

5.4.1 Ensamble de los loci GH/CSH

Con las secuencias del cuadro 6 fue posible determinar la organización genómica del locus GH/CSH del mono rhesus, mientras que para el mono araña solo fue posible proponer una organización hipotética como se muestra en la figura 17.

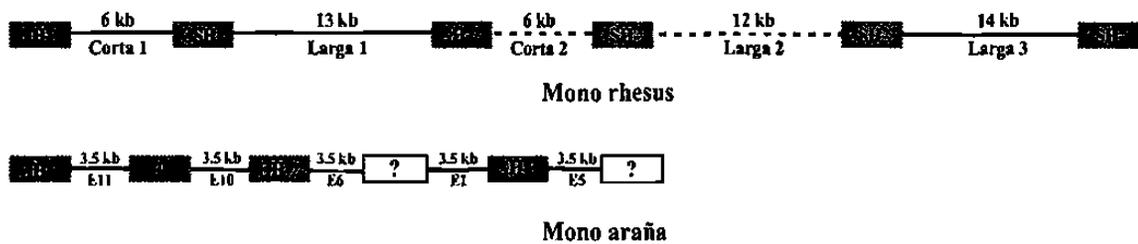


Figura 17. Organización de los loci GH/CSH. Las cajas en gris indican los genes obtenidos, mientras que las vacías a los genes que no se pudieron amplificar. Las líneas sólidas representan a las regiones intergénicas secuenciadas en su totalidad, mientras que las punteadas a aquellas que solo se secuenciaron por sus extremos.

5.4.2 Análisis de las proteínas

En el cuadro 7 se muestran los cambios que presentaron las proteínas deducidas a partir de las secuencias de los genes obtenidos en este trabajo, respecto de las reportadas anteriormente (Golos y cols, 1993).

Cuadro 7. Cambios aminoacídicos entre las proteínas previamente reportadas (denotadas con un *) y las inferidas en este trabajo.

Gen	Posición	Cambio	Naturaleza
GH-2/GH-2*	57	Phe x Leu	Apolar neutro x apolar neutro
	152	Gly x Glu	Apolar neutro x ácido
	190	Phe x Tyr	Apolar neutro x apolar neutro
CSH-1/CSH-1*	24	Gly x Ala	Apolar neutro x apolar neutro
	26	Gly x Arg	Apolar neutro x básico
	27	Phe x Val	Apolar neutro x apolar neutro
	89	Ser x Asn	Polar neutro x polar neutro
	187	Arg x Gly	básico x apolar neutro
	210	Ala x Thr	Apolar neutro x polar neutro
CSH-2/CSH-2*	109	Val x Ile	Apolar neutro x apolar neutro
	193	Gly x Arg	Apolar neutro x básico

Los proteínas GH-1 y CSH-3 no mostraron ningún cambio respecto a las reportadas, mientras que nuestra CSH-4 no se había reportado previamente. Fue de nuestro interés averiguar si estos cambios aminoácidos ocurrían en los sitios clave de unión al receptor. En la figura 18 se muestra el alineamiento las proteínas del mono rhesus junto con la familia GH/CSH del humano.

humano_GH-1	FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTS LC	53
rhesus_GH-1	-----	53
rhesus_GH-2	-----w-ntvf--h--k-----pk-----r-----	53
rhesus_CSH-1	--sv-----h-ig-----k-h-lme---a-f-	53
rhesus_CSH-2	vqsv---f-----h-----k-----n-----	53
rhesus_CSH-3	v-sv-----i-mq-----kt----k-h-lmg---a-f-	53
rhesus_CSH-4	v-sv-----ih-y--r-----q-----rk--p-w	53
humano_GH-1	FSESIPTSPNREETQOKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGAS	106
rhesus_GH-1	-----	106
rhesus_GH-2	-----k-----h-----h--htn-	106
rhesus_CSH-1	-ad-----sl-----s-----n-lhht-	106
rhesus_CSH-2	-----m-r-----r--c-t-	106
rhesus_CSH-3	-----v-----l-g---n---t-	106
rhesus_CSH-4	l-----m-----h-----r---t-	106
humano_GH-1	DSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKN	159
rhesus_GH-1	y-d-----s-----n-----	159
rhesus_GH-2	nfdi-ly-k-----e---y-----t---	159
rhesus_CSH-1	--d-h-----w-----h-q--s---	159
rhesus_CSH-2	--d---s-----a--i-----n---e	159
rhesus_CSH-3	e-da---n-----r-q-----t--d-q--s---	159
rhesus_CSH-4	--d---s---pnad-g-----t-----t---	159
humano_GH-1	YGLLYCFRKMDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF	191
rhesus_GH-1	-----i-----	191
rhesus_GH-2	-r--f-----n-----t-r-a-----	191
rhesus_CSH-1	-r--h-----m-----m---a-----	191
rhesus_CSH-2	-r--h--rn-----ma-----	191
rhesus_CSH-3	-e--h--g---m-----m---t-----	191
rhesus_CSH-4	-w--h-----m-----	191

Figura 18. Alineamiento de las proteínas. Se muestran en negritas los aminoácidos clave en la unión al receptor reportados para la GH-1 del humano. Los guiones indican identidad con la secuencia de arriba, los cambios se representan por la letra correspondiente, pero en minúscula.

En la construcción del árbol filogenético (Figura 19) se incluyeron las secuencias del cerdo y los prosimios como grupo fuera. Solo se observa clara ortología entre las GH-1 de humano y chimpancé, mientras que el resto se agrupan de manera linaje específico.

En el caso de las CSHs también se observa el agrupamiento especie-específica y no se observa una clara ortología entre ellas. Se observan dos grandes grupos de este tipo de proteínas, uno para las CSHs de los grandes mono y el otro para las CSHs de los MVM y todas derivan de un mismo ancestro común. En los MVM, la GH-2 no forma un clado con las de los grandes monos, confirmando que el gen correspondiente a esta hormona se originó por un evento de duplicación independiente.

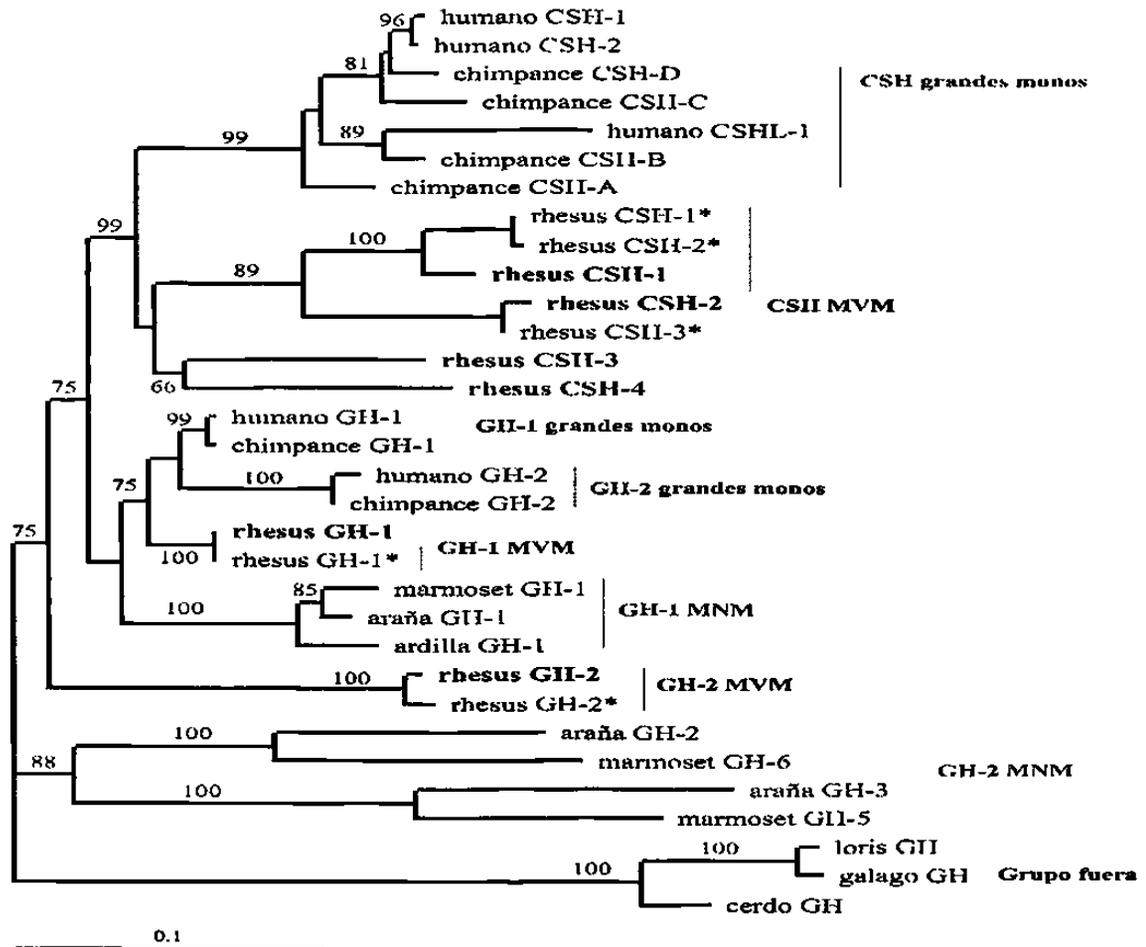


Figura 19. Árbol filogenético de las proteínas GH/CSH de primates. El árbol fue construido con el programa DNAMAN por el método de NJ, utilizando la secuencia completa de las proteínas que se mencionan en el cuadro 5 de Material y Métodos. Para el mono rhesus, el * indica las secuencias previamente reportadas (Golos et al., 1993), las que se encuentran en negritas corresponde a las secuencias generadas en este trabajo.

Adicionalmente se utilizaron otros métodos como máxima parsimonia y maximum likelihood para construir el árbol, pero siempre se obtuvo la misma topología.

