (también designado como hCS-B). Los genes hGH y hPL presentan la misma orientación transcripcional y están separados por regiones intragénicas de 6 a 13 kilopares de bases (kpb). Secuencias repetidas de la familia Alu fueron localizadas flanqueando los genes o en sus intrones (2,4 y 5). Las secuencias del extremo 5', regiones codificantes e intrones mostraron al menos un 90% de similitud entre hGH y hPL.

C Estructura génica.

El DNAC de hPL obtenido por Barrera-Saldaña y

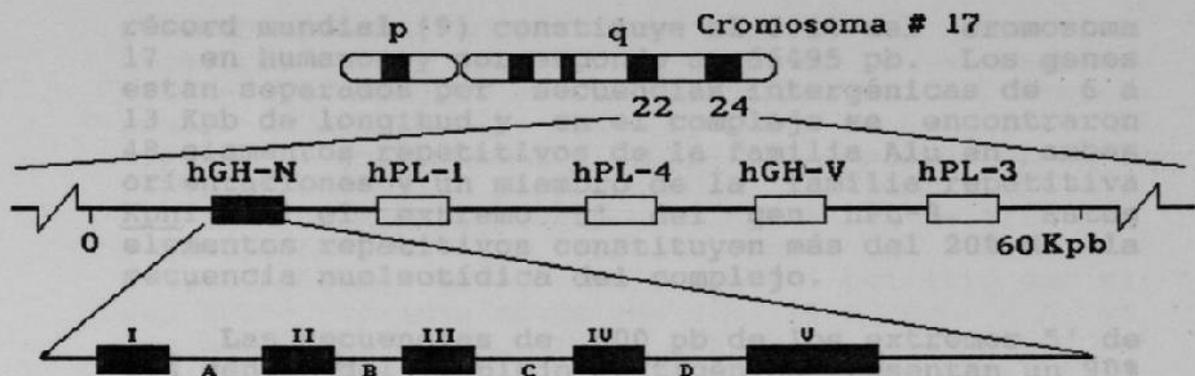


Figura 1. El complejo multigénico hGH-hPL. En este diagrama se presenta la localización cromosómica, anatomía molecular y estructura génica del complejo multigénico hGH-hPL.

col. en 1982 (ver sección IIA) fue hibridado con el gen hPL-3 para construir lo que se conoce como heteroduplex (6). El análisis al microscopio electrónico de estos heteroduplex reveló la presencia, en el gen para hPL, de cuatro intrones. El tamaño de los intrones y exones determinados en este estudio fueron similares a los descritos para el gen hGH por De Noto y col. en 1981 (7).

Estudios posteriores confirmaron que los cinco genes del complejo génico presentan la misma organización génica con cinco exones y cuatro intrones en la misma posición. El patrón de corte con enzimas de restricción permitió identificar cada uno de estos genes. Los dos genes hGH están contenidos en fragmentos EcoRI de 2.6Kpb. Ambos genes tienen sitios únicos para la enzima BglI, sin embargo difieren en la posición de sitios BamHI. Dos de los genes para hPL están contenidos dentro de fragmentos EcoRI de 2.9Kpb, presentan sitios únicos para las enzimas XbaI y BamHI y difieren en la presencia de uno (hPL-3) o dos (hPL-4) sitios PvuII. El tercer gen hPL-1 que contiene secuencias relacionadas con hPL está contenido en un fragmento EcoRI-XbaI de 3.5Kpb que no presenta sitios de corte con las enzimas de restricción XbaI ni BamHI.

D PL Secuencia nucleotídica.

Un extraordinario esfuerzo fué realizado por Chen y col., en 1989 cuando determinaron la secuencia nucleotídica completa del complejo multigénico hGH-hPL (8). Esta secuencia considerada

récord mundial (9) constituye el 0.1% del cromosoma 17 en humanos y corresponde a 66495 pb. Los genes están separados por secuencias intergénicas de 6 a 13 Kpb de longitud y en el complejo se encontraron 48 elementos repetitivos de la familia Alu en ambas orientaciones y un miembro de la familia repetitiva KpnI en el extremo 5' del gen hPL-3. Estos elementos repetitivos constituyen más del 20% de la secuencia nucleotídica del complejo.

Las secuencias de 500 pb de los extremos 5' de los genes del complejo multigénico presentan un 90% de similitud en sus secuencias nucleotídicas. Esta similitud se extiende hasta regiones de 1.8Kpb corriente arriba del sitio de inicio de transcripción. Además incluyen regiones simétricas, invertidas, repetidas y palindrómicas que podrían unir proteínas importantes en la regulación de la expresión génica. Todos los genes del complejo multigénico contienen una secuencia TATAA, la cual ha sido usada para asignar el sitio del casquete (cap). Existen además secuencias ricas en A-T (ATAAAT) a - 80 pb del sitio de iniciación de la transcripción.

E Evolución molecular.

El análisis de la secuencia de los genes ha proporcionado una información muy valiosa para reconstruir el proceso evolutivo que dió origen al actual complejo multigénico hGH-hPL. El alto grado de similitud en la secuencia de aminoácidos entre hGH, hPL y prolactina (Prl) y en las secuencias nucleotídicas de sus genes, aunado a que comparten actividades biológicas, permitió postular la hipótesis de que los miembros del complejo multigénico hGH-hPL provienen de un mismo gen ancestral común (2,10 y 11). Este ancestro común el cual se cree fué más similar a la Prl actual, dió origen mediante duplicación y divergencia a los otros miembros de la familia (12).

Se ha postulado que hace aproximadamente 350 millones de años el gen ancestral común se duplicó dando origen a dos ramas, una para los genes hGH y hPL y la otra para el gen hPrl. Los dos genes precursores de cada rama segregaron en dos cromosomas diferentes; actualmente el gen hPrl está localizado en el cromosoma 6 y los genes hGH y hPL en el cromosoma 17. La hipótesis postula la presencia de tres eventos de duplicación génica: el

primero originó hace ~ 400 millones de años los ancestros de la prolactina y de GH y el segundo evento dió origen a una distribución de cuatro genes: hGH-N, hPL-1, hGH-V y hPL-3. En el último evento el gen ancestral hPL-1 se duplicó hace ~5 millones de años para producir los genes hPL-4 y hPL-1. Se ha propuesto que hPL-4 se originó por duplicación del gen hPL-1 y que un mecanismo recombinacional de conversión génica permitió que el gen hPL-4 presente ahora una similitud mayor con el gen hPL-3 que con el propio gen hPL-1. La presencia de homologías internas entre estas hormonas y la abundancia de secuencias de DNA altamente repetitivas a través del locus puede explicar estos eventos recombinacionales no-usuales (13). De los 66Kpb de la secuencia nucleotídica del complejo multigénico, el 21% de las secuencias corresponden a 48 secuencias repetitivas de la familia Alu (8).

F Deleciones génicas.

El complejo multigénico hGH-hPL ha sido analizado en pacientes con niveles bajos o ausencia total de hPL durante el embarazo. En el caso de una mujer embarazada con ausencia total de hPL (14) se identificó por análisis molecular del complejo una deleción homocigótica de aproximadamente 35 kpb que incluye los genes hPL-4, hGH-V y hPL-3; otros miembros de la familia fueron heterocigotos para la deleción (15). El embarazo, parto y producto fueron normales, por lo que se pensó que el gen hPL-1 que contiene secuencias relacionadas a hPL y que no se eliminó en la deleción, podría producir una proteína que presentara actividades similares a las de hPL. En el caso de reducción parcial de hPL (16) se encontró en la madre afectada ausencia del gen hPL-4. En este caso los niveles de hPL en el suero materno fueron la cuarta parte de los valores normales. Dado que la expresión del gen hPL-3 no compensó la pérdida del otro gen hPL, esto sugiere una relación directa entre la dosis génica y la concentración de hPL en suero materno. Hasta la fecha no está claro el porque hPL resulta dispensable durante el embarazo.

Contrariamente a lo que sucede con hPL, en un caso de deficiencia de hormona de crecimiento que se caracteriza por enanismo, se encontró al analizar el complejo multigénico una deleción de 7.5Kpb que elimina al gen hGH-N, siendo esta la causa de la ausencia de hGH (17).

II Expresión de los genes hGH y hPL.

A Clonación molecular de los DNACs.

Trabajos realizados inicialmente en 1977 por Shine y Seeburg y col. permitieron la clonación molecular de un fragmento de 550 pb correspondiente a una porción del DNAC de hPL que hibridó al RNAm de hPL (4,18). Posteriormente Barrera-Saldaña y col. usaron esta porción del DNAC de hPL como sonda para aislar de un banco de DNACs de placenta el DNAC de hPL completo (6). En estos estudios los RNAs obtenidos de placentas a término también fueron utilizados para construir un banco de DNACs. El 5% de las clonas recombinantes del banco hibridaron con secuencias de DNA para hPL, indicando que el RNAm para hPL es abundante en tejido placentario a término. Estudios adicionales realizados por Barrera-Saldaña y col. detectaron dos diferentes DNACs de hPL que fueron caracterizados mediante digestión con enzimas de restricción (18). Cuando compararon sus secuencias encontraron que existen diez diferencias en posiciones nucleotídicas, las cuales, sólo una ocasiona un cambio en la secuencia aminoacídica. Este cambio sin embargo está localizado en el péptido señalador, que se elimina al secretarse la forma madura de la hormona, por lo que se dedujo que las hormonas producidas por los dos DNACs son idénticas.

Los DNACs de hPL obtenidos presentan aproximadamente un 92% de similitud con la secuencia de nucleótidos del DNAC de hGH (7). Esta alta similitud entre los DNACs de hGH y hPL condujo a realizar mapeos extensivos mediante digestión con enzimas de restricción para su caracterización. Los DNACs de hGH y hPL pudieron ser diferenciados por la presencia de un sitio único para la enzima XbaI y la ausencia de corte con la enzima BglII en el DNAC de hPL. Por otro lado, la secuencia del DNAC de hGH presenta un sitio único para la enzima BglII y no presenta sitio de corte para la enzima XbaI (1).

B Productos a nivel de RNA.

Los transcritos primarios de los genes hGH-N, hGH-V, hPL-3 y hPL-4 tienen una longitud de 1650 nucleótidos. El procesamiento de los transcritos produce RNAs que codifican para prehormonas de 217 aminoácidos. Además, la eliminación de los intrones "splicing" por una vía alternativa del transcrito

primario del gen hGH-N produce una delección de los primeros 45 nucleótidos del tercer exón. Este RNAm alternativo codifica para la forma variante de hGH de 20KDa (19).

Trabajos realizados por Cooke y col., demostraron que el gen hGH-V se expresa en placenta y produce también dos RNAs mediante "splicing" alternativo a nivel del cuarto intrón (20). En este estudio encontraron especies de RNAs de 900 y 1250 nucleótidos en una proporción 2:1 y esta expresión se encontró limitada al tejido de las vellosidades coriónicas de la placenta. Una de las especies de RNA se produjo por la vía de procesamiento normal que hemos descrito para hGH-N y hPL. La segunda especie de RNAm (20% del total) se originó por una vía de eliminación de intrones alternativa, en la cual, el último intrón del transcrito primario de hGH-V fué retenido, aumentando el tamaño del RNAm en 253 nucleótidos. Posteriormente, mediante histohibridación in situ, demostraron un aumento en la concentración de hGH-V durante la gestación y sublocalizaron la expresión de hGH-V en el sincitiotrofoblasto de placentas a término (21).

Entre un 10 y un 20% de los RNAs en placentas a término se encontraron específicos para hPL mientras que sólo un 0.05% fueron específicos para hGH-V. Recientemente Nickel y col. demostraron que el promotor de hPL-3 es más fuerte que el de hGH-V en células de pituitaria de rata transfectadas (22). Estos resultados indican que la expresión diferencial de estos genes esta relacionada en parte con la fuerza de sus respectivos promotores y sugiere que un mecanismo similar puede existir en placenta humana.

En el caso de los transcritos de los genes hPL activos, los tamaños de los transcritos sin procesar y procesados fueron descritos por Barrera-Saldaña y col. mediante análisis tipo Northern de los RNAs obtenidos de placenta a término (6). En este trabajo mostraron un RNAm de hPL predominante de aproximadamente 860 nucleótidos y los RNAs nucleares contenían especies de 990, 1200, 1460 y 1760 nucleótidos. Estos RNAs nucleares de alto peso molecular representan muy probablemente precursores del RNAm de hPL.

Dos sitios de iniciación de la transcripción diferentes se identificaron en los genes hPL-3 y

hPL-4 (11). La mayoría de los transcritos inician la transcripción 30 pb corriente abajo de la secuencia TATAAA y aproximadamente el 5% de los transcritos inician 30 pb corriente abajo de la secuencia CATAAA. Esta secuencia se encuentra localizada 55 pb corriente arriba de la secuencia TATAAA. Los niveles de RNAs de los genes hPL-3 y hPL-4 en placenta fueron determinados por Barrera-Saldaña y col. mediante digestión con enzimas de restricción de las clonas de DNAC de placenta, así como por análisis de transcripción inversa y digestión con nucleasa S1. Estos estudios mostraron una mayor expresión de hPL-4 en relación a hPL-3 en una proporción de 3 a 2 (18).

Por otro lado, el grupo de Chen y col. encontraron que los niveles de expresión de hPL-4 y hPL-3 constituyen el 3 y 0.5% de los RNAs de placenta, lo cual, muestra una relación de 6 a 1 en la expresión de hPL-4 y hPL-3 (8). Estudios adicionales realizados por Fritzpatrick y col., detectaron una amplia variabilidad en la relación de RNAs de hPL-4 y hPL-3 cuando analizaron los niveles de RNAs de hPL en diez placentas diferentes (23).

En relación al gen hPL-1, sus transcritos no pudieron ser detectados en placentas a término (6) y esta falta de expresión fué atribuída a la mutación que contiene este gen (G-->A) al inicio del segundo intrón (7). Interesantemente, Chen y col. en 1990 detectaron transcritos de hPL-1 en un banco de DNAC de placentas usando oligonucleótidos específicos para hPL-1. El análisis de la expresión de hPL-1 mostró que el transcrito primario puede presentar un procesamiento diferente a los transcritos de los otros cuatro genes del complejo multigénico. Debido a la transición G->A presente en el sitio donador del "splicing" del segundo intrón del gen hPL-1, en este procesamiento se utilizó un sitio donador alternativo localizado dentro del segundo intrón y un sitio aceptor localizado dentro del tercer exón. Esto último condujo a la eliminación de 24 codones de este exón. La eficiencia de esta eliminación de intrones fué muy baja; uno de cada diez transcritos entró a este vía alternativa. Por lo que el mayor porcentaje de los transcritos fueron procesados en forma incompleta con eliminación total del tercer exón (8).

representa un precursor de hGH que retiene la secuencia amino-terminal de 26 aminoácidos del péptido señalador. La variante de hGH 20KDa proviene de la eliminación alternativa de intrones durante el procesamiento de las moléculas de RNAm, lo que produce una delección de los residuos aminoacídicos 32 al 46. Esta variante constituye del 5 al 10% del total de hGH producida en la pituitaria. Por último, la hGH de 17.5KDa se origina de una delección de 420 pb en el exón III que produce la eliminación de 40 aminoácidos en la proteína (19).

El gen hGH-V, cuya expresión había sido demostrada solo en la placenta y en un tumor hipofisiario (25), también expresa in vivo una proteína de 22KDa que difiere en 13 aminoácidos de la hGH 22KDa codificada por el gen hGH-N (21). Estos trabajos revelaron la presencia en placenta de un segundo RNAm del gen hGH-V producido por una vía alternativa del procesamiento del transcrito primario, del cual se deriva una proteína madura de 26KDa. El análisis del medio de las células transfectadas con hGH-V demostró la presencia de tres proteínas: la más prominente de 22KDa y las otras de 24 y 26KDa (20). Recientemente, estos mismos autores demostraron que las últimas dos proteínas son productos glicosilados de la hGH-V de 22KDa (26).

hPL es secretada como una proteína de 22KDa por las células del sincitiotrofoblasto de la placenta (27). Esta hormona es detectable en sangre periférica a las tres semanas después de la concepción (28) y alcanza un nivel máximo de hasta un gramo diario al final del embarazo (29). hPL se ha encontrado en sangre fetal y fluido amniótico en concentraciones de 300-1000 veces menores que en tejido normal. Por otro lado, a pesar de que transcritos del gen hPL-1 han sido detectados (8), hasta la fecha no se ha determinado si el gen hPL-1 puede producir una proteína in vivo.

Con estos antecedentes podemos resumir que mientras dos genes hGH producen al menos cuatro proteínas diferentes, la secuencias nucleotídicas de los tres genes de hPL codifican para la síntesis de una sola forma madura de hPL (ver figura 3), paradoja que requería mayor investigación al inicio del presente trabajo.

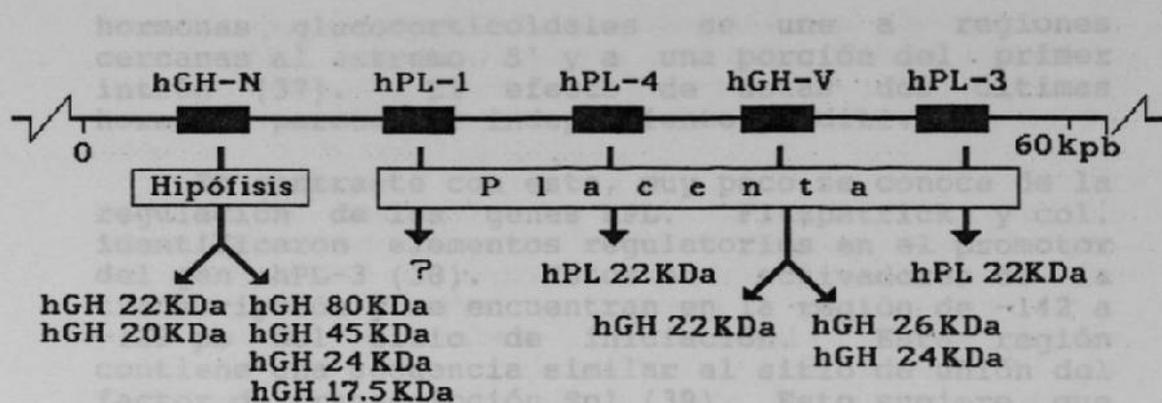


Figura 3. Expresión de los genes hGH y hPL. En este diagrama se representa la expresión específica de tejido de los genes hGH y hPL, así como sus productos a nivel de proteína.

