



CLONACION MOLECULAR, CARACTERIZACION Y EXPRESION
DEL DNA_c DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO DEL GATO
(FCGH)

TESIS QUE CON OPCION AL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR E
INGENIERIA GENETICA.

PRESENTA

FELIPA CASTRO PERALTA

MONTERREY, NUEVO LEON

MAYO DE 1995



1020113970

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**CLONACION MOLECULAR, CARACTERIZACION Y EXPRESION
DEL DNAc DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO DEL GATO
(FCGH)**

TESIS QUE CON OPCION AL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

**CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR E
INGENIERIA GENETICA**

PRESENTA

FELIPA CASTRO PERALTA

11
37 6

MONTERREY, NUEVO LEON

MAYO DE 1995

TM
26658
FM
1995
C376

0113-38660

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



REGULACION DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO DEL CAYO
MOLUCULAS AL CARACTERIZACION Y EXPRESION
(PCCM)

TESIS QUE CONSTITUYE AL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

EN ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR E
INGENIERIA GENETICA

PRESENTA

FELIPA CASTRO PERALTA

MAYO DE 1995

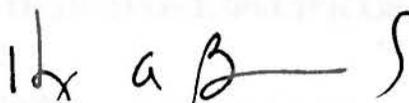
DON CARLOS ALFONSO

**Clonación molecular, caracterización y expresión del DNAC
de la hormona del crecimiento del gato (FCGH)**

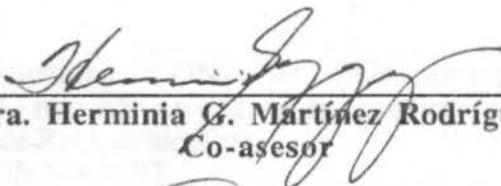
Por

Felipa Castro Peralta
Q.F.B.

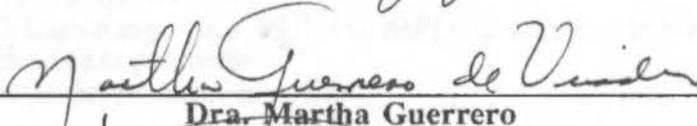
El comité de tesis:



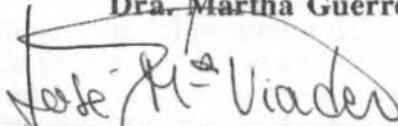
Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
Asesor



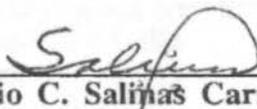
Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
Co-asesor



Dra. Martha Guerrero



Dr. José María Viader Salvadó



Dr. Mario C. Salinas Carmona



FONDO TESIS

Clonación molecular, caracterización y expresión del *hGH*
de la hormona del crecimiento del gato (FCHG)

199

Felipe José Pardo
V.F.B.

Excmo. Sr. Rector

[Signature]
Dr. Hugo A. Larrea Saldaña
Asesor

[Signature]
Dr. Fernando G. Martínez Rodríguez
Co-asesor

[Signature]
Dr. María Guzmán

[Signature]
Dr. José María Valdez Saldaña

[Signature]
Dr. Mario C. Salazar Corrales



FONDO TESIS

V RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Clonación molecular del DNAC de <i>FCGH</i>	
a) Extracción de RNA a partir de hipófisis de gato	35
b) Síntesis y amplificación del DNAC	36
c) Clonación del producto amplificado en los vectores M13	36
d) Secuencia nucleotídica del DNAC	37
e) Características del DNAC y de la proteína codificada por éste	42
5.2 Promotor	49
5.3 Síntesis de FCGHr	
a) En <i>Escherichia coli</i>	52
b) En células COS-7	55

VI CONCLUSIONES	61
-----------------	----

VII BIBLIOGRAFIA	63
------------------	----

El presente trabajo de tesis se realizó en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña y con la co-asesoría de la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Hugo A. Barrera, Jefe de la Unidad de Estudios de Historia y Geografía de la Universidad de Cienfuegos por su apoyo y colaboración.

A la Dra. Juana María E. Valderrama Rodríguez por su apoyo y colaboración en la realización de este trabajo.

A los doctores Dr. José Luis Suárez, Dra. Martha Guerrero y Dr. María del Socorro por su apoyo y colaboración en la realización de este trabajo.

A la Comisión Nacional de Estudios y Tecnología (CUNAC) por haber financiado este trabajo y a los doctores Dr. José Luis Suárez y Dr. María del Socorro por su apoyo y colaboración.

DEDICATORIA:

A Rosario y a Patrocinio, por mostrarme la sencillez de "EXISTIR"
A mis hermanas, por su alegría y mis "PEQUEÑOS" sobrinos
A "LUCKY", por compartir conmigo su enorme mundo interno
y de forma muy especial
A Ataúlfo, a través de la distancia.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Hugo A. Barrera Saldaña**, por contagiarme de su entusiasmo por el trabajo y la investigación. MUCHAS GRACIAS por su paciencia.

A la **Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez** por su interés en este trabajo, por sus acertados comentarios y por su comprensión.

Agradezco al **Dr. José Ma. Viader**, **Dra Martha Guerrero** y **Dr. Mario C. Salinas** por sus sugerencias y su ayuda en la revisión del documento.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por haberme otorgado una beca para la realización de estudios de Post-grado.

Al **Dr. Alfredo Jacobo Molina (ITESM)** por el gran interés, disposición y ayuda durante la última etapa de este trabajo.

Gracias a **M. Iturbe** y **J. Zavala** por su ENORME ayuda en el procesamiento de secuencias (y demás).

A **Ana Ma. Sifuentes**, por SER primero compañera y amiga y ahora hermana.

A **Marissa B.** ("Maricha"), **Alicia M.** ("Pir I"), **Marina T.** ("Mina") y **Blanca** por hacer un hogar de nuestra casa.