5.4.3 Análisis del promotor proximal

En la figura 20 se muestra el alineamiento del promotor proximal del humano, mono rhesus y mono araña, donde se indican los diferentes sitios de unión a factores transcripcionales descritos para el primero.

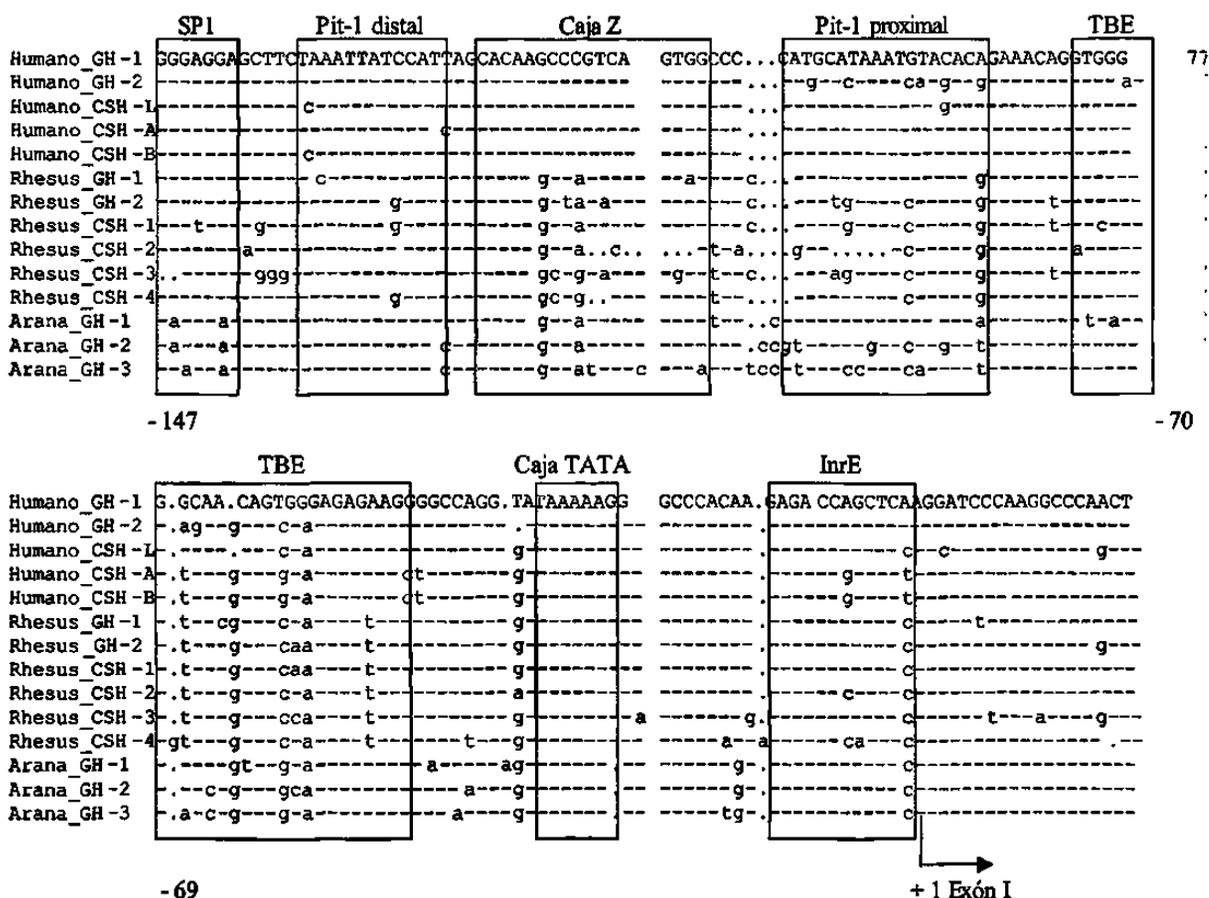


Figura 20. Alineamiento del promotor proximal. El alineamiento se hizo en el programa DNAMAN, utilizando la secuencia de la GH-1 del humano como referencia al momento de indicar los sitios de unión a los factores transcripcionales.

Los promotores proximales exhiben un 90.51% de similitud entre sí, además todos poseen los elementos mínimos indispensables para la transcripción basal. Se requieren ensayos de transfección frente algún gen reportero para evaluar el significado biológico de los cambios puntuales observados.

5.4.4 Análisis de otros elementos regulatorios

a) *El inhibidor hipofisiario o elemento P.* Como su nombre lo indica, este elemento inhibe la expresión de los genes placentarios en la hipófisis. Se encontró en las regiones intergénicas cortas y largas del mono rhesus, así como en todas las del mono araña. En todos los casos, se localiza ~ 2 kpb río arriba de los genes. En la figura 21 se observa el alineamiento de las 90 pb que comprenden al elemento P.

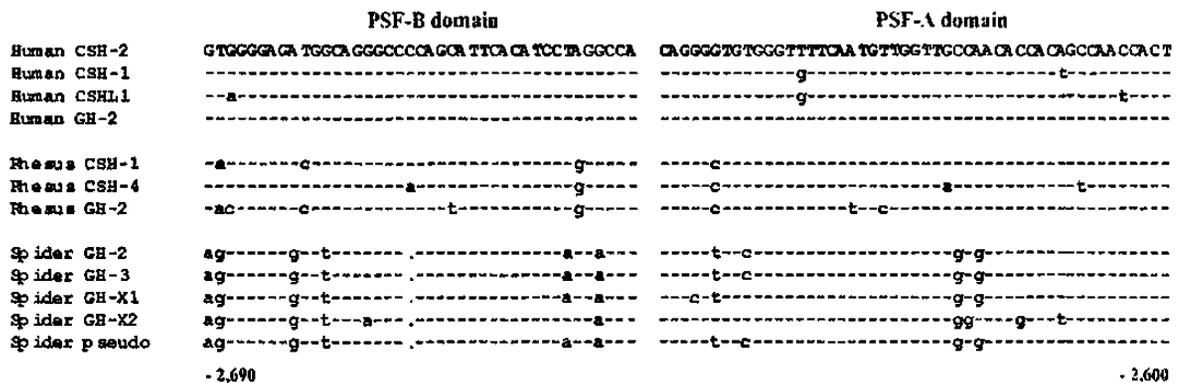


Figura 21. Alineamiento del elemento P. Se obtuvo la secuencia del elemento de cada uno de los genes mencionados y se alinearon. Todas las secuencias entre si tienen una similitud del 89.86%.

b) *El potenciador o enhancer.* Este elemento incrementa la expresión de los genes placentarios en dicho tejido. A diferencia del inhibidor, este elemento se encontró únicamente en las regiones intergénicas largas del mono rhesus. Nada similar se observó en las regiones intergénicas cortas del mono rhesus, ni en las del mono araña. De manera similar, el potenciador se localiza ~ 2 kpb, pero río abajo de los genes placentarios. En la figura 22 se muestra el alineamiento de las 280 pb responsables de potenciar la expresión de los genes CSH en la placenta.

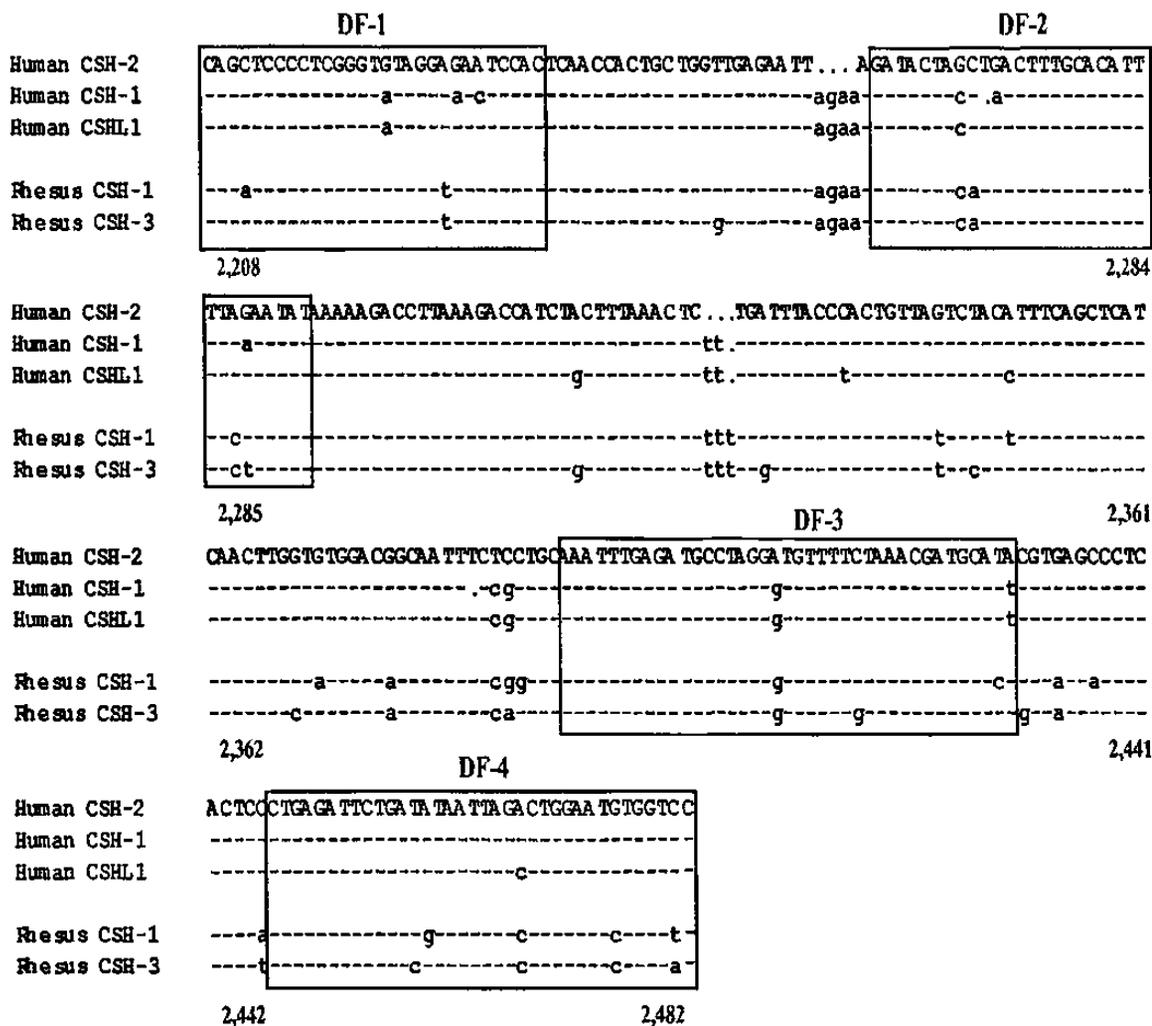


Figura 22. Alineamiento del potenciador. Se obtuvieron las secuencias de los tres potenciadores en el humano y estos se alinearon con los del mono rhesus. Las cinco secuencias se asemejan en un 95.44%.

