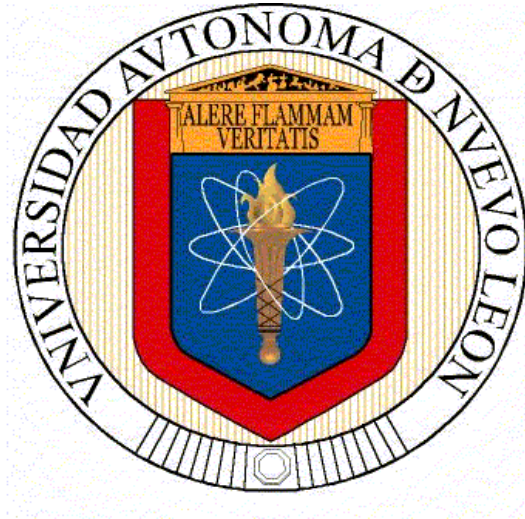


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

**EVALUACIÓN DEL PROMOTOR hTERT COMO HERRAMIENTA
DE DETECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES**

PRESENTADO POR:

ULRICH RAMÓN JIMÉNEZ HERRERA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

DICIEMBRE 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DEL PROMOTOR hTERT COMO HERRAMIENTA DE DETECCIÓN
DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES**

PRESENTADO POR:

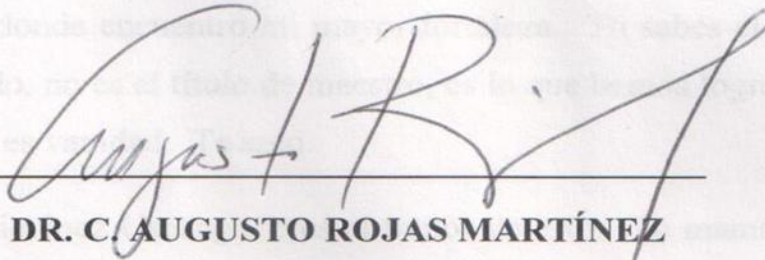
QBP. Ulrich R. Jiménez Herrera

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

Diciembre, 2014

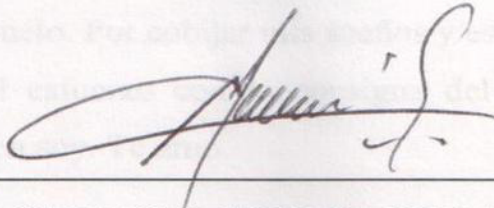
**Evaluación del Promotor hTERT como Herramienta de Detección de Células
Tumorales Circulantes**

Aprobación de la Tesis:



DR. C. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ

Director de Tesis



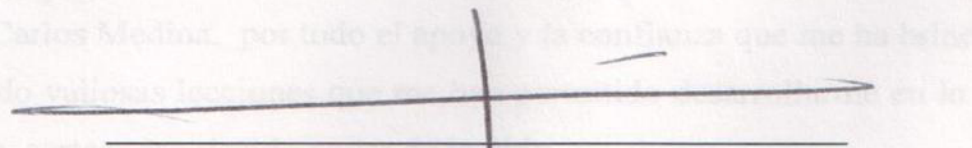
DR. C. CARLOS E. MEDINA DE LA GARZA

Co-Director de Tesis



DR. C. IVAN MARINO MARTÍNEZ

Miembro de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO

Subdirector de Estudios de Posgrado

Tabla de contenido

RESUMEN.....	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABLAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
Capítulo 1.....	1
Marco Teórico	1
1.1 Cáncer	1
1.2 Células TumORAles Circulantes (CTCs).....	2
1.3Telomeros y telomerasa.....	4
1.4 Proteínas fluorescentes	8
Capítulo 2.....	10
Justificación	10
Capítulo 3.....	11
Objetivos	11
3.1 Objetivo General.....	11
3.2 Objetivos específicos	11
Capítulo 4.....	12
Material y Métodos	12
4.1 Lugar de realización del estudio.....	12
4.2 Materiales	12
4.3 Métodos.....	14
Capítulo 5	20
Resultados	20
5.1 Construcción del plásmido pGL3-hTERT-Luc	20
5.2 Ensayos de Luminiscencia	24
5.3 PCR cuantitativa.....	25

5.4 Ensayos de Microscopia Confocal.....	27
Capítulo 6.....	30
Discusión	30
6.1 Análisis de la potencia y especificidad del promotor hTERT en líneas tumorales y controles.....	30
6.2 Correlación de la expresión del transcrito de hTERT con la expresión de luciferasa en líneas tumorales y controles.....	30
6.3 Evaluación de la expresión de la proteína RFP en líneas tumorales y controles.....	31
Capítulo 7	32
Conclusiones	32
Capítulo 8.....	32
Bibliografía	33

RESUMEN

Evaluación del Promotor hTERT como Herramienta de Detección de Células Tumorales Circulantes.

Introducción. El cáncer es un padecimiento con una alta incidencia y mortalidad en el mundo, lo que resulta en un problema de salud mundial. Es necesario la búsqueda y aplicación de nuevos marcadores para mejorar el diagnóstico, tipificación y tratamiento del cáncer. Las células tumorales circulantes (CTCs) son células que se desprenden del tumor y viajan por sangre o linfa y tienen asociación con la progresión tumoral y la respuesta al tratamiento. Adicionalmente, la captura de CTCs vivas permitiría hacer estudios moleculares (ácidos nucleicos y proteínas) para una mejor caracterización tumoral y la definición de blancos terapéuticos específicos. Los métodos de detección y captura de CTCs deben de ser altamente sensibles y específicos debido a la baja proporción en sangre de las CTCs (1 célula tumoral circulante por 10^9 células sanguíneas normales). Una estrategia específica podría ser el uso del promotor hTERT, promotor que esta específicamente activo en las células tumorales.

Objetivo. Evaluación del promotor hTERT *in vitro* mediante ensayos de expresión.

Material y métodos. Se transfectaron las líneas tumorales: HeLa, SiHa, Colo320, HepG2 y fibroblastos con los plásmidos pGL3-hTERT-Luc, pGL3-CMV-Luc y pShuttle-hTERT-RFP para su posterior evaluación mediante ensayos de luminiscencia y microscopía confocal. Se realizaron ensayos de PCR cuantitativa para evaluar los niveles del transcrito hTERT en cada línea y hacer correlaciones con los niveles de luminiscencia en los experimentos de expresión. Finalmente, las observaciones por microscopía confocal en las células transfectadas se correlacionó con los resultados de expresión de luminiscencia y con la expresión de transcritos de la subunidad catalítica de hTERT.

Resultados. Los ensayos de expresión de Luc mostraron que el promotor hTERT es 4 veces menos potente respecto al promotor CMV y muestra una expresión baja y variable en las distintas líneas tumorales transfectadas. Se observa una correlación entre los niveles del transcrito de hTERT que resultaron de los ensayos de PCR cuantitativa y los niveles de expresión de Luc en fibroblastos y las líneas tumorales Colo320 y HeLa, correlación que no presentan las líneas tumorales SiHa y HepG2. La microscopía confocal mostro señales débiles y limitadas en las líneas tumorales, un poco más intensa en Colo320 y en general, estos estudios se correlacionaron con los niveles de expresión observados en los ensayos previos.

Discusión. Los niveles de expresión del plásmido experimental fueron específicos para las líneas transformadas, pero bajos y variados en las diferentes líneas estudiadas. Dicha variabilidad puede ser debido a las diferencias en los mecanismos de regulación transcripcional entre las líneas tumorales estudiadas.

Conclusiones. El promotor hTERT es específico para células transformadas pero tiene una potencia en cada línea tumoral ensayada. Este resultado no es satisfactorio para el desarrollo de vectores para la identificación de CTCs.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer en el mundo.	1
Figura 2. Diagrama que representa la diseminación de una célula tumoral en sangre.	2
Figura 3. Procedimiento a seguir para la detección de CTCs por el método CellSearch (Veridex, Raritan, NJ, USA).	3
Figura 4. Diagrama del vector diseñado por Takakura et al. con el objetivo de detectar CTCs	4
Figura 5. Diagrama que muestra la posición de los telómeros en el cromosoma.	5
Figura 6. Diagrama que muestra los componentes de la telomerasa.	5
Figura 7. Maquinaria de regulación del promotor hTERT	7
Figura 8. Estructura de la proteína mRFP1	9
Figura 9. Estrategia General	14
Figura 10. Distribución de líneas tumorales y tratamientos en placa de 96 pozos	16
Figura 11. Geles caracterización con NotI – BglII, plásmidos pGL3Basic y pUC57-HhTERT-TFP	21
Figura 12. Geles restricción con XhoI – KpnI, plásmidos pGL3basic y pUC57-hTERT-RFP.	22

Figura 13.	Gel caracterización con NotI – BglII, colonias sospechosas, pGL3-hTERT-Luc.	23
Figura 14.	Análisis de expresión de luminiscencia	24
Figura 15.	Relación entre el nivel de expresión del transcrito de TERT respecto al de fibroblastos.	25
Figura 16.	Comparación de los niveles de expresión del transcrito de TERT y los niveles de RLU en cada una de las líneas tumorales a evaluar.	26
Figura 17.	Micrografías, microscopia confocal.	28
Figura 18.	Barridos espectrales.	29
Figura 19.	Micrografía Colo 320 positivo.	29

LISTA DE TABLAS

	Página	
Tabla 1	Distribución de tratamientos, luminiscencia	17
Tabla 2	Programa para síntesis de ADNc.	18
Tabla 3.	Programa para PCR cuantitativa	19

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribunocleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNp	Ácido desoxirribonucleico plasmídico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
°C	Grados Celsius
CK	Citoqueratina
cm²	Centímetros cuadrados
CMV	Citomegalovirus
CO₂	Dióxido de carbono
CTCs	Células Tumorales Circulantes
DAPI	4', 6-Diamino-2-fenilindol
DEPC	Dietil-Pirocarbonato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EpCAM	Molécula de Adhesión de Células Epiteliales
GFP	Proteína verde fluorescente
hTERC	Componente de ARN de la telomerasa humana
hTERT	Subunidad catalítica transcriptasa inversa de la telomerasa humana
LB	Medio Luria-Bertani

mL	Mililitro
μL	Microlitro
mm	Milímetro
Myc	Mielocitomatosis
Nm	Nanómetro
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
pH	Potencial de hidrógeno
ng	Nanogramo
nt	Nucleotidos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RFP	Proteína roja fluorescente
RLU	Unidades relativas de luminiscencia
TEM	Transición Epitelial - Mesenquimal

Capítulo 1

Marco Teórico

1.1 Cáncer

Cáncer es un término usado para definir enfermedades que presentan como característica la presencia de células anormales con una división celular descontrolada y con células que presentan la habilidad de invadir otros tejidos, habilidad que es definida como metástasis, la mayor causa de muerte por cáncer. (National Cancer Institute, 2014)