A **N. Guerra**, **J. Ascacio** y **A. Martínez**, por su tiempo y su paciencia durante mis primeros meses en la ULIEG.

A todos los compañeros de laboratorio, por su ayuda, su amistad y por hacer tan agradable mi vida en la ULIEG: Norma, Mario, Martín, Marcos, Maestra Rosy, Jorge Ascacio, Ataúlfo, Ana María, Javier, Claudio, Everardo, Déctor, Carmen B., Lolita, Marissa, Lisbeth, Gil, Jorge Ampudia, Carmen V., Alma., Hugo G., Luis lauro, Eddy, Ramiro y Celia.

Al **Dr Grady F. Saunders**, por haberme facilitado su laboratorio para la realización de algunos experimentos.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla I. Lista de genes y DNACs de GHs que han sido clonados y secuenciados	6
Tabla II. Componentes de la Reacción de Retrotranscripción	16
Tabla III. Componentes de la Reacción de PCR para amplificar DNAC	17
Tabla IV. Componentes de la Reacción de PCR para amplificar promotor	20
Tabla V. Porcentaje de similitud aminoacídica entre FCGH y GHs de especies relacionadas	45
Tabla VI. Resultados de la purificación de los plásmidos en gradiente de cloruro de cesio	55
Figura 1. Modelo tridimensional para las GHs	3
Figura 2. Mecanismos de acción de las GHs	4
Figura 3. Estrategia general de clonación y secuenciación	12
Figura 4. Estrategia general de expresión	13
Figura 5. Iniciadores consenso para DNACs de GHs	18
Figura 6. Oligonucleótidos consenso para promotores de genes GHs	21
Figura 7. Reacción de secuenciación	22
Figura 8. Secuenciación del DNAC de las clonas en M13	23
Figura 9. Estrategia para subclonar el DNAC de <i>FCGH</i> en el vector pMALc	27
Figura 10. Estrategia general de inducción y análisis de la expresión	29
Figura 11. Construcción de pNUTFCGH	31
Figura 12. Ensayo CAT	32
Figura 13. Perfil electroforético de RNAs extraídos de hipófisis	35
Figura 14. Amplificación del DNAC de FCGH	36
Figura 15. Mapa de restricción de M13FCGH	37
Figura 16. Secuencia del DNAC de <i>FCGH</i> del nucleótido 1 al 127	38
Figura 17. Secuencia del DNAC de <i>FCGH</i> del nucleótido 128 al 415	39
Figura 18. Secuencia del DNAC de <i>FCGH</i> del nucleótido 415 al 648	40
Figura 19. Secuencia del DNAC de <i>FCGH</i> del nucleótido 649 al 749	41
Figura 20. Secuencia nucleotídica del DNAC de <i>FCGH</i>	42
Figura 21. Mapa de restricción del DNAC de <i>FCGH</i>	43
Figura 22. Comparación de la secuencia nucleotídica de <i>FCGH</i> con la <i>CFGH</i>	44
Figura 23. Arbol filogenético de carnívoros	45
Figura 24. Análisis de la estructura primaria de la cuarta hélice alfa de GHs de mamífero	46

Figura 25. Análisis de la estructura terciaria de la proteína	48
Figura 26. Producto amplificado del promotor	49
Figura 27. Secuencia nucleotídica del promotor del gen de <i>FCGH</i>	50
Figura 28. Mapa de restricción del promotor	51
Figura 29. Mapa de restricción y caracterización enzimática de pMALcFCGH	53
Figura 30. Análisis electroforético de la síntesis de FCGH en fusión con MBP	54
Figura 31. Mapa y caracterización enzimática de pNUTFCGH	56
Figura 32. Ensayo de la enzima Cloranfenicol acetil transferasa	58
Figura 33. Producción transitoria de hormonas recombinantes en células COS-7 transfectadas con varios plásmidos	59
Figura 34. Detección de FCGH por ELISPOT	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de Adenosina
BCIP	Fosfato de (5-bromo-4-cloro-3-indolil)
BGH	Hormona del crecimiento bovino
CAT	Acetil transferasa del cloranfenicol
Ci	Curie
CFGHr	Hormona del crecimiento recombinante de perro
<i>CFGH</i>	Hormona del crecimiento del perro (DNA)
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
D-MEM	Medio mínimo esencial de Dulbecco
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario al RNAm
dNTPs	Desoxinucleótidos
DTAB	Bromuro de dodeciltrimetilamonio
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
g	Gramos
FCGHr	Hormona del crecimiento recombinante de gato
<i>FCGH</i>	Hormona del crecimiento de gato (DNA)
GHs	Hormonas del crecimiento.
h	Hora (s)
HGHr	Hormona del crecimiento recombinante de humano
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido piranosa
kDa	Kilodaltones
l	Litros
M	Concentración Molar
MBP	Proteína de unión a maltosa
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Concentración milimolar
MOPS	Acido (3-[N-Morfolino] propan-sulfónico)
NBT	Cloruro de nitroazul de tetrazolio
ng	Nanogramos
nuc	Nucleótidos
OGH	Hormona del crecimiento ovino
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PGHr	Hormona del crecimiento recombinante de cerdo
pH	$-\log [H^+]$
poli A	Acido poliadenílico
PSA	Persulfato de amonio
RNA	Acido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
RNAr	RNA ribosomal
RNAt	RNA de transferencia
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción

S	Unidades Svedberg
s	Segundos
SDS	Lauril sulfato de sodio
SEVAG	Cloroformo-alcohol-isoamílico (24:1)
SBF	Suero bovino fetal
TBST	Amortiguador Tris-salino-tween 20
U	Unidades
uv	Ultravioleta
v	Voltios
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar
°C	Grados Celsius

8

RESUMEN

Las hormonas del crecimiento (GHs) de mamíferos son polipéptidos de aproximadamente 190 aminoácidos (aa) con pesos moleculares de 22 kDa que participan activamente en una gran variedad de procesos metabólicos. Se sintetizan como prehormonas en los somatotrofos de la pituitaria anterior, con una extensión aminoterminal hidrofóbica de 26 residuos aminoacídicos que son removidos durante su secreción al torrente sanguíneo.