5.4.5 Elementos de DNA repetitivo

La identificación de los elementos repetitivos del tipo Alu se efectuó mediante análisis visual sobre los alineamientos de las regiones intergénicas de los monos rhesus y araña, utilizando las contrapartes del humano como molde. El reporte se muestra de manera gráfica en la figura 23.

Evolución Molecular de la Familia GH/CSH en Primates

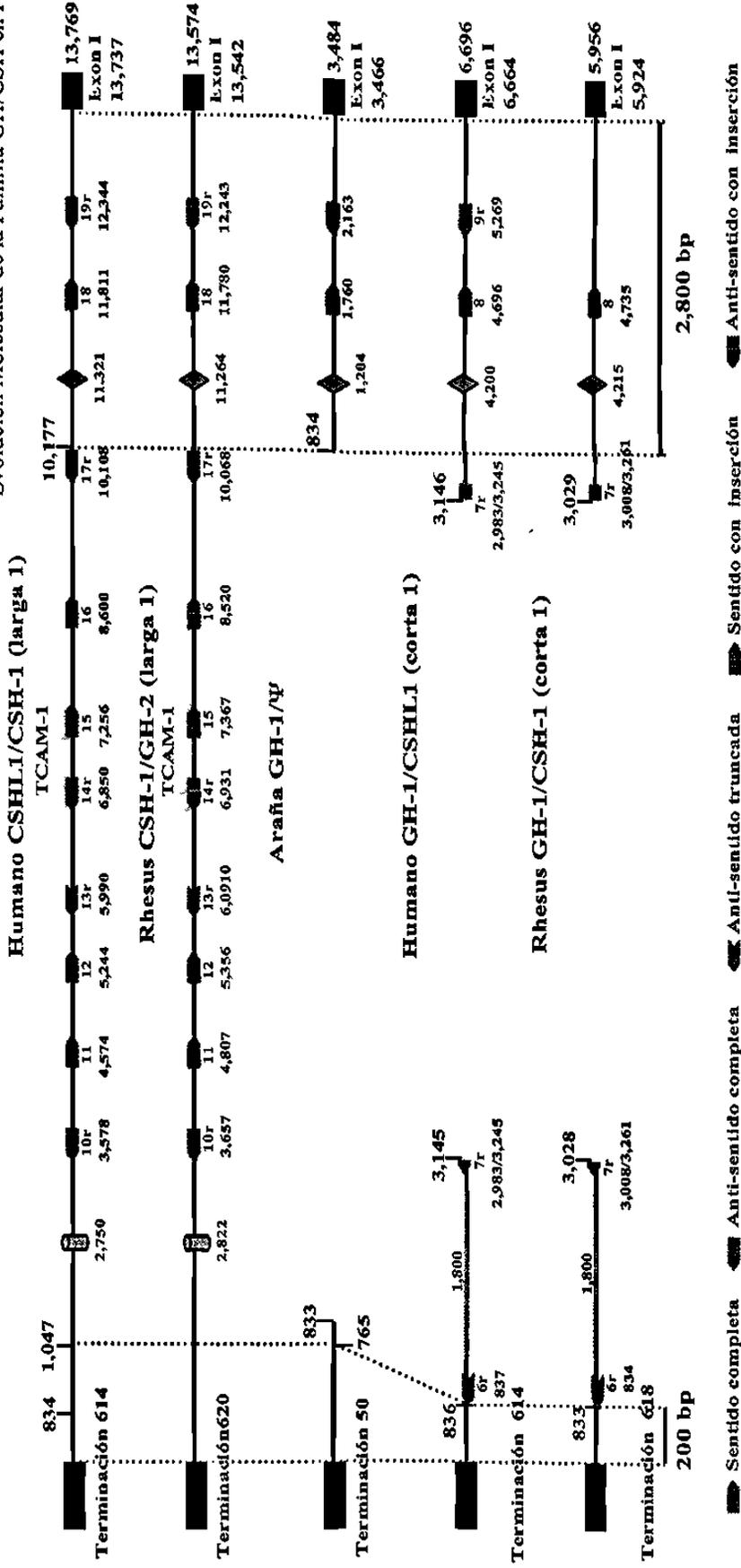


Figura 23. Anatomía de las regiones intergénicas. Un tipo de región intergénica de humano, monos rhesus y araña fueron tomadas como típicas para ilustrar la anatomía. Los números indican la posición donde comienza la secuencia Alu, mismas que fueron nombradas de acuerdo a la nomenclatura de Chen et al., 1989. La Alu 7r del humano y mono rhesus, pueden ser anotadas indistintamente como la 10r o 17r. La zona gris entre las Alu 6r y 7r del humano y mono rhesus, indica similitud de secuencia con una zona del promotor de hGH-1 entre las Alu 2 y 3r. Las regiones conservadas a través de las regiones intergénicas están delimitadas por la línea vertical y punteada, ~ 200 pb antes del codón de terminación y ~ 2.8 kb antes del codón de inicio. Los números indican la posición exacta de cada elemento de acuerdo a la numeración nucleotídica de cada región intergénica. El cilindro y el rombo representan al potenciador y al elemento P, respectivamente.

5.4.5 Estimación de los índices evolutivos de las proteínas

A partir de la secuencia de aminoácidos se estimaron las sustituciones aminoácido/sitio/año (K). A partir de la secuencia del cDNA se calcularon las sustituciones no sinónimas (d_N) y las sinónimas (d_S). El valor de K para las proteínas relacionadas a GH del mono rhesus fue estimado tomando en cuenta el número de diferencias entre éstas y las homólogas con el humano. La relación d_N/d_S es < 1 para la GH-1, mientras que para la GH-2 y los CSH es > 1 (Cuadro 8).

Cuadro 8. Índices evolutivos de las proteínas relacionadas a GH del mono rhesus.

Proteína	AA índice ($\times 10^{-9}$) (AA sustitución/sitio/año)	d_N	d_S	d_N/d_S
GH-1/hGH-1	0.801	0.184	0.280	0.657
GH-2/hGH-2	5.010	0.106	0.082	1.292
CSH-1/hCSH-1	4.308	0.096	0.071	1.352
CSH-2/hCSH-1	4.608	0.107	0.077	1.389
CSH-3/hCSH-1	3.907	0.072	0.069	1.043
CSH-4/hCSH-1	3.707	0.081	0.088	0.920

5.4.6 Pruebas de selección

En el cuadro 9 se muestran los resultados de la validación estadística a las hipótesis de evolución neutral ($d_N = d_S$), evolución positiva ($d_N > d_S$) y purificación de la selección ($d_N < d_S$) para los tres tipos de genes relacionados a GH del mono rhesus. De manera global, la GH-1 está sujeta a purificación de la selección. Aunque la relación d_N/d_S es > 1 para los genes GH-2 y CSH, al aplicar las pruebas estadísticas por los métodos Z de una cola y "Fisher's Exact test", dicho valor no es estadísticamente significativo. Al momento la fuerza de selección que actúa sobre esos genes es incierta.

Cuadro 9. Pruebas de selección.

	GH-1	GH-2	CSH
$d_N = d_S$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$
$d_N > d_S$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$
$d_N < d_S$	$P < 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$

5.4.7 Pruebas de hipótesis al reloj molecular

La hipótesis del reloj molecular para secuencias no codificantes, estipula que el valor de r de la secuencia 1 es similar al valor de r de la secuencia 2, es decir, $H_0: r_{\text{secuencia 1}} = r_{\text{secuencia 2}}$ utilizando una tercera secuencia como grupo de comparación, por tanto para aceptar H_0 , el valor de P debe de ser < 0.05 . Los intrones de la GH-1 se compararon contra el humano utilizando el loris (prosimio) como grupo de comparación. Los cuatro intrones evolucionaron de acuerdo a la teoría del reloj molecular. Los intrones de GH-2 y CSH se compararon entre ellos utilizando la propia GH-1 del mono rhesus como grupo de comparación. En el cuadro 10 se indica si se aceptó (A) o rechazó (R) H_0 , por cada método, T (Tajima), $K2$ (Kimura 2 parámetros), JC (Jukes Cantor) y por grupo de comparación. Por parte de las regiones intergénicas, únicamente se analizó la región comprendida entre el elemento P y el codón de inicio (Figura 23), utilizando como grupo de comparación una de las intergénicas del mono araña. En todos los casos, las regiones intergénicas evolucionaron de acuerdo a la teoría del reloj molecular.

Cuadro 10. Resultados de las pruebas de hipótesis del reloj molecular.