Para explicar lo anterior, Rogers y col., en 1986 analizaron la presencia de potenciadores o "enhancers" en el complejo multigénico hGH-hPL. Demostraron la presencia de un "enhancer" o D

Regulación génica. La alta similitud en la secuencia nucleotídica de los extremos 5' de los genes hGH y hPL (93.8%) sugiere que un mecanismo muy preciso regula su expresión específica de tejido.

El promotor de hGH contiene varias secuencias importantes para la regulación de la transcripción. Esta regulación está dada por la hormona tiroidea (30 y 31), glucocorticoidea (29, 30) y liberadora de hormonas del crecimiento (GHRH). También se une al promotor el factor específico de pituitaria GHF-1/Pit-1 (32 y 33). Este factor es una proteína de unión al DNA que contiene un dominio "homeobox" (34 y 35) y se cree que es responsable de la expresión específica de tejido de los genes hGH y hPrl. Las secuencias de DNA requeridas para la inducción hormonal parecen ser diferentes. El receptor de la hormona tiroidea se une a la secuencia de -290 a -129 pb del sitio de iniciación de la transcripción. Estudios adicionales indican que cuatro sitios están involucrados en la regulación de la hormona tiroidea, estos están localizados: i) 1000 pb corriente arriba del promotor, ii) dentro de las 200 pb corriente arriba del inicio de la transcripción, iii) en la secuencia TATA y iv) dentro del primer intrón del gen hGH (36). El receptor de las

hormonas glucocorticoidales se une a regiones cercanas al extremo 5' y a una porción del primer intrón (37). El efecto de estas dos últimas hormonas parece ser independiente y aditivo.

En contraste con esto, muy poco se conoce de la regulación de los genes hPL. Fitzpatrick y col. identificaron elementos regulatorios en el promotor del gen hPL-3 (38). Estos son activadores de la transcripción y se encuentran en la región de -142 a -129 pb del sitio de iniciación. Esta región contiene una secuencia similar al sitio de unión del factor de transcripción Sp1 (39). Esto sugiere que hPL-3 puede ser regulado transcripcionalmente por factores trans-actuantes como Sp1 o similares a Sp1. Estas secuencias regulatorias del promotor de hPL-3 fueron requeridas para la expresión basal pero no regularon la expresión específica de tejido.

Para explicar lo anterior, Rogers y col., en 1986 analizaron la presencia de potenciadores ó "enhancers" en el complejo multigénico hGH-hPL. Demostraron la presencia de un "enhancer" o potenciador transcripcional de 2.2 Kpb en el extremo 3' del gen hPL-3, esto es en el extremo distal del complejo multigénico hGH-hPL (40). Recientemente, Walker y col., delimitaron al "enhancer" de hPL a una región de 138 pb en el extremo 3' del gen hPL-3 (41). Este potenciador mostró ser esencial para la expresión específica de tejido. Además identificaron una secuencia de 22 pb en el "enhancer" que se une a proteínas regulatorias encontradas en células productoras de hPL. Hasta la fecha no se ha descrito ningún "enhancer" asociado al gen hGH, aunque se encontró uno en el extremo 5' del gen de la hormona de crecimiento de rata (34).

E Modelos in vitro.

El análisis de la expresión de secuencias de DNA introducidas a células en cultivo ha sido importante en estudios de regulación de la expresión génica. Los genes aislados en el laboratorio mediante técnicas de Ingeniería Genética pueden ser introducidos a células eucarióticas en cultivo.

La expresión de genes en cultivo de células puede ser transitoria o estable, dependiendo del tiempo que dure la expresión. En la primera el gen introducido generalmente por transfección permanece en forma extracromosómica y se expresa activamente

en las primeras 24-72 h, después de lo cual, es eliminado. En la segunda, se seleccionan aquellas células en las que el gen introducido se integra al genoma celular por lo que se establece una expresión continua y heredable (42).

Se ha dado gran importancia a la construcción de vectores de expresión eucarióticos que dirigen eficientemente la expresión de los genes o sus DNAs (43). Estos vectores poseen básicamente los siguientes componentes: i) secuencias procarióticas del origen de replicación y un marcador de resistencia a antibióticos para la propagación y selección del plásmido en la célula hospedera respectivamente, ii) secuencias promotoras y potenciadores o "enhancers" que controlan la iniciación de la transcripción, eficiencia y especificidad, iii) secuencias involucradas en el procesamiento del transcrito primario y iv) el gen o DNAC que se quiere expresar.

Algunos de los vectores de expresión más eficientes se han construido utilizando señales de regulación virales. Un ejemplo de este tipo es la serie de plásmidos pSV2 que contienen el promotor del virus del simio 40 (SV40) (44). Otros vectores contienen como secuencias reguladoras las repeticiones terminales largas (LTR) del virus del sarcoma murino (VSM) ó del virus del sarcoma de Rous (45).

Se ha demostrado la síntesis, procesamiento y secreción de hGH en diferentes sistemas de cultivo celular. Pavlakis y cols., determinaron la expresión de hGH con plásmidos recombinantes que contienen los genes hGH en el vector pSV (46). Este mismo vector permitió a Lupker y col., demostrar que la prehormona es procesada correctamente por las células de mono cuando obtuvieron una línea de células Vero que expresa establemente grandes cantidades de hGH al medio extracelular (47).

La presencia de un potenciador muy potente localizado corriente arriba del gen inmediato temprano del citomegalovirus humano (hCMV) fue descrita por Boshart y col., en 1985. Durante su caracterización esta unidad promotor-potenciador mostró ser una de las unidades de control de la transcripción mas fuertes quedando evidente su utilidad para ser incorporado a vectores de expresión eucariotes (48). La potencia de la unidad

promotor-potenciador fue demostrada por Foecking y Hofstetter tanto en ensayos de expresión transitoria como estable. Esta unidad mostró ser mas potente y versátil como elemento regulatorio transcripcional que el promotor del virus SV40 y el LTR del virus del sarcoma de Rous (49). Como apoyo a los resultados anteriores Pasleu y col., demostraron una mayor expresión de bGH en células de rata GH3 con esta unidad que cuando utilizaron el LTR del virus de sarcoma de Rous (45).

Las primeras observaciones de la expresión de genes eucarióticos en cultivo celular sugirieron que la eliminación de intrones era obligatoria para la acumulación de RNAs en el citoplasma. Debido a lo anterior la llamada primera generación de vectores de expresión para DNAs, incluyeron un intrón heterólogo además de las secuencias de poliadenilación (44). Sin embargo, en 1980 Brinster y col. usaron vectores de expresión de DNAs de la segunda generación que no contienen intrones y demostraron que los intrones no son necesarios para la acumulación de RNAs en células transfectadas (50).

F hGH como gen de referencia.

La cuantificación de la expresión génica en sistemas de expresión transitoria está basada en determinar los niveles, ya sea de RNA o proteína, que dirige el gen transfectado. El estudio de la expresión génica en células transfectadas para lograr expresión transitoria ha sido facilitado con el uso de vectores de expresión que dirigen la síntesis de actividades enzimáticas que pueden ser determinadas fácilmente, como es el caso de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT)(51). Este ensayo de actividad de CAT ha sido utilizado ampliamente porque es fácilmente cuantificable, rápido y reproducible. El ensayo CAT ha sido también utilizado como gen referencia para determinar la eficiencia de los experimentos de transfección. En algunos experimentos el mismo vector de expresión contiene el gen de referencia así como el gen que se va a analizar su expresión. En otros experimentos se utilizan estos elementos en vectores diferentes, por lo que se recurre a co-transfectar las células en cultivo con los dos vectores de interés.

En 1986 Selden y col. describieron un sistema

de expresión transitoria que está basado en la detección inmunológica de la hGH secretada por las células transfectadas (52). Los niveles de hGH secretada al medio extracelular fueron proporcionales a la cantidad de RNAm citoplásmico y a la cantidad de DNA transfectado. Esta característica permitió el registro continuo de la expresión en las células transfectadas y la utilización de la expresión de hGH como gen de referencia para determinar la eficiencia de la transfección. También demostraron que el sistema de expresión transitoria de hGH en células de ratón es diez veces más sensible que el sistema de expresión CAT y es cualitativamente diferente a los sistemas generalmente utilizados porque no requiere la destrucción de las células transfectadas.

III Relaciones funcionales de hGH y hPL.

A Estructura tridimensional.

El reciente desarrollo de los métodos para purificación de proteínas y la capacidad para producir proteínas homogéneas mediante Ingeniería Genética ha hecho posible la disponibilidad de sus cristales para estudiarlos por difracción de rayos X.

hPL, hGH y la hormona del crecimiento porcino (pGH), son los tres miembros de la familia de la hormona del crecimiento que se han analizado. De estas hormonas, pGH fué utilizada por Abdel-Meguid y col. en 1987 para determinar su estructura tridimensional (53). Esta consiste principalmente de cuatro α -hélices antiparalelas distribuidas en un paquete helicoidal enrollado a la izquierda (ver figura 4). El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de pGH con otras GHs revela que los residuos dentro de las α -hélices son predominantemente invariables y por lo tanto son necesarios para mantener la integridad estructural de estas proteínas.

La alta similitud en secuencia aminoacídica de estas hormonas sugiere que la estructura porcina es básicamente la misma en las otras hormonas del crecimiento de mamíferos, por lo que se propuso como una estructura tridimensional general para todas estas proteínas (ver figura 4).

B Receptores somatogénicos y lactogénicos.

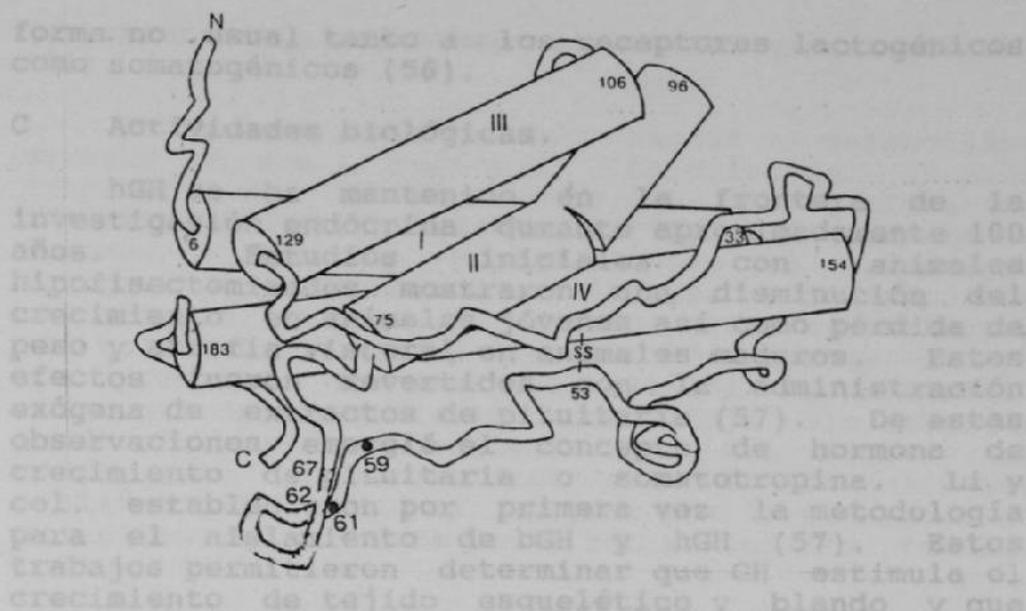


Figura 4. Modelo tridimensional de hGH basado en la estructura de la hormona del crecimiento porcino. Los cilindros representan la estructura de alfa-hélice y los residuos están numerados de acuerdo a la secuencia de hGH.

Una gran cantidad de actividades biológicas han sido atribuidas a los miembros de la familia multigénica hGH-hPL. Estas actividades están mediadas por la unión de las hormonas a receptores específicos en la superficie celular de las células blanco. Se han descrito dos categorías de receptores: los somatogénicos y los lactogénicos. La estructura de estos dos tipos receptores ha sido descrita (54 y 55), pero no se conoce como se lleva a cabo la transducción de la señal.

Las interacciones receptor lactogénico-ligando contribuyen al mantenimiento de la lactancia, desarrollo mamario y función reproductiva normal. Los efectos de las interacciones receptor somatogénico-ligando están relacionadas con el crecimiento lineal del hueso y con funciones metabólicas generales. Estas funciones están mediadas: i) indirectamente por la expresión del factor-1 del crecimiento parecido a insulina y ii) directamente por efecto en tejidos blanco periféricos (54).

Prl y PL se unen a receptores lactogénicos, mientras que las GHs de subprimates se unen a receptores somatogénicos. Contrario a esto, hGH y todas las GHs de primates en general se unen de una

forma no usual tanto a los receptores lactogénicos como somatogénicos (56).

C Actividades biológicas.

hGH se ha mantenido en la frontera de la investigación endócrina durante aproximadamente 100 años. Estudios iniciales con animales hipofisectomizados mostraron una disminución del crecimiento en animales jóvenes así como pérdida de peso y atrofia visceral en animales maduros. Estos efectos fueron revertidos con la administración exógena de extractos de pituitaria (57). De estas observaciones emergió el concepto de hormona de crecimiento de pituitaria o somatotropina. Li y col. establecieron por primera vez la metodología para el aislamiento de bGH y hGH (57). Estos trabajos permitieron determinar que GH estimula el crecimiento de tejido esquelético y blando y que está involucrada en el metabolismo de proteínas, carbohidratos y grasas. La función primaria de esta hormona es inducir el crecimiento proporcional de tejidos esquelético y blando. Estos efectos anabólicos son en parte mediados por factores de crecimiento dependientes de hGH llamados somatomedinas (59). La propiedad inductora de crecimiento de hGH es determinada: i) mediante la prueba de ganancia de peso, en la cual, el incremento de peso en los animales hipofisectomizados es registrado durante diez días de administración de la hormona y ii) mediante el ensayo de tibia, en el que, el crecimiento de las epífisis de las tibias en animales hipofisectomizados se mide después de inyecciones diarias de hGH. Además de la actividad somatogénica, hGH presenta efectos biológicos múltiples, como son: actividades diabetogénicas, lipolíticas, lactogénicas, similares a insulina y activación de macrófagos (60).

Por su parte, la hGH 20KDa comparte algunas actividades biológicas con la hGH 22KDa, ya que presentan la misma actividad para inducir el crecimiento y aumentar la ganancia de peso en animales hipofisectomizados (61). Sin embargo, algunas otras actividades como las similares a insulina, el efecto sobre ácidos grasos y glucosa se encuentran altamente disminuidos, pero no ausentes, en la hGH 20KDa. Por lo que esta variante, comparada con hGH 22KDa, presenta actividades marcadamente disminuidas en el metabolismo de

carbohidratos, proteínas y ácidos grasos libres (62).

Se ha postulado, que hPL regula el metabolismo materno durante el embarazo. La principal función propuesta para hPL es como un antagonista de insulina (63). hPL estimula lipólisis materna e incrementa los ac. grasos libres en la sangre materna, permitiendo su utilización como una fuente de energía. A pesar de su alta similitud con hGH, hPL no es efectiva como inductora del crecimiento ya que presenta solamente el 1% de la actividad inductora del crecimiento de hGH (64). Sin embargo, evidencia reciente sugiere que hPL regula el crecimiento y metabolismo en tejidos fetales aislados (65). Esto es apoyado por la presencia de receptores específicos para hPL en tejidos fetales humanos (66).

D Bioensayos in vitro.

La actividad biológica de hGH ha sido verificada tradicionalmente en bioensayos animales midiendo el aumento de peso corporal y el incremento de tejido esquelético blando y duro (67). Recientemente, Morikawa y col. demostraron que hGH induce la conversión adipocítica de fibroblastos 3T3-F442A de ratón e identificaron esta actividad como una propiedad específica de hGH, que no presentan otras hormonas de procedencia hipofisiaria (68). Estos mismos autores encontraron que la hGH 20KDa, también es capaz de inducir este fenómeno de diferenciación y que además este bioensayo presenta una alta sensibilidad y especificidad comparado con el bioensayo tradicional animal (69). La conversión adipocítica depende de los receptores somatogénicos en los fibroblastos 3T3, por lo que hGH actúa como un potente factor adipogénico mientras que hPL no presenta esta actividad.

Las propiedades lactogénicas de hGH fueron descritas desde hace aproximadamente 20 años y han sido confirmadas en varias especies. Uno de los bioensayos in vitro mas utilizado para medir la actividad lactogénica está basado en el efecto mitogénico de las células Nb2 de Linfoma de rata (70). En este bioensayo las células proliferan cuando se cultivan en presencia de Prl, hGH, hPL u otras hormonas lactogénicas.

E Estudios con digestiones enzimáticas.

Se han realizado múltiples estudios de digestiones enzimáticas de estas hormonas proteicas con el objeto de dilucidar las relaciones entre su estructura primaria y actividades biológicas. En estos estudios, enzimas como la plasmina, subtilisina, bromelaina, quimiotripsina, pepsina y tripsina, cortan estas moléculas en uno o más sitios, y las hormonas son convertidas en una estructura con dos o más cadenas (71). La digestión de hGH con plasmina mostró que el fragmento correspondiente a los 134 residuos del extremo amino-terminal de la proteína presentaba actividades somatotrópicas. Este fragmento pudo ser posteriormente degradado con bromuro de cianógeno y se obtuvo un fragmento de 111 aminoácidos (residuos 15-125) que presentó tanto actividad lactogénica como somatogénica (72). Posteriormente se describieron péptidos pequeños como los residuos 1-54 de hGH, ó 6-133 de bGH que presentaron una actividad significativa en el aumento de las epífisis esqueléticas, por lo que la actividad biológica de hGH fué adscrita a diferentes regiones en la molécula. Por otro lado, otros estudios utilizaron fragmentos de hPL producidos mediante digestión limitada con plasmina y determinaron también que la actividad lactogénica de esta hormona se encuentra en los primeros 134 residuos aminoácidos de la proteína (73). Resultados similares fueron obtenidos con la hidrólisis de hGH por subtilisina (74). Sin embargo en todos estos estudios de bioactividades in vitro de los fragmentos hormonales se requirieron altas dosis de fragmentos; en muy pocas ocasiones los fragmentos produjeron respuestas dependientes de la dosis, como cuando se administraron hormonas íntegras.

F Características estructurales de hGH y hPL relacionadas a actividades biológicas.