La demanda de GHs con posible uso veterinario o biomédico intensificó esfuerzos para aislar genes y DNACs de GHs, con el propósito de lograr producir estas hormonas a partir de la fermentación y cultivo de organismos reprogramados por ingeniería genética. Sin embargo, existen además otros aspectos de bastante interés con respecto a las GHs, como lo son el tratar de conocer los mecanismos de regulación genética, identificar los elementos que constituyen sus promotores génicos y realizar estudios de evolución molecular, con el fin de entablar relaciones filogenéticas basadas exclusivamente en el análisis de secuencias de GHs.

En el presente trabajo se logró obtener por RT-PCR y clonar molecularmente, un fragmento de 749 pb correspondientes al DNAC que codifica para la hormona del crecimiento del gato (*FCGH*). El fragmento aislado y secuenciado, se subclonó en dos vectores de expresión: en el plásmido pMALc, mediante el cual se sintetizó la hormona en fusión con una proteína de origen bacteriano (MBP) y en el plásmido pNUT, con el cual se logró producir la proteína madura en células COS-7.

También se clonó por PCR, 191 pb del promotor del gen y por medio de la determinación de su secuencia nucleotídica, se identificaron y situaron algunos elementos estructurales propios de genes eucarióticos y característicos de genes de GHs.

I INTRODUCCION

El uso potencial de las versiones recombinantes de las hormonas del crecimiento (GHs) de vertebrados, llevó a la clonación molecular de una amplia variedad de sus genes y DNAs. A pesar del alto número de secuencias que han sido generadas, muchas especies han permanecido sin ser incluidas en estos estudios, como es el caso del gato.

1. Hormonas del crecimiento (GHs)

Las GHs (también llamadas somatotropinas) son miembros de una familia de hormonas que incluye a las prolactinas y los lactógenos placentarios. Estas hormonas poseen estructuras similares (1),(2),(3) y comparten propiedades funcionales e inmunológicas (4), por lo que se ha considerado que sus genes han evolucionado a partir de un gen ancestral común (5),(6).

1.1 Estructura y función de las GHs

Las GHs son proteínas globulares contituidas por 4 hélices alfa antiparalelas. La molécula presenta dos enlaces disulfuro que conectan la hélice 4 con el extremo carboxilo terminal de la proteína, y la hélice 1 con la 4 (7). Debido al alto grado de conservación de los residuos aminoacídicos observado entre las GHs de diferentes especies, se ha propuesto una estructura "estándar" para estas hormonas (8)(ver fig 1), en la cual sólo el 40% de los residuos aminoacídicos están contenidos en las 4 hélices alfa (secuencias conservadas), el 60% restante está distribuído en 2 lazos largos que conenctan la hélice 1 a la 2 y la 3 con la 4; además de un lazo pequeño que une la hélice 2 con la 3. Una característica estructural importante que exhiben las GHs es la presencia de una prolina en la posición 89 que provoca un doblez pronunciado a mitad de la hélice 2 (9).

Gracias a los avances alcanzados hasta hoy en técnicas de purificación y cristalización de proteínas, los trabajos recientes en esta área se han enfocado a elucidar las bases moleculares de la interacción de la GH con su receptor(10), y con el receptor de proteínas estrechamente relacionadas, como la prolactina (11). Los residuos involucrados en la interacción de la GH con su receptor pertenecen a las hélices 1 y 4, siendo uno de los más importantes el ácido glutámico (E) 174, identificado en HGH, mediante mutagénesis (12).