Par de secuencia	Intrón 1	Intrón 2	Intrón 3	Intrón 4
GH-2/CSH-1	T: A K2: A JC: A	T: A K2: A JC: A	T: A K2: A JC: A	T: R K2: A JC: A
GH-2/CSH-2	T: A K2: A JC: A	T: A K2: A JC: A	T: A K2: A JC: A	T: R K2: R JC: R
GH-2/CSH-3	T: R K2: A JC: A	T: A K2: A JC: A	T: A K2: A JC: A	T: A K2: A JC: A
GH-2/CSH-4	T: A K2: A JC: A			
CSH-1/CSH-2	T: A K2: A JC: A			
CSH-1/CSH-3	T: R K2: A JC: A	T: A K2: A JC: A	T: A K2: A JC: A	T: A K2: A JC: A
CSH-1/CSH-4	T: A K2: A JC: A			
CSH-2/CSH-3	T: R K2: A JC: A	T: A K2: A JC: A	T: A K2: A JC: A	T: A K2: A JC: A
CSH-2/CSH-4	T: R K2: A JC: A	T: A K2: A JC: A	T: A K2: A JC: A	T: R K2: A JC: A
CSH-3/CSH-4	T: A K2: A JC: A			

5.4.8 Identificación de los eventos de conversión génica

Tres eventos de conversión génica fueron identificados durante el análisis de los genes relacionados a GH del mono rhesus. El primero tuvo lugar en el segundo exón de los genes CSH-4 y CSH-2. El segundo ocurrió en el primer intrón de los genes GH-1 y CSH-1. Finalmente, el tercer evento sucedió en el tercer exón de los genes GH-1 y GH-2 (Cuadro 11).

Cuadro 11. Identificación de los eventos de conversión génica

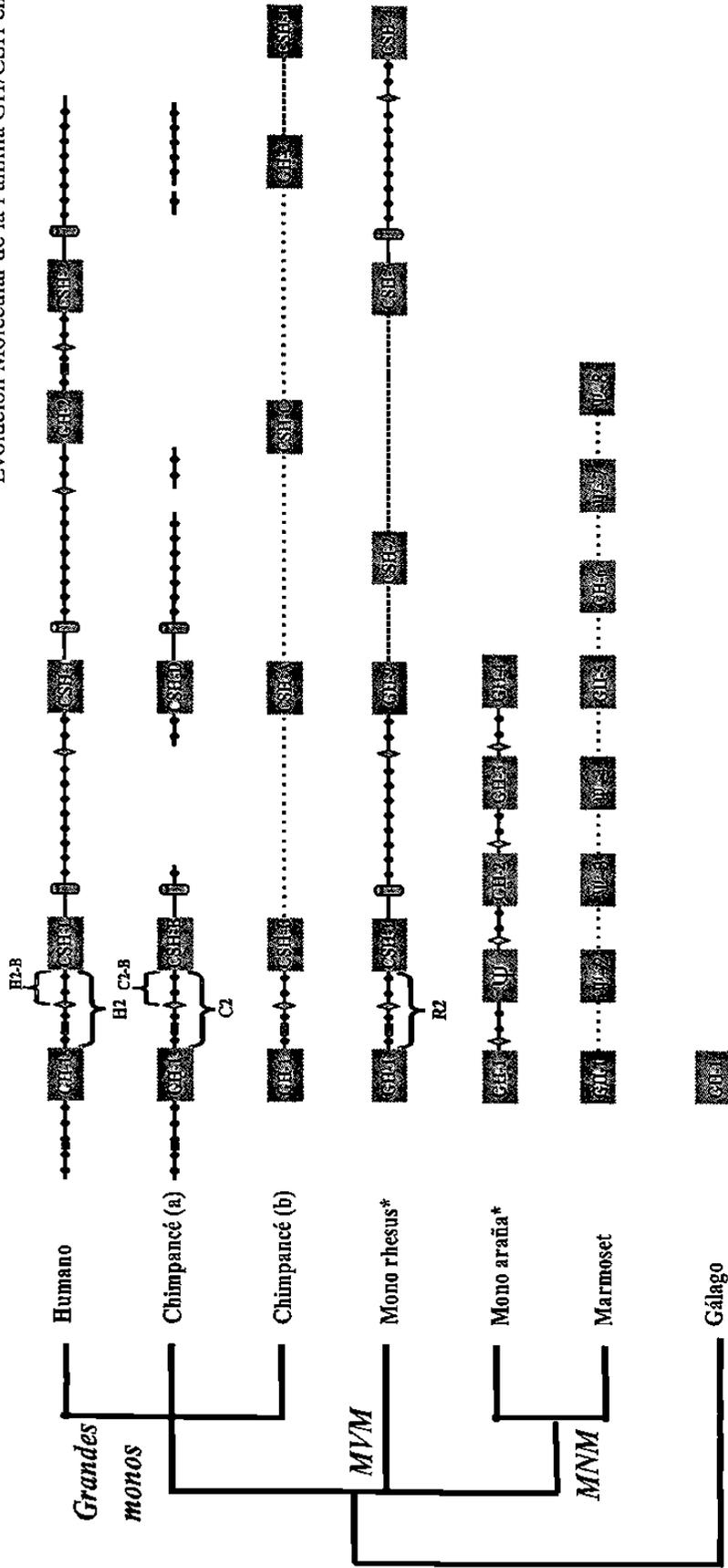
Secuencias	BC Sim valor P	BC KA Valor P	Inicio	Término	Tamaño	Num Poly ^a	Num Difs ^b	Total Difs ^c
CSH-4/CSH-2	0.0009	0.00317	716	794	79	24	0	170
GH-1/CSH-1	0.0016	0.00519	560	656	97	17	0	150
GH-1/GH-2	0.0388	0.07276	1051	1130	80	21	0	153

Inicio y término, indican las posiciones nucleotídicas del fragmento afectado por el evento de conversión.

^a Num Poly es el número de sitios polimórficos compartidos por las dos secuencias. ^b Num Difs es el número de diferencias en la región que tuvo lugar el evento de conversión. ^c Total Difs es el total de diferencias entre los dos genes comparados.

5.4.9 Detalles de la comparación de los loci GH/CSH

La organización de los loci obtenidos en este trabajo se comparo con los previamente reportados (Figura 24). En los MNM son más compactos que en el humano, debido a que tienen regiones intergénicas más cortas, a pesar de que incluyen un mayor número de genes (seis o más). En el marmoset, el locus está compuesto de ocho genes del tipo GH, siendo cinco de ellos pseudogenes (Wallis et al., 2002). Los genes CSH aparecen en los MVM, de manera concomitante con la extensión de las secuencias intergénicas y la adquisición del potenciador. A pesar de que el número de genes es similar al de los MVM y el chimpancé, un buen número de las duplicaciones que generaron los genes en estos dos grupos parecen haber sido independientes.



Prosimios

Figura 24.- Organización de los loci GH/CSH analizados. Las cajas indican los genes, las líneas sólidas representan las regiones intergénicas totalmente secuenciadas. Las líneas en guiones representan las regiones intergénicas parcialmente secuenciadas, mientras que las punteadas a aquellas faltantes. El cilindro indica el potenciador y el rombo al elemento P. Los círculos negros representan a las secuencias repetitivas del tipo Alu. Las zonas grises entre dos secuencias Alu representa a una región homóloga situada entre las Alu 2 y 3r del promotor de hGH-1. Mientras que los MNM tienen únicamente genes del tipo GH en sus loci, los de los MVM y grandes monos poseen genes CSH. El arreglo genómico denominado como chimpancé (a) representa la recientemente reportado por el consorcio "Chimpanzee Genome Project". El arreglo chimpancé (b) corresponde al previamente inferido por nuestro grupo. * Representa a los loci deducidos en este trabajo.

5.4.10 Una nueva hipótesis de la evolución del locus GH/CSH

Las relaciones filogenéticas de las proteínas codificadas por los genes hCSHL-1/cCSH-B y hCSH-1/CSH-2/cCSH-D (Figura 19) y la posición en los loci de dichos genes, nos condujo a proponer una nueva hipótesis para explicar el origen del locus GH/CSH en el humano (Figura 25).

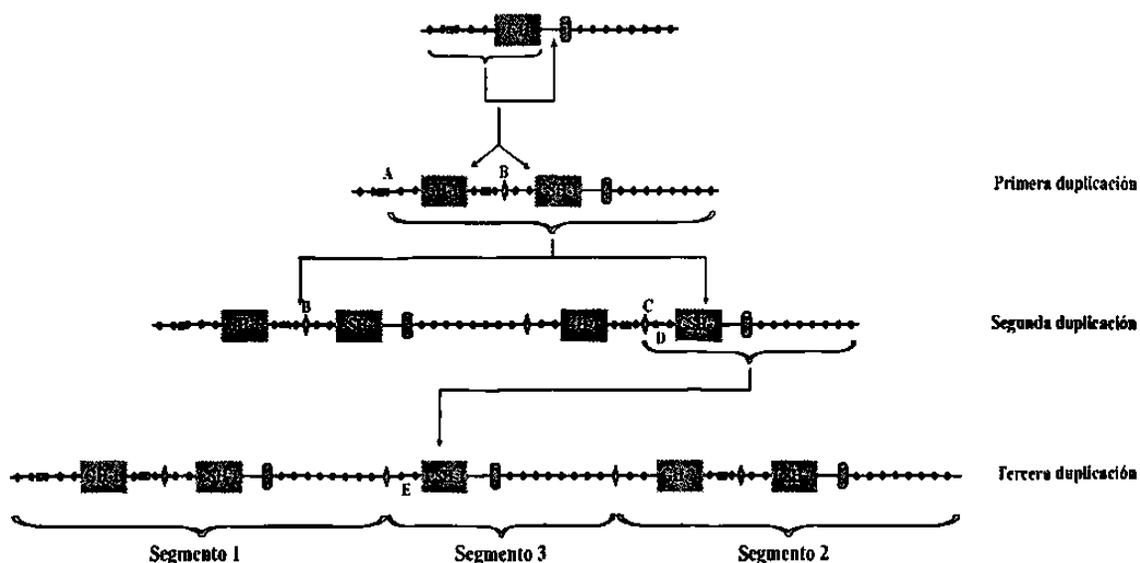


Figura 25. Nueva hipótesis sobre el origen del locus GH/CSH en el humano. Tres eventos sucesivos de duplicación generaron el locus actual. Primero, el gen ancestral de GH y su extremo 5' se duplicaron. Segundo, el segmento de la tercer Alu al final del mismo se duplicó. Finalmente, el segmento del inhibidor al final del mismo se duplicó y se insertó entre el CSHL-1 y la GH-2.