1.1.2 Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estimó 8.2 millones de personas fallecieron a causa de cáncer durante el año del 2012, lo cual equivale a un 22% del total de las defunciones por enfermedades no transmisibles de ese año en el mundo (Figura 1). (GLOBOCAN PROJECT, OMS, 2012) En México durante 2012, las defunciones a causa de tumores malignos fueron de 73,240 casos, ubicándose como la tercera causa de mortalidad en el país. (INEGI, 2012)

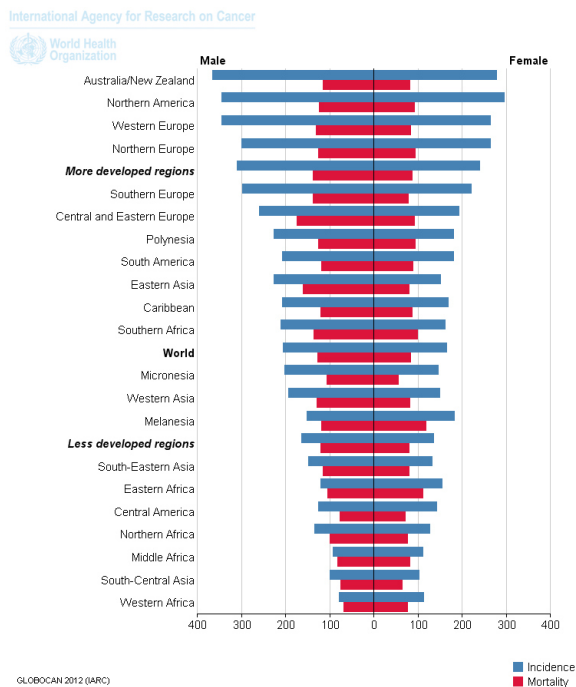


Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer en el mundo.

1.2 Células Tumorales Circulantes (CTCs)

El mecanismo de metástasis es un evento complejo, en el cual las células tienen la habilidad de desprenderse y crecer en un tejido lejano del sitio del tumor primario. La diseminación puede darse a través de sangre y/o sistema linfático y las células que presentan dicha habilidad se conocen como células tumorales circulantes (CTCs). La presencia de CTCs se explica por dos mecanismos diferentes: transición epitelial-mesenquimal (TEM) en la cual, en un tumor primario de origen epitelial, existen cambios en los patrones de expresión de moléculas que permiten la adhesión célula-célula, o célula-matriz como son EpCAM, e-caderina por la sobre-expresión de moléculas propias de un fenotipo mesenquimal, tales como la vimentina y la n-caderina. (1) La difusión tumoral pasiva es otro mecanismo que explica la presencia de las CTCs, y sugiere que, por el propio crecimiento del tumor, existe desprendimiento de algunas células hacia el sistema sanguíneo y/o sistema linfático (Figura2). (3)(4)

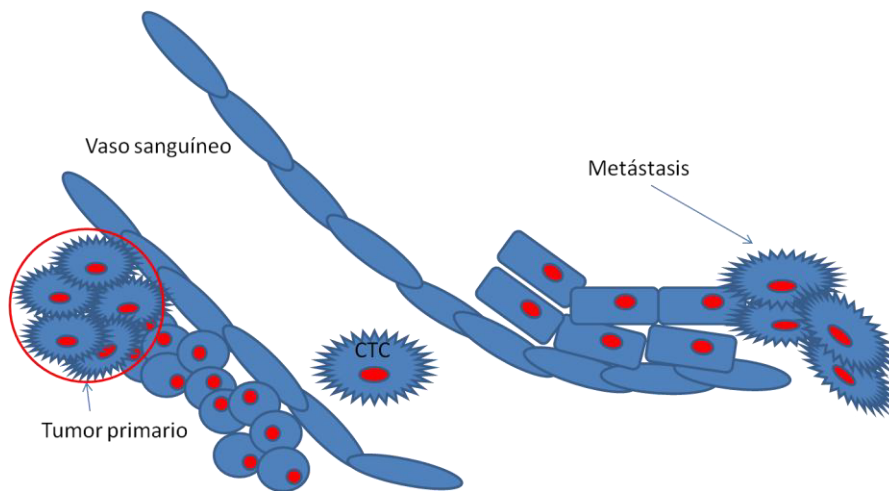


Figura 2. Diagrama que representa la diseminación de una célula tumoral en sangre.

Se han realizado esfuerzos para la detección de CTCs en sangre periférica, pues se considera que su análisis molecular proporcionaría nuevas perspectivas para el mejor diagnóstico, tipificación y tratamiento del cáncer. Sin embargo a las CTCs se les considera una población celular rara por su baja proporción con respecto a las células

sanguíneas normales (una CTC por cada 10⁹ células sanguíneas normales). A pesar de esta limitante, se han desarrollado tecnologías para la detección de estas CTCs y actualmente existen estudios clínicos que concluyen que la presencia de CTCs en sangre periférica está correlacionada con la progresión de la enfermedad en ciertos tipos de carcinomas, como el cáncer colorrectal, el cáncer de mama y cáncer de próstata. (2) De Giorgi U et. al en el 2009 sugieren que el conteo de las CTCs en un momento dado, refleja la respuesta del paciente a la terapia. Además, estos conteos son superiores o aditivos a los métodos de imagen convencional.(5)

Los métodos desarrollados para la detección de las CTCs están enfocados hacia el reconocimiento inmunológico con marcadores específicos. Existe solo un método aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los EEUU (FDA por sus siglas en inglés) para la detección de CTC, el sistema denominado CellSearch (Veridex, Raritan, NJ, USA) (6). CellSearch es un sistema automatizado de detección de CTCs que consiste en un enriquecimiento celular por inmuno-captura con perlas magnéticas conjugadas con anticuerpos contra EpCAM y detección por medio de una triple tinción; tinción positiva (CK8/18/19) y DAPI y una tinción negativa para CD45, antígeno común de leucocitos (Figura 3). (7)(8) La limitante en esta tecnología es que subpoblaciones de CTCs diseminadas por la vía TEM escaparían, dado que la expresión de EpCAM resulta sub-expresada o nula en células tumorales con fenotipo mesenquimal.

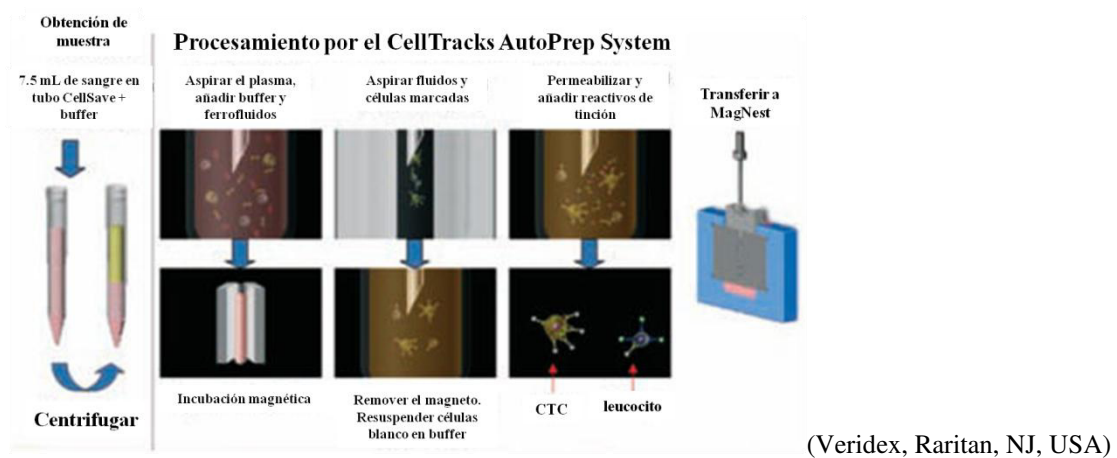
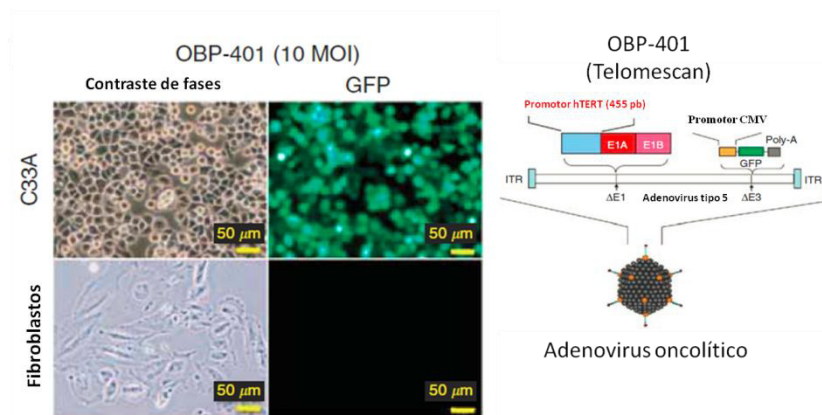


Figura 3. Procedimiento a seguir para la detección de CTCs por el método CellSearch.

Diversos equipos de investigación se encuentran optimizando y desarrollando nuevas estrategias y tecnologías para la detección de CTCs. En el 2012 Takakura y colaboradores (Figura 4) desarrollaron un sistema de detección para CTCs que se basa en la transducción de estas células con un vector adenoviral de replicación selectiva-telomerasa específica, el cual expresa el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) como gen reportero, expresión modulada por el promotor CMV. El fundamento de esta técnica se basa en la actividad de la telomerasa aumentada en células tumorales, por lo que la transducción del vector utilizaría la maquinaria celular para la replicación viral y a su vez se generaría la expresión de la GFP obteniendo una señal fluorescente lo que permitiría la muerte de las CTCs. (9)



(9)

Figura 4. Diagrama del vector diseñado por Takakura et al.

1.3 Telómeros y telomerasa

1.3.1 Telómero

El concepto de telómero tiene sus orígenes a finales de 1930s. Se sabe que es una estructura altamente conservada al final de los cromosomas que consiste en repeticiones en tándem de secuencias de ADN y proteínas asociadas (Figura 5). (10) El telómero está involucrado en diversas funciones biológicas esenciales. Éste protege a los cromosomas de las exonucleasas y de la recombinación, de la fusión extremo – extremo y en el reconocimiento del ADN dañado; proporciona medios para la replicación completa de los cromosomas; contribuye a la organización funcional de los cromosomas en el núcleo, participa en la regulación génica y sirve

como reloj molecular que controla la capacidad replicativa de las células humanas y su entrada en senescencia. (11)

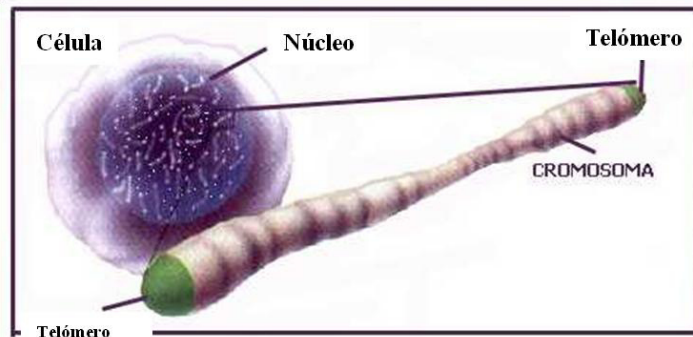


Figura 5. Diagrama que muestra la posición de los telómeros en el cromosoma.