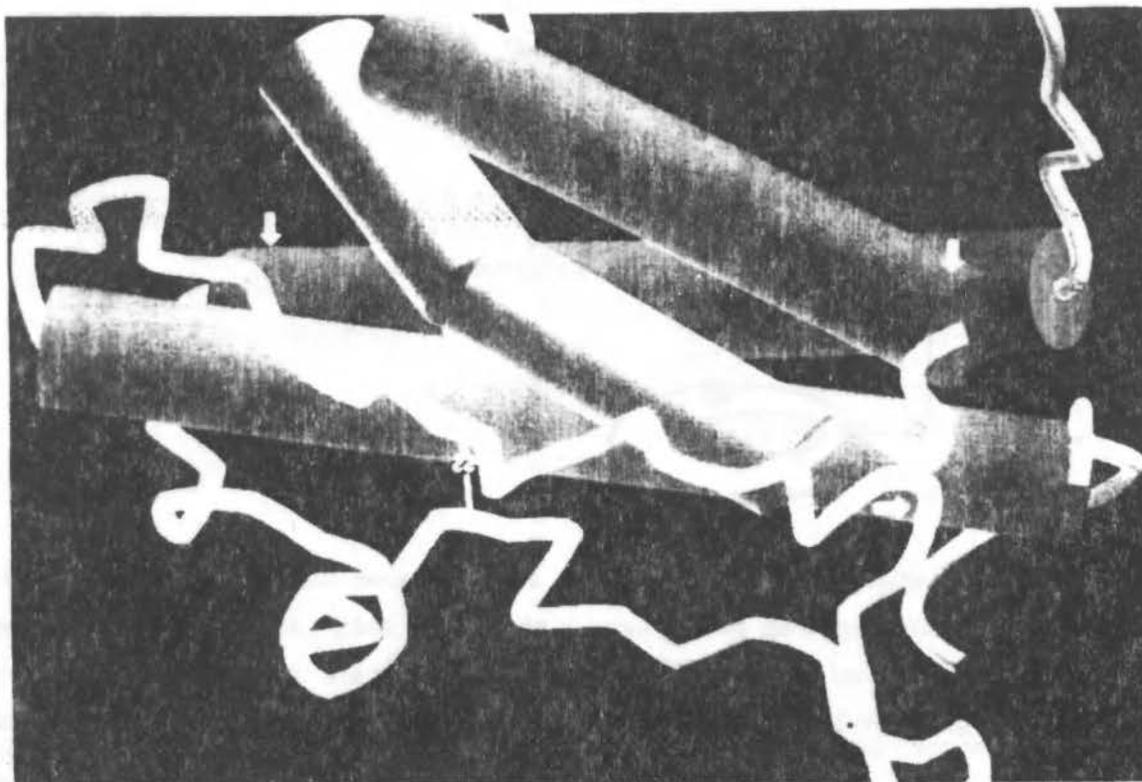


Figura 1. Modelo tridimensional para las GHs. Se muestra la representación en cilindros o barriles de las cuatro helices alfa que constituyen la proteína y los lazos que las unen, tomando como modelo la estructura de la hormona del crecimiento porcina recombinante (PGHr).

La hormona del crecimiento actúa directamente sobre las células de los tejidos blanco, o por medio de intermediarios de tipo hormonal, llamados somatomedinas (ver figura 2).

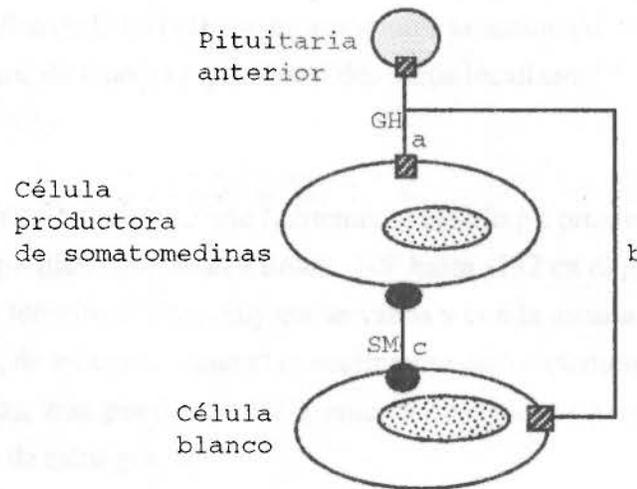


Figura.2. Mecanismos de acción de las GHs. Vía a: La GH liberada por la hipófisis actúa indirectamente sobre los tejidos, induciendo a otras células para que produzcan intermediarios llamados somatomedinas. Vía b: La GH actúa directamente sobre las células blanco. Vía c: Las somatomedinas ejercen su efecto sobre las células blanco (Tomado de Schmeitzel, 1988).

La producción de la GH es episódica y está regida por la acción de dos hormonas hipotalámicas, el factor liberador de la hormona del crecimiento y la somatostatina. Mientras que el primero estimula su síntesis, el segundo inhibe su liberación. Los efectos catabólicos de la GH incluyen: incremento de la lipólisis, oxidación de los ácidos grasos y transporte disminuido de glucosa, lo cual provoca que se eleve la concentración de glucosa en sangre (13). Los efectos anabólicos incluyen: incremento en el transporte de aminoácidos con disminución de su catabolismo y estimulación de la síntesis de DNA, RNA y proteínas a nivel hepático (14). En términos generales, se considera que el efecto neto de las GHs y de las somatomedinas es anabólico (15).

1.2 Síntesis tejido-específica

Mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas se ha podido observar que las células acidófilas productoras de GH ocupan casi la mitad de la parte anterior de la pituitaria. La expresión pituitaria-específica de la GH (16) se ha atribuido a la acción del factor transcripcional Pit-1 (GHF-1), el cual se une de manera específica a dos sitios localizados dentro de la región el promotor del gen hGH-N (17).

Esta proteína de unión al DNA, se une fuertemente al sitio pit proximal, desde -66 hasta -92 y con menor fuerza a pit distal que abarca desde -108 hasta -132 en el gen hGH-N (18). En rata también se ha logrado identificar sitios muy conservados y con la misma localización dentro del promotor de rGH (19), de tal manera que el conocimiento de los elementos estructurales de las secuencias regulatorias, nos puede ayudar a entender mejor los procesos de control y regulación de la expresión de estos genes.

1.3. Biotecnología

Las primeras aplicaciones comerciales derivadas del uso de la tecnología del DNA recombinante se han centrado desde hace ya varios años en la producción bacteriana (principalmente en *Escherichia coli*) de proteínas de interés terapéutico y con un gran valor comercial para la industria farmacéutica.

La insulina humana fue la primer proteína recombinante autorizada para usarse como agente terapéutico en humanos. Posteriormente le siguieron, también de origen humano, la hormona del crecimiento, el activador del plasminógeno tisular, el interferon β , la interleucina-2, la eritropoyetina, el factor de necrosis tumoral y los factores VIII y IX. A excepción del interferon β , todas han sido aprobadas para su venta (20).

Conjuntamente con la producción de proteínas recombinantes en bacterias, se inició la producción de las mismas en diversos sistemas de células de mamífero en cultivo, en los cuales se han obtenido excelentes resultados hasta ahora. En el caso de GHs de interés pecuario, están siendo producidas en *Escherichia coli*, la porcina (21), la bovina (22),(23) y la de pollo (24),(25), las cuales se añaden también a la larga lista de genes y/o DNAs complementarios a los RNAs mensajeros (DNACs) que han sido clonados y secuenciados (ver tabla I).