Para analizar las relaciones estructura-función en las GHs, Nicoll y col. determinaron los residuos conservados en diferentes especies (75). Las secuencias conocidas de GHs de no-primates fueron alineadas con Prls para determinar la máxima similitud con hGH y hPL. Como ya hemos descrito, hPL presenta un 85% de similitud con hGH, pero es virtualmente inactiva en el ensayo de inducción del crecimiento. De los 28 residuos en que hPL difiere de hGH; 17 fueron eliminados como residuos implicados en esta actividad porque se encuentran en

partes de la molécula que no son esenciales para la actividad de hGH y otras GHs. Además, encontraron que éstas hormonas difieren solamente en las regiones de los residuos aminoacídicos 60-68 y 99-113, cuando analizaron sus perfiles hidrofílicos e hidrofóbicos. La primer región de divergencia es causada por una sustitución de la arg 24-->met y la segunda involucra seis sustituciones, dos de las cuales causan solo ligeros cambios y las cuatro restantes causan un incremento significativo en las características hidrofílicas de hPL en esta región. Estas cuatro sustituciones cambian la predicción de la estructura secundaria de la proteína, haciendo a hPL diferente de hGH y otras hGHs en esta región. Por lo tanto, estos análisis indican que las cuatro sustituciones entre los residuos 99-113 de hPL podrían ser importantes para la pérdida de su actividad inductora del crecimiento.

Por otro lado, Retegui y col. en 1982 reconocieron mediante anticuerpos monoclonales el principal determinante antigénico de hGH en los residuos 98 a 128 del extremo amino terminal de la proteína (76). Se ha descrito que el triptofano (trp) que se encuentra en la posición 86 de esta proteína no es esencial para la actividad biológica de hPL. En este estudio encontraron una actividad disminuída de hPL cuando oxidaron el residuo trp en hPL así como cuando realizaron un rompimiento de este mismo residuo. Lo anterior podría deberse a que el residuo trp está formando parte de uno de los determinantes antigénicos que permiten mantener la configuración molecular requerida para el reconocimiento por el anticuerpo específico (77). Posteriormente Neri y col. en 1984 identificaron un determinante antigénico común a hGH y hPL entre sus residuos 166 y 179 (78).

G Análisis funcional de proteínas quiméricas.

Burstein y col. y Rusell y col., en trabajos independientes, construyeron moléculas híbridas de hGH y hPL mediante la recombinación de un fragmento de hGH (residuos 1-134) con un fragmento de hPL (residuos 135-191) y viceversa. Estos experimentos fueron realizados con modificaciones químicas y/o proteólisis parcial de las proteínas y demostraron una vez más que la actividad biológica y la especificidad inmunológica de cada una de estas hormonas esta determinada por el fragmento

comprendido entre los aminoácidos 1 y 134 de estas proteínas (79, 80).

Gertler y col. en 1986 construyeron y expresaron en *Escherichia coli* un recombinante análogo de hGH que perdió 13 aminoácidos del extremo amino-terminal de la proteína (81). Este análogo de hGH inhibió la proliferación de las células Nb2 de linfoma y mostró una disminución en la unión a receptores somatogénicos de células Nb2 y linfocitos IM-9. Estos resultados indicaron que el extremo amino-terminal de hGH es absolutamente necesario para la unión eficiente de hGH a los receptores lactogénicos y somatogénicos.

Estudios posteriores realizados por este mismo grupo con quimeras construídas entre hGH y bGH sugirieron que el sitio de unión de hGH hacia el receptor lactogénico y somatogénico incluye el extremo amino-terminal de la molécula, mas específicamente los residuos aminoacídicos 8-18 (82, 83).

Recientemente Cooke y col. describieron la síntesis de proteínas quiméricas producto del intercambio del tercer y cuarto exón de hGH por los exones correspondientes de Prl de rata y GH de rata (84). Las proteínas quiméricas resultantes conservaron su habilidad para unirse a receptores lactogénicos pero perdieron su actividad de unión a receptores somatogénicos. Esta pérdida selectiva de unión al receptor somatogénico de las proteínas quiméricas sugiere que algunos de los determinantes estructurales de unión a receptores somatogénicos y lactogénicos son distintos y que los requerimientos estructurales del receptor lactogénico podrían ser menos estrictos que los necesarios para la unión al receptor somatogénico.

H Localización de regiones funcionales de hGH mediante mutagénesis dirigida.

Elegantes experimentos realizados por Cunningham y col. identificaron tres regiones específicas de hGH que modulan la unión al receptor somatogénico (85, 86). Estos trabajos fueron realizados mediante mutagénesis dirigida por barrido con DNA análogo y alanina y evaluaciones por unión a anticuerpos monoclonales y a receptores somatogénicos.

Las regiones que identificaron están localizadas en: i) los residuos aminoácidos 12 al 19 codificados por el segundo exón de hGH, ii) los residuos 56 al 64 codificados por el tercer exón y iii) los aminoácidos 167 al 181 codificados por el quinto exón. Se basaron en el modelo tridimensional descrito para pGH (53), para deducir que estas tres regiones coalescen en una región discreta entre el extremo amino terminal de la hélice 1, un lazo desde la cisteína 53 al inicio de la hélice 2 y la porción central al extremo carboxi-terminal de la hélice 4 de la proteína (ver figura 5).

La región central y el extremo carboxi-terminal fueron mas importantes en la unión al receptor somatogénico que el segmento del extremo amino-terminal de la proteína. Hasta la fecha no se sabe si estas mismas regiones están involucradas en la unión al receptor lactogénico o si esta segunda especificidad es distinta estructuralmente.

En una serie de estudios realizados por Retegui y col. encontraron 20 determinantes antigénicos en la superficie de hGH. Estos trabajos demostraron que los dominios antigénicos de hGH están localizados en la porción central de la secuencia. Estos son los residuos aminoácidos 1 al 32 codificados por el segundo exón. Esta porción interactúa parcialmente con los residuos 106-128 codificados por el cuarto exón y con los residuos 155-191 codificados por el quinto exón de hGH (87, 88).

Por otro lado, el grupo de Vogel y col. construyó y expresó en *Escherichia coli* dos nuevos análogos de hGH para determinar las propiedades de unión a los receptores somatogénicos y lactogénicos (89). Uno de los análogos de hGH construídos contenía una delección de siete aminoácidos en el extremo amino-terminal de la proteína, además de dos mutaciones puntuales en las cuales la arg en la posición 8 fué sustituida por metionina (met) y el aspártico (asp) en el sitio 11 por alanina (ala). El otro análogo además de contener los primeros 13 aminoácidos de bGH ya descritos por estos mismos autores, contenía una elongación de los aminoácidos met y ala en el extremo amino-terminal y una mutación puntual que condujo a la sustitución del residuo ala en la posición 11 por asp. Estos trabajos indican que los dominios de hGH involucrados en la unión a los receptores

somatogénicos y lactogénicos no son idénticos. Además, sus resultados sugieren que el asp en el sitio 11 encontrada en los GHs de primates y Prls (no encontrada en GHs de no-primates) no es importante para la actividad lactogénica en el bioensayo de células Nb2. Por otro lado, determinaron que los residuos aminoacídicos del 8 al 13 son definitivamente esenciales para la actividad de hGH, pero se propone que afectan indirectamente su actividad, estabilizando la siguiente parte de la α -hélice, por lo que la eliminación de esta región podría afectar la estructura secundaria de la proteína.

Recientemente, el grupo de Uchida y col. utilizó también mutagénesis dirigida para construir cuatro mutantes artificiales de hGH (90). Dirigieron las modificaciones a la región central del lazo localizada en los aminoácidos 54 a 74 previamente descrita por el grupo de la compañía Genentech (86). Los cambios nucleotídicos condujeron al reemplazo de la prolina en la posición 59 ó 61 por alanina y a la delección de los residuos aminoacídicos 62 al 67 de hGH. Las proteínas mutantes purificadas mostraron que los residuos 62 al 67 deletados (ver figura 4) son determinantes importantes para la diferenciación de células preadipocíticas 3T3-F442A hacia adipocitos. Por lo que se sugiere que esta región podría ser un requerimiento común para la unión al receptor somatogénico de hGH.

HIPOTESIS

Las secuencias nucleotídicas de dos de los tres genes hPL codifican una sola forma madura de la hormona y se desconoce si el tercero es funcional. Como se ha detectado gran variabilidad en la expresión de estos genes y aun no se ha demostrado su contribución a la producción placentaria de hPL, si analizamos la expresión de cada uno de ellos en un modelo in vitro, determinaremos su potencial de codificación y podremos identificar secuencias nucleotídicas responsables de sus diferencias en niveles de expresión.

OBJETIVOS

1. Desarrollar un sistema eficiente para detectar productos de expresión derivados de genes introducidos a células en cultivo.
2. Determinar la expresión y el potencial de codificación in vitro de los genes hPL.
3. Verificar la actividad biológica de las hormonas producidas en cultivo celular en el modelo de diferenciación adipocítica.

MATERIALES Y METODOS

I Enzimas, estuches comerciales, radioisótopos, bacterias y plásmidos.

Obtuvimos las enzimas de restricción y modificación de las compañías Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD E.U.A.) y New England Biolabs, (Berkeley, MA E.U.A.) y para su utilización seguimos las recomendaciones de los fabricantes. Para la cuantificación de hGH por radioinmunoensayo (RIA) utilizamos un estuche comercial de Diagnostic Products Co. (Los Angeles, CA E.U.A.). Los nucleótidos radiactivos [32 P]- α dCTP y [35 S]-metionina los adquirimos de Amersham International (Buckinghamshire, Inglaterra). Las cepas de Escherichia coli utilizadas fueron HB101, RRI y JM101. Aunque los plásmidos utilizados no ofrecen riesgo alguno para la salud, trabajamos siguiendo las recomendaciones internacionales de los Institutos Nacionales de la Salud en E.U.A. El plásmido pNUT (91) fué obsequiado por el Dr. Richard Palmiter de la Universidad de Washington en Seattle, E.U.A. El gen hGH-N cuyo aislamiento ya ha sido descrito a partir de un banco de genes humanos (92), fué donado a nuestros laboratorios por el Dr. Grady Saunders de la Universidad de Texas en Houston, E.U.A., mientras que el plásmido pCMVCat fué un obsequio del Dr. Hans Hofstetter de la compañía CIBA-GEIGY. El DNAC de hPL, fragmento utilizado como rastreador molecular, fué derivado del plásmido phPL815 (6). Dicho fragmento presenta un 90% de similitud en secuencia con el DNAC de hGH.

II Construcción de moléculas recombinantes.

Los fragmentos de DNA requeridos para los experimentos de clonación molecular fueron purificados a partir de geles preparativos de agarosa o poliacrilamida. Esto lo efectuamos ya sea por electroelución o por la técnica de adsorción a vidrio (93).

Realizamos las reacciones de ligación a 16°C por 18 h en volúmenes de 10 a 20 μ l. Empleamos una relación molar de 3 a 1 del DNA del inserto con respecto al vector. Precipitamos el material ligado con etanol y resuspendimos en TE (10 mM Tris-HCl y 0.1 mM EDTA, pH 7.5). Empleamos este material para transformar (94) las cepas HB101 o RRI de Escherichia coli. Aislamos los plásmidos recombinantes a partir de 3 ml cultivo y los sometimos a un análisis rápido con

enzimas de restricción y finalmente preparamos el DNA plasmídico a gran escala (94). Caracterizamos los plásmidos recombinantes en detalle mediante digestiones con enzimas de restricción diagnósticas, electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida y análisis de DNA tipo Southern (95). Finalmente obtuvimos tres preparaciones independientes de los DNAs plasmídicos mediante la técnica de preparación a gran escala (94) para asegurar una calidad uniforme de las preparaciones y evitar variaciones en los experimentos posteriores donde se introducirían estos a células en cultivo.

A partir del plásmido pMThGH, recuperamos con la ayuda de cortes con enzimas de restricción un fragmento de 2.1 Kpb que contiene, en la estructura del gen, la región que va desde el sitio BamHI en el nucleótido +2 (es decir inmediato al inicio del RNAm) hasta el sitio EcoRI localizado aproximadamente 600 nucleótidos más allá de la señal de poliadenilación. Como siguiente paso de la estrategia insertamos este fragmento de BamHI a EcoRI entre los mismos sitios de la región de sitios múltiples de clonación (SMC) del vector de expresión pAVE1, dando lugar a pAVE1hGH.

Los genes hPL sin sus promotores fueron insertados en pNUT, al cual se le habían eliminado previamente las secuencias del gen hGH. Las construcciones se llevaron a cabo al ligar el fragmento mayor BamHI-EcoRI de pNUT, con uno o varios fragmentos de DNA conteniendo los genes de interés. Las regiones génicas hPL subclonadas en pNUT, consistieron de las secuencias de estos genes desde el sitio natural BamHI (excepto por hPL-1), ubicado entre el segundo y sexto nucleótido del primer exón, hasta el sitio EcoRI natural o artificial (creado en el extremo 3' del gen hPL-1, con la ayuda de enlazadores moleculares) localizado varios cientos de pares de bases más allá del sitio de poliadenilación de los genes.

Construimos plásmidos recombinante híbridos entre los genes hGH-N, hPL-3 y hPL-4. Realizamos una digestión con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI de los plásmidos pNUT, pNUTHPL-3 y pNUTHPL-4, recuperamos los fragmentos correspondientes a los genes hGH-N y hPL-3 y el vector pNUT(-). Posteriormente digerimos los genes hGH, hPL-3 y hPL-4, con la enzima SacI y obtuvimos dos fragmentos de cada gen. Los fragmentos más pequeños contienen el primero y segundo exones de los genes y los más grandes contienen los últimos tres exones de los genes. Ya que obtuvimos los fragmentos realizamos las siguientes ligaciones:

vector pNUT de 5247pb con el fragmento BamHI-SacI de hPL-3 de 582pb que contiene los dos primeros exones y con el fragmento SacI-EcoRI que contiene los últimos tres exones de hGH. El producto de esta ligación fue denominado: GH(PL-3:I,II).

vector pNUT con el fragmento BamHI-SacI de hPL-4 y el fragmento SacI-EcoRI de hGH. El plásmido recombinante fue llamado: GH(PL-4:I,II).

vector pNUT con el fragmento BamHI-SacI de hGH y el fragmento SacI-EcoRI de hPL-4. El plásmido recombinante obtenido fué denominado: PL-4(GH:I,II).

III Cultivo celular, expresión transitoria y marcaje de proteínas secretadas.

Las células COS-7 de riñón de mono donadas por el Dr. Tien Kuo de la Universidad de Texas en Houston, E.U.A. fueron adaptadas a crecer en medio Eagle modificado por Dulbecco (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) conteniendo 5% y 1% de suero fetal de ternera (SFT, HyClone Laboratories, Inc., Logan UT E.U.A.). El mantenimiento y propagación de las células se realizó a 37°C en atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂.

Expusimos 3 X 10⁶ células COS-7 a 7.5 ug de DNA plasmídico preparado como precipitado fino por la técnica de fosfato de calcio (96). Evaluamos la eficiencia de transfección en cada experimento usando el ensayo (97) de cloranfenicol acetyl transferasa (CAT). Este ensayo lo practicamos en extractos de células cotransfectadas con los plásmidos de interés y el plásmido pCMVCat (98).

Para marcar las proteínas sintetizadas de novo transfectamos las células COS-7 y 48 h después sustituimos el medio de cultivo inicial por medio libre de metionina conteniendo 1% de SFT dializado y metionina marcada con [³⁵S] (Amersham Intl., Buckinghamshire, Inglaterra). Agregamos 12.5 ó 25 microcuries (μCi) de [³⁵S]-metionina por ml de medio de cultivo y continuamos la incubación por 4 h más. Para el análisis electroforético de proteínas marcadas radiactivamente precipitamos las proteínas del medio con cuatro volúmenes de acetona fría, determinamos su concentración por el método de Bradford (99) y las resuspendimos en amortiguador para electroforesis (100). Desnaturalizamos las proteínas, por ebullición durante 2 min en presencia de SDS y β-mercaptoetanol y enseguida las sometimos a electroforesis en geles

discontinuos de poliacrilamida-SDS de 5% y 13%. Colocamos los geles sobre papel filtro Whatman 3MM y secamos al vacío por 1 h a 60°C. Una vez secos, los expusimos a películas ultrasensibles de rayos X por tiempos variables a temperatura ambiente (autorradiografía).

Las cuantificaciones de hGH se realizaron mediante RIA empleando el estuche comercial anteriormente descrito. Medios de cultivo o extractos celulares fueron diluidos y procesados, usando el protocolo incluido con el estuche, con las modificaciones brevemente descritas a continuación: se disminuyó el volumen de reacción a la mitad y se aumentó el tiempo de incubación de 60 a 90 min en la primera fase de incubación y de 60 a 75 min en la segunda.

IV Aislamiento de RNA, hibridación en línea "slot dot" e hibridación tipo "Northern".

Recuperamos los RNA totales de las células transfectadas por el método de isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (101). Colectamos las células 48 h después de la transfección y aislamos los RNAs totales por el método mencionado anteriormente. Posteriormente desnaturalizamos los RNAs y los separamos en un gel agarosa-urea-ácido al 5% para analizar su integridad.

Cuando realizamos estudios de hibridación en línea "slot dot" depositamos por duplicado 3 µg de los diferentes RNAs desnaturalizados en una membrana de nitrocelulosa previamente colocada en el ensamble del sistema "vacusystem". Horneamos las dos tiras de nitrocelulosa con los diferentes RNAs e hibridamos estas con la sonda previamente marcada radiactivamente por el método de oligonucleótidos al azar (102). Utilizamos como sondas o rastreadores moleculares el DNAC de hPL y el DNAC de DHFR obtenido del plásmido pNUT. Este último fue utilizado como un reportero interno para estandarizar las eficiencias de transfección en los diferentes experimentos. Además, para validar los resultados tomando en consideración variaciones en la eficiencia de transfección, cuantificamos la cantidad de sonda DHFR hibridada y los valores obtenidos los usamos para normalizar las cantidades de RNAs depositados en un nuevo experimento.

Para el análisis de RNA tipo "Northern" desnaturalizamos los RNAs mediante glioxilación, los separamos por electroforesis en geles de agarosa de

acuerdo a su tamaño (103) y los transferimos por capilaridad a membranas de nitrocelulosa (104). Las prehibridaciones, hibridaciones, lavados y autorradiografías de los filtros las realizamos usando técnicas estándares (95).

V **Bloensayo de hGH en el modelo de diferenciación adipocítica.**

Se cultivaron células 3T3-F442A como preadipocitos en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) modificado por Dulbecco y suplementado con 5 μ g/ml de insulina, 10^{-6} M de biotina y una mezcla de 5% de suero de gato con 0.5% de suero de ternera. Para el ensayo se disgregaron las células en crecimiento exponencial con una solución de tripsina al 0.1% e inocularon en cajas de 35 mm de diámetro. Las células se cultivaron en el medio no adipogénico anteriormente descrito y cuando estuvieron confluentes reemplazamos éste por el medio definitivo de conversión (105).