1.3.2 Telomerasa

Es una ADN polimerasa ARN dependiente que sintetiza secuencias de ADN telomérico y proporciona las bases moleculares de un potencial proliferativo ilimitado. Descubierta en 1985 en el organismo *Tetrahymena thermophila*, ésta enzima se encuentra ausente en la mayoría de las células somáticas normales humanas, pero presente en más del 90% de las células tumorales y células inmortalizadas *in vitro*.(12)(13) La telomerasa consiste de dos componentes: el componente catalítico denominado hTERT que presenta actividad transcriptasa inversa y un segundo componente el cual es denominado hTERC, un ARN funcional que sirve como templado para la síntesis del ADN telomérico (Figura 6). (14)(15)

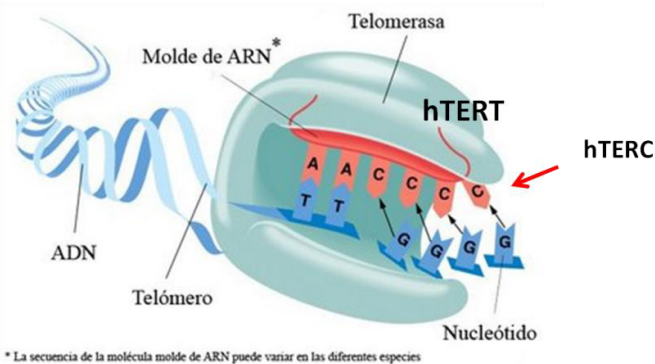


Figura 6. Diagrama que muestra los componentes de la telomerasa.

Estudios realizados a principios de la década pasada demostraron que la expresión de la telomerasa por si sola es suficiente para la inmortalización de diversos tipos de células. (17)(18) Se tiene conocimiento que la telomerasa puede cooperar con oncogenes o en la inactivación de genes supresores de tumor para inducir la conversión tumorigénica de las células de epitelio humano normal y de fibroblastos. (16) Estos hallazgos indican el importante papel que desempeña la telomerasa en el envejecimiento celular y tumorigénesis. Por lo tanto la actividad de la telomerasa tiene importantes aplicaciones en el desarrollo de estrategias de diagnóstico y terapéuticas.

1.3.3 Promotor hTERT

En 1999 fue clonada la región 5' del gen hTERT que corresponde al promotor de éste y se logró identificar las regiones funcionales y el core esencial para la activación transcripcional cáncer - específica del promotor. Dentro del core del promotor están presentes varios sitios de unión para diversos factores de transcripción (Figura 7). Cajas E (CACGTG) localizadas en las posiciones -165 y + 44 respecto al sitio de inicio de la transcripción las cuales son posibles sitios de unión de cremallera básica hélice – loop – hélice factores de transcripción codificados por oncogenes de la familia Myc. Otra de las secuencias características que se encuentran en el promotor hTERT son las cajas GC (GGGCGG). Por lo menos se encuentran cinco cajas las cuales son sitios de unión para factores de transcripción con motivos de dedos de zinc como lo es el factor transcripcional SP1. (19)(20)(21)

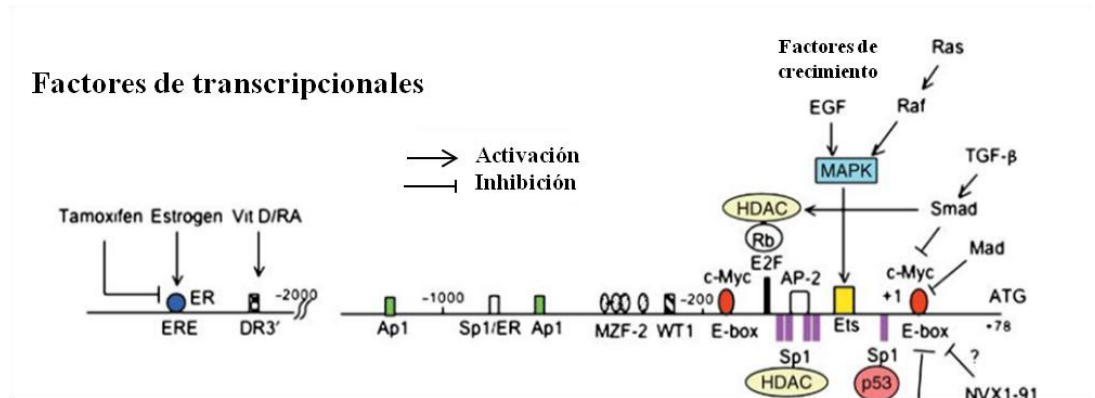


Figura 7. Diagrama que muestra la regulación transcripcional y epigenética del promotor hTERT. Se identifican los sitios de unión y los diversos factores de transcripción que regulan la expresión de éste.

La regulación a nivel transcripcional es el principal mecanismo de regulación de la activación de la telomerasa en células humanas. Experimentos de transfección transitoria del promotor hTERT dirigiendo la expresión del gen reportero de la luciferasa muestran la inactivación del promotor en células normales pero al igual que la telomerasa este se activa en células inmortales. (22)(23)

1.4 Proteínas fluorescentes

El auge de las proteínas fluorescentes como elemento básico fundamental en la investigación biomédica ha sido señalado como una revolución. La primera fase en las implementaciones en el uso de proteínas fluorescente se da en 1994 cuando se utilizaba la proteína verde fluorescente nativa de la medusa *Aequorea victoria* que se utilizó para resaltar las neuronas sensoriales en el nematodo *C. elegans*. (24) Desde entonces se han producido nuevas y mejores versiones con más brillo, que cubren un amplio rango espectral, que exhiben una mayor fotoestabilidad con la reducción de oligómeros, inertes a los cambios de pH e índices de maduración más rápidos. La proteína verde fluorescente nativa también se modificó rápidamente para producir variantes que emiten señal en las regiones del azul, cian y amarillo. (25) (26) (27) A pesar de los esfuerzos realizados por obtener variantes que emitieran fluorescencia en la región del naranja y el rojo, y que estos esfuerzos resultaban infructuosos, no fue sino hasta 1999 que se dio el descubrimiento inesperado de la primera proteína roja fluorescente, aislada de arrecifes de coral no bioluminiscentes. (28) Este avance lanzó una segunda fase de la revolución, con la incesante búsqueda de proteínas fluorescentes más brillantes y versiones monoméricas más fotoestables derivadas de las proteínas rojas, cuya actuación sea similar a las mejores variantes de GFP.

1.4.1 Proteína Roja Fluorescente (RFP)

La búsqueda de una proteína fluorescente roja de buen comportamiento ha sido la meta para la observación de células vivas e imágenes de animales completo, sobre todo por la necesidad de ampliar la paleta de colores en ensayos multicolor. Otra ventaja es que debido que la excitación a esas longitudes de onda genera menor fototoxicidad y pueden obtenerse imágenes más profundas en los tejidos biológicos y finalmente la auto-fluorescencia celular se ve disminuida en esa región del espectro y no se genera fluorescencia de fondo. Tal vez el acontecimiento más sobresaliente en este frente ha sido el diseño y la obtención de la mRFP1 a través de mutagénesis dirigida a los residuos correspondientes al cromóforo, que se sabe desempeñan un papel clave en la determinación de las características espectrales (Figura 8). (29) (30)

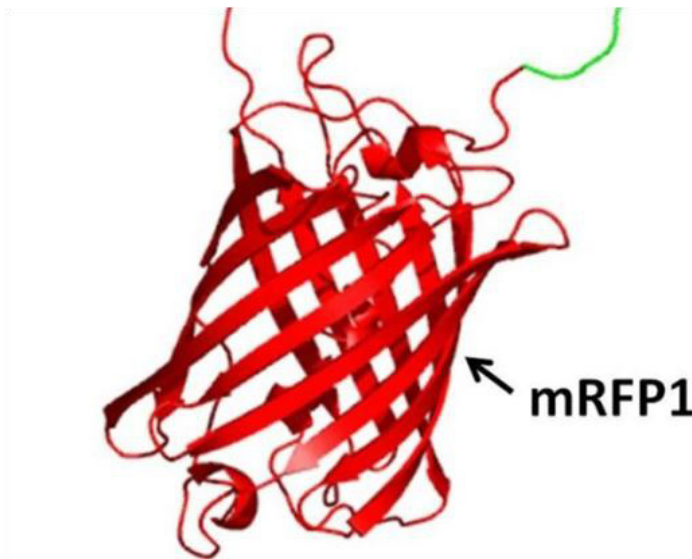


Figura 8. Estructura de la proteína mRFP1

Capítulo 2

Justificación

Este trabajo plantea la evaluación del promotor hTERT como herramienta en la detección de CTCs. Los resultados ayudarán en el correcto diseño de un vector adenoviral que permita una identificación más específica de las CTCs. Las estrategias actuales para detección de CTCs, basadas en el reconocimiento de marcadores epiteliales y citoqueratinas, no son discriminatorias y no permiten la recuperación de las células vivas para análisis posteriores.

Capítulo 3

Objetivos

3.1 Objetivo General

Evaluar el promotor hTERT *in vitro* mediante ensayos de expresión.

3.2 Objetivos específicos

1. Analizar la potencia y especificidad del promotor hTERT en líneas tumorales y control (HeLa, SiHa, Colo320, HepG2 y fibroblastos).
2. Correlacionar expresión del transcrito de hTERT con la expresión de luciferasa en líneas tumorales y control (HeLa, SiHa, Colo320, HepG2 y fibroblastos).
3. Evaluar la expresión de la proteína RFP en líneas tumorales y control (HeLa, SiHa, Colo320, HepG2 y fibroblastos).

Capítulo 4

Material y Métodos

4.1 Lugar de realización del estudio

El presente proyecto de tesis se llevó a cabo en el laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Terapia Experimental del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

4.2 Materiales

4.2.1 Consumibles

Se utilizaron cajas para cultivo celular de poliestireno de 100 mm estilo petri, tubos conicos de 50 mL (Corning inc. Corning, NY) para cultivo bacteriano, microtubos de 2 mL, 1.5 mL, 0.6 mL y 0.2 mL (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) y puntas de pipeta de 50 – 1000 μ L, 2 – 200 μ L y 0.5 – 10 μ L (Brand GMBH+CO KG, Wertheim, Alemania) para diversos usos, Placas transparentes para cultivo celular de poliestireno de 96 y 6 pozos (Falcon® Corning, NY), Cajas para cultivo celular de 25 y 75 cm² (Corning inc.) pipetas estériles desechables de 5 mL y 10 mL (Corning inc.) para cultivo de líneas tumorales y fibroblastos. Placa PCR 96 pozos natural (Applied Biosystem® Foster City, CA).