TABLA I
GENES Y DNACs DE GHs QUE HAN SIDO CLONADOS Y SECUENCIADOS

A) PECES

<i>Hypophthalmichthys</i>	<i>molitrix</i> (26)
<i>Hypophthalmichthys</i>	<i>nobilis</i> (27)
<i>Cyprinus</i>	<i>carpio</i> (28)
<i>Ctenopharyngodon</i>	<i>idella</i>
<i>Pangasius</i>	<i>pangasius</i>
<i>Caranx</i>	<i>delicatissimus</i>
<i>Oncorhynchus</i>	<i>kisutch</i> (29)
<i>Oncorhynchus</i>	<i>tschawytscha</i>
<i>Oncorhynchus</i>	<i>mykiss</i>
<i>Oncorhynchus</i>	<i>keta</i> (30)
<i>Oncorhynchus</i>	<i>niloticus</i>
<i>Salmo</i>	<i>gairdneiri</i> (31)
<i>Salmo</i>	<i>salar</i> (32)
<i>Sparus</i>	<i>aurata</i>
<i>Thunnus</i>	<i>thynnus</i> (33)
<i>Paralichthys</i>	<i>olivaceus</i>
<i>Esox</i>	<i>lucius</i>
<i>Solea</i>	<i>senegalensis</i>
<i>Anguilla</i>	<i>japonica</i>
<i>Acanthopagrus</i>	<i>butcheri</i>
<i>Acanthopagrus</i>	<i>latus</i>
<i>Dicentrarchus</i>	<i>labrax</i>
<i>Lates</i>	<i>calcarifer</i>
<i>Oreochromis</i>	<i>niloticus</i>
<i>Pangasianodon</i>	<i>gigas</i>
<i>Pagrus</i>	<i>major</i> (34)
<i>Solea</i>	<i>senegalensis</i>

B) MAMIFEROS

<i>Mus</i>	<i>musculus</i> (35)
<i>Rattus</i>	<i>norvegicus</i> (36)
<i>Mesocricetus</i>	<i>auratus</i>
<i>Macaca</i>	<i>mulatta</i>
<i>Homo</i>	<i>sapiens</i> (37)
<i>Alopex</i>	<i>lagopus</i>
<i>Mustela</i>	<i>vison</i> (38)
<i>Canis</i>	<i>lupus</i> (39)
<i>Bos</i>	<i>taurus</i> (40)
<i>Capra</i>	<i>hircus</i> (41)
<i>Capricornis</i>	<i>crispus</i>
<i>Ovis</i>	<i>ovis</i> (42)
<i>Buba</i>	<i>bubalis</i>
<i>Sus</i>	<i>scrofa</i>
<i>Cervus</i>	<i>nippon</i>
<i>Balanoptera</i>	<i>borealis</i>
<i>Equus</i>	<i>caballus</i> (43,44)
<i>Loxodonta</i>	<i>africana</i>

C) ANFIBIOS

<i>Rana</i>	<i>catesbiana</i> (45)
<i>Xenopus</i>	<i>laevi</i>

D) AVES

<i>Gallus</i>	<i>gallus</i>
<i>Gallus</i>	<i>domesticus</i>
<i>Meleagris</i>	<i>gallopavo</i>
<i>Anas</i>	<i>platyrrincus</i> (46)

1.4 Filogenia molecular

La aplicación de una gran variedad de técnicas de biología molecular ha hecho factible el que en la actualidad se estén estableciendo mapas genéticos comparativos entre diversas especies de mamíferos (47). El gato doméstico (*Felis catus*), junto con la vaca, ocupa el séptimo lugar en cuanto al número de genes que han identificados y situados dentro de sus cromosomas, con un total de 50. La construcción de estos mapas nos ayuda a "reconstruir" sucesos que ocurrieron en los organismos vivos y a formar un contexto evolutivo en la interpretación de la organización de los genomas (48).

Hasta hace algunos años, las relaciones filogenéticas se establecían exclusivamente en base a datos morfológicos y paleontológicos (49). Sin embargo, en la actualidad la mayor parte de ellas se realizan en base a hibridaciones de DNA y análisis de secuencias nucleotídicas de DNA mitocondrial, citocromo b y genes de RNA ribosomal. El bajo nivel de mutaciones puntuales (0-7/100 residuos/10⁸ años) observado entre las secuencias de las GHs de diversos organismos (50) y el número cada vez mayor de secuencias disponibles, las ha convertido en un instrumento útil para la construcción de árboles filogenéticos entre organismos. Un ejemplo de ello, es la filogenia molecular entre peces, determinada por Bernardi y Cols. en 1993, basándose exclusivamente en el análisis de secuencias aminoacídicas de GHs (51).

2. Hormona del crecimiento del Gato

2.1 Trastornos asociados con la deficiencia de GH

El enanismo pituitario en el gato es un hipopituitarismo hereditario que provoca estatura corta, alopecia simétrica bilateral e hiperpigmentación, síntomas todos éstos adjudicados a la deficiencia de GH en el gato (FCGH)(52). Otros signos clínicos incluyen ausencia permanente de dentición y anomalías esqueléticas. Su diagnóstico está basado en el examen físico, radiografías, biopsias de piel y pruebas de funcionamiento endócrino (53).

La terapia para el enanismo pituitario felino incluye el reemplazo de la FCGH, la cual se administra subcutáneamente tres veces por semana durante tres ó cuatro semanas, con lo cual se revierten todos los síntomas del padecimiento. La BGHr, la PGHr o la HGHr pueden ser efectivas (54), sin embargo lo ideal es contar con la hormona homóloga, la que al ser especie-específica evitaría efectos indeseables derivados del rechazo inmunológico, que puede presentarse a largo o mediano plazo.