La actividad adipogénica de las proteínas quimeras se analizó cuando agregamos, al medio no adipogénico de fibroblastos 3T3, un 30% del medio de las células COS-7 transfectadas con los plásmidos recombinantes. Este último contenía las proteínas quimeras producidas por las células COS-7 transfectadas con los plásmidos recombinantes híbridos. Utilizamos como testigo negativo el medio de las células que no secretaron hGH porque fueron transfectadas con el vector pNUT(-), el cual carece de secuencias codificantes para la hormona y como testigo positivo el medio de las células transfectadas con el plásmido pNUT que contiene secuencias para hGH. 7 días después de agregarles el medio definitivo de conversión, las células fueron fijadas y teñidas con el colorante rojo oleoso O para determinar la acumulación de lípidos. Posteriormente cuantificamos el número de agrupamientos de células adiposas y determinamos el porcentaje (%) de conversión adipocítica (figura 5A).

Por otro lado, también introdujimos los plásmidos recombinantes en los fibroblastos 3T3 (ver figura 5B) por la técnica de co-precipitación con fosfato de calcio-DNA (96). Posteriormente 7 días después determinamos el % de conversión adipocítica como ya describimos en el párrafo anterior.

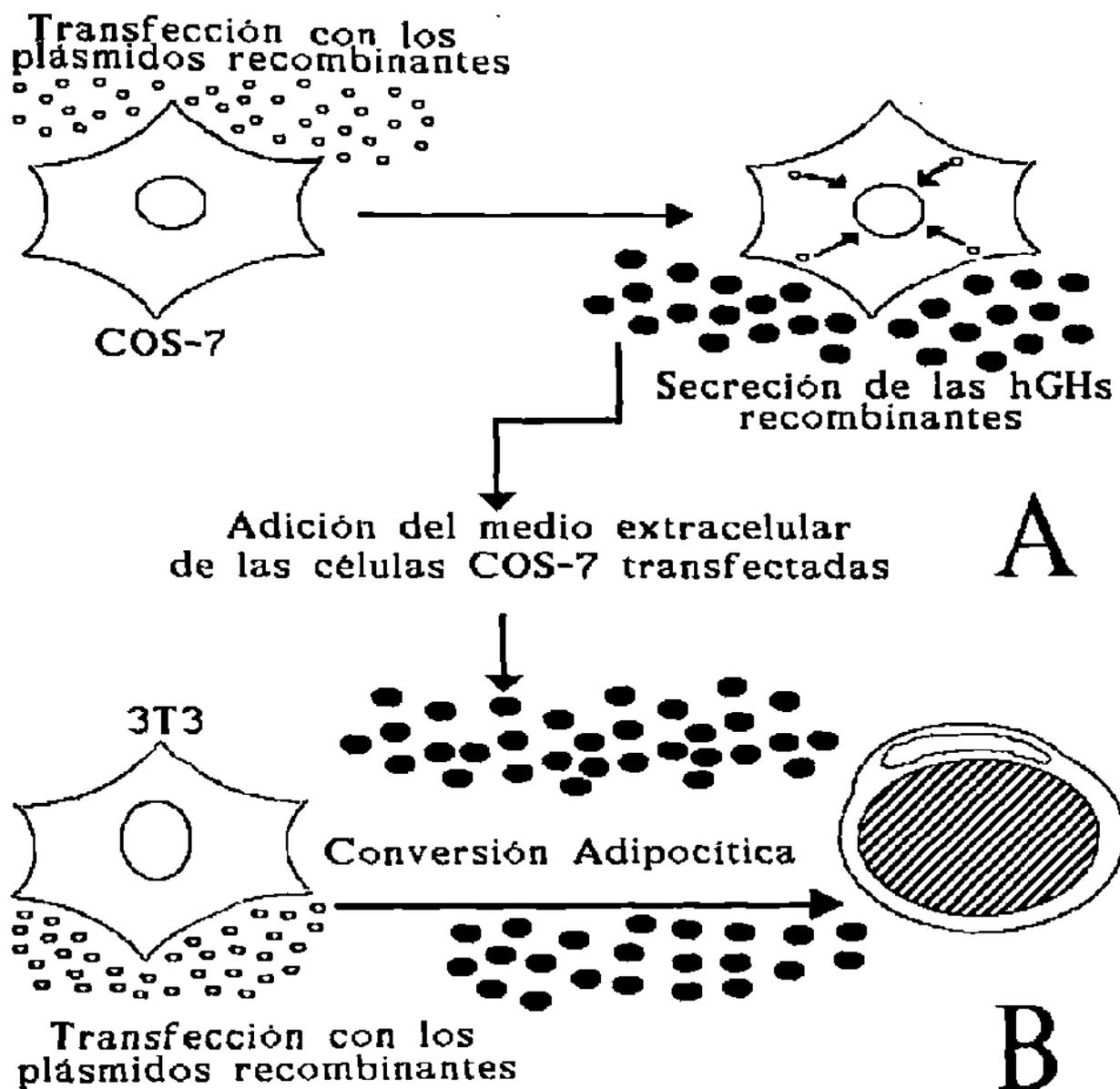


Figura 5. Bioensayo de hGH en el modelo de conversión adipocítica. En el diagrama se muestra la conversión adipocítica de las hGHs recombinantes producidas por las células COS-7 y adicionadas a cultivos de preadipocitos 3T3 (A) y de las hGHs producidas directamente por las células preadipocíticas transfectadas con los plásmidos recombinantes (B).

RESULTADOS

I. Adaptación de un modelo in vitro para la expresión y análisis funcional de hGH.

A Construcción de un vector para la expresión de hGH en cultivo celular.

Iniciamos nuestro trabajo con el vector de expresión pAVE1 previamente construido en nuestro laboratorio por Ramiro Ramírez Solís (106). Este vector posee una gran versatilidad para insertar y colocar regiones estructurales de genes bajo el control transcripcional de la potente unidad promotor-potenciador del hCMV. Decidimos probar la habilidad de este vector para expresar genes de mamíferos, optamos por usar la región estructural del gen cromosómico hGH-N (conteniendo aún los intrones), el cual ya ha sido probado y propuesto como un excelente gen de referencia para estudios de expresión transitoria de genes (50). Procedimos como se ilustra en la figura 6. En esta figura se muestra que a partir del plásmido pMThGH, recuperamos con la ayuda de cortes con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI un fragmento de 2.1 Kpb que comprende, en la estructura del gen, la región que va desde el nucleótido +2 (es decir inmediato al inicio del RNA_m) hasta aproximadamente 600 nucleótidos más allá de la señal de poliadenilación. Como siguiente paso de la estrategia, insertamos este fragmento BamHI-EcoRI entre los mismos sitios de la región de SMC de pAVE1, dando lugar a pAVE1hGH.

Una vez que obtuvimos el plásmido recombinante pAVE1hGH; caracterizamos éste con enzimas de restricción diagnósticas y realizamos la preparación de su DNA a gran escala. Obtuvimos el DNA de buena calidad y en cantidad suficiente para los experimentos posteriores con células en cultivo.

El DNA del vector pAVE1hGH fué introducido transitoriamente a células COS-7 en cultivo mediante el método de co-precipitación con fosfato de calcio. 48 h más tarde cuantificamos mediante RIA la producción de hGH por las células transfectadas. Este análisis fué practicado tanto en el medio intracelular como en el extracelular de las células transfectadas. Encontramos en el medio extracelular de las células transfectadas 1.2µg de hGH/caja de cultivo de 75 cm² lo que correspondió a un 98% del

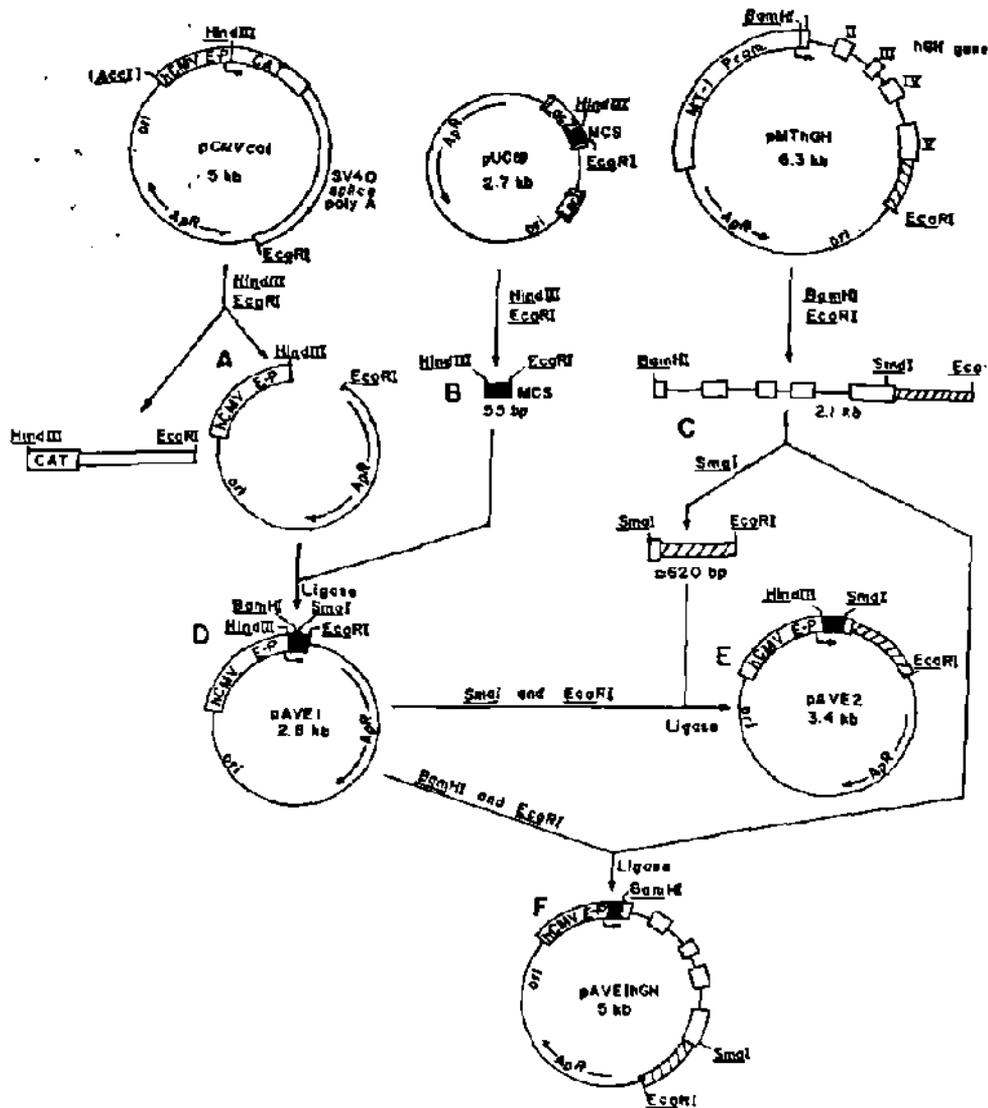


Figura 6. Estrategia para la construcción del vector de expresión pAVE1hGH. Los fragmentos aislados a partir de los plásmidos pMThGH (C) y pAVE1 (D) fueron ensamblados en (F) para dar lugar a pAVE1hGH. Kilopares de bases esta representada como Kb.

total de hGH producida por las células COS-7 transfectadas.

B Selección del vector de expresión más eficiente.

Para asegurarnos de emplear el vector de expresión más eficiente a nuestro alcance para la expresión de genes eucarióticos en cultivo, comparamos la eficiencia de expresión de hGH del vector pAVE en relación con otros vectores que poseen elementos de control transcripcionales y que son comúnmente utilizados.

Transfectamos células COS-7 con los DNAs de las construcciones quiméricas de interés: pSVgpthGH, pMThGH, pNUT y pAVE1hGH (ver figura 7). Estos vectores contienen los siguientes elementos de regulación: en el caso del pSVgpthGH, el gen hGH se encuentra bajo el control de su propio promotor natural (P) y de una copia de potenciador o "enhancer" del virus SV40. En pMThGH, el gen estructural hGH se encuentra fusionado al promotor de la metalotioneína de rata (MT). pNUT contiene el promotor de MT así como el potenciador de SV40 para expresar hGH. Finalmente pAVE1hGH, como ya describimos anteriormente, contiene el promotor-potenciador de hCMV dirigiendo la expresión de hGH.

Cuantificamos mediante RIA la cantidad de hGH secretada al medio de cultivo por las células transfectadas con cada uno de estos plásmidos recombinantes. En estos experimentos detectamos por RIA los niveles más altos de expresión en las células COS-7 transfectadas con los plásmidos pNUT y pAVE1hGH (ver figura 8). Por lo que seleccionamos estos dos vectores de expresión para los estudios subsecuentes.

C Expresión de los DNAs de hGH en cultivo celular.

Por otro lado, confirmamos la selección anterior cuando analizamos la expresión de los DNAs de hGH. Los DNAs de las hGHs de 20 y 22KDa fueron obtenidos en nuestro laboratorio mediante clonación preferencial por Diego E. Rincón Limas (107). Estos minigenes fueron insertados en el vector de expresión pAVE2 (108) por Luis E. Alvidrez Quihui (109).

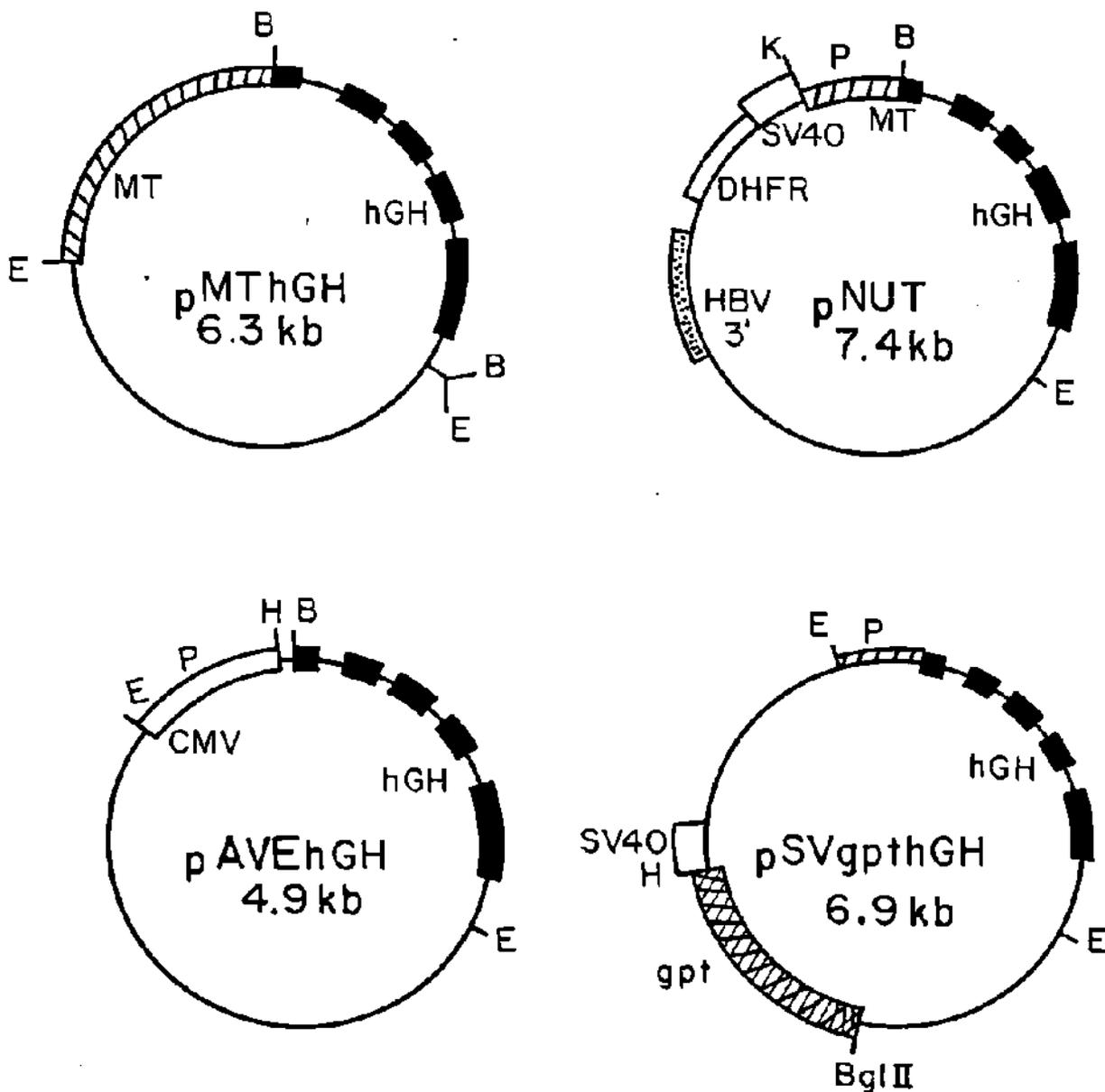


Figura 7. Estructura de los vectores de expresión de hGH. Todos los vectores de expresión, con excepción de pSVgpthGH contienen el gen hGH sin su promotor natural fusionado a los diferentes elementos de control transcripcional indicados.

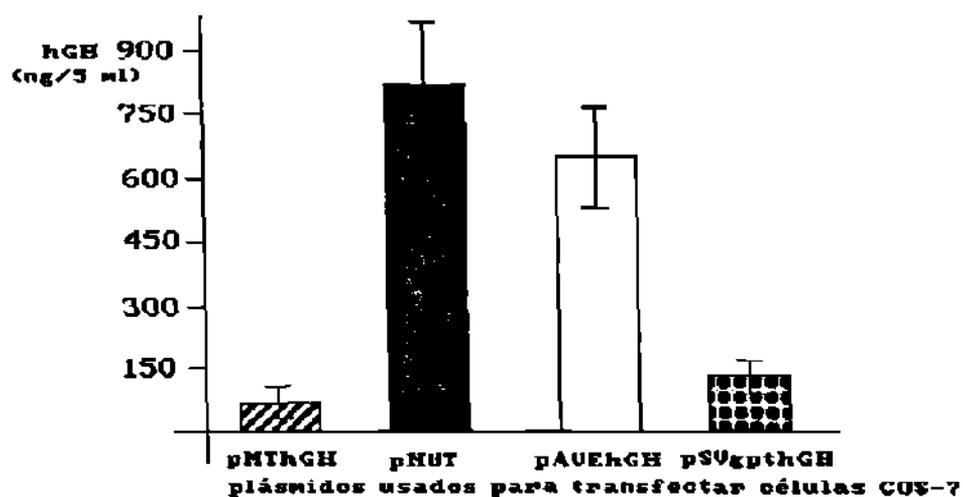


Figura 8. Expresión transitoria de hGH en células COS-7 transfectadas con los diferentes vectores de expresión. Introdujimos los plásmidos recombinantes en células COS-7 mediante la técnica de co-precipitación de fosfato de calcio-DNA. 48 h después cuantificamos mediante radioinmunoensayo la secreción de hGH al medio de cultivo. Los valores de hGH corresponden al promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes.