4.2.2 Reactivos

Caldo y Agar Luria-Bertani (LB) (DIBICO®, D. F., México), ampicilina y kanamicina (Sigma-Aldrich Co. San Luis, MO) enzimas de restricción XhoI, KpnI, NotI y BglII (New England BioLabs, Ipswich, MA.), kit para purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Madison, WI), ligasa T4 DNA Ligase (New England BioLabs.), alcohol absoluto, isopropanol, fenol y cloroformo (J.T. Baker®), Lipofectamine®2000 Transfection Reagent

(Invitrogen™ Waltham, MA) SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen™), IQ™SYBR® Green Supermix (Bio-Rad® Hercules, CA.), Medio de cultivo DMEM Advance, RPMI 1640 y EMEM (Gibco® Waltham, MA) Suero Fetal Bovino (Sigma-Aldrich Co.) Tripsina-EDTA 1X (Gibco®).

4.2.3 Material Biológico

Líneas tumorales, HeLa, SiHa, Colo320 y HepG2 (ATCC™ Manassas, VA.), fibroblastos (aislados de piel humana), bacterias calcio-competentes *E. coli* cepa GM2929 (*E. coli* Genetic Stock Center at Yale University), plásmidos pGL3Basic, pGL3-CMV-Luc (Promega) y pUC57-hTERT-RFP (IDT® Coralville, IA). Constructos propios: pShuttle-hTERT-RFP y pGL3-hTERT-Luc.

4.2.4 Instrumentación

NanoDrop2000c (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA.), Centrifugas modelos 5418 y 5810 R (Eppendorf AG), Fuente de poder PowerPac® HC (Bio-Rad®), Fotodocumentador VisiDoc-It™ Imaging System y transiluminador Banchtop UV Transilluminator (UVP, Jena, Alemania), Thermomixer confort (Eppendorf AG), Termocicladores Perkin Elmer PCR system 2400 (Applied Biosystem®) y CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad®) Balanza granataria GX-2000 (A&D Weighing, Tokyo, Japón), micropipetas de 100 – 1000 µL, 10 – 100 µL, 0.5 – 10 µL y 0.1 – 2.5 µL (Eppendorf AG), Incubadora Series 8000 WJ CO₂ Incubator y Shaker MaxQ 4000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), Gabinete de bioseguridad Purifier Logic clase II tipo B2 (LABCONCO®, Kansas City, MO.), Microscopio confocal, LSM 710 NLO (Carl Zeiss, Jena, Alemania)

4.3 Métodos

4.3.1 Estrategia General

Estrategia general

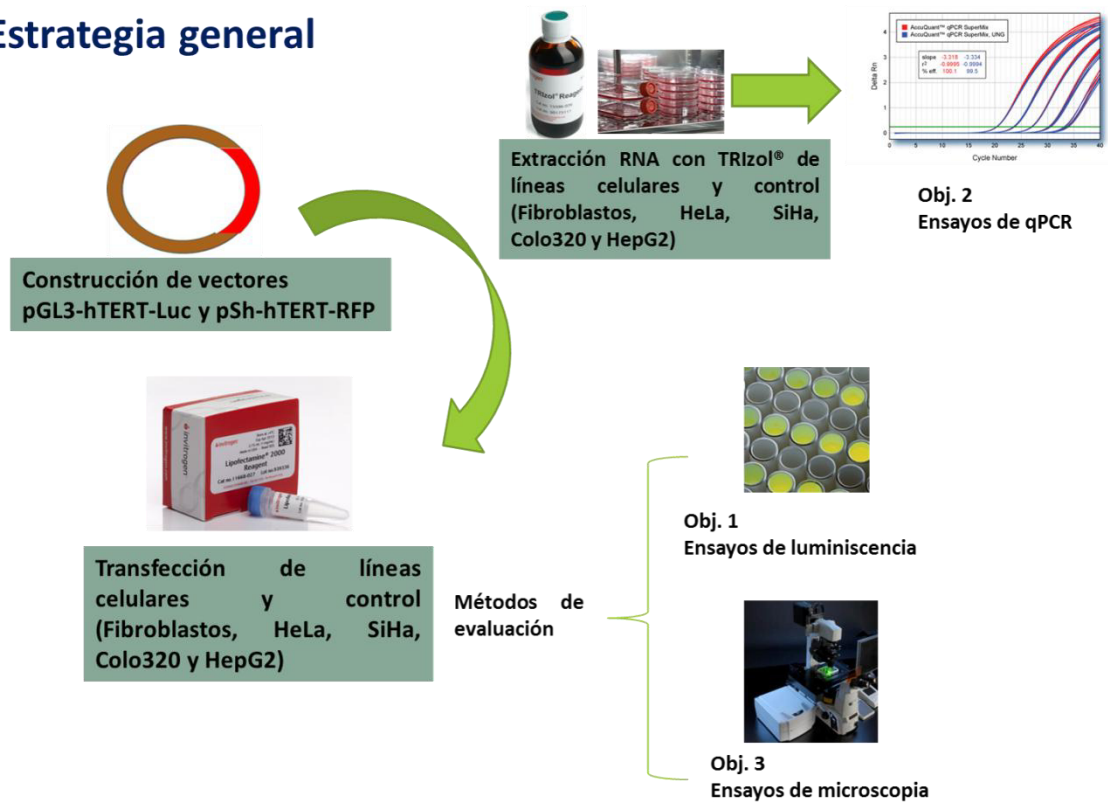


Figura 9. Estrategia general para cumplir con los objetivos propuestos en el presente proyecto. Se realizó la construcción de plásmidos los cuales fueron transfectados en líneas tumorales y controles para la evaluación del promotor hTERT por ensayos de luminiscencia para cumplir con el Objetivo 1 y ensayos de microscopia confocal para concluir con el Objetivo 3. Para cumplir con el Objetivo 2 se realizó una extracción de ARN con TRIZOL® y posterior producción de ADNc para determinar los niveles mTERT por PCR cuantitativa y correlacionar con los niveles de expresión de luciferasa obtenidos en el Objetivo 1.

4.3.2 Construcción del plásmido pGL3-hTERT-Luc

Para la construcción del plásmido pGL3-hTERT-Luc que se utilizó para evaluar la potencia y especificidad del promotor hTERT se partió de obtener una amplia concentración de ADN plasmídico (ADNp) de los plásmidos pGL3Basic (receptor) y pUC57-hTERT-RFP (plásmido de clonación del cual se obtuvo el promotor hTERT). La

propagación se realizó con la transformación de bacterias calcio-competentes de la especie *E. coli* cepa GM2929, estas fueron sembradas en placas con medio selectivo LB adicionado con ampicilina. Las colonias sospechosas con crecimiento de 16 horas a 37°C se cosecharon y se sembraron en tubos cónicos de 50 mL con caldo selectivo LB adicionado con ampicilina y se incubaron a 37°C en agitación. 12 horas posteriores a la siembra se realizó la extracción del ADNp por el método de lisis alcalina. El ADNp fue cuantificado por espectrofotometría con el equipo **NanoDrop2000c** (Thermo Fisher Scientific Inc.) y posteriormente caracterizado por restricción con una doble digestión con las enzimas **NotI-BglII** (New England BioLabs). Con los plásmidos pGL3Basic y pUC57-hTERT-RFP ya caracterizados se realizó una doble digestión con las enzimas **XhoI-KpnI** (New England BioLabs®inc.) con el objetivo de “abrir” el plásmido receptor y obtener el promotor hTERT de nuestro plásmido “donador”. Se corrió la digestión en un gel de agarosa al 2% para realizar la purificación de una banda de 809 pb que corresponde al promotor hTERT y de una banda de 4791 pb que corresponde al plásmido pGL3Basic linearizado, por el kit **Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System** (Promega). Con el plásmido receptor linerizado y el promotor hTERT purificados, se realizó la ligación con la ligasa **T4 DNA Ligase** (New England BioLabs®inc.) y una proporción de los elementos a ligar de 1:4 (vector:fragmento) en un volumen de reacción de 15 µL, se incubó a 16°C toda la noche y se corrió una electroforesis en gel de agarosa de un volumen de 7.5 µL para visualizar si fue exitosa nuestra reacción de ligación. Con los 7.5 µL restantes se procedió a transformar células calcio-competentes de la especie *E. coli* cepa GM2929, se sembraron en placas con medio selectivo LB adicionado con ampicilina. Las colonias sospechosas con crecimiento de 16 horas a 37°C se cosecharon y se sembraron en tubos cónicos de 50 mL con caldo selectivo LB adicionado con ampicilina, se incubaron a 37°C en agitación y a las 12 horas posteriores a la siembra se realizó la extracción del ADNp por el método de lisis alcalina. El ADNp fue cuantificado por espectrofotometría con el equipo **NanoDrop2000c** (Thermo Fisher Scientific Inc.) y caracterizado por restricción con una doble digestión con las enzimas **NotI-BglII** (New England BioLabs).

4.3.3 Transfección de líneas tumorales y controles (ensayo luminiscencia)

Cultivos de líneas tumorales de HeLa, SiHa, Colo320 y HepG2 y fibroblastos (control) que se encontraban en caja de cultivo de 25 cm² con una confluencia entre el 70-80%, fueron cosechadas y contabilizadas en cámara de Neubauer para ser sembradas 10,000 células por pozo en placas de 96 pozos (Corning Life Science®). Se sembraron 12 pozos por línea tumoral y controles para realizar triplicados de cada uno de los tratamientos experimentales. En la Figura 10 se muestra la distribución de las líneas celulares y en la Tabla 1 la distribución de los respectivos tratamientos. La placa fue incubada a 37°C, 5% de CO₂ por 12 horas, para posteriormente realizar la transfección con **Lipofectamine®2000 Transfection Reagent** (Invitrogen™) siguiendo las indicaciones del fabricante. La placa se incubó a 37°C, 5% de CO₂ por 48 horas. Cumplido el tiempo de incubación se realizaron los ensayos de luminiscencia con el kit **Dual-Glo® Luciferase Assay System** (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante, realizando la lectura en el equipo **GloMax®-Multi+ Microplate Multimode Reader with Instinct®** (Promega).