Se ha establecido que en gatos la GH promueve el crecimiento del cabello y el desarrollo de las fibras de elastina (55),(56), mientras que su deficiencia ocasiona cambios cutáneos que llevan al padecimiento de hiperqueratosis, atrofia epidémica, melanosis, atrofia de las glándulas sebáceas y adelgazamiento de la piel (57). También se ha visto una asociación sinérgica entre la actividad de la GH y las hormonas sexuales esteroideas para promover el crecimiento (58),(59).

El interés creciente por investigar la GH del gato, surgió a partir de los resultados obtenidos de diversos estudios metabólicos, en los cuales después de medir la concentración de GH en suero, luego de administrar sustancias que estimulan o inhiben la liberación de la hormona (60), se llegó a la conclusión de que los mecanismos que gobiernan la secreción y regulación de la biosíntesis de GH en esta especie, debían ser mucho menos sensibles o insensibles a los estímulos que sí funcionan en Primates (61).

II. OBJETIVO GENERAL:

CLONAR Y DETERMINAR LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL DNAC Y DEL PROMOTOR DEL GEN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO DEL GATO Y SINTETIZAR LA PROTEINA RECOMBINANTE EN *Escherichia coli* Y CELULAS COS-7.

III. OBJETIVOS PARTICULARES:

El proyecto abarcó los siguientes objetivos:

1. Obtener por PCR el DNAC de la hormona del crecimiento del gato (*FCGH*), usando oligonucleótidos consenso y retrotranscritos del RNA de hipófisis de gatos como sustrato.
2. Clonar el DNAC de *FCGH* en los vectores M13mp18 y M13mp19 y determinar su secuencia nucleotídica.
3. Clonar y determinar la secuencia nucleotídica del promotor del gen en ambos vectores M13.
4. Subclonar el DNAC en el plásmido pMALc e inducir la síntesis de la proteína en *Escherichia coli*, fusionada con la proteína de unión a maltosa (MBP).
5. Construir el plásmido pNUT*FCGH* que contenga el minigen *FCGH* y lograr su expresión en células COS-7.

IV MATERIAL Y METODOS

4.1 Origen de los reactivos

Las enzimas de restricción y de modificación de ácidos nucleicos fueron adquiridas de Gibco-Bethesda Research Laboratories, Inc. (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA), New England Biolabs, Inc. (NEB, Beverly, MA, EUA) y Boheringer Mannheim (Indianapolis, IN, EUA) y fueron empleadas según las indicaciones de uso de cada compañía.

El nucleótido radiactivo ^{35}S -dATP, necesario para llevar a cabo la determinación de las secuencias nucleotídicas, así como el D-treo-(dicloroacetil-1- ^{14}C)-Cloranfenicol para la realización de los ensayos CAT, fueron adquiridos de Amersham International (Buckinghamshire, UK).

Para realizar la síntesis de la primera cadena de DNAc a partir de los RNAs totales del tejido hipofisiario, se utilizaron reactivos de la compañía Gibco-BRL, y para la amplificación de los productos correspondientes al DNAc y al promotor de *FCGH* por PCR, se emplearon las enzimas: Taq-polimerasa de la corporación Promega (Madison, WI, USA) y Amplitaq de Perkin Elmer-Cetus (Alameda, CA, USA).

Las secuencias nucleotídicas del DNAc y del promotor fueron determinadas empleando el estuche "Sequenase version 2.0", adquirido de United States Biochemicals, Inc. (USB, Cleveland, OH, EUA).

El par de iniciadores necesarios para llevar a cabo la amplificación del DNAc y del promotor fueron previamente diseñados en la ULIEG por J.A.I. Ascacio y J.C. Moreno (respectivamente) en base a las secuencias consenso de diferentes DNacs y genes de GHs de mamíferos reportadas en los bancos de secuencias y fueron sintetizados por la compañía BioSynthesis (Lewisville, TX, EUA).

Los materiales usados para el cultivo de células (frascos, cajas, tubos, filtros, pipetas, unidades de filtración, etc.) fueron adquiridos de Falcon (Lincoln Park, NJ, EUA), Corning (New York, NY, EUA), Costar (Cambridge, MA, USA) y de Promega.

Los reactivos para la preparación de medios de cultivo, así como suero bovino fetal (SBF), tripsina, el reactivo LIPOFECTAMINE™, además del estuche de E.L.I.S.A para la detección y cuantificación de las proteínas recombinantes, se adquirieron en Sigma Chemical Co. (Missouri, MI, USA), HyClone, Inc. (Logan, Utah, USA), DIFCO-LABORATORIES (Detroit, Michigan, USA) y Gibco-BRL.

Los reactivos para elaborar las soluciones, amortiguadores, medios de cultivo, geles, etc., necesarios para realizar este trabajo se obtuvieron de: Sigma Chemical, CO, Merck (Monterrey, México), y Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, EUA).

4.2 Origen del material biológico

Como producto de la disección de 5 gatos (*Felis catus*), se lograron recuperar 600 mg de tejido hipofisiario y tejido sanguíneo necesario para realizar la clonación del DNAC de *FCGH* y del promotor de su gen, respectivamente. Las hipófisis recién extraídas, fueron colocadas inmediatamente en CO₂, con el objeto de preservar la integridad de los RNAs del tejido durante su transportación al congelador a -70°C, donde fueron almacenadas hasta su uso. La sangre fué procesada de inmediato para extracción de DNA genómico.

Los fagos M13 utilizados como vectores de clonación y secuenciación y el plásmido pMALc empleado en los ensayos de expresión de la proteína recombinante en *Escherichia coli*, fueron adquiridos de NEB.

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas fueron: DH5 α F', DH5 α , y TB-1, esta última adquirida de NEB. Los demás plásmidos, y cepas de *Escherichia coli* empleados en este trabajo, provienen de la genoteca y bacterioteca de la U.L.I.E.G.