Para analizar la expresión de estos DNAs procedimos a introducirlos a las células COS-7 en cultivo. Utilizamos los plásmidos que contenían los nuevos minigenes hGH 22KDa (pAVEhGH22K) y hGH 20KDa (pAVEhGH20K), así como el DNA de plásmidos testigos pAVE1 y pAVE1hGH. 48 después recuperamos los medios de cultivo de las células COS-7 transfectadas con los diferentes vectores de expresión. Los valores de RIA para hGH detectados en estos experimentos se muestran en la tabla I; los valores de hGH secretados por las células transfectadas con pAVEhGH22K promediaron 1259 ng por frasco de cultivo de 75 cm² de superficie. En el caso de pAVEhGH20K estos promediaron 41 ng. Esta marcada diferencia en valores de hGH determinados mediante RIA no la esperábamos y después de confirmar su reproducibilidad, nos propusimos encontrarle explicación.

Decidimos entonces realizar la detección de las proteínas hGH22KDa y hGH20KDa expresadas y secretadas al medio en los experimentos de transfección.

Tabla I. Expresión transitoria de hGH en células COS-7 transfectadas.

Plásmido transfectado	Producción de hGH* $\bar{X} \pm D.S.$
pAVE 2	2.3 \pm 2.0
pAVE1hGH	1252.0 \pm 169.0
pAVEhGH22K	1258.8 \pm 158.3
pAVEhGH20K	41.1 \pm 23.4

* Los valores son en ng de hGH por frasco de cultivo de 75 cm² obtenidos mediante RIA en alícuotas de los medios y corresponden al promedio (\bar{X}) y desviación estandar (D.S.) de tres experimentos independientes.

D Detección de las hGHs secretadas por las células COS-7.

Primero realizamos los experimentos para detectar las proteínas sintetizadas de novo por las

células transfectadas. Para ello, marcamos con [³⁵S]-metionina las proteínas sintetizadas de novo por las células transfectadas con el plásmido pNUT. En la figura 9 se muestra el autorradiograma de un experimento de expresión transitoria donde utilizamos concentraciones de 25µCi y 50µCi de metionina marcada con ³⁵S. Una banda nueva, ausente en el medio de las células transfectadas con el vector solo [carril (-)] apareció en el medio de las células transfectadas (carriles marcados con 25µCi y 50µCi). Esta nueva banda migró en la posición esperada para la hGH purificada de hipófisis humanas. Además, detectamos una segunda banda de menor intensidad y tamaño (20KDa), la cual también comigró con la forma variante de hGH menos abundante en la hipófisis. Estos resultados cumplieron nuestro objetivo inicial de visualizar proteínas secretadas derivadas de genes transfectados mediante marcaje con 25 y 50 µCi de [³⁵S]-metionina. Como en ambos casos obtuvimos buenos resultados utilizamos la concentración menor.

Una vez que implementamos los experimentos para visualizar las proteínas sintetizadas de novo, evaluamos la expresión de las hGHs del 22KDa y 20KDa. Para ello, realizamos transfecciones con los minigenes hGH 20KDa y 22KDa y llevamos a cabo el marcaje de proteínas con [³⁵S]-metionina. Posteriormente analizamos las proteínas secretadas por las células COS-7 transfectadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y autorradiografía. La figura 10 muestra tanto la proteína hGH22KDa como la hGH20KDa con señales autorradiográficas específicas y con diferencias en abundancia mucho menores que las detectadas por el RIA. Los resultados anteriores confirmaron nuestra sospecha referente a la ineficiente detección inmune de la variante de hGH 20KDa por el anticuerpo específico para hGH 22KDa.

E Actividad adipogénica de las hGHs recombinantes producidas in vitro.

Ademas, verificamos, la actividad funcional de las hGHs recombinantes producidas in vitro en el modelo de diferenciación de fibroblastos preadipocíticos de la línea celular 3T3-F442A hacia adipocitos (105).

Cuando agregamos alícuotas del medio de las células transfectadas con pAVE1hGH al medio de

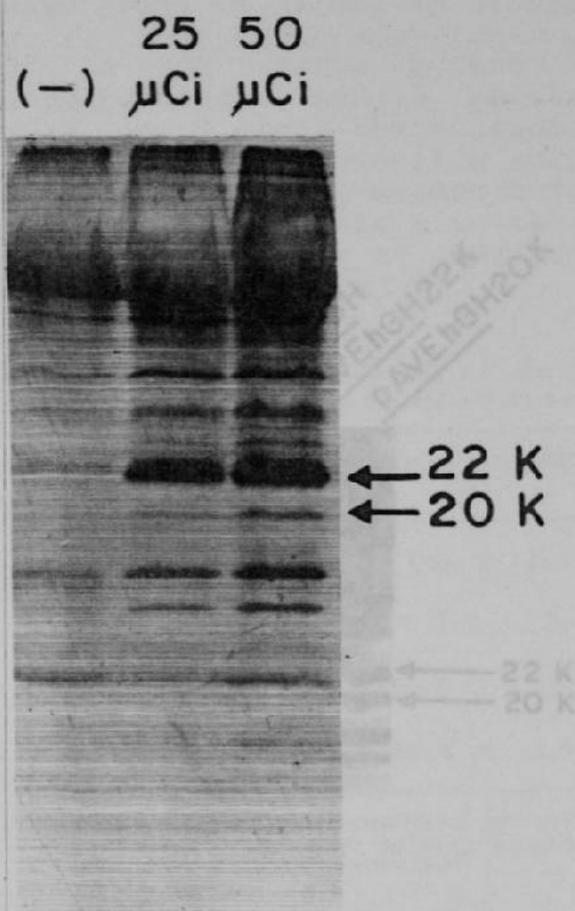
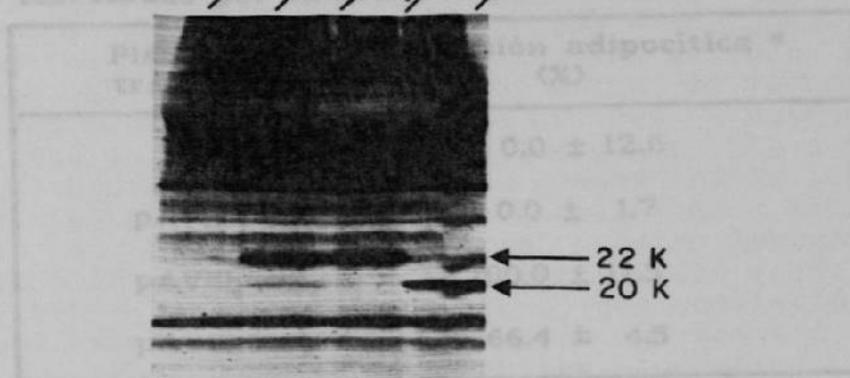


Figura 9. Detección de proteínas secretadas por las células transfectadas. Analizamos los medios de cultivo de las células COS-7 transfectadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y autorradiografía para determinar la presencia de proteínas radiactivas secretadas. Las proteínas sintetizadas de novo fueron marcadas radiactivamente usando 25 ó 50 μ Ci de [35 S]-metionina. La autorradiografía muestra la presencia de dos nuevas bandas (flechas) presentes en el medio de cultivo de las células COS-7 a las que les introdujimos el plásmido pNUT (carriles marcados 25 y 50 μ Ci). El testigo negativo [(-)] correspondió al medio de las células transfectadas con el derivado del plásmido pNUT al que se le eliminó la región codificante para hGH. El tamaño de las proteínas hGH se indica en KDa (K).

cultivo de los preadipocitos, una fracción significativa (55%) de ellos, se diferenciaron hacia adipocitos. El medio de las células COS-7 conteniendo la hGH 22KDa mostró un 100% de conversión adipocítica. Además, células 3T3 suplementadas con el medio conteniendo la hGH 20KDa alcanzaron un 55.4% de conversión adipocítica. El medio de las células transfectadas únicamente con el vector (pAVE2) no indujo esta tasa de diferenciación a niveles mayores a los que se observan de fondo o no significativos (ver Tabla II).

Tabla II. Conversión adipocítica de las hGHs secretadas por las células COS-7 transfectadas



* Las valores corresponden al promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes.

Las evidencias anteriores demuestran que las hGHs de 22KDa y 20KDa secretadas por las células COS-7 fueron capaces de inducir la conversión adipocítica de los fibroblastos preadipocíticos (3T3).

Figura 10. Detección de las hGHs de 20 y 22KDa en el medio de las células COS-7 transfectadas con los plásmidos recombinantes. Realizamos un marcaje con [³⁵S]-metionina de las proteínas secretadas por las células COS-7 transfectadas. La autorradiografía muestra la presencia de dos nuevas bandas (flechas) presentes en el medio de las células transfectadas con el vector pAVE2, conteniendo ya sea el gen (pAVEhGH), el DNAC de hGH 22KDa (pAVEhGH22K) o el DNAC de hGH 20KDa (pAVEhGH20K). Estas nuevas proteínas se encuentran ausentes en el medio de las células a las que se les introdujo el vector solo (pAVE2). El tamaño de las proteínas hGH se indica en valores de KDa enseguida de las flechas (K).

cultivo de los preadipocitos, una fracción significativa (65%) de ellos, se diferenciaron hacia adipocitos. El medio de las células COS-7 conteniendo la hGH 22KDa mostró un 100% de conversión adipocítica. Además, células 3T3 suplementadas con el medio conteniendo la hGH 20KDa alcanzaron un 66.4% de conversión adipocítica. El medio de las células transfectadas únicamente con el vector (pAVE1) no indujo este paso de diferenciación a niveles mayores a los que se consideran de fondo o no significativos (ver tabla II).

Tabla II. Conversión adipocítica de las hGHs secretadas por las células COS-7 transfectadas

Plásmido transfectado	Conversión adipocítica * (%)
-	0.0 ± 12.6
pAVE1	0.0 ± 1.7
pAVEhGH22K	100.0 ± 11.5
pAVEhGH20K	66.4 ± 4.5

* Los valores corresponden al promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes.

Las evidencias anteriores demuestran que las hGHs de 22KDa y 20KDa secretadas por las células COS-7 fueron capaces de inducir la conversión adipocítica de los fibroblastos preadipocíticos 3T3, aunque a niveles diferentes.

Los resultados que obtuvimos en esta subsección fueron utilizados para la publicación del artículo: New vectors for the efficient expression of mammalian genes and their complementary DNAs in cultured cells. Además, algunos de estos resultados fueron incluidos en la revisión: The human placental lactogen and growth hormone multigene family y en el artículo que fué sometido a publicación en Biochemical Biophysical Acta: Functional expression of human pituitary growth hormone complementary DNAs (ver anexo A).

I Potencial de codificación in vitro de los genes hPL.

Una vez que desarrollamos el modelo experimental que nos permitió cuantificar la expresión funcional de hGH in vitro, lo utilizamos para determinar la expresión de los genes hPL.

A Construcción de una nueva serie de vectores para la expresión de los genes hPL.

Las secuencias estructurales de todos los genes hPL sin sus promotores naturales fueron insertados en el vector de expresión pNUT previamente seleccionado en la sección anterior. Para realizar esto, reemplazamos las secuencias del gen hGH-N en pNUT, por aquellas correspondientes a los genes hPL. Todos los genes de la familia hGH-hPL excepto hPL-1 poseen un sitio BamHI único entre el segundo y séptimo nucleótido del inicio del gen. Este sitio facilitó la transferencia de los genes hPL a pNUT. Para proveer a hPL-1 con este sitio BamHI conveniente para las manipulaciones, Ramiro Ramírez-Solís en trabajos previos en nuestro laboratorio realizó la construcción de un gen híbrido entre hPL-1 y hPL-3 (111). Este nuevo gen consistió del primer exón, primer intrón y parte del segundo exón del gen hPL-3 y posee intactas las secuencias hPL-1 desde el sitio PvuII, en el segundo exón, hasta el sitio EcoRI, al final del gen. Las nuevas secuencias al inicio del gen hPL-1, solo difieren de las secuencias naturales en las posiciones aminoacídicas +10 y +11. Estas diferencias representan cambios de un residuo de ácido aspártico y otro de histidina en hPL-1, por residuos de lisina y ácido glutámico en hPL-3, respectivamente. Por lo que utilizamos este nuevo gen en lugar del gen hPL-1 natural.

Una vez que obtuvimos todos los plásmidos recombinantes con los genes hPL, caracterizamos sus DNAs mediante digestión con enzimas de restricción diagnósticas y realizamos una hibridación de DNA tipo Southern (94). En la figura 11 mostramos la anatomía molecular de los nuevos plásmidos, así como sus patrones de hibridación con la sonda radiactiva específica para los genes hGH y hPL (6). Todos los patrones de restricción resultaron como esperábamos y solo los fragmentos conteniendo los genes hibridaron con la sonda homóloga. Con lo anterior corroboramos la identidad de los diferentes genes de la familia hGH-hPL en el vector pNUT.

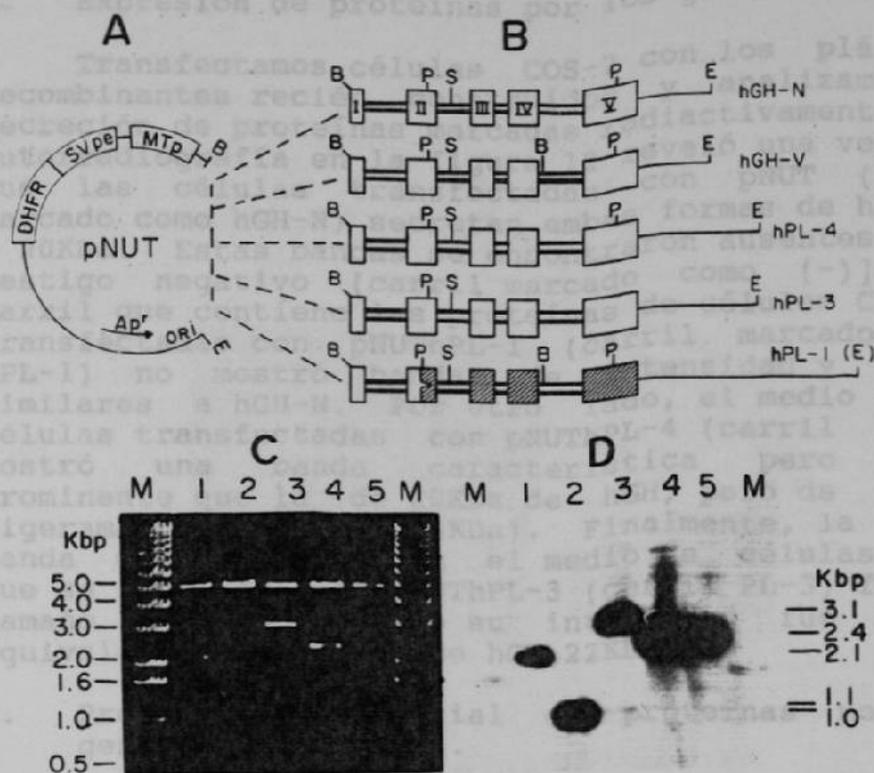


Figura 11. Construcción de los plásmidos de expresión para los genes hGH y hPL. En este diagrama esquematizamos la organización y mapa de los plásmidos de expresión (A y B). Para subclonar la región estructural de los genes en pNUT (A), reemplazamos la región hGH-N por la misma región de los otros genes. La digestión con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI (C) así como la hibridación molecular con la sonda de hPL marcada radiactivamente (D) confirmaron la identidad de los nuevos plásmidos híbridos. En C y D los carriles contienen: 1, pNUT; 2, pNUTHGH-V; 3, pNUTHPL-1; 4, pNUTHPL-3; y 5, pNUTHPL-4. M corresponde a marcadores de peso molecular representados en kbp, (kbp). Los tamaños de las bandas que hibridaron con la sonda están indicados en kbp (kbp) a la derecha de D, utilizamos el gen hPL-1 híbrido entre el gen hPL-3 y el hPL-1 (B) en lugar del gen hPL-1 natural. pNUTHGH-V no fue empleado en este estudio. DHFR indica la unidad transcripcional para la dihidrofolato reductasa. SVpe representa al promotor-potenciador "enhancer" de SV40. MTP señala al promotor de la metalotioneína. B=BamHI; P=PvuII; S=SacI y E=EcoRI. Los exones se indican con números romanos y los intrones con línea doble.

B. Expresión de proteínas por los genes hPL.

Transfectamos células COS-7 con los plásmidos recombinantes recién construidos y analizamos la secreción de proteínas marcadas radiactivamente. La autorradiografía en la figura 12 reveló una vez más que las células transfectadas con pNUT (carril marcado como hGH-N) secretan ambas formas de hGH, 22 y 20KDa. Estas bandas se encontraron ausentes en el testigo negativo [carril marcado como (-)]. El carril que contiene las proteínas de células COS-7 transfectadas con pNUThPL-1 (carril marcado como hPL-1) no mostró bandas de intensidad y tamaño similares a hGH-N. Por otro lado, el medio de las células transfectadas con pNUThPL-4 (carril hPL-4) mostró una banda característica pero menos prominente que la de 22KDa de hGH, pero de tamaño ligeramente mayor (~ 25KDa). Finalmente, la única banda que observamos en el medio de células a las que se les introdujo pNUThPL-3 (carril PL-3) fue del tamaño de hPL-4, pero su intensidad fue mayor, equivalente a la banda de hGH 22KDa.

C. Producción diferencial de proteínas por los genes hPL-3 y hPL-4.

Primero corroboramos la expresión diferencial de los genes hPL-3 y hPL-4 en nuestro modelo de cultivo celular (figura 13B). Posteriormente, construimos recombinantes híbridos entre hGH y hPL para analizar la expresión de los genes hPL-3 y hPL-4 (figura 13A). Detectamos diferencias en la abundancia relativa entre las proteínas quiméricas entre hPL-3/hGH versus hPL-4/hGH, expresadas por los genes híbridos correspondientes. De la misma forma que con los genes hPL no híbridos, observamos menos proteína cuando las secuencias de los primeros dos exones provienen de hPL-4 que cuando estas provienen de hPL-3. Estos resultados se muestran en la figura 13B en los carriles GH (PL-3:I,II) y GH (PL-4:I,II).