5.4.11 Estimación de los tiempos de duplicación

De acuerdo a la hipótesis del reloj molecular, la cual establece que dos secuencias de DNA no codificante evolucionan a un índice constante, se seleccionaron tres secuencias de DNA del humano y chimpancé para estimar dichos índices (Cuadro 12), enseguida se contabilizó el número de diferencias (no inserciones ni deleciones) entre los pares de secuencias (Cuadro 13).

Cuadro 12. Segmentos utilizados para estimar los índices de evolución.

Segmento	Espacio del segmento
H2	Región intergénica (RI) completa entre los genes hGH-1 y hCSH-L en la figura 24
H2-B	RI parcial del elemento P al gen CSH-L en la figura 24
C2	RI completa entre los genes cGH-1 y cCSH-B en la figura 24
C2-B	RI parcial del elemento P al gen cCSH-B en la figura 24
R2	RI completa del mono rhesus entre los genes rGH-1 y rCSH-1 en la figura 24

Cuadro 13. Número de diferencias entre los segmentos utilizados para estimar los índices, así como de los bloques de duplicación.

Secuencia 1/Secuencia 2	Número de diferencias	Tamaño (pb)
H2/C2 en la figura 24	190	5914
H2/R2 en la figura 24	529	6050
H2-B/C2-B en la figura 24	99	2462
A/B en la figura 25	991	5914
B/C en la figura 25	379	6050
D/E	92	2462

Con los datos de ambos cuadros y utilizando las formulas descritas en la sección 4.3.5.10, se estimaron los tres tiempos de duplicación que a continuación se describen.

En el cuadro 14 se hace un condensado de los índices, así como de los tiempos estimados para las tres duplicaciones descritas en la figura 25.

$$\text{Índice}_{H2/C2} = 190 / (2)(5914)(6,000,000) = 2.677 \times 10^{-9}$$

$$\text{Años}_{A/B} = 991 / (2)(2.677 \times 10^{-9})(5914) = 31.3$$

Cuadro 14. Tiempos de duplicación, en millones de años (MYA)

Índice ($\times 10^{-9}$)	Años
Primera Duplicación	
H2/C2 = 2.677	31.3
Segunda Duplicación	
H2/R2 = 1.900	16.5
Tercera Duplicación	
H2-B/C2-B = 3.350	5.6

CAPITULO VI

DISCUSIÓN

Si bien las técnicas de clonación y secuenciación de genes han contribuido a la comprensión de diversos fenómenos biológicos, entender cómo han surgido y evolucionado los genomas sigue siendo uno de los grandes retos actuales de la biología. Precisamente gracias a la automatización de la técnica de secuenciación del DNA fue posible desarrollar esta metodología a gran escala, al grado de poder secuenciar genomas completos. Con la disponibilidad de varios genomas nació la genómica comparativa, misma que se define como el estudio que compara secuencias de genomas completos. Tiene el objetivo entender los principios generales que durante la evolución moldearon la estructura y función de los genomas, esta disciplina no podría realizarse sin el uso de programas computacionales necesarios para manejar el gran volumen de datos; por consiguiente el nacimiento de la bioinformática. Al conjunto de algoritmos matemáticos utilizados en el desarrollo de la genómica comparativa se les incluye dentro de las herramientas genómicas. Con estas en cierta medida se ha logrado reconstruir la cronología de los cambios a nivel de los genes e identificar las fuerzas involucradas en el proceso evolutivo de los genomas. Algunas de las aportaciones de las ciencias genómicas ha sido la creación de enormes bancos de datos que han permitido hacer exploraciones de cromosomas que han ayudado a comprender fenómenos tan variados como la transferencia horizontal de genes, identificar familias de genes involucradas en las distintas rutas metabólicas, haciendo posible rastrear su surgimiento y evolución,

esclarecer las relaciones filogenéticas entre los seres vivos, así como identificar y discriminar los posibles escenarios en donde se desarrollo la especie, entre otras.

La genómica comparativa presenta la limitación de que sólo permite identificar y estimar el grado de similitud entre las familias multigénicas. El entendimiento de la evolución, divergencia, expresión diferencial de los miembros de dicha familia, así como las fuerzas que rigen el mantenimiento de las mismas, son la clave para entender el éxito evolutivo de las especies. Por otra parte, es bien sabido que precisamente la interacción entre las familias multigénicas es la responsable de proporcionar las características fenotípicas de cada especie, campo emergente referido como biología de sistemas.

La familia de la GH, CSH y PRL constituye un buen modelo para estudiar estos y otros aspectos de la evolución de los genomas. En su “copa” del “árbol”, la familia GH/CSH “ramifico” notablemente en algunos órdenes de mamíferos a partir del tronco de la GH, en el caso específico de los primates y por otro “tronco” el gen de la PRL en roedores y rumiantes. Entre las primeras “ramas” surgieron los CSH, que en el humano y mono rhesus presentan expresión placentaria. Sus funciones y patrones de expresión en otros primates apenas están siendo investigadas.

6.1 Obtención de los genes GH/CSH y sus regiones intergénicas

En el presente trabajo, para el mono rhesus se reporta la secuencia completa de seis genes relacionados a GH, de los cuales se logró evidenciar que su organización génica consta de cinco exones separados por cuatro intrones, en posiciones y tamaños similares a los de los genes del locus humano; así como la secuencia total de tres regiones intergénicas y la parcial para dos de ellas, logrando describir, por primera vez la organización del locus GH de una especie representativa de los MVM (Figuras 17 y 23).

La organización descrita aquí, proviene del análisis del DNA de diferentes individuos de la misma especie. Además, el análisis de los BAC sólo reveló genes agrupados en el mismo locus, por lo que la posibilidad de encontrar otros genes relacionados a GH fuera del locus está prácticamente descartada.

Para el mono araña sólo fue posible determinar la secuencia completa de las cinco regiones intergénicas previamente clonadas (Esquivel-Escobedo, 1999). Sin embargo también fue posible ensamblarlas en un locus (Figura 17). Partiendo de estas secuencias y las previamente reportadas en el GenBank (Cuadro 5), se realizaron los análisis y derivaron las conclusiones que a continuación se describen.

6.2 Análisis de los genes y las proteínas

A partir de las secuencias nucleotídicas se determinaron las aminoácidas y éstas se compararon con los aminoácidos clave en la unión al receptor descritos para la hGH-1, se establecieron sus relaciones filogenéticas, se probaron las hipótesis de evolución neutral, positiva y purificación de la selección, para finalmente identificar los eventos de conversión génica.

Golos y su equipo (Golos et al., 1993), determinaron por Southern blot que el locus GH del mono rhesus posee de 5 a 6 genes, sin embargo, únicamente lograron clonar los cDNA de tres CSH y dos GH. La comparación de las proteínas reportadas en este trabajo con el previo (denotados con *), muestra clara correspondencia entre GH-1*, GH-2*, CSH-1*, CSH-2* y CSH-3*. Las proteínas CSH-3 y 4 aquí descritas no tienen contraparte entre las reportadas por esos autores. Aunque las proteínas CSH-1* y CSH-2* son idénticas y sus cDNA son casi similares, solo presentan contraparte con el CSH-1. La ausencia de cDNA para CSH-3 y 4 tal vez se debe a su nula o muy baja expresión en la placenta. Ambos son aparentemente funcionales, aunque sus promotores presentan

ligeros cambios, similares a los observados en la hGH-2, mismos que disminuyen su transcripción (Nachtigal et al., 1989). Por su parte, la GH-2 reportada en los dos trabajos se encuentra bien conservada, incluso a nivel de los intrones. Contrariamente CSH-1*, CSH-2* y CSH-1 presentan múltiples cambios, a la fecha no existe una explicación clara del porque tal cantidad de cambios. Dichos cambios no se ubican en sitios funcionalmente importantes, por lo tanto podrían considerarse como polimorfismos; además estos cambios no se explican por transiciones (A por G o C por T) que son las más frecuentes.

El significado potencial de los cambios aminoácídicos de todas las proteínas respecto a la GH-1 del humano se puede evaluar específicamente en el contexto de los aminoácidos involucrados en la unión al receptor. Cuando todas las secuencias de las proteínas se comparan, los cambios no alteran los aminoácidos que contribuyen a la unión del receptor (Figura 18) y por ende puede que no afecten con su actividad somatogénica y lactogénica. Más investigación sobre la estructura, la función y la expresión de estas hormonas en primates se requiere para intentar entender la naturaleza de los cambios observados en estas especies.

El análisis filogenético se realizó mediante el método de "Neighbor-Joining" (NJ), utilizando la GH del cerdo y los prosimios como grupo fuera (Figura 19). El árbol sugiere que los de las GH-1 y GH-2 son los únicos genes claramente ortólogos entre el humano y el chimpancé. Interesantemente la GH-2 del mono rhesus no hace un clado con esos genes, sugiriendo que este gen fue generado por un acontecimiento independiente de la duplicación en los MVM (Wallis et al., 2002; Revol et al., 2004).

Múltiples eventos de duplicación fueron invocadas en la historia evolutiva de los genes CSH en los MVM. Aunque los genes CSH del humano y del mono rhesus se expresan

en placenta, se agregan de una manera linaje-específica, sin embargo, se puede observar que se originaron de un ancestro común. En este punto es difícil de establecer la ortología y/o paralogía de los genes CSH, únicamente para los genes CSHL-1 del humano y CSH-B del chimpancé se puede aplicar esta definición. Resultados similares fueron obtenidos usando diferentes métodos filogenéticos para el análisis, tales como máxima parsimonia y Likelihood.