Las células COS-7 obtenidas de riñón de mono verde empleadas para realizar los ensayos de expresión transitoria de las proteínas recombinantes fueron donadas por el Dr Tien Kuo del Depto. de Patología Experimental del M. D. Anderson Cancer Center Research de Houston, TX, E.U.A.

4.3. Métodos

El trabajo experimental se dividió en dos etapas. En la primera, se describe todo lo referente a la clonación y determinación de la secuencia nucleotídica del DNAc y del promotor del gen (ver fig 3), mientras que la segunda fase se enfoca a la producción de la hormona recombinante en *Escherichia coli* y células en cultivo (ver fig. 4).

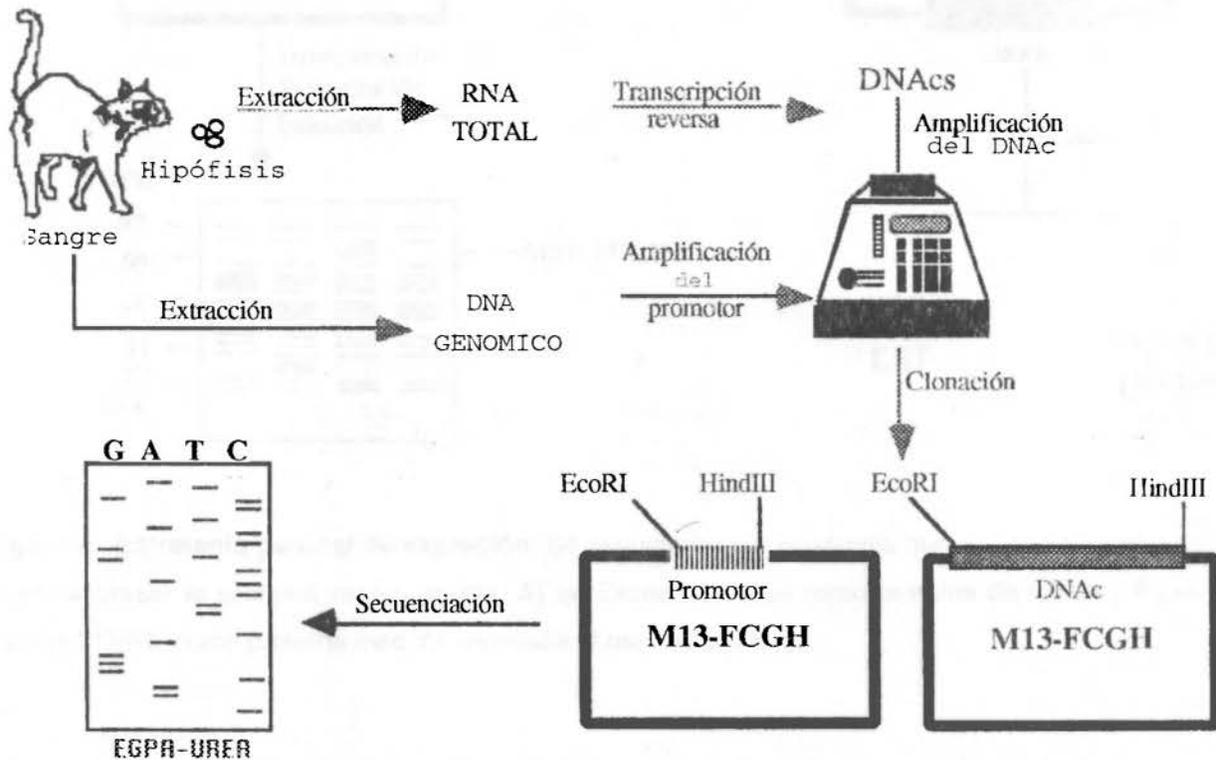


Figura. 3. Estrategia general de clonación y secuenciación. Se esquematizan los principales procesos desarrollados para clonar y determinar la secuencia nucleotídica del DNAc y del promotor del gen FCGH.