Por otro lado, en la construcción recíproca, donde los últimos tres exones fueron del gen hPL-4 y los primeros dos de hGH-N (figura 13A), la intensidad de la banda correspondió a aquella de hGH [figura 13B: carril PL-4(GH:I,II)]. Por lo tanto, la abundancia relativa de las proteínas naturales o quiméricas hGH-hPL dependió de los dos primeros exones, en nuestro modelo in vitro de cultivo celular.

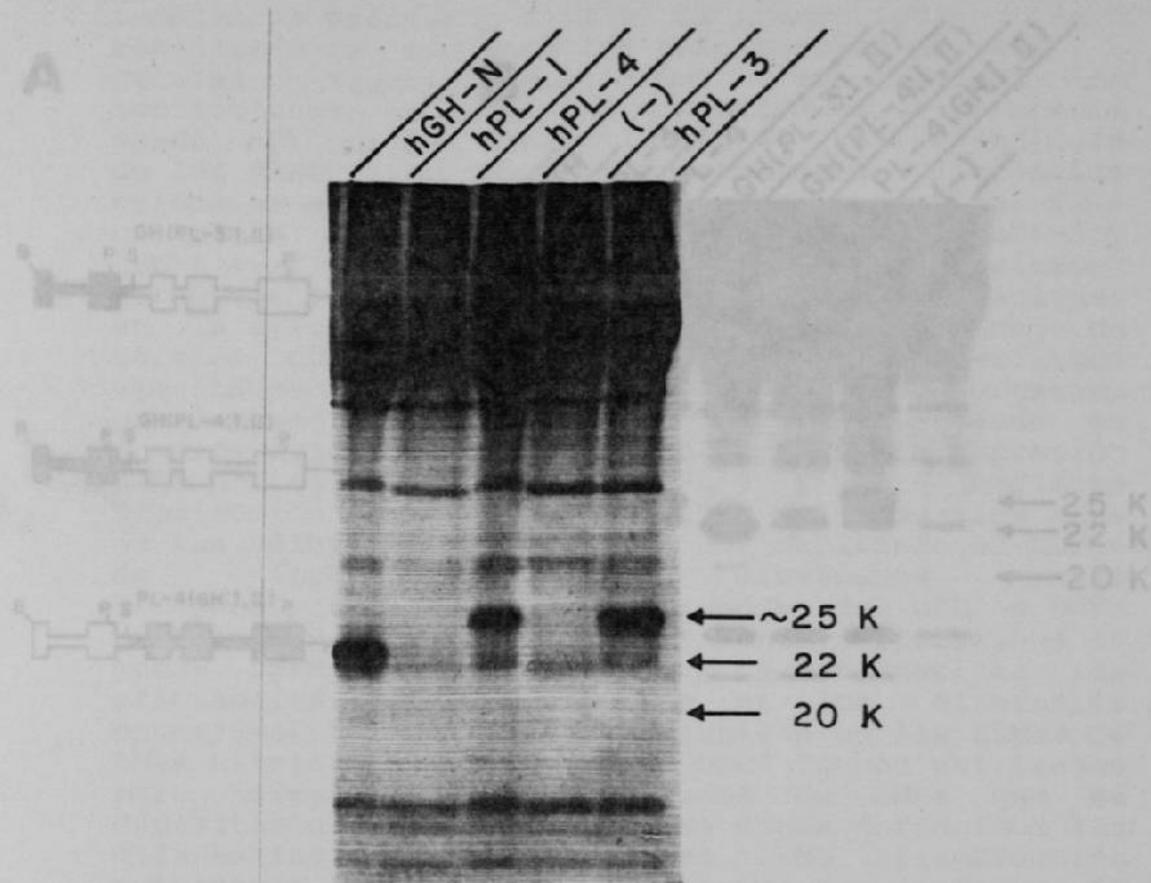


Figura 13. Diversidad en tamaño y abundancia de las proteínas codificadas por los genes hGH y hPL. Los genes recombinantes híbridos entre hGH y hPL que utilizamos en estos experimentos son mostrados en (A) para un mejor seguimiento y claridad de los resultados. El autorradiograma como en las figuras anteriores muestra el análisis de proteínas radiactivas secretadas

Figura 12. Producción in vitro de proteínas secretadas derivadas de los genes hPL. Analizamos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y autorradiografía el medio de las células COS-7 transfectadas con los plásmidos indicados en cada carril e incubamos en presencia de [35 S]-metionina. El símbolo (-) identifica al medio de células transfectadas con el vector solo pNUT(-). Los tamaños de las bandas hPL y hGH características se indican en KDa (K).

D. Origen transcripcional de la expresión diferencial de los genes hPL-3 y hPL-4.

Decidimos analizar si las diferencias en expresión de los genes hPL-3 y hPL-4 detectadas también se presentan a nivel de transcripción. Para realizar esto, aislamos los RNAs totales de las células transfectadas, por el método de isotiocianato de guanidina e hibridamos éstos con la sonda hPL marcada radiactivamente. En los análisis de los RNAs tipo "Northern" detectamos diferencias evidentes en los niveles de expresión de los RNAs obtenidos de las células transfectadas con hPL-3 y hPL-4 (ver figura 14). Para validar los resultados obtenidos tomamos en consideración las variaciones en la eficiencia de transfección en cada caja de células COS-7 transfectadas. Para ello evaluamos simultáneamente la expresión del gen DHFR presente en el mismo plásmido (testigo interno). Tomando en consideración lo anterior analizamos la expresión diferencial de los genes hPL-3 y hPL-4 mediante hibridación en línea "slot dot". Colocamos los RNAs de las células transfectadas por duplicado en tiras de nitrocelulosa e hibridamos estas independientemente con las sondas de hPL y DHFR previamente marcadas radiactivamente. Utilizamos la sonda DHFR como referencia para estandarizar las eficiencias de transfección en los diferentes experimentos. Los valores obtenidos en las tiras de RNAs hibridadas con la sonda DHFR fueron utilizados para normalizar las cantidades de RNAs que se depositaron en otro experimento donde corregimos las diferencias en eficiencias de transfección detectadas. En el autorradiograma de la figura 15 se muestra que logramos normalizar y tener una señal constante cuando hibridamos con la sonda radiactiva DHFR y señales notablemente diferentes para el caso de la sonda de hPL. Cuantificamos las diferencias de expresión mediante espectrofometría de centelleo líquido y detectamos una disminución de ocho veces en la expresión de los RNAs de hPL-4 en relación a los de hPL-3. Con lo anterior demostramos que la expresión diferencial entre las proteínas hPL-3 y hPL-4, depende cuando menos en parte de diferencias en los niveles de los RNAs correspondientes.

E Efecto de la mutación al inicio del segundo intrón de hPL-1 en la producción de proteínas.

Analizamos también el efecto de la mutación del intrón de hPL-1 en la producción de proteínas. Nos

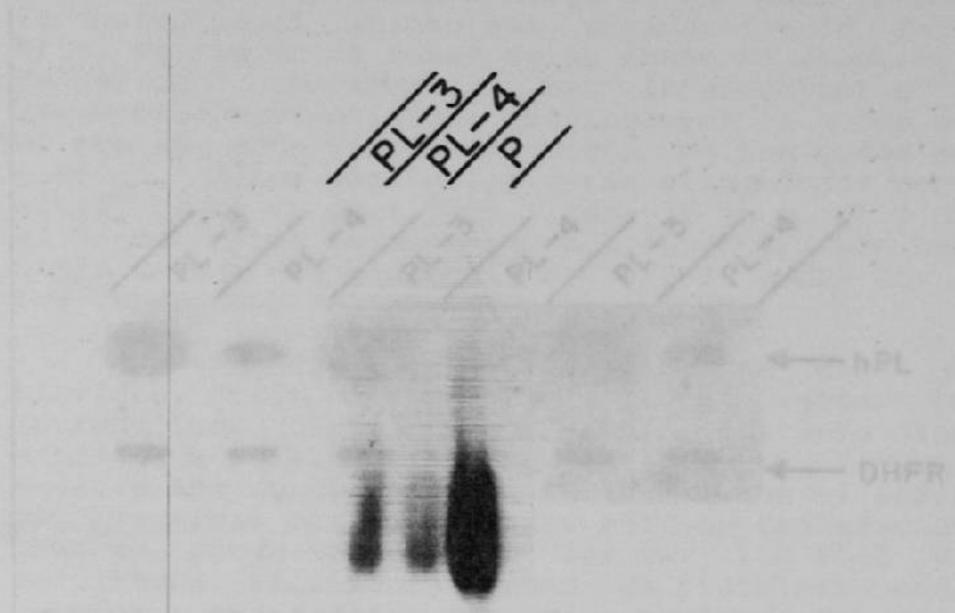


Figura 15. Análisis de la expresión diferencial de los genes hPL-3 y hPL-4 mediante hibridación en línea "slot dot". 3 µg de los RNAs que obtuvimos de las células transfectadas con los plásmidos recombinantes pNUT conteniendo los genes hPL-3 y hPL-4 fueron hibridados independientemente con sondas de hPL y DHFR previamente marcadas radiactivamente. En la autorradiografía mostramos que logramos normalizar y tener una señal

Figura 14. Expresión de los genes hPL-3 y hPL-4 a nivel de RNAm. Obtuvimos los RNAs totales de las células COS-7 transfectadas con los plásmidos recombinantes por el método de isotiocianato-fenol-cloroformo. La autorradiografía muestra los resultados del análisis tipo "Northern" de los RNAs obtenidos de las células transfectadas con los plásmidos pNUTHPL-3 (carril PL-3) y pNUTHPL-4 (carril PL-4). P identifica al carril que contiene RNAs totales de hipófisis humanas.

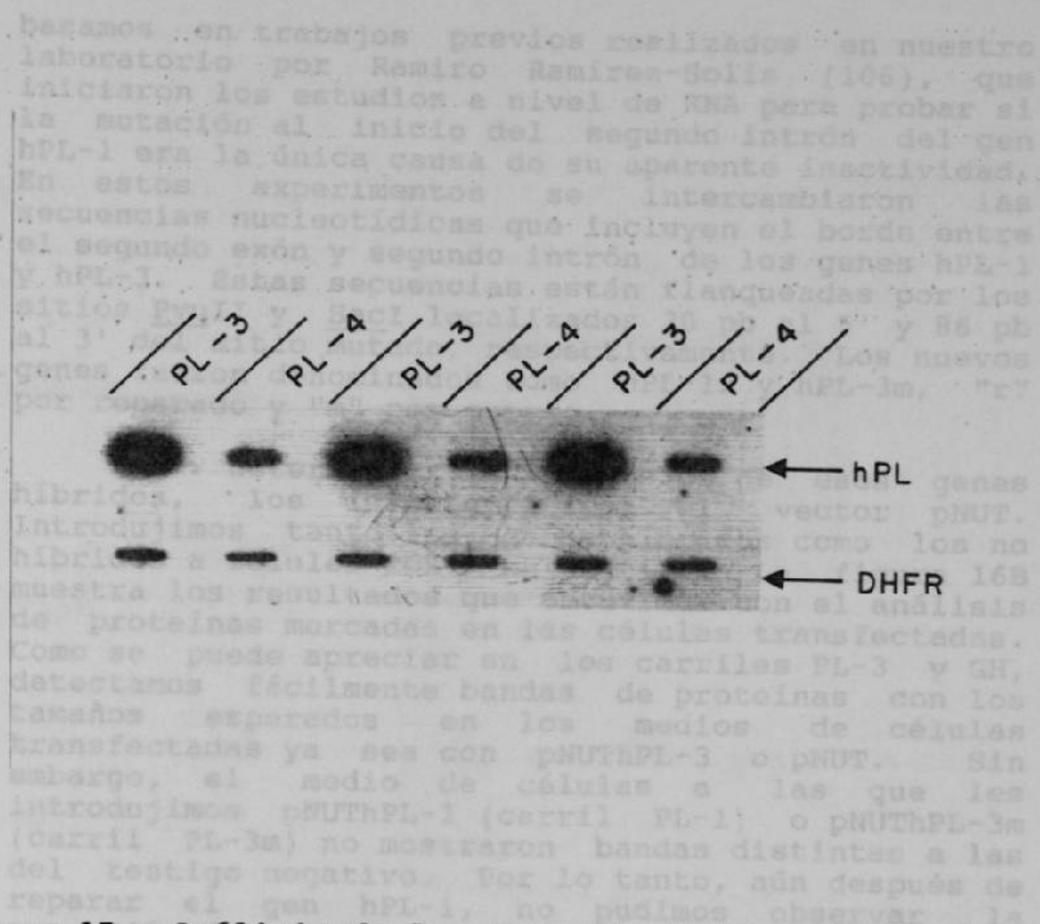


Figura 15. Análisis de la expresión diferencial de los genes hPL-3 y hPL-4 mediante hibridación en línea "slot dot". 3 μ g de los RNAs que obtuvimos de las células transfectadas con los plásmidos recombinantes pNUT conteniendo los genes hPL-3 y hPL-4 fueron hibridados independientemente con sondas de hPL y DHFR previamente marcadas radiactivamente. En la autorradiografía mostramos que logramos normalizar y tener una señal constante cuando hibridamos con la sonda radiactiva DHFR y señales notablemente diferentes para el caso de sonda de hPL. Cuantificamos las diferencias de expresión mediante espectrofotometría de centelleo líquido.

En la mutación GH(PL-3a:1,11) no detectamos banda prominente [figura 15B:carril GH(PL-3:1,11)]. En el caso del recombinante GH(PL-3:1,11) también se produjo, al igual que con hGH, la segunda banda (20KDa) de menor tamaño e intensidad. Con esto demostramos que en su forma de gen híbrido, también funcionan las secuencias del gen hGH-N responsables de la vía alternativa de procesamiento del RNA que codifica para la forma de hGH 20KDa.

basamos en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio por Ramiro Ramírez-Solis (106), que iniciaron los estudios a nivel de RNA para probar si la mutación al inicio del segundo intrón del gen hPL-1 era la única causa de su aparente inactividad. En estos experimentos se intercambiaron las secuencias nucleotídicas que incluyen el borde entre el segundo exón y segundo intrón de los genes hPL-1 y hPL-3. Estas secuencias están flanqueadas por los sitios PvuII y SacI localizados 30 pb al 5' y 86 pb al 3' del sitio mutado, respectivamente. Los nuevos genes fueron denominados como hPL-1r y hPL-3m, "r" por reparado y "m" por mutado.

Para determinar la expresión de esos genes híbridos, los insertamos en el vector pNUT. Introdujimos tanto los genes híbridos como los no híbridos a células COS-7 en cultivo. La figura 16B muestra los resultados que obtuvimos con el análisis de proteínas marcadas en las células transfectadas. Como se puede apreciar en los carriles PL-3 y GH, detectamos fácilmente bandas de proteínas con los tamaños esperados en los medios de células transfectadas ya sea con pNUTHPL-3 o pNUT. Sin embargo, el medio de células a las que les introdujimos pNUTHPL-1 (carril PL-1) o pNUTHPL-3m (carril PL-3m) no mostraron bandas distintas a las del testigo negativo. Por lo tanto, aún después de reparar el gen hPL-1, no pudimos observar la expresión de una nueva banda proteica (carril PL-1r). Interesantemente, la introducción de la mutación del segundo intrón de hPL-1, al gen hPL-3 inactivó la expresión de este último (carril PL-3m).

Corroboramos los resultados anteriores cuando construimos recombinantes híbridos entre hGH y hPL (figura 16A) e introdujimos estos a células COS-7. La expresión y secreción del recombinante GH(PL-3:I,II) mostró una banda prominente parecida en tamaño e intensidad a la obtenida con el gen hGH (ver figura 16B). Pero con el recombinante que contiene la mutación GH(PL-3m:I,II) no detectamos banda prominente [figura 16B:carril GH(PL-3:I,II)]. En el caso del recombinante GH(PL-3:I,II) también se produjo, al igual que con hGH, la segunda banda (20KDa) de menor tamaño e intensidad. Con esto demostramos que en su forma de gen híbrido, también funcionan las secuencias del gen hGH-N responsables de la vía alternativa de procesamiento del RNAm que codifica para la forma de hGH 20KDa.

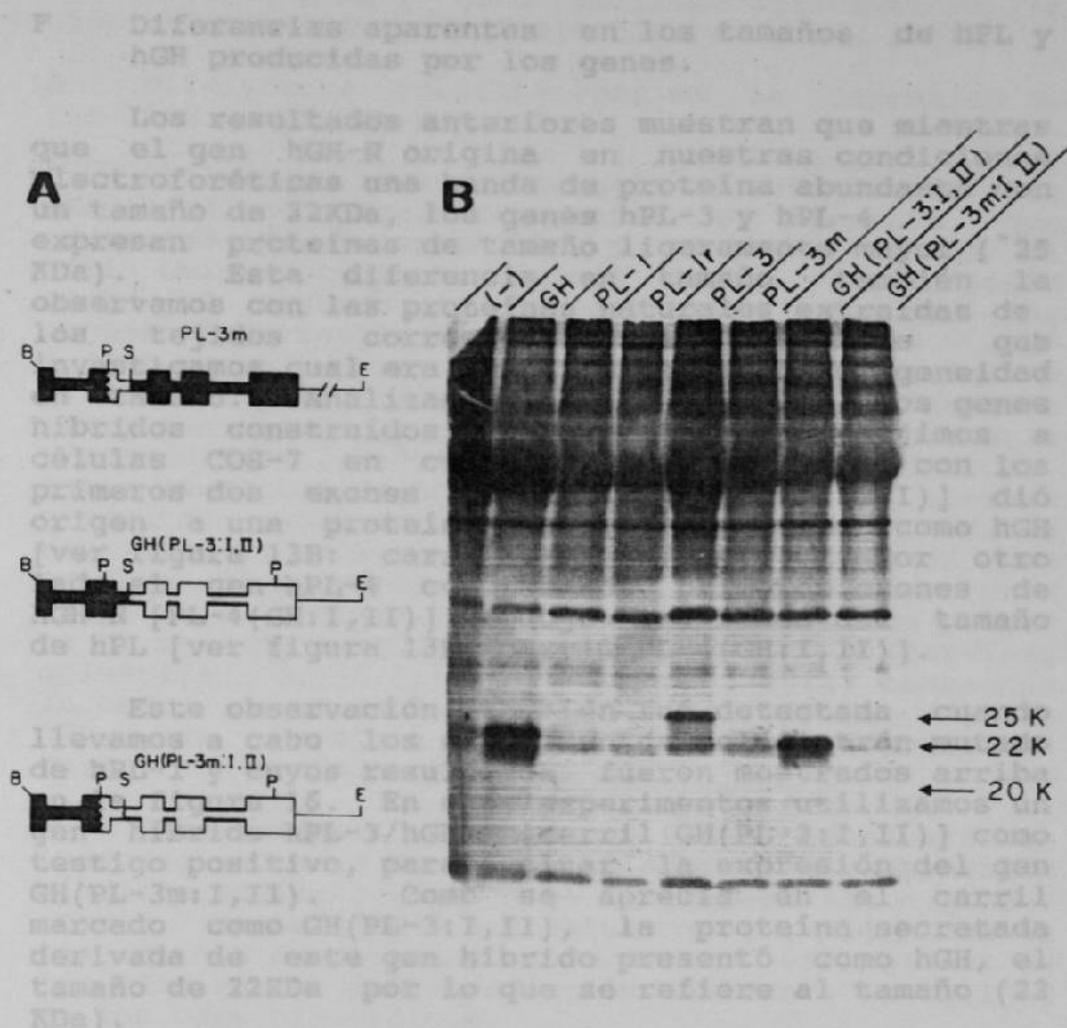


Figura 16. Efecto de la mutación al inicio del segundo intrón del gen hPL-1 sobre la producción de proteínas secretadas. Los genes híbridos descritos en (A) fueron construidos al unir, a través del sitio único SacI en el segundo intrón, los primeros dos exones de los genes hPL-3 (natural) y hPL-3m (mutado) con los últimos tres exones del gen hGH-N. Medios de cultivo de células transfectadas con los diferentes genes híbridos (indicados arriba) fueron analizados para determinar la presencia de proteínas radiactivas secretadas (B). Las flechas indican el tamaño en KDa (K) de las nuevas proteínas originadas por los genes introducidos transitoriamente.

en la sección anterior diseñamos una estrategia que denominamos "Mutagénesis por DNA homólogo". Esta estrategia consiste en insertar las regiones de interés de algún gen homólogo en el contexto del gen que codifica para hGH. Para realizar

F Diferencias aparentes en los tamaños de hPL y hGH producidas por los genes.