Las pruebas de evolución muestran que los miembros de esta familia evolucionaron bajo diferentes procesos de selección, así como a diferentes índices de mutación (Cuadro 8). El análisis estadístico de los índices de mutación demostró que la GH-1 es la única que está claramente bajo el proceso de purificación de la selección, mientras que para los genes GH-2 y CSH no está claramente definida la fuerza evolutiva que actúa sobre ellos (Cuadro 10). Estudios adicionales de actividad biológica de estas hormonas son requeridos para precisar el tipo de fuerza evolutiva que influye sobre estos genes.

Las pruebas de hipótesis al reloj molecular a los intrones mostró que únicamente los intrones 2 y 3 cumplen con ésta teoría (Cuadro 9), mientras que los intrones 1 y 4 resultaron tener más excepciones a la regla del reloj molecular. Dichas excepciones a la regla podrían atribuirse a que dentro ellos se encuentran sitios de unión a factores transcripcionales, lo cual obliga a plantear que estos intrones no están bajo el índice basal de mutación. De hecho, se realizó la búsqueda de tales sitios en el programa MatInspector, sin embargo no se detectó ningún sitio de unión para algún factor transcripcional conocido que se relacione con la regulación transcripcional de estos genes. Por consiguiente esta violación a la teoría del reloj molecular, de momento queda sin explicación alguna.

Estudios previos han identificado algunos eventos de conversión génica en la familia GH/CSH, como es el caso de los pares de genes hCSH-1/hCSH-2 (Hirt et al., 1987), chimpancé CSH-A/GH-1 y CSH-C/GH-2 (Revol et al., 2004). En este trabajo se identificaron los eventos de conversión génica para los genes GH/CSH del mono rhesus (Cuadro 11). Queda demostrado una vez más que la conversión génica es sólo una de las diversas fuerzas evolutivas que actúan sobre la familia GH/CSH en primates, por lo que, de manera global se puede decir que esta familia es un claro ejemplo de evolución por nacimiento y muerte.

6.3 Surgimiento de la expresión diferencial de los genes relacionados a GH

El presente estudio también abarcó el análisis de los elementos reguladores de la transcripción, localizados dentro de las regiones intergénicas que se han descrito para el humano. La expansión del locus GH comenzó con los MNM, sin embargo la expresión diferencial de los genes únicamente se ha descrito en el mono rhesus y el humano. El elemento P se encontró en cada una de las regiones intergénicas de los monos araña y rhesus, mientras que el potenciador únicamente se encontró en las regiones intergénicas largas del mono rhesus.

6.3.1 Análisis del promotor proximal

Aunque el promotor proximal no confiere especificidad tisular (Canizales et al., 2005), el análisis en los monos araña y rhesus, reveló que algunas de las secuencias reguladoras están conservadas fuertemente en todos los casos. En varios casos Pit-1 proximal se altera substancialmente en los genes CSH de los MVM, siendo poco probable que su función normal este preservada. El elemento TBE es el más variable, mientras que la caja TATA está conservada en todos los casos. Aunque Sp1 e InrE se conservan en los genes GH, se sabe que estos elementos inducen la transcripción de los genes CSH en la

placenta y no la inducen para los genes GH. ¿Acaso los promotores proximales que no poseen frente a sí al elemento P activan la transcripción del gen en cuestión en líneas celulares derivadas de pituitaria, al igual que en líneas de placenta?. Experimentos de transfección deben contestar a esta pregunta.

6.3.2 El elemento P

En el genoma humano el elemento P están situados en las posiciones -2,439; -2,386; -2,287 y -2,690 de los genes CSH-L, CSH-1, GH-2 y CSH-2, respectivamente. En el mono rhesus (MVM) está en las posiciones -1,777; -2,307 -2,437 de los genes CSH -1, GH-2 y CSH-4 respectivamente. Finalmente también fue encontrado en el mono araña (MNM) a 1,295 río arriba de cada gen; indicando que para este mono, probablemente la expresión de todos los genes a excepción de la GH-1 se repriman en la glándula pituitaria, aunque es no se ha demostrado experimental. Por otra parte, el alto porcentaje de similitud que comparten el humano y el mono rhesus sugiere un mecanismo similar del control de la transcripción de los genes CSH.

6.3.3 El potenciador

Interesantemente los dos potenciadores descritos para el mono rhesus poseen la inserción "AGAA" río arriba del dominio DF-2 (Figura 22). Dicha inserción se ha descrito para el humano en los potenciadores de los genes CSHL-1 y CSH-1 como un inhibidor (Jaquemin et al., 1994). Estos datos sugieren mecanismos similares de la regulación diferencial de los genes relacionados a GH, entre el humano y el mono rhesus. El patrón de expresión de estos genes en los MNM completará el estudio y permitirá definir cuándo se adquirió la especificidad tisular.

6.4 Expansión de las regiones intergénicas entre los MNM y MVM

En el linaje de los MNM las regiones intergénicas presentan un mismo tamaño (3.5 kpb), mientras que en los MVM y el humano se clasifican de acuerdo a su tamaño en cortas (6 kpb) y largas (13 kpb). El presente estudio se centró en identificar los segmentos de DNA involucrados en la expansión de las regiones intergénicas después de la divergencia de los MNM/MVM.

Las regiones intergénicas largas del mono rhesus y el humano presentan un patrón similar en la distribución de los elementos Alu, además poseen una mayor cantidad de secuencias Alu que las intergénicas del mono araña (diez *versus* dos, respectivamente). Paradójicamente, dichas regiones del mono araña son más parecidas a las intergénicas largas del humano y mono rhesus. La expansión de las regiones intergénicas de 3.5 a 13 kpb es principalmente atribuida a una inserción única que incluye al potenciador y ocho secuencias Alu, así como a los exones VII y VIII del gen TCAM-1. El gen TCAM-1 se encuentra en el extremo 3' del gen GH de rata y ratón (Sakatani et al., 2000). Por tanto, la hipótesis más simple es que el potenciador ya estaba presente en el extremo 3' del locus ancestral cuando ocurrió el evento de recombinación. A falta de la secuencia del extremo 3' del locus GH del mono araña, en este momento no se puede afirmar o rechazar la presencia del potenciador en los MNM.

Las regiones intergénicas cortas del humano y mono rhesus presentan casi el mismo patrón de secuencias Alu, excepto por la Alu 9r que está ausente en el mono rhesus. Las tres intergénicas cortas analizadas poseen la secuencia Alu localizada ~ 200 pb río abajo del codón de terminación (correspondientes a las Alu 6r y 30r en el humano). Aunque en este momento la segunda intergénica corta del mono rhesus no se ha terminado de secuenciar, en un trabajo previo (Golos et al., 1993) se reportó la existencia de dicha

secuencia Alu, presente río abajo del gen GH-2 (cuya secuencia se reporto completa). Consecuentemente, se puede deducir que esta Alu se insertó río abajo del gen ancestral GH-1 después de la divergencia de los MNM. Esta inserción precede al evento de recombinación que generó los genes GH-2 en los MVM y el humano.

Las intergénicas cortas del mono rhesus y humano, poseen una región de ~ 1.8 kpb que no está incluida en las intergénicas largas, ni en las del mono araña. Esta observación sugiere que las intergénicas cortas del mono rhesus y humano provienen de un evento de duplicación común e independiente al que genero las regiones intergénicas largas. Interesantemente, en este evento tomó parte el promotor del gen humano de GH-1. El análisis de los extremos 5' y 3' de los loci de los monos araña y rhesus, así como del humano, nos permitió precisar los eventos que fueron requeridos en la formación de las intergénicas cortas y largas. De manera global, se puede decir que las intergénicas cortas se formaron por un evento de recombinación en el cual participó el extremo 5' del locus ancestral. En la formación del las intergénicas largas participó el extremo 3' del locus ancestral de GH, tal y como ya se comentó arriba.

6.5 Detalles de la comparación de los loci

La comparación entre el marmoset (Wallis et al., 2002) y el mono araña en su contexto genómico, incita algunas observaciones. El gen del extremo 5' corresponde ciertamente al ortólogo de la GH pituitaria del humano. El análisis del promotor proximal demuestra que el pseudogen 3 del marmoset y el pseudogen del mono de la araña tienen el grado más alto de similitud, mientras que el pseudogene 4 del marmoset no se asemeja al gen GH-2 del mono de la araña, sugiriendo que el mono araña carece de los otros dos pseudogenes y que esos pseudogenes en el marmoset son cambios *de novo*. El resto de los genes funcionales del marmoset, pudieran ser los ortólogos solamente en el sentido

de su secuencia, pero no por su posición en el locus, puesto que el marmoset GH-5 hace clado con el GH-2 del mono araña, el GH-6 con el GH-3 (Figura 19), es decir, se invierten sus posiciones en los locus. Finalmente, los extremos 3' de ambos locus son muy diferentes (Figura 24).

El análisis comparativo en los MVM y grandes monos, indica que los loci comienzan siempre con el gen pituitario de la GH seguido por una región intergénica corta, mientras que el resto de las secuencias de los loci son muy heterogéneas en cuanto a la clase, número y tamaños de los genes y de las regiones intergénicas; planteando algunas preguntas interesantes, por ejemplo: ¿es ésta heterogeneidad relacionada con el tamaño animal?; ¿el número de crías por parto? ¿o es asociado con la duración del embarazo y de la lactancia? ¿o con qué aspectos de la biología reproductiva del primate? En el presente, la GH pituitaria en los primates conserva su función original. Si durante la evolución ésta adquirió una segunda función, por ejemplo la actividad lactogénica ("PRL-like"), es razonable pensar que los genes duplicados (en este caso los CSH) adquirieran esta función, pero ¿qué sucedió en el linaje de los MNM? donde no hay genes CSH. El hecho de encontrar al elemento P delante de cada supuesto gen placentario del mono araña, hace suponer que la regulación fina en la expresión tejido específico comenzó en el linaje de los MNM y su refinamiento terminó en el linaje de los MVM/grandes monos. El análisis biológico para determinar cuál es la función y el patrón de expresión de cada uno de los genes duplicados es necesario para entender cómo y porqué esta familia se ha expandido.