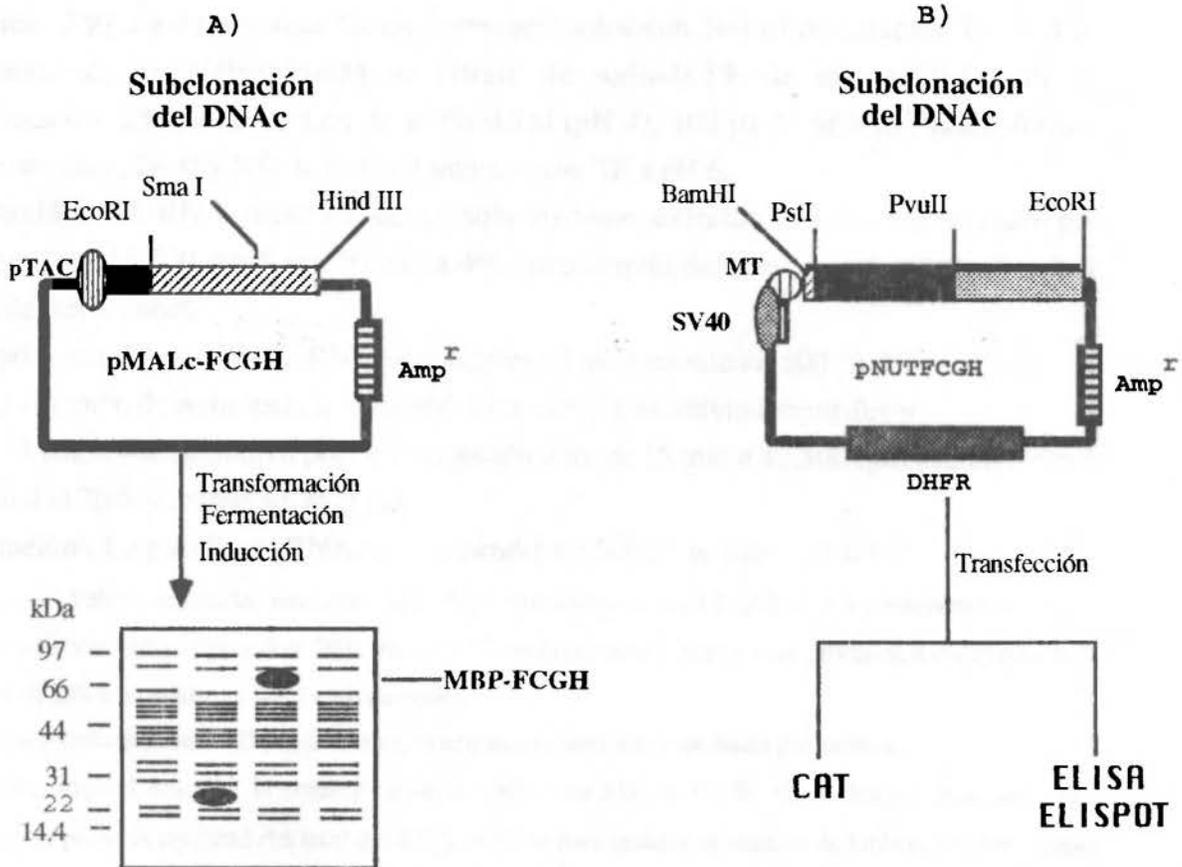


Figura 4. Estrategia general de expresión. Se esquematiza la estrategia que se llevó a cabo para lograr expresar la proteína recombinante. **A)** en *Escherichia coli* como proteína de fusión y **B)** en células COS-7, como proteína madura secretada al medio de cultivo.

4.3.1. CLONACION MOLECULAR DEL DNAc de *FCGH* por RT-PCR

4.3.1.1. Aislamiento de RNA de hipófisis

La extracción del RNA total a partir de tejido hipofisiario de gato, se realizó empleando una modificación a la técnica del **Isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo**, descrita por Chomezynski y Sachi en 1987 (62), la cual comprende 5 etapas que se describen a continuación:

Extracción. 250 mg de hipófisis fueron homogenizados con 500 μ l de solución D¹ (4M de isotiocianato de guanidina/25mM de citrato de sodio/0.5% de sarcosil/0.1M de β -mercaptoetanol), 250 μ l de acetato de sodio 0.2M (pH 4), 100 μ l de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico, 24:1) y 500 μ l de fenol saturado con TE a pH 6.

Precipitación. El RNA presente en el sobrenadante extraído del homogenizado por centrifugación a 13,500 rpm* por 10 min a 4°C, se precipitó durante 1h a -20°C añadiendo 1 volumen de isopropanol.

Reprecipitación. La pastilla de RNA se resuspendió nuevamente en 500 μ l de solución D, se agregó un volumen de isopropanol, se incubó 1 h a -20°C y se volvió a centrifugar.

Lavado. El botón que se obtuvo por centrifugación durante 15 min a 13,500 rpm., se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se dejó secar al aire.

Solubilización². La pastilla de RNA se resuspendió en 500 μ l de etanol al 100%.

* A lo largo del trabajo se usarán rpm como unidad de centrifugación, con la aclaración pertinente de que se empleó una microcentrífuga Eppendorf 5402 (rotor de 10.69cm de radio) en todos los procesos, a excepción de la purificación de DNA en gradiente de cloruro de cesio).

1. Una vez preparada la solución D puede almacenarse a temperatura ambiente hasta por un mes.
2. El método original describe la solubilización del RNA en SDS al 0.5%, sin embargo, dado que sólo requerimos una pequeña cantidad del total del RNA extraído para realizar la síntesis de DNAc, es conveniente mantener el resto en etanol al 100% a -70°C, para preservar su integridad.

El proceso de extracción de RNA se realizó en condiciones de ausencia total de ribonucleasas. El material de vidrio se lavó primeramente con NaOH al 0.5%, se enjuagó con agua Milli-Q tratada con DEPC al 1% y finalmente se sometió a un proceso de horneado a 250°C por 4h. El material de plástico se usó estéril. Todos los reactivos fueron preparados en DEPC:H₂O y durante todo el procedimiento de trabajo con guantes. Estas condiciones se mantuvieron durante todas las etapas del proceso.

Para realizar la cuantificación espectrofotométrica del RNA recién extraído, se tomó una alícuota de 2 μ l a partir del "stock", se evaporó el etanol en el evaporador centrífugo SAVANT y el RNA liofilizado, se resuspendió en 1ml de agua Milli-Q ultrapura, midiéndose su absorbancia a 260 y 280 nm. Posteriormente, se verificó la integridad del RNA en gel de agarosa-formaldehído-MOPS al 1% y se visualizó bajo luz uv.

a) *Preparación del gel agarosa-formaldehído-MOPS al 1%: (60 ml)*

En un tubo falcon de 15 ml se mezcló:

0.6 g de Agarosa

6.0 ml de MOPS 10X (0.2M de MOPS/ 0.05M de NaOAc/ 0.01M de EDTA, pH 7.0)

43.2 ml de DEPC:H₂O

Los reactivos se disolvieron perfectamente con calor y la mezcla se dejó enfriar hasta 65°C , añadiéndole enseguida:

10.8 ml de formaldehído al 37%, precalentado a 65°C

Finalmente se vertió en el molde previamente tratado con NaOH al 5% por media hora y enjuagado con DEPC:H₂O. El resto de la mezcla para gel, puede almacenarse a -20°C y usarse en preparaciones posteriores.

b) *