Los resultados anteriores muestran que mientras que el gen hGH-N origina en nuestras condiciones electroforéticas una banda de proteína abundante con un tamaño de 22KDa, los genes hPL-3 y hPL-4 expresan proteínas de tamaño ligeramente mayor (~25 KDa). Esta diferencia en tamaño también la observamos con las proteínas naturales extraídas de los tejidos correspondientes, por lo que investigamos cual era la causa de tal heterogeneidad en tamaño. Analizamos la expresión de los genes híbridos construidos, cuando los introdujimos a células COS-7 en cultivo. El gen hGH con los primeros dos exones de hPL-4 [GH(PL-4:I,II)] dió origen a una proteína que se comportaba como hGH [ver figura 13B; carril GH(PL-4:I,II)]. Por otro lado el gen hPL-4 con los dos primeros exones de hGH-N [PL-4(GH:I,II)] produjo una banda del tamaño de hPL [ver figura 13B; carril PL-4(GH:I,II)].

Esta observación también fué detectada cuando llevamos a cabo los experimentos del intrón mutado de hPL-1 y cuyos resultados fueron mostrados arriba en la figura 16. En esos experimentos utilizamos un gen híbrido hPL-3/hGH-N [carril GH(PL-3:I,II)] como testigo positivo, para evaluar la expresión del gen GH(PL-3m:I,II). Como se apreciaba en el carril marcado como GH(PL-3:I,II), la proteína secretada derivada de este gen híbrido presentó como hGH, el tamaño de 22KDa por lo que se refiere al tamaño (22 KDa).

Los resultados que obtuvimos en los experimentos descritos en esta sub-sección fueron utilizados para publicar el artículo: Coding potential of transfected human placental lactogen genes y fueron incluidos en la revisión: Transcriptional regulation of human placental lactogen genes (anexo B).

III Disección in vitro de los genes hPL mediante mutagénesis por DNA homólogo.

Para cuantificar la expresión diferencial de los genes hPL descrita en la sección anterior diseñamos una estrategia que denominamos "Mutagénesis por DNA homólogo". Esta estrategia consiste en insertar las regiones de interés de algún gen homólogo en el contexto del gen que codifica para hGH. Para realizar

esto nos basamos en la alta similitud existente en las secuencias aminoacídica y nucleotídica de hGH y hPL.

A Diferencias cuantitativas en la expresión de los genes hPL-3 y hPL-4.

Utilizamos esta estrategia de mutagénesis por DNA homólogo para reemplazar un segmento que comprende las primeras 588 pb del gen, desde el sitio del casquete al inicio de la transcripción hasta el segundo intrón del gen hGH, por los segmentos correspondientes de los genes hPL-3 y hPL-4 (figura 17). Insertamos estos genes híbridos en el vector pNUT (-) y caracterizamos los plásmidos recombinantes híbridos resultantes mediante digestión con enzimas de restricción diagnósticas. Estos segmentos de 588 pb de los genes hPL activos presentan solamente ocho cambios nucleotídicos distribuidos como sigue: uno en la región del extremo 5' no traducible, otro en el primer exón (péptido señalador), tres en el primer intrón y tres en el segundo intrón. El hecho de que las proteínas quiméricas GH(PL-3:I,II) y GH(PL-4:I,II) contienen la mayor parte de los aminoácidos (169 de 191) de hGH, nos permitió cuantificar estas proteínas quiméricas mediante RIA para hGH.

Primeramente realizamos tres preparaciones independientes de DNA de los plásmidos recombinantes híbridos mediante la técnica de preparación a gran escala. De tal forma que obtuvimos los plásmidos en las mismas condiciones para evitar variaciones en las eficiencias de transfección debidas a la calidad de los DNAs plasmídicos.

Estos tres grupos de plásmidos recombinantes fueron utilizados independientemente para tranfectar células COS-7 mediante la técnica de precipitación con fosfato de calcio-DNA. En estos experimentos realizamos co-transfección con el plásmido pCMcat para medir la actividad de la enzima CAT y determinar así la eficiencia en los experimentos de transfección. 48 h después colectamos el sobrenadante de las células transfectadas y cuantificamos la hGH presente en el medio extracelular. Además determinamos la actividad de CAT en los extractos de las células co-transfectadas (figura 18) y utilizamos estos resultados para normalizar las proteínas quiméricas sintetizadas por las células transfectadas con los plásmidos recombinantes. En estos experimentos encontramos

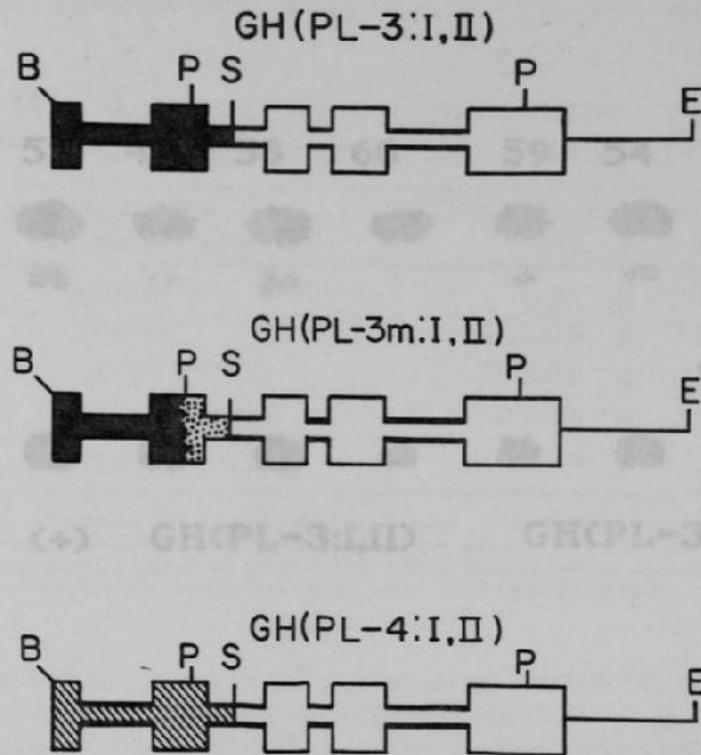


Figura 18. Comparación de la eficiencia de expresión de los plásmidos recombinantes híbridos hGH-hPL en células COS-7. Introdujimos los plásmidos recombinantes GH(PL-3:I,II) y GH(PL-4:I,II) en las células COS-7 mediante la técnica de co-precipitación

Figura 17. Organización de las construcciones génicas quiméricas. El diagrama ilustra los mapas y origen de los fragmentos génicos usados para las construcciones quiméricas hGH-hPL (2150pb). Los sitios de corte para las enzimas de restricción están indicados como B=BamHI, P=PvuII, S=SacI y E=EcoRI. El origen de los fragmentos se muestra en negro para hPL-3, punteado para hPL-1, rayado para hPL-4 y blanco para hGH.

con [14 C] (bandas superiores) y cuantificamos la radiactividad presente mediante espectrofotometría de centelleo líquido (Actividad de CAT).

que el plásmido recombinante híbrido GH(PL-3:I,II) secreta cinco veces más proteína que GH(PL-4:I,II) [datos incluidos en la tabla III]. Encontramos que el medio de las células transfectadas con el plásmido que contiene los dos primeros exones de hPL-3 [GH(PL-3:I,II)] contenía una cantidad de hGH equivalente al 62.38 de la detectada en el testigo positivo (ver tabla III).

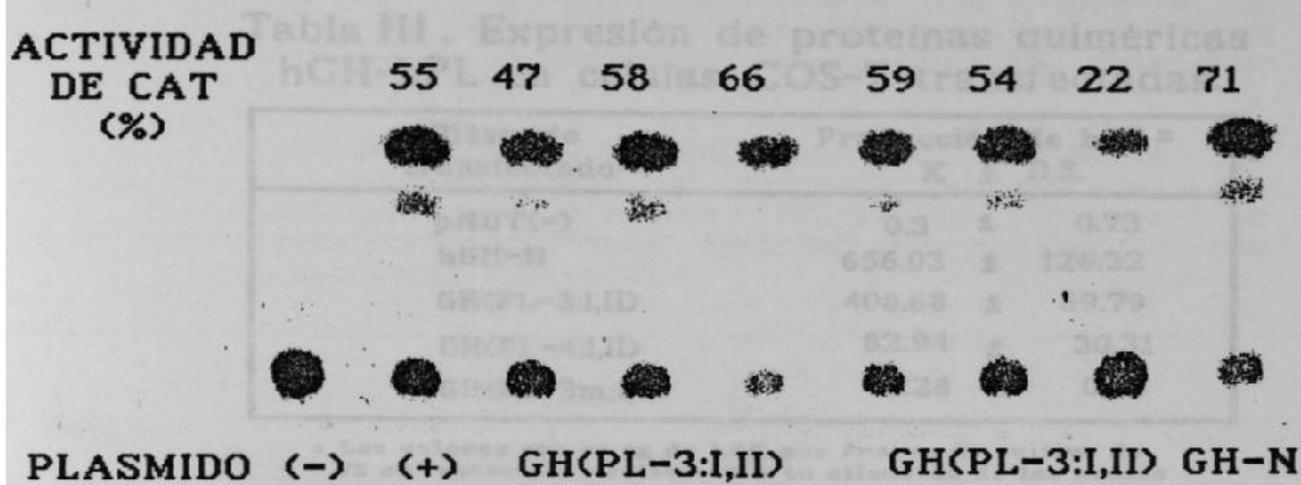


Figura 18. Comparación de la eficiencia de expresión de los plásmidos recombinantes híbridos hGH-hPL en células COS-7. Introdujimos los plásmidos recombinantes GH(PL-3:I,II) y GH(PL-4:I,II) en las células COS-7 mediante la técnica de co-precipitación con fosfato de calcio-DNA. 48h después determinamos en los extractos celulares la cantidad de proteínas por el método de Bradford y analizamos la actividad de CAT. El autorradiograma muestra ligeras diferencias en la actividad CAT con los diferentes plásmidos recombinantes. Como estos resultados son cualitativos, cortamos en la placa de sílica-gel la región que contenía las formas acetiladas de cloranfenicol marcado con $[^{14}\text{C}]$ (bandas superiores) y cuantificamos la radiactividad presente mediante espectrofometría de centelleo líquido (Actividad de CAT).

que el plásmido recombinante híbrido GH(PL-3:I,II) secreta cinco veces más proteína que GH(PL-4:I,II) (datos incluidos en la tabla III). Encontramos que el medio de las células transfectadas con el plásmido que contiene los dos primeros exones de hPL-3 [GH(PL-3:I,II)] contenía una cantidad de hGH equivalente al 62.3% de la detectada en el testigo positivo (ver tabla III).

Tabla III. Expresión de proteínas quiméricas hGH-hPL en células COS-7 transfectadas.

Plásmido transfectado	Producción de hGH *		
	X	±	D.S.
pNUT(-)	0.3	±	0.73
hGH-N	656.03	±	126.32
GH(PL-3:I,II)	408.68	±	69.79
GH(PL-4:I,II)	82.94	±	30.31
GH(PL-3m:I,II)	0.28	±	0.68

* Los valores son en ng de hGH por frasco de cultivo de 75 cm² obtenidos mediante RIA en alícuotas de los medios y corresponden al promedio (X) y desviación estándar (D.S.) de tres experimentos independientes.

De estos resultados podemos deducir una vez más que en los dos primeros exones de hPL-3 y hPL-4 se encuentran codificadas las características que conducen a las diferencias en expresión de los genes hPL-3 y hPL-4.

B Cuantificación del efecto de la mutación del gen hPL-1.

En otros experimentos construimos genes híbridos hGH cuyos dos primeros exones y parte del segundo intrón corresponden ya sea a hPL-3 o hPL-3m. Estos nuevos genes híbridos GH(PL-3:I,II) y GH(PL-3m:I,II), consisten de secuencias de hPL-3 o hPL-3m desde el inicio del gen hasta el segundo intrón (en el sitio único SacI) a las que les unimos secuencias del gen hGH-N, desde su sitio SacI en el segundo intrón, hasta el sitio EcoRI al final del gen (ver figura 17).

Cuando introdujimos éstos genes híbridos y sus plásmidos testigos a células COS-7 en cultivo

detectamos las proteínas quiméricas derivadas de la expresión de estos genes y mediante RIA para hGH. Los niveles de hGH en el medio de las células transfectadas con el plásmido que contiene el gen híbrido hPL-3m/hGH-N [plásmido:GH(PL-3mI,II)] no fueron detectados por RIA (ver tabla III). Estos resultados con las proteínas quiméricas corroboran que la mutación en el sitio donador del procesamiento de intrón al inicio del segundo intrón del gen hPL-1, podría ser una de las causas de la falta de expresión de este gen, ya que inactivó totalmente la expresión de la proteína quimérica GH(PL-3,I,II).

Utilizamos los resultados que obtuvimos en los experimentos descritos en esta sub-sección para publicar el artículo: Expression studies of transfected multigene families by homologous DNA mutagenesis (anexo C).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La reintroducción a células en cultivo, de genes aislados por técnicas de Ingeniería Genética (94, 96), ha resultado ser un método de gran valor en la identificación y disección de secuencias nucleotídicas requeridas para el control del funcionamiento del gen. También ha brindado valiosa información sobre los efectos de mutaciones en estas secuencias. Escogimos esta metodología para determinar el potencial de codificación de todos los genes hPL.

Los estudios de clonación de DNA y de determinación de secuencias nucleotídicas han conducido al aislamiento de clonas de DNAC para todos los genes de la familia hGH-hPL, excepto hPL-1. Una gran cantidad de información referente a la expresión de genes hGH y hPL resultó de estos estudios de DNAC. A pesar de estos, pocos han sido los experimentos encaminados a demostrar que algún RNAm particular de los genes hGH efectivamente se traduce en proteínas. Para el caso de los genes hPL esta clase de experimentos simplemente son inexistentes.

Cuando introdujimos los genes hPL activos a la línea celular COS-7 de riñón de mono, bajo el control de sus promotores naturales, no pudimos detectar señal en un análisis de RNA tipo "Northern" de los transcritos. Esta falta de expresión puede deberse a la ausencia en estas células de factores de transcripción específicos para los genes hPL. También puede explicarse por un requerimiento del amplificador de la transcripción del gen hPL (40), o por ambas razones. Se ha demostrado que se requiere la presencia de un factor transcripcional particular, llamado GHF-1, para alcanzar una expresión eficiente del gen hGH-N (110). Los resultados que obtuvimos usando los promotores naturales de los genes están en concordancia con esta observación. Como también lo está el hecho de haber conseguido expresar las secuencias estructurales de estos genes al fusionarlas a señales transcripcionales potentes y de especificidad celular amplia.

Para la ejecución del presente trabajo, primeramente desarrollamos un sistema eficiente para detectar la expresión de genes en cultivo celular. Para realizar esto, diseñamos y construimos vectores eucarióticos de expresión y comparamos estos vectores con otros comunmente usados para seleccionar los más potentes para dirigir la expresión de hGH en cultivo celular. Además, llevamos a cabo un análisis funcional

de las hGHs de 20 y 22KDa producidas in vitro en el modelo de diferenciación de fibroblastos 3T3 hacia adipocitos. Posteriormente analizamos el potencial de codificación in vitro de los genes hPL. Además, diseñamos una estrategia que denominamos "Mutagénesis por DNA homólogo" que nos permitió cuantificar la expresión diferencial de los genes hPL-3 y hPL-4 y analizar el efecto de la mutación presente al inicio del segundo intrón del gen hPL-1.

El modelo experimental que desarrollamos en este trabajo consiste en la detección de la expresión de genes y DNAs en cultivo celular. Primeramente insertamos la secuencia estructural del gen hGH bajo la influencia de la unidad promotor-potenciador del hCMV. Cuando introdujimos este plásmido a células COS-7 en cultivo, demostramos que la hGH producida in vitro por las células COS-7 es secretada al medio extracelular, lo cual esperábamos ya que hGH es una proteína normalmente secretada por las células de la hipófisis. Estos resultados nos permitieron concluir que el vector pAVE1hGH es capaz de expresar y secretar hGH eficientemente en cultivo de células eucarióticas.

Posteriormente comparamos la expresión de este vector con otros vectores de expresión comúnmente utilizados. Para ello, analizamos la expresión de hGH en las células COS-7 transfectadas tanto a nivel de RNAm (datos no mostrados) como a nivel de proteínas secretadas al medio extracelular. En ambos casos detectamos los mayores niveles de expresión en las células transfectadas con los plásmidos pAVE1hGH y pNUT. Estos valores de hGH son muy similares a los detectados por Selden y col. en células L transfectadas transitoriamente (52) y son cuarenta veces mayores que los obtenidos en células Vero transfectadas con vectores basados en SV40 (47). Por otro lado, determinamos la capacidad de estas hGHs producidas in vitro para inducir específicamente la conversión de fibroblastos 3T3 hacia adipocitos. La conversión adipocítica dependió de la cantidad de hGH adicionada, por lo que obtuvimos la mayor actividad funcional de las hGHs secretadas por las células transfectadas con los plásmidos pNUT y pAVE1hGH (resultados no mostrados), en comparación con los otros vectores arriba mencionados.