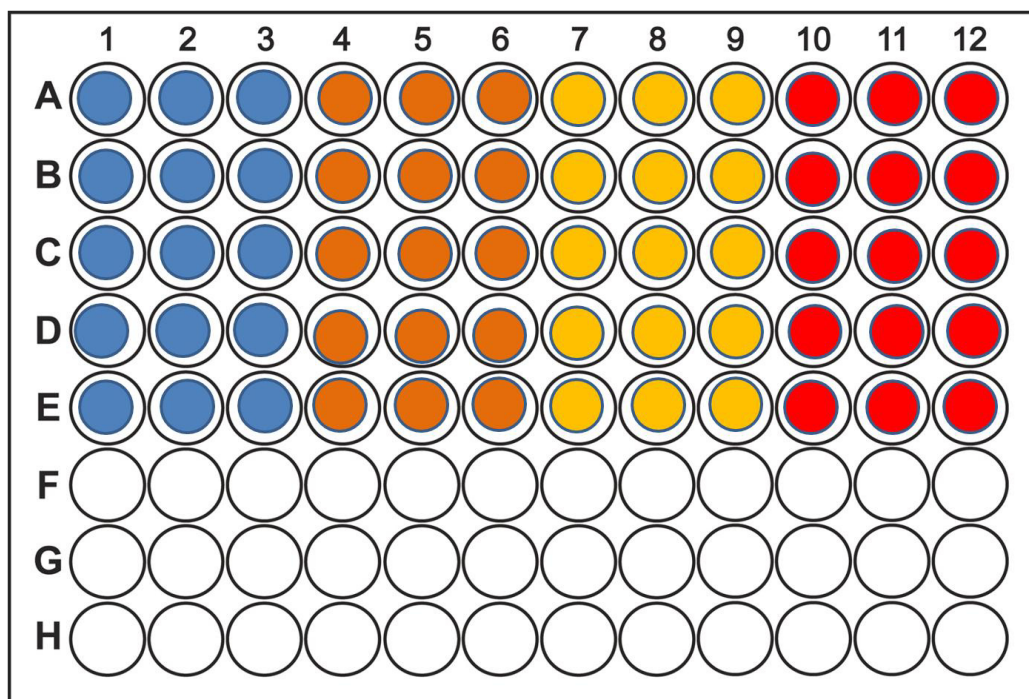


Figura 10. Se muestra la distribución de la placa para realizar los ensayos de luminiscencia. Fila A Fibroblastos, Fila B HeLa, Fila C SiHa, Fila D Colo320 y Fila E HepG2.

	Tratamientos
Columnas 1-3	Células tratadas con lipofectamina sin plásmido
Columnas 4-6	Células transfectadas con pGL3Basic
Columnas 7-9	Células transfectadas con pGL3-hTERT-Luc
Columnas 10-12	Células transfectadas con pGL3-CMV-Luc

Tabla 1. Muestra la distribución de los diferentes tratamientos a evaluar en los ensayos de luminiscencia.

4.3.4 Extracción de ARN

Para cumplir con el objetivo 2 se realizó la extracción de ARN total con el reactivo **TRIZOL® Reagent** (Invitrogen™) a las líneas tumorales HeLa, SiHa, Colo320, HepG2 y fibroblastos (control), que se encontraban en cultivo en cajas de 75 cm² con una confluencia entre 70-80%. Como primer paso se retiró el medio y se realizaron 2 lavados con PBS 1X (volumen necesario para cubrir la superficie de la caja) se descartó el PBS y se agregó el **TRIZOL® Reagent** (Invitrogen™) 1 mL por cada 10 cm² a continuación se siguieron las indicaciones que indica el fabricante. Se usó de agua DEPC y posterior a la extracción por fenol-cloroformo mantener la muestra en hielo durante todo el proceso. Después de realizada la extracción, el ARN se cuantifica por espectrofotometría con el equipo **NanoDrop2000c** (Thermo Fisher Scientific Inc.). Conociendo las concentraciones obtenidas se realizaron los cálculos para conocer el volumen a agregar en nuestra reacción de retro-transcripción.

4.3.5 Síntesis de ADNc

Para obtener el ADNc se utilizó el kit de retro-transcripción **SuperScript® III First-Strand Synthesis System** (Invitrogen™). La primera etapa es la de alineamiento del oligo dT reacción que se compuso de 6 µL de la muestra se adicionó 1 µL de primer (50 µM oligo dT) más 1 µL del RT Buffer para un volumen final de 8 µL. Se realizó una incubación de 65°C por 5 minutos para el alineamiento del oligo dT en el termociclador **Perkin Elmer PCR system 2400** (Applied Biosystem®) se colocó en hielo y se agregó los demás componentes de la reacción de retro-transcripción, 10 µL de 2X First-strand Reaction Mix, 2 µL de SuperScript III RT/RNaseOUT Enzyme Mix y se llevó a cabo el programa que se muestra en la Tabla 2 para la síntesis del ADNc.

Programa para síntesis de ADNc	
50°C	50'
85°C	5'

Tabla 2. En la primera columna se muestran las temperaturas requeridas para la síntesis del ADNc y en la segunda los respectivos tiempos.

4.3.6 PCR cuantitativa

Para realizar la cuantificación relativa del transcrito de hTERT se utilizaron los siguientes primers: **Fwd 5'-AGATCCTGGCCAAGTTCC-3'** y **Rv 5'-GCAGAGGTCAGGCAGCAT-3'**, utilizando β-actina como gen endógeno usando el siguiente par de primers: con el programa que se muestra en la Tabla 3. La cantidad de ADNc que se le agregó a la reacción fue de 50 ng por pozo y se realizaron 3 repeticiones por cada línea tumoral y control para cada gen evaluado en el equipo de tiempo real CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad®).

Condiciones		
Desnaturalización	95°C	5'
Desnaturalización	95°C	30''
Alineamiento	60°C	1'
Extensión final	72°C	3'

} 40 ciclos

Tabla 3. Programa de temperaturas y tiempos para realizar la PCR.

4.3.7 Transfección de líneas tumorales y controles (ensayo microscopia confocal)

De cultivos de líneas tumorales de HeLa, SiHa, Colo320 y HepG2 y fibroblastos (control) que se encontraban en caja de cultivo de 25 cm² con una confluencia entre el 70-80%, fueron cosechadas y contabilizadas en cámara de Neubauer para ser sembradas a 1 millón de células por pozo en 2 placas de 6 pozos (Corning Life Science®). Se sembraron 2 pozos por línea tumoral y controles, un pozo para las células sin transfectar y el otro pozo para las células que fueron transfectadas. La placa fue incubada a 37°C 5% de CO₂ por 12 horas, para posteriormente realizar la transfección del plásmido **pShuttle-hTERT-RFP** con **Lipofectamine®2000 Transfection Reagent** (Invitrogen™) siguiendo las indicaciones del proveedor. La placa se incubó a 37°C, 5% de CO₂ por 48 horas, cumplido el tiempo de incubación se realizaron los ensayos de microscopia confocal con el equipo LSM 710 NLO (Carl ZEISS).

Capítulo 5

Resultados

5.1 Construcción del plásmido pGL3-hTERT-Luc

La Figura 11 corresponde a los geles que confirman la identidad de los plásmidos pGL3Basic y pUC57-hTERT-RFP por presentar los patrones electroforéticos propios a la doble digestión con las enzimas NotI-BglII, teniendo la certeza de contar con los plásmidos correctos se realizaron las restricciones propias para generar el plásmido pGL3-hTERT-Luc. Se realizó la doble digestión a los plásmidos caracterizados, con las enzimas XhoI-KpnI de la cual se muestra los geles en la figura 12 con los patrones electroforéticos propios de cada plásmido digerido. Con los componentes de la construcción purificados se procedió a realizar la ligación para obtener nuestro plásmido pGL3-hTERT-Luc, las colonias sospechosas que presentaron resistencia al antibiótico de selección fueron caracterizadas por restricción con una doble digestión con las enzimas NotI-BglII. En la Figura 13 se muestra el gel que corresponde a dicha restricción, resultando en el patrón electroforético característico del plásmido pGL3-hTERT-Luc.

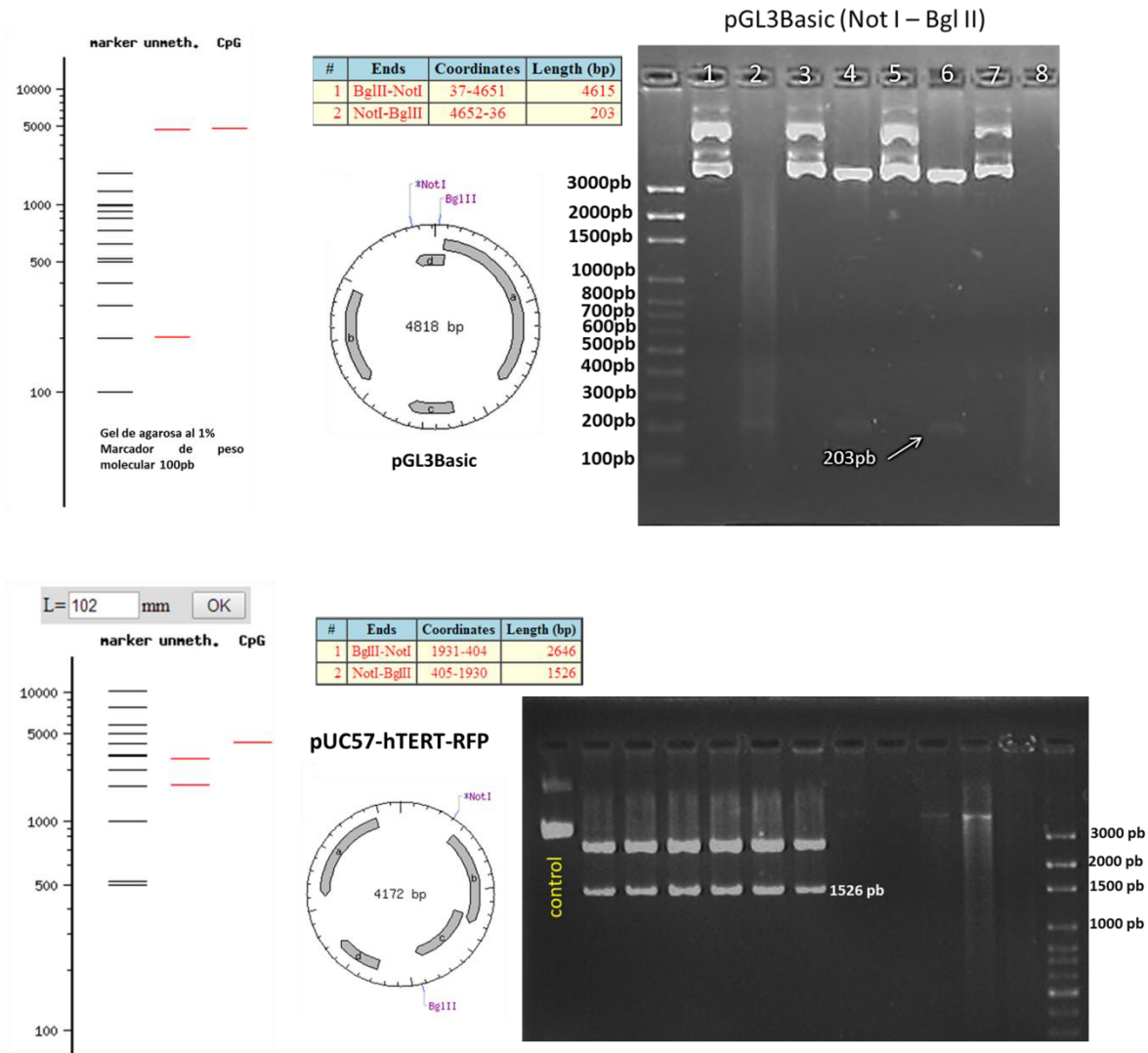


Figura 11. Geles que corresponden a la caracterización de los plásmidos pGL3Basic y pUC57-hTERT-RFP con los respectivos análisis *in silico* por la herramienta bioinformática de NebCutter 2.0 de la compañía New England BioLabs®inc.