6.6 Una nueva hipótesis sobre el origen del locus GH/CSH en el humano

Las observaciones que nos condujeron a proponer esta nueva hipótesis fueron: 1) La cercanía de los genes hCSH-1 y hCSH-2 en el árbol filogenético (Figura 19) sugiere que

el tiempo de duplicación entre ellas es muy corto, tal vez es menor a seis millones de años. 2) La ortología entre los genes CSHL-1 y CSH-B del humano y chimpancé, respectivamente (Figura 19). 3) La posición espacial en los loci GH/CSH de humano y chimpancé de los pares de genes hGH-1/cGH-1, hCSHL-1/cCSH-B, hGH-2/cGH-2 y hCSH-2/cCSH-D (Figura 24). 4) La similitud del extremo 5' de los loci con la primer intergénica corta.

Con las observaciones anteriores se propusieron los bloques o segmentos de duplicación descritos en la figura 25. Enseguida los loci se fraccionaron en sub-unidades de comparación (Cuadro 12 y Figura 24) para estimar los tiempos de duplicación de los tres eventos propuestos (Figura 25). Los tiempos de duplicación (Cuadro 14), se calcularon utilizando los segmentos descritos en el cuadro 12, los datos del cuadro 13 y las formulas descritas en la sección 4.3.5.10.

Del cuadro 14, se puede decir de manera global que las duplicaciones descritas en la figura 25, ocurrieron en los tiempos que a continuación se describen. La primera duplicación sucedió ~ 31 MYA, la segunda ~ 16 MYA y la tercera < 6 MYA. Considerando que los MNM divergieron de los prosimios ~ 40 MYA, los MVM lo hicieron ~ 23 MYA y el humano del chimpancé ~ 6 MYA. De esta manera, nos damos cuenta que los tiempos estimados por nosotros están en acorde con los del registro fósil. Lo más interesante de esto, es que la tercera duplicación en la cual se generó el hCSH-1 a partir del hCSH-2 (Figura 25), ocurrió específicamente en linaje humano. Los RNAm de hCSH-1 y 2 representan el 3.5% del total del RNAm de la placenta y hCSH-1 es expresado de tres a seis veces más que hCSH-2 (Walker et al., 1991). Esto nos da pie a pensar que la duplicación del gen hCSH-1 en algún momento de la evolución humana fue pieza fundamental para el triunfo evolutivo del humano. Sin embargo, estudios sobre

el transcriptoma de la placenta de chimpancé son requeridos para ayudar a esclarecer interrogantes como: ¿porqué los humanos evolucionaron hacia el silenciamiento del gen hCSHL-1?, ¿porqué la necesidad de duplicar el gen hCSH-2, en lugar de utilizar el mismo arreglo genómico que el chimpancé?. El esclarecimiento a estas interrogantes aportará elementos necesarios para poder postular a la familia GH/CSH como una de las responsables de las diferencias fenotípicas entre el humano y chimpancé.

6.6.1 Evidencias clínicas que soportan la nueva hipótesis

Con las observaciones hechas aquí se pudieron identificar los tres segmentos de duplicación que generaron al actual locus GH/CSH en el humano (Figura 25). Estudios efectuados en embarazos anormales mostraron deleciones de los segmentos 2 y 3, o únicamente del 3 (Simon et al., 1986; Rygaard et al., 1998; Eggermman et al., 1998). Por consiguiente, se puede decir que el locus GH/CSH como tal, aún no se ha fijado en el total de la población debido a su reciente aparición en el linaje humano. Estudios de genética de poblaciones son requeridos para aceptar o rechazar esta hipótesis.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

- 1.- El locus GH/CSH del mono rhesus comprende 2 GHs y cuatro CSHs separados por cinco regiones intergénicas, de acuerdo a su tamaño se clasifican en dos cortas (6 kpb) y tres largas (13 kpb).
- 2.- El gen GH-2 apareció tardíamente en el linaje de los MVM por sustitución de un CSH en el locus ancestral, no siendo ortólogo al de los grandes monos.
- 3.- El gen CSH-2 se duplicó específicamente en el linaje humano, para formar al CSH-1.
- 4.- El gen GH-1 de todas las especies estudiadas es el único que claramente bajo la fuerza evolutiva de purificación de la selección, mientras que para los genes GH-2 y CSH no se logró definir la fuerza evolutiva que actúa sobre éstos.
- 5.- Los genes CSH surgieron a partir de los MVM.
- 6.- Las regiones intergénicas se alargaron a partir de los MVM por la inserción de las secuencias repetitivas Alu, el potenciador y los exones VII y VIII del gen TCAM-1. Específicamente, en las RI largas participó el extremo 3', mientras que para las cortas el extremo 5'.
- 7.- Aparentemente la especificidad tisular comenzó en los MNM y se refinó en los MVM y grandes monos.
- 8.- El promotor basal está conservado en todos los monos antropoides.
- 9.- La familia GH/CSH es un claro ejemplo de evolución por nacimiento y muerte.
- 10.- El locus GH/CSH en los monos antropoides fue moldeado por múltiples eventos de recombinación.

CAPITULO VIII

PERSPECTIVAS

- 1.- ¿A caso el número, el tipo y la organización de los genes tiene que ver con el tamaño del animal, el número de crías, tiempo de lactancia u otros aspectos de la reproducción de los primates?
- 2.- ¿Son los promotores proximales capaces de iniciar la transcripción basal tanto en células de hipófisis como de placenta?
- 3.- ¿Confieren los promotores distales de los MNM la expresión diferencial en células de hipófisis *versus* de placenta?
- 4.- ¿Es la expansión de las regiones intergénicas consecuencia de la especificidad tisular?
- 5.- ¿A caso la duplicación del gen CSH-2 aseguró el éxito de nuestra especie y/o esta involucrado en las diferencias fenotípicas entre el humano y el chimpancé?

CAPITULO IX

BIBLIOGRAFÍA

- Adkins, R.M., Nekrutenko, A., Li, W.H., 2001. Bushbaby growth hormone is much more similar to nonprimate growth hormones than to rhesus monkey and human growth hormones. *Mol Biol Evol* 18, 55-60.
- Amemiya Y., Sogabe Y., Nozaki M., Takahshi A., Kawauchi H., 1998. Somatolactin in the white sturgeon and African lungfish and its evolutionary significance. *General and comparative endocrinology* 114, 181-190.
- Anthony, R.V., Liang, R., Kayl, E.P., Pratt, S.L., 1995. The growth hormone/prolactin gene family in ruminant placentae. *J Reprod Fertil Suppl* 49, 83-95.
- Bagga, R., Vasishta, K., Majumdar, S., Garg, S.K., 1990. Correlation between human placental lactogen levels and glucose metabolism in pregnant women with intrauterine growth retardation. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 30, 310-313.
- Barboza-Cerda, M.D.C., 1998. Participación del factor transcripcional Sp1 en la regulación de la expresión del gen hPL-4, *Bioquímica Vol. Maestría*, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, pp. 60.
- Barrera-Saldana, H.A., Seeburg, P.H., Saunders, G.F., 1983. Two structurally different genes produce the same secreted human placental lactogen hormone. *J Biol Chem* 258, 3787-3793.
- Ben-Jonathan, N., Mershon, J.L., Allen, D.L., Steinmetz, R.W., 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 17, 639-669.
- Brown, D.D., Wensink, P.C., Jordan, E., 1972. A comparison of the ribosomal DNA's of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. *J Mol Biol* 63, 57-73.
- Chellakooty, M., Vangsgaard, K., Larsen, T., Scheike, T., Falck-Larsen, J., Legarth, J., Andersson, A.M., Main, K.M., Skakkebaek, N.E., Juul, A., 2004. A longitudinal study of intrauterine growth and the placental growth hormone (GH)-insulin-like growth factor I axis in maternal circulation: association between placental GH and fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 384-391.
- Chen, E.Y., Liao, Y.C., Smith, D.H., Barrera-Saldana, H.A., Gelinas, R.E., Seeburg, P.H., 1989. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics* 4, 479-497.

- Courtois, S.J., Lafontaine, D.A., Lemaigre, F.P., Durviaux, S.M., Rousseau, G.G., 1990. Nuclear factor-I and activator protein-2 bind in a mutually exclusive way to overlapping promoter sequences and trans-activate the human growth hormone gene. *Nucleic Acids Res* 18, 57-64.
- Day, I.N., Chen, X.H., Gaunt, T.R., King, T.H., Voropanov, A., Ye, S., Rodriguez, S., Syddall, H.E., Sayer, A.A., Dennison, E.M., Tabassum, F., Barker, D.J., Cooper, C., Phillips, D.I., 2004. Late life metabolic syndrome, early growth, and common polymorphism in the growth hormone and placental lactogen gene cluster. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 5569-5576.
- Eggermann, T., Eggermann, K., Mergenthaler, S., Kuner, R., Kaiser, P., Ranke, M.B., Wollmann, H.A., 1998. Paternally inherited deletion of CSH1 in a patient with Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 35, 784-786.
- Esquivel Escobedo Dolores, 1999. Organización del locus del complejo GH-PL en el mono araña (*Ateles geoffroyi*), Departamento de Bioquímica Vol. Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey.
- Fitzpatrick, S.L., Walker, W.H., Saunders, G.F., 1990. DNA sequences involved in the transcriptional activation of a human placental lactogen gene. *Mol Endocrinol* 4, 1815-1826.
- Goffin, V., Shiverick, K.T., Kelly, P.A., Martial, J.A., 1996. Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. *Endocr Rev* 17, 385-410.
- Goffin, V., Touraine, P., Pichard, C., Bernichtein, S., Kelly, P.A., 1999. Should prolactin be reconsidered as a therapeutic target in human breast cancer? *Mol Cell Endocrinol* 151, 79-87.
- Golos, T.G., Durning, M., Fisher, J.M., Fowler, P.D., 1993. Cloning of four growth hormone/chorionic somatomammotropin-related complementary deoxyribonucleic acids differentially expressed during pregnancy in the rhesus monkey placenta. *Endocrinology* 133, 1744-1752.
- Gordon, D., Abajian, C., Green, P., 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* 8, 195-202.
- Handwerger, S., Freemark, M., 2000. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13, 343-356.
- Harper, M.E., Barrera-Saldana, H.A., Saunders, G.F., 1982. Chromosomal localization of the human placental lactogen-growth hormone gene cluster to 17q22-24. *Am J Hum Genet* 34, 227-234.
- Higgins, D.G., Sharp, P.M., 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple

- sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73, 237-244.
- Hirt, H., Kimelman, J., Birnbaum, M.J., Chen, E.Y., Seeburg, P.H., Eberhardt, N.L., Barta, A., 1987. The human growth hormone gene locus: structure, evolution, and allelic variations. *Dna* 6, 59-70.
- Hughes, A.L., Nei, M., 1990. Evolutionary relationships of class II major-histocompatibility-complex genes in mammals. *Mol Biol Evol* 7, 491-514.
- Ingraham, H.A., Chen, R.P., Mangalam, H.J., Elsholtz, H.P., Flynn, S.E., Lin, C.R., Simmons, D.M., Swanson, L., Rosenfeld, M.G., 1988. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55, 519-529.
- Jacquemin, P., Oury, C., Peers, B., Morin, A., Belayew, A., Martial, J.A., 1994. Characterization of a single strong tissue-specific enhancer downstream from the three human genes encoding placental lactogen. *Mol Cell Biol* 14, 93-103.
- Jiang, S.W., Shepard, A.R., Eberhardt, N.L., 1995. An initiator element is required for maximal human chorionic somatomammotropin gene promoter and enhancer function. *J Biol Chem* 270, 3683-3692.
- Kaneko, T., 1996. Cell biology of somatolactin. *Int Rev Cytol* 169, 1-24.
- Karabulut, A.K., Layfield, R., Pratten, M.K., 2001. Growth promoting effects of human placental lactogen during early organogenesis: a link to insulin-like growth factors. *J Anat* 198, 651-662.
- Karin, M., Theill, L., Castrillo, J.L., McCormick, A., Brady, H., 1990a. Cell type specific expression of the growth hormone gene and its control by GHF-1. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* 66, 1205-1220.
- Karin, M., Theill, L., Castrillo, J.L., McCormick, A., Brady, H., 1990b. Tissue-specific expression of the growth hormone gene and its control by growth hormone factor-1. *Recent Prog Horm Res* 46, 43-57; discussion 57-48.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5, 150-163.
- Lefevre, C., Imagawa, M., Dana, S., Grindlay, J., Bodner, M., Karin, M., 1987. Tissue-specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific trans-acting factor. *Embo J* 6, 971-981.
- Lemaigre, F.P., Lafontaine, D.A., Courtois, S.J., Durviaux, S.M., Rousseau, G.G., 1990. Sp1 can displace GHF-1 from its distal binding site and stimulate transcription from the growth hormone gene promoter. *Mol Cell Biol* 10, 1811-1814.

- Li, Y., Ye, C., Shi, P., Zou, X.J., Xiao, R., Gong, Y.Y., Zhang, Y.P., 2005. Independent origin of the growth hormone gene family in New World monkeys and Old World monkeys/hominoids. *J Mol Endocrinol* 35, 399-409.
- Lipkin, S.M., Naar, A.M., Kalla, K.A., Sack, R.A., Rosenfeld, M.G., 1993. Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1-dependent growth hormone gene expression. *Genes Dev* 7, 1674-1687.
- Liu, J.C., Makova, K.D., Adkins, R.M., Gibson, S., Li, W.H., 2001. Episodic evolution of growth hormone in primates and emergence of the species specificity of human growth hormone receptor. *Mol Biol Evol* 18, 945-953.
- Nachtigal, M.W., Nickel, B.E., Cattini, P.A., 1993. Pituitary-specific repression of placental members of the human growth hormone gene family. A possible mechanism for locus regulation. *J Biol Chem* 268, 8473-8479.
- Nachtigal, M.W., Nickel, B.E., Klassen, M.E., Zhang, W.G., Eberhardt, N.L., Cattini, P.A., 1989. Human chorionic somatomammotropin and growth hormone gene expression in rat pituitary tumour cells is dependent on proximal promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 17, 4327-4337.
- Nei, M., Gu, X., Sitnikova, T., 1997. Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7799-7806.
- Nei, M., Rooney, A.P., 2005. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet* 39, 121-152.
- Ota, T., Nei, M., 1994. Divergent evolution and evolution by the birth-and-death process in the immunoglobulin VH gene family. *Mol Biol Evol* 11, 469-482.
- Paci, S., Russo, G., Mure, G., Parisi, R., de Filippo, V., Correnti, R., Eliamo, A., Comis, B., Latagliata, C., Ventimiglia, E., et al., 1989. [Usefulness and limitations of hormonal monitoring of pregnancy with HPL and estriol in improving fetal prognosis and preventing neonatal neurologic deficiency]. *Minerva Ginecol* 41, 265-275.
- Resendez-Perez, D., Ramirez-Solis, R., Varela-Echavarría, A., Martínez-Rodríguez, H.G., Barrera-Saldana, H.A., 1990. Coding potential of transfected human placental lactogen genes. *Nucleic Acids Res* 18, 4665-4670.
- Revol De Mendoza, A., Esquivel Escobedo, D., Martínez Davila, I., Saldana, H., 2004. Expansion and divergence of the GH locus between spider monkey and chimpanzee. *Gene* 336, 185-193.
- Rubin, D.A., Dores, R.M., 1994. Cloning of a growth hormone from a primitive bony fish and its phylogenetic relationships. *Gen Comp Endocrinol* 95, 71-83.

- Rygaard, K., Revol, A., Esquivel-Escobedo, D., Beck, B.L., Barrera-Saldana, H.A., 1998. Absence of human placental lactogen and placental growth hormone (HGH-V) during pregnancy: PCR analysis of the deletion. *Hum Genet* 102, 87-92.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- Sakatani, S., Takahashi, R., Okuda, Y., Aizawa, A., Otsuka, A., Komatsu, A., Ono, M., 2000. Structure, expression, and conserved physical linkage of mouse testicular cell adhesion molecule-1 (TCAM-1) gene. *Genome* 43, 957-962.
- Sambrook Joseph., R.W.D., 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Sawyer, S., 1989. Statistical tests for detecting gene conversion. *Mol Biol Evol* 6, 526-538.
- Simon, P., Decoster, C., Brocas, H., Schwers, J., Vassart, G., 1986. Absence of human chorionic somatomammotropin during pregnancy associated with two types of gene deletion. *Hum Genet* 74, 235-238.
- Singer M., Berg P., 1982. *Genes and genomes. A changing perspective*.
- Sonntag, W.E., Ramsey, M., Carter, C.S., 2005. Growth hormone and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and their influence on cognitive aging. *Ageing Res Rev* 4, 195-212.
- Stauffer, R.L., Walker, A., Ryder, O.A., Lyons-Weiler, M., Hedges, S.B., 2001. Human and ape molecular clocks and constraints on paleontological hypotheses. *J Hered* 92, 469-474.
- Stephanou, A., Handwerger, S., 1995a. Identification of a composite steroid hormone response element on the human placental lactogen promoter. *Mol Cell Endocrinol* 112, 123-129.
- Stephanou, A., Handwerger, S., 1995b. The nuclear factor NF-IL6 activates human placental lactogen gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 206, 215-222.
- Stephanou, A., Handwerger, S., 1995c. Retinoic acid and thyroid hormone regulate placental lactogen expression in human trophoblast cells. *Endocrinology* 136, 933-938.
- Stephanou, A., Ross, R., Handwerger, S., 1994. Regulation of human placental lactogen

- expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology* 135, 2651-2656.
- Su, Y., Liebhaber, S.A., Cooke, N.E., 2000. The human growth hormone gene cluster locus control region supports position-independent pituitary- and placenta-specific expression in the transgenic mouse. *J Biol Chem* 275, 7902-7909.
- Swenne, I., Hill, D.J., Strain, A.J., Milner, R.D., 1987. Growth hormone regulation of somatomedin C/insulin-like growth factor I production and DNA replication in fetal rat islets in tissue culture. *Diabetes* 36, 288-294.
- Takezaki, N., Rzhetsky, A., Nei, M., 1995. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Mol Biol Evol* 12, 823-833.
- Verhaeghe, J., Pintiaux, A., Van Herck, E., Hennen, G., Foidart, J.M., Igout, A., 2002. Placental GH, IGF-I, IGF-binding protein-1, and leptin during a glucose challenge test in pregnant women: relation with maternal body weight, glucose tolerance, and birth weight. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 2875-2882.
- Ville C.A., 1996. *Biología*.
- Walker W.H., Fitzpatrick S.L., Barrera-Saldaña H.A., Reséndez-Perez D., Saunders G.F., 1991. The human placental lactogen genes: Structure, function, evolution and transcriptional regulation. *Endocrine Reviews* 12, 316-328.
- Wallis, O.C., Wallis, M., 2002. Characterisation of the GH gene cluster in a new-world monkey, the marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Mol Endocrinol* 29, 89-97.
- Ye, C., Li, Y., Shi, P., Zhang, Y.P., 2005. Molecular evolution of growth hormone gene family in old world monkeys and hominoids. *Gene* 350, 183-192.
- Zhang, J., Dyer, K.D., Rosenberg, H.F., 2000. Evolution of the rodent eosinophil-associated RNase gene family by rapid gene sorting and positive selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4701-4706.
- Zhang, J., Rosenberg, H.F., Nei, M., 1998. Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3708-3713.