Después que detectamos reproduciblemente la expresión del gen estructural hGH en cultivo celular, analizamos la expresión de los DNAs de hGH obtenidos en trabajos previos en nuestro laboratorio. Detectamos

niveles bajos de expresión del DNAC de hGH 20KDa en relación al DNAC de hGH 22KDa. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio mediante análisis de hibridación tipo "Northern" de los RNAs de las células transfectadas con estos mismos plásmidos mostraron que las señales de hibridación dadas por los RNAs expresados, tanto por pAVEhGH22K como pAVEhGH20K, fueron similares en intensidad. Estos resultados indicaron que ambos DNACs son eficientes en la producción de RNAs maduros (109). Además se ha demostrado que el gen hGH expresado transitoriamente, produce niveles de RNAm equivalentes a los encontrados por nosotros y que los niveles de expresión de RNAm reflejan directamente los niveles de proteína (52). Por lo tanto, dado que no teníamos evidencias para dudar de la integridad e identidad de nuestros genes, establecimos como posible explicación para tan sorprendentemente bajos niveles de RIA de hGH 20KDa, el que los anticuerpos del estuche comercial para RIA de hGH que usamos, al ser altamente específicos para hGH22KDa, reconocen pobremente la variante de 20KDa de la hormona. Nuestra suposición fué apoyada por los hallazgos de que la variante 20KDa presenta únicamente un 20 a un 50% de capacidad para desplazar [125 I]-hGH unida a anticuerpo, así como un 30 a 50% de capacidad para desplazar [125 I]-hGH unida al receptor de membrana de hígado de rata o conejo (111).

En vista de lo anterior fué necesario demostrar que era posible visualizar la expresión de las diferentes formas conocidas de hGH. Cuando analizamos la cantidad de proteínas presentes en el medio extracelular de las células COS-7 transfectadas, encontramos que aunque los niveles de expresión transitoria de hGH en nuestros cultivos resultaron altos (hasta 300 ng/ml), eran superados por los niveles de proteínas totales presentes como componentes del medio de cultivo (2mg/ml). Esto impedía la visualización de la banda proteica correspondiente a hGH al teñir las proteínas separadas en el gel. Una complicación adicional resultó ser la presencia de bGH, porque presenta un tamaño muy similar a hGH y hPL y es un componente del SFT que utilizamos para complementar el medio de cultivo. Tampoco consideramos conveniente utilizar técnicas de detección como la inmunoelectrotransferencia para detectar las proteínas de interés, debido a que contábamos solamente con los anticuerpos contra las formas mejor conocidas de hGH y hPL (22KDa). Por lo que con esta limitante tendríamos que confiar en una buena reacción cruzada para detectar variantes proteicas que pudieran derivarse de todos los

genes hGH y hPL. Decidimos entonces realizar un marcaje de las proteínas sintetizadas de novo por las células transfectadas con [³⁵S]-metionina. En estos experimentos detectamos bandas correspondientes a las hGHs de 22KDa y 20KDa con las dos concentraciones de metionina utilizadas. Obviamente fué necesario asegurarnos que las bandas de proteínas correspondieran con los tamaños esperados y que su presencia coincidiera con la transfección del plásmido que contiene el gen que la codifica. La abundancia de la hGH de 20KDa, estimada por apreciación visual, coincidió con la abundancia de la variante en la glándula pituitaria, donde el 90% de la producción de hGH es de 22KDa y el 10% corresponde a la forma de 20KDa (57, 111).

Ya que seleccionamos la concentración menor de metionina marcada para realizar el marcaje, logramos visualizar las proteínas secretadas por los DNAs de hGH. En estos experimentos detectamos la expresión de las hGHs de 20 y 22KDa. Aunque la expresión de ambas formas de hGH presenta diferencias en la intensidad de las bandas pudimos demostrar la ineficiente detección inmune del anticuerpo específico de la hGH 22KDa por la variante de 20KDa. Por otro lado, logramos verificar la actividad biológica de ambas formas de hGH en la conversión adipocítica de fibroblastos 3T3. Consideramos con lo anterior que nuestro modelo estaba adaptado para el análisis de la expresión de genes y DNAs en cultivo celular.

Una vez que implementamos el modelo experimental, analizamos la expresión de todos los genes hPL en cultivo celular. Estos resultados nos permitieron determinar, por primera vez, la expresión in vitro y el potencial de codificación de todos los genes hPL. Los resultados que aportamos demuestran que los genes hPL-3 y hPL-4, mas no hPL-1, contribuyen a la producción de hPL madura. También demostramos que a pesar de ser altamente similares, las secuencias estructurales, de estos genes responden diferencialmente al mismo promotor heterólogo. Aunque las proteínas expresadas por estos genes son idénticas en su estructura primaria, difieren en el nivel de expresión. Como consecuencia de este hallazgo, diseñamos una estrategia que denominamos "mutagénesis por DNA homólogo". Esta consistió en la inserción de regiones mutadas de genes homólogos en el contexto del gen que codifica para un producto fácilmente cuantificable.

Demostramos la factibilidad de esta estrategia

mediante la sustitución de segmentos del gen hGH-N, por secuencias homólogas del gen hPL, que nos permitieron el análisis de mutaciones sin afectar la conformación nativa de la proteína modificada. Analizamos el efecto de dos tipos diferentes de mutaciones presentes en los genes hGH y hPL. Para la primera escogimos la variación de secuencias existentes entre los primeros dos exones de los genes hPL-3 y hPL-4. La segunda correspondió a la mutación puntual del pseudogen hPL-1, antes referida y presente al inicio de su segundo intrón.

Para analizar la primera mutación intercambiamos los dos primeros exones de los genes hPL-3 y hPL-4 con los del gen hGH-N. Encontramos una disminución del 80% en los niveles de expresión de hPL-4 comparados con los de hPL-3. Pudiera argumentarse que los resultados anteriores solo indican una disminución en el reconocimiento de ambas proteínas quiméricas hPL/hGH por los anticuerpos específicos del RIA para hGH. Sin embargo consideramos que nuestro enfoque es adecuado y los resultados son válidos para detectar efectos de las diferencias nucleotídicas sobre la expresión génica ya que las secuencias aminoacídicas de estas proteínas quiméricas secretadas al medio de cultivo son idénticas. Los cambios se encuentran en las formas precursoras o inmaduras de estas proteínas quiméricas que presentan una diferencia aminoacídica en la tercera posición del péptido señalador. Esta diferencia podría influenciar la eficiencia de eliminación del péptido señal de estas proteínas. Sin embargo, cuando analizamos la expresión diferencial de los genes hPL-3 y hPL-4 a nivel de RNA detectamos una disminución de ocho veces la expresión, por lo que la acumulación diferencial extracelular de las proteínas hPL-3 y hPL-4 maduras se debe principalmente a diferencias en la eficiencia de transcripción de estos genes en nuestro modelo in vitro. Como ya hemos descrito los estudios in vivo en placenta humana de los niveles de RNA provenientes de hPL-3 y hPL-4 presentan mucha variabilidad y muestran una relación inversa a la que detectamos en nuestro modelo in vitro de cultivo celular donde la expresión está dirigida por un mismo promotor heterólogo en relación a sus diferentes promotores y potenciadores naturales (6, 8, 23).

Además, encontramos que al introducir el área mutada de hPL-1 al gen hPL-3, la producción de la proteína hPL-3 secretada fué nula. A pesar de que reemplazamos la mutación al inicio del segundo intrón en hPL-1 por secuencias no-mutadas, no pudimos observar

proteína hPL-1 alguna, en el medio de cultivo de las células transfectadas con este gen reparado (hPL-1r). Por lo tanto, pensamos que deben existir mutaciones adicionales que contribuyen a esta carencia de expresión génica. Obtuvimos los mismos resultados cuando construimos genes híbridos entre los primeros exones de hPL-3 y hPL-3m con los últimos exones del gen HGH y cuantificamos los resultados mediante radioinmunoensayo. Evidencia adicional del efecto negativo de este tipo de mutaciones, al inicio de intrones, proviene también de estudios practicados in vitro. En tales estudios se introdujeron mutaciones al inicio de uno de los intrones del gen de β -globina por mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (112). En todos los casos estudiados a la fecha ya sea in vivo o in vitro, un cambio de guanosina monofosfato por adenosina monofosfato (G por A) al inicio del intrón, produce RNA mensajeros precursores incapaces de eliminar correctamente sus intrones.

Estos resultados también nos indicaron que la diferencia en tamaños entre las proteínas hGH y hPL, está codificada por los últimos tres exones de los genes que codifican para los aminoácidos 23 al 191 de la proteína. No tenemos explicación para las diferencias en tamaño observadas en el análisis electroforético de proteínas hPL y hGH. La diferencia la observamos tanto con las proteínas naturales, extraídas de sus tejidos humanos de origen, como con las proteínas expresadas por genes hGH y hPL transfectados. Puede ser posible que las diferencias aparentes de los tamaños observados correspondan simplemente a nuestras condiciones electroforéticas que permiten diferencias en el grado de interacción de las proteína y el SDS, y por lo tanto de desnaturalización de las proteínas.

Los resultados que obtuvimos nos permitieron llegar a las conclusiones abajo incluídas:

- 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 en parte de las diferencias nucleotídicas presentes en los dos primeros exones de estos genes.
- La mutación al inicio del segundo intrón del gen hPL-1 es una de las causas que afectan su falta de

expresión, pero no la única, ya que no detectamos su reactivación cuando ésta fue reparada.

Además consideramos que uno de los logros mas importantes de este trabajo son las siguientes contribuciones:

- Desarrollamos un modelo experimental eficiente y confiable para detectar la expresión de genes y DNAs en cultivo celular.
- Demostramos y cuantificamos la actividad adipogénica de los productos de expresión del gen hGH-N y sus DNAs, en cultivo celular.
- Diseñamos un nuevo enfoque que denominamos "Mutagénesis por DNA homólogo" para la cuantificación de la expresión genética en familias multigénicas donde el producto de expresión de al menos uno de los miembros es cuantificable

Este nuevo enfoque permite determinar fácilmente el efecto en la expresión génica de cambios en secuencias nucleotídicas o mutaciones presentes en los miembros de la familia o de sus alelos. Con la utilización del gen que codifica para hGH, nuestro enfoque permite la cuantificación del efecto de prácticamente cualquier mutación o cambio en secuencia nucleotídica que ocurra en los otros genes hPL o hGH, miembros del complejo. Nuestro procedimiento podría ser usado con cualquier miembro de una familia multigénica que codifique para un producto que sea fácilmente cuantificable.

Los resultados obtenidos en este trabajo abren la posibilidad para realizar estudios encaminados a determinar si una, varias o la totalidad de las diferencias nucleotídicas presentes en los primeros exones de los genes hPL-3 y hPL-4 conducen a su diferente expresión y cuáles son las otras mutaciones en el gen hPL-1 involucradas en su falta de expresión. Por otro lado, el análisis de proteínas quiméricas hGH-hPL permitirá llevar a cabo un análisis de las relaciones estructura-función en el modelo de diferenciación de fibroblastos 3T3 hacia adipocitos e identificar el o los residuos aminoacídicos involucrados específicamente en esta actividad.

Las relaciones estructura-actividad se pueden estudiar basándose en la postulación de que los exones dentro de ciertos genes pueden codificar para dominios

funcionales importantes en la proteína codificada. Por lo tanto, la alteración por delección o intercambio de exones íntegros mediante mutagénesis por DNA homólogo puede facilitar el mapeo de la o las regiones funcionales de la proteína en estudio.

Finalmente la producción estable de proteínas quiméricas hGH-hPL puede permitir el análisis estructural y/o funcional de otras actividades biológicas tales como la ganancia de peso en ratas hipofisectomizadas.

BIBLIOGRAFIA

1. Barrera-Saldaña, H.A., Expression of the human placental lactogen genes, Tesis doctoral. The University of Texas Health Science Center at Houston (1982).
2. Barsh, G.S., Seeburg, P.H. y Gelinas, R.E., The human growth hormone gene family structure and evolution of the chromosomal locus, *Nucleic Acids Res.*, 12:3939-3958 (1983).
3. Harper, M.E., Barrera-Saldaña, H.A. y Saunders, G.F., Chromosomal localization of the human placental lactogen-growth hormone gene cluster to 17q22-24, *Am. J. Hum. Genet.*, 34:227-234 (1982).
4. Seeburg, P.H., Shine, J., Martial, J.A., Baxter, J.D. y Goodman, H.M., Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone, *Nature*, 270:486-494 (1977).
5. Kidd, V.J. y Saunders, G.F., Linkage arrangement of human placenta lactogen and growth hormone genes, *J. Biol. Chem.*, 257:10673-10680 (1982).
6. Barrera-Saldaña, H.A., Robberson, D.L. y Saunders, G.F., Transcriptional products of the human placental lactogen gene, *J. Biol. Chem.*, 257:12399-12404 (1982).
7. DeNoto, F.M., Moore, D.D. y Goodman, H.M., Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure, Possible alternative splicing. *Nucl. Acids. Res.*, 9:3719-3730 (1981).
8. Chen, E.Y., Liao, Y., Smith, D.H., Barrera-Saldaña, H.A., Gelinas, R.E. y Seeburg, P.H., The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution, *Genomics*, 4:479-497 (1989).
9. *Research News, Science*, 242:1245 (1988).
10. Niall, H.D., Hogan, M.L., Sauer, R., Rosenblum, I.Y. y Greenwood, F.C., Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: Evolution from a primordial peptide by gene reduplication, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 68:866-869 (1971).
11. Selby, M.J., Barta, A., Baxter, J.D., Bell, G. y Eberhardt, N.L., Analysis of a major human chorionic somatomammotropin gene, *J. Biol. Chem.*, 259:13131-13138 (1984).
12. Cooke, N.E., Coit, D., Shine, J., Baxter, J.D. y Martial, J.A., Human prolactin: cDNA structural analysis and evolutionary

- comparisons, *J. Biol. Chem.*, 256:4007-4016 (1981).
13. Hirt, H., J. Kimelman, M.J. Birnbaum, E.Y. Chen, P.H. Seeburg, N.L. Eberhardt, and A. Barta, The human growth hormone gene locus, structure, evolution and allelic variations, *DNA*, 6:59-70 (1987).
 14. Nielsen, P.V., Pedersen, H. and Kampmann, E-M., Absence of human placental lactogen in a otherwise uneventful pregnancy, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 135:322-326 (1979).
 15. Wursel, J.M., Parks, J.S., Herd, J.E. y Nielsen, P.V., A gen deletion is responsible for absence of human chorionic Somatomammotropin, *DNA*, 1:251 (1982).
 16. Parks, J.S., Nielsen, P.V., Sexton, L.A., Jorgensen, E.H., An effect of gene dosage on production of human chorionic somatomammotropin, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 60:994-997 (1985).
 17. Phillips III, J.A., Hjelle, B.L., Seeburg, P.H. y Zachmann M., Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:6372-6375 (1981).
 18. Barrera-Saldaña, H.A., Seeburg, P.H. y Saunders, G.F., Two structurally different genes produce the same secreted human placental lactogen hormone, *J. Biol. Chem.*, 258:3787-3793 (1983).
 19. Masuda, N., Watahiki, M., Tanaka, M., Yamakawa, M., Shimizu, K., Nagai, J. y Nakashima, K., Molecular cloning of cDNA encoding 20 kDa variant human growth hormone and the alternative splicing mechanism. *Biochem. Biophys. Acta*, 949:125-131 (1988).
 20. Cooke, N.E., Ray, J., Watson, M.A., Estes, P.A., Kuo, B.A. y Liebhaber, S.A., Human growth hormone gene and the highly homologous growth hormone variant gene display different splicing patterns, *J. Clin. Invest.*, 82:270-275 (1988).
 21. Cooke, N.E., Ray, J., Emery, J.G. y Liebhaber, A., Two distinct species of human growth hormone variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins, *J. Biol. Chem.*, 263:9001-9006 (1988).
 22. Nickel, B.E., Kardami, E. y CaHini, P.A., Differential expresion of human placental growth hormone variant and chorionic somatomammotropin in culture, *Biochem. J.*, 267:653-658 (1990).

23. Fitzpatrick, S.L., Analysis of human placental lactogen gene promoter, Tesis doctoral. The University of Texas Health Science Center at Houston (1989).
24. Phillips III, J.A., Inherited defects in growth hormone synthesis and action, Chapter 77 (1989).
25. Frankenne, F., Rentier-Delrue F., Scippo, M.L., Martial, J. y Hennen, G., Expression of the human growth hormone variant gene in human placenta, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 64:635-637 (1987).
26. Ray, J., Jones, B.K., Liebhaber, S.A., Cooke, N.E., Glycosylated human growth hormone variant, *Endocrinology*, 125:566-568 (1989).
27. Josimovich, J.B. y McLaren, J.A., Presence in human placenta and term serum of highly lactogenic substance immunologically related to pituitary growth hormone, *Endocrinology*, 71:209-220 (1962).
28. Spellacy, W.N., Carlson, K.L. y Birk, S.A., Dynamics of human placental lactogen, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 96:1164-1173 (1966).
29. Kaplan, S.L., Gurpide, E., Sciarra, J.J., Grumbach, M.M., Metabolic clearance rate and production rate of chorionic growth hormone-prolactin in late pregnancy, *J. Clin. Endocrinol Metab.*, 28:1450-1460 (1968).
30. Cattini, P.A., T.R. Anderson, J.D. Baxter, P. Mellon, N.L. Eberhardt., The human growth hormone gene is negatively regulated by triiodothyronine when transfected into rat pituitary tumor, cells. *J. Biol. Chem.*, 261:13367-13372 (1986).
31. Cattini, P.A. and N.L. Eberhardt, Regulated expression of chimaeric genes containing the 5'-flanking regions of human growth hormone-related genes in transiently transfected rat anterior pituitary tumor cells, *Nucleic Acids Res.*, 15:1297-1309 (1987).
32. Eliard, P.H., M.J. Marchand, G.G. Rousseau, P. Formstecher, M. Mathy-Hartert, A. Belayew, and J.A. Martial, Binding of the human glucocorticoid receptor to defined regions in the human growth hormone and placental lactogen genes, *DNA*, 4:409-417 (1985).
33. Nelson, C., E.B. Crenshaw, III, R. Franco, S.A. Lira, V.R. Albert, R.M. Evans, and M.G. Rosenfeld, Discrete cis-active genomic sequence dictate the pituitary cell type specific expression of rat prolactin and growth hormone