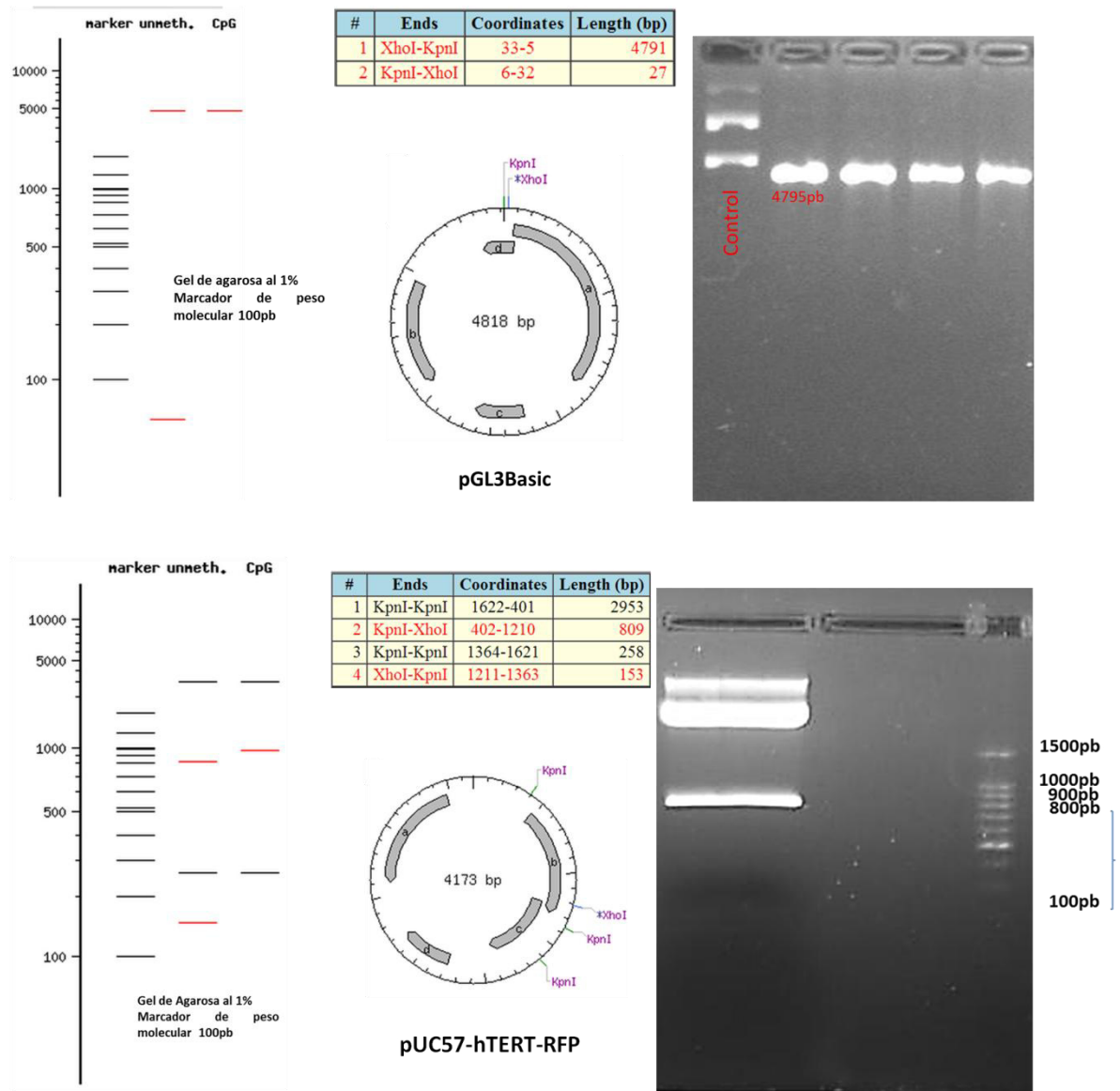


Figura 12. Geles correspondientes a los resultados de la doble digestión XhoI-KpnI a los plásmidos pGL3Basic y pUC57-hTERT-RFP, presentando el patrón electroforético característico para la posterior purificación de las bandas correspondientes de 4,791 pb que representa el plásmido pGL3Basic linealizado y la banda de 809 pb correspondiente al promotor hTERT.

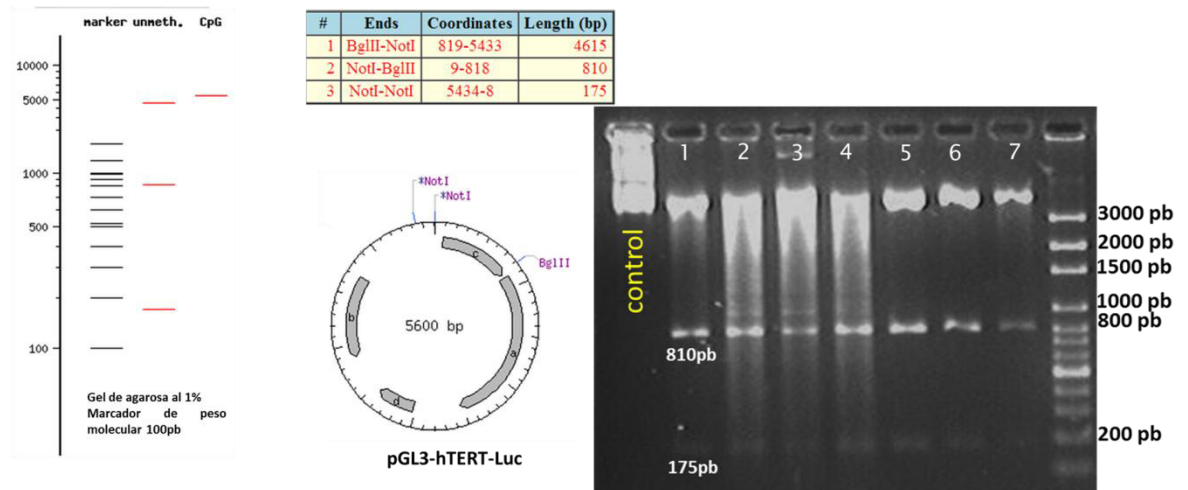


Figura 13. Muestra el gel de la caracterización de las colonias sospechosas resultando en la obtención de 7 clonas con patrón electroforético característico del constructo pGL3-hTERT-Luc, lo que permitió realizar la evaluación de la potencia y especificidad del promotor hTERT por ensayos de luminiscencia.

5.2 Ensayos de Luminiscencia

Se observa en la Figura 14 el comportamiento de las unidades relativas de luminiscencia en cada una de las líneas tumorales y fibroblastos transfectados con los diversos plásmidos. Se observa la especificidad del promotor hTERT, pues la expresión de luciferasa modulada por este promotor solo se presenta en líneas tumorales, lo que no ocurre en los fibroblastos, pero también muestra variabilidad de la expresión de luciferasa en cada línea tumoral, Observandose que alcanza altos niveles en Colo320, pero muy bajos niveles en HeLa SiHa y HepG2. En cuanto a la potencia del promotor hTERT se hace una comparación con el promotor viral CMV. Dicha comparación muestra que el promotor hTERT es en promedio 4 veces menos potente respecto al promotor viral.

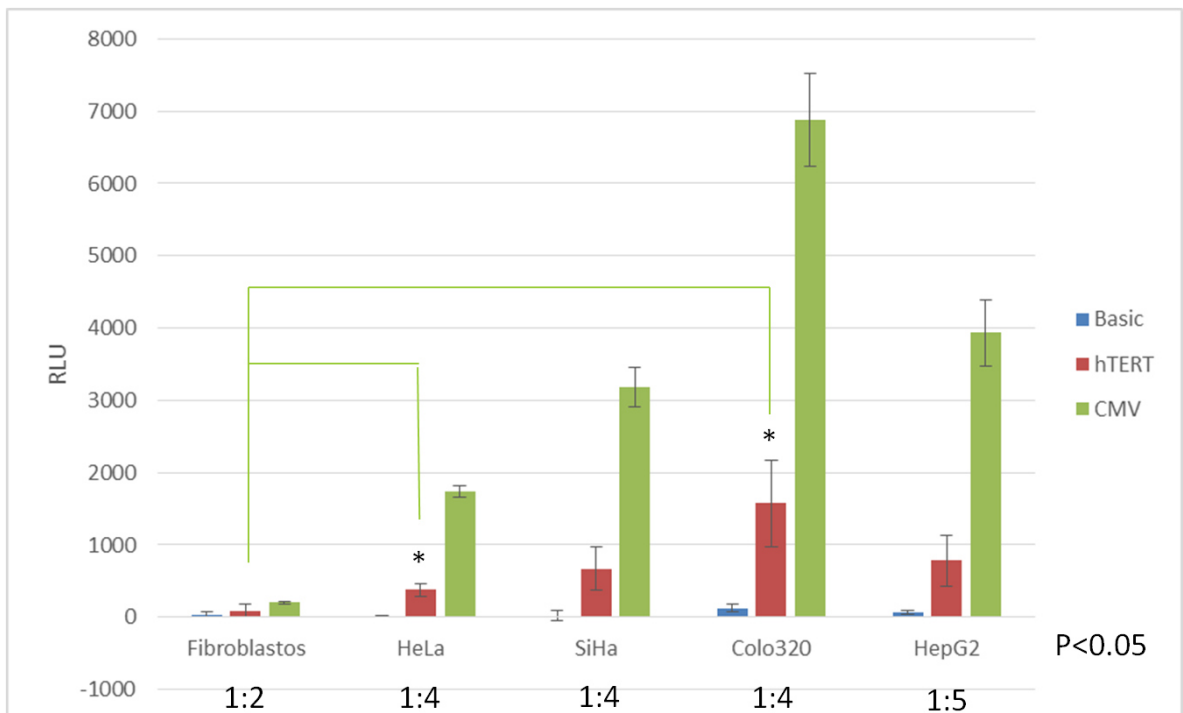


Figura 14. Análisis de expresión de luminiscencia, se observa las unidades relativas de luminiscencia resultantes de cada línea tumoral evaluada con las distintas transfecciones plasmídicas.

5.3 PCR cuantitativa

Se realizó una cuantificación relativa de la expresión del transcrito de TERT con el objetivo de correlacionar los niveles de éste con los resultados del ensayo de luminiscencia, estos resultados se resumen en el Figura 15 se representa una relación de la expresión del transcrito de TERT en líneas tumorales respecto a los niveles expresados en fibroblastos. Se observa que los niveles del transcrito de TERT en la línea tumoral Colo320 son 989 veces mayor que los niveles que se expresan en los fibroblastos.

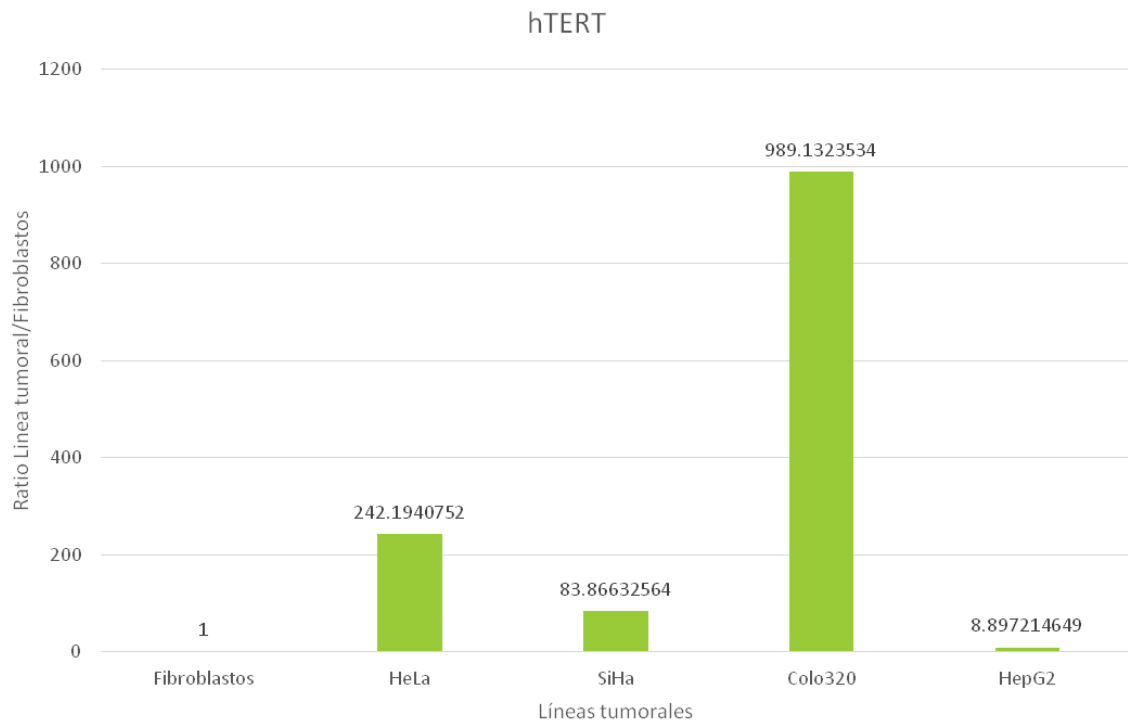


Figura 15. Relación entre el nivel de expresión del transcrito de TERT respecto al de fibroblastos.

La correlación de los niveles del transcrito de TERT y los niveles de expresión en los ensayos de luminiscencia se muestran en el Figura 16, la expresión del transcrito de TERT comparada con las unidades relativas de luminiscencia muestran correlación en algunas de las líneas tumorales evaluadas, siendo la línea Colo320 la que resulta con un mayor nivel de expresión del transcrito de TERT lo cual correlaciona con los niveles altos de unidades relativas de fluorescencia, de igual manera los niveles de expresión en la línea HeLa correlacionan no así para las líneas tumorales SiHa y HepG2.

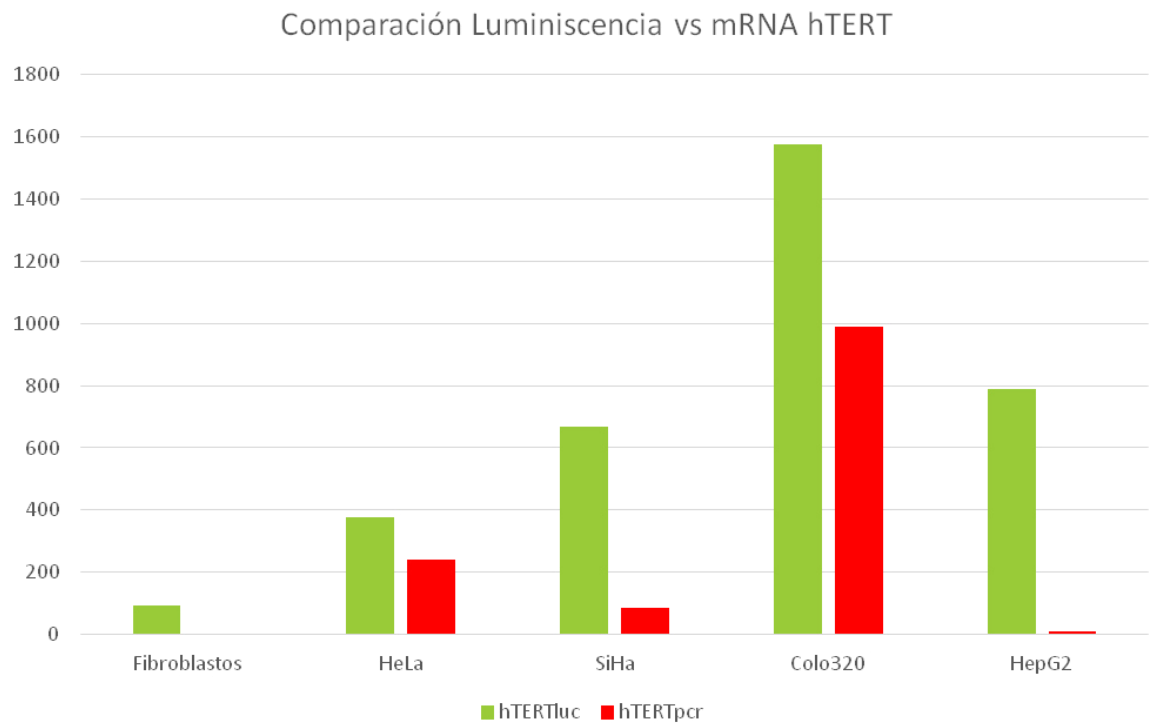


Figura 16. Comparación de los niveles de expresión del transcrito de TERT y los niveles de RLU en cada una de las líneas tumorales a evaluar.

5.4 Ensayos de Microscopia Confocal

La transfección de las líneas tumorales con el plásmido pShuttle-hTERT-RFP permitió evaluar la expresión de la RFP como molécula reportera. En la Figura 17 se observan las micrografías que resultaron del ensayo de microscopía confocal, observando claramente la especificidad en la expresión de la RFP en las líneas tumorales, expresión que no se presenta en los fibroblastos. La expresión está dirigida por el promotor hTERT. La evaluación cualitativa de estas micrografías nos sugiere poca intensidad en la señal fluorescente y una expresión variable entre las líneas tumorales evaluadas.

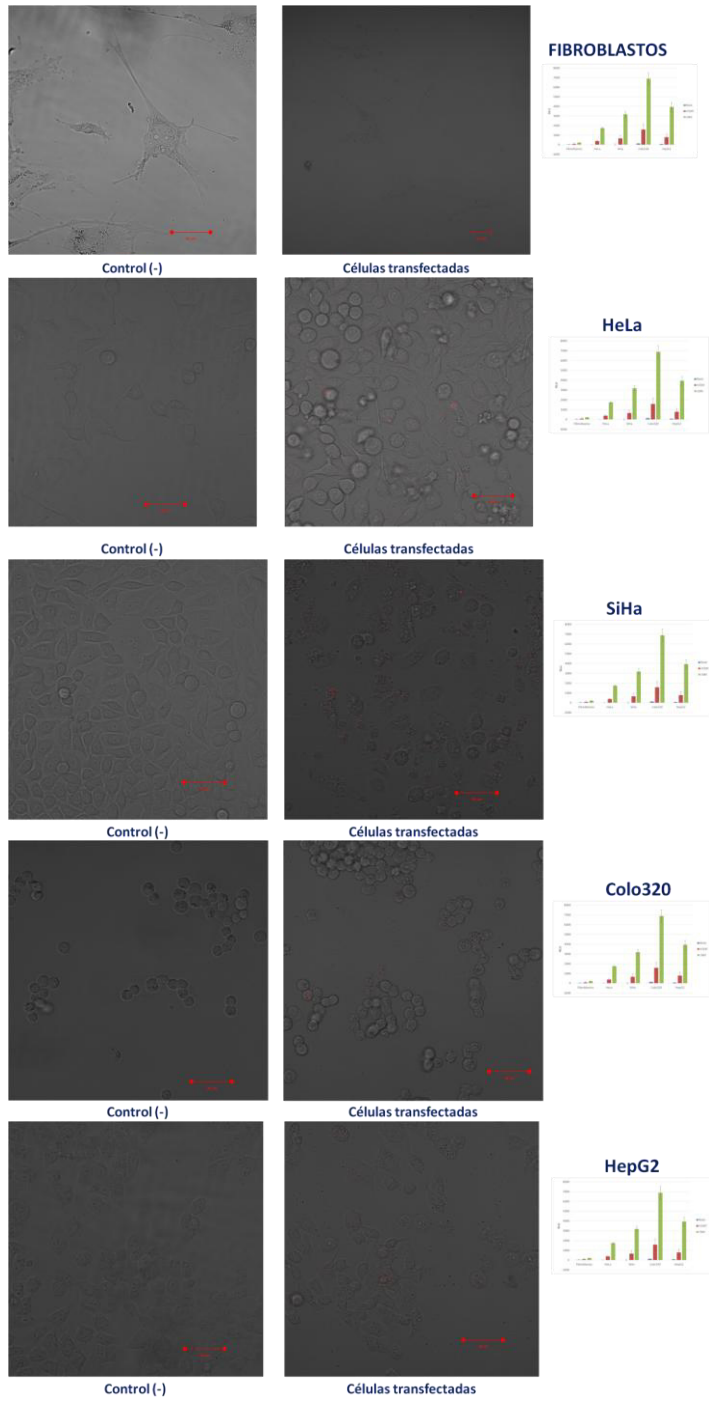


Figura 17. Micrografías adquiridas con el microscopio confocal LSM 710 NLO (ZEISS).

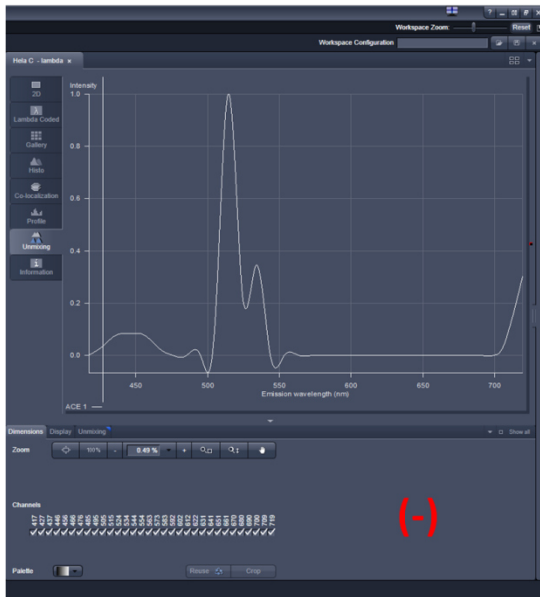


Figura 18. Barridos espectrales

En la Figura 18 se muestran los barridos espectrales, de células no transfectadas y células transfectadas. Los barridos muestran que en las células no transfectadas se presenta una señal fluorescente en un rango de longitud de onda entre 500 – 550 nm y para el barrido espectral de células transfectadas se presenta una señal fluorescente en un rango entre 600 – 650 nm, señal ausente en las células no transfectadas.

Colo320
++++

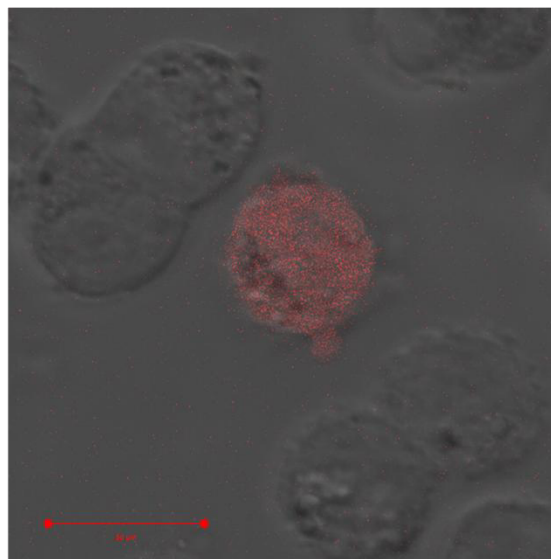


Figura 19. Se muestra una micrografía de una célula con una señal fluorescente intensa

Capítulo 6

Discusión

6.1 Análisis de la potencia y especificidad del promotor hTERT en líneas tumorales y controles.

Para el análisis de la potencia del promotor hTERT se realizó una comparación con el nivel de expresión de luciferasa por el promotor viral CMV. Los resultados indican que el promotor hTERT es cuatro veces menos potente con respecto del promotor CMV, esta relación se estableció en la mayoría de las líneas tumorales transfectadas. Respecto a la especificidad. El promotor hTERT, resulta ser específico. Éste promotor conduce solo la expresión de luciferasa en líneas tumorales, mientras que en fibroblastos la expresión fue mínima, ésta expresión en fibroblastos puede ser debido a la presencia de sitios críticos reportados en el plásmido pGL3Basic en el cual se añadió el promotor hTERT. (31)

Los niveles de expresión de luciferasa en las líneas tumorales mostraron una gran variabilidad, que se explica por las diferencias en la maquinaria transcripcional de los diferentes tipos de líneas tumorales.

6.2 Correlación de la expresión del transcrito de hTERT con la expresión de luciferasa en líneas tumorales y controles.

En la mayoría de los casos la expresión de hTERT está estrechamente correlacionada con la actividad de telomerasa y con la iniciación y progresión del cáncer. hTERT es transcripcionalmente reprimido en muchas células normales y se reactiva o sobre-regula durante la inmortalización.(32)(33) Los resultados experimentales presentados en la Figura 15 demuestran la diferencia en los niveles de transcrito hTERT de líneas tumorales (células inmortalizadas) respecto a fibroblastos (células normales). El transcrito hTERT es el elemento limitante para la activación de la expresión de la telomerasa. (32)(33) esto hacía suponer que existiera una correlación directamente proporcional entre los niveles de transcrito hTERT y las RLU obtenidas en los ensayos de luminiscencia en todas las líneas tumorales evaluadas. Los resultados fueron

variables (Figura 14) en cada una de las líneas tumorales. Se sugiere tal variabilidad por las diferencias en los elementos que regulan la expresión de hTERT entre líneas tumorales.

6.3 Evaluación de la expresión de la proteína RFP en líneas tumorales y controles.

En las micrográficas se confirma la especificidad del promotor hTERT, pues es carente la señal de fluorescencia roja en los fibroblastos transfectados. Se sabe que esta especificidad es por la falta de actividad de la telomerasa en el tipo celular de fibroblastos, en este tipo celular no se tiene el “switch” para encender la maquinaria para producir la proteína fluorescente. (34) Las líneas tumorales presentan células con señal fluorescente, pero al igual que los ensayos anteriores, estas presentan una variabilidad entre líneas tumorales. La variabilidad es debido, a las diferencias en los mecanismos regulatorios de la expresión de hTERT, elemento determinante para el encendido del promotor. (32)(33)

El barrido espectral confirma estas observaciones microscópicas.

Capítulo 7

Conclusiones

Se evaluó la potencia del promotor hTERT mediante ensayos de luminiscencia, resultando 4 veces menos potente respecto al promotor viral CMV y mostrando una alta variabilidad en las diferentes líneas tumorales ensayadas. Respecto a la especificidad, el promotor hTERT resulta ser específico para dirigir la expresión de Luc sólo en células transformadas.

No se presenta una correlación entre la expresión del transcrito hTERT con la expresión de Luc en las líneas tumorales y fibroblastos evaluados. Los resultados muestran una alta variabilidad en la relación entre la expresión de Luc y la expresión del transcrito hTERT en las líneas tumorales ensayadas.

Mediante los ensayos de microscopia confocal se evaluó la expresión de RFP, en las líneas tumorales transfectadas se presenta una señal fluorescente correspondiente a la RFP, señal carente en fibroblastos. Estos resultados confirman la especificidad del promotor hTERT. Sin embargo, la intensidad en la señal de la RFP es variable entre las líneas tumorales ensayadas, misma variabilidad presente en los ensayos de luminiscencia.

Como conclusión general, los resultados de la evaluación del promotor hTERT *in vitro*, evidencian variabilidad en la expresión de las diferentes moléculas reporteras, en las diferentes líneas tumorales ensayadas, Lo que permite concluir que el uso del promotor hTERT para el desarrollo de un vector que permita la identificación de CTCs, no es satisfactorio.

Capítulo 8

Bibliografía

1. Hoon DS, Ferris R, Tanaka R, Chong KK, Alix-Panabieres C, Pantel K (2011) Molecular mechanisms of metastasis. *J Surg Oncol* 103(6):508–517.
2. Tjensvoll K, Nordgard O, Smaaland R. Circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: Methods of detection and clinical implications. *Int J Cancer*, Febrero 2013, PMID: 23447365
3. Aktas B, Tewes M, Fehm T, et al. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2009;11:R46.
4. Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 2008;13:58–68.
5. De Giorgi U., Valero V., Rohren E., Dawood S., Ueno N. T., Miller M. C., Doyle G. V., Jackson S., Andreopoulou E., Handy B. C., Reuben J M., Fritsche H. A., Macapinlac H. A., Hortobagyi G. N., and Cristofanilli M. Circulating Tumor Cells and [18F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography/Computed Tomography for Outcome Prediction in Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(20): 3303-3311.
6. Joosse SA, Pantel K. Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. *Cancer Research*, 73(1):8-11, Enero 2013 PMID: 23271724
7. Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Janicke F, Jackson S, Gornet T, Cristofanilli M, Pantel K. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 2007; 13(3): 920–928
8. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*, 2004; 10(20): 6897–6904
9. Takakura M, Kyo S, Nakamura M, Maida Y, Mizumoto Y, Bono Y, Zhang X, Hashimoto Y, Urata Y, Fujiwara T, Inoue M. Circulating tumour cells detected

by a novel adenovirus-mediated system may be a potent therapeutic marker in gynaecological cancers. *Br J Cancer*, 2012; 107, 448-454

10. Blackburn, EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001; 106:661–673.
11. Cong YS, Wright WE, and Shay JW. Human Telomerase and Its Regulation *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002; 66:3, 407 – 425
12. Kim, N. W., M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P. L. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich, and J. W. Shay. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266:2011–2015.
13. Shay JW and Bacchetti S. 1997. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33:787–791.
14. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, and Cech TR 1997. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276:561–567.
15. Harrington L, Zhou W, McPhail T, Oulton, R, Yeung DS, Mar V, Bass MB, and Robinson M O. Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev*. 1997; 11:3109–3115.
16. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, and Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999; 400:464–468.
17. Bodnar, AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, and WE Wright.. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279:349–352.
18. Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS, Rohde JM, Passons C, Shay JW, and Wright WE.. Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev*. 2001; 15: 398–403.
19. Takakura M, Kyo S, Kanaya T *et al*. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res* 1999; 59: 551–7.

20. Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ. Myc activates telomerase. *Genes Dev* 1998; 12: 1769–1774.
21. Xu D, Popov N, Hou M *et al.* Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proc Acad Sci USA* 2001; 98: 3826–31.
22. Cong, Y. S., J. Wen, and S. Bacchetti. 1999. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet.* 8:137–142.
23. Horikawa, I., P. L. Cable, C. Afshari, and J. C. Barrett. 1999. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res.* 59:826–830.
24. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. and Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
25. Heim, R., Prasher, D. C. and Tsien, R. Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 12501-12504.
26. Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. and Remington, S. J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273, 1392-1395.
27. Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* 67, 509-544.
28. Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L. and Lukyanov, S. A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* 17, 969-973.
29. Patterson, G. H. (2004). A new harvest of fluorescent proteins. *Nat. Biotechnol.* 22, 1524 1525.
30. Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E. and Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567-1572.

31. Tencomnao T, Rakkhitawatthana V and Sukhontasing K. Evaluation of a novel luciferase reporter construct: a positive control plasmid for reporter gene assay, *Afr J Biotechnol* 2008; (7):13, 2124 - 2127
32. Cong, Y. S., J. Wen, and S. Bacchetti. 1999. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet.* 8:137–142.
33. Wick, M., D. Zubov, and G. Hagen. 1999. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene* 232:97–106.
34. Wright, W. E., M. A. Piatyszek, W. E. Rainey, W. Byrd, and J. W. Shay.. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996; 18:173–179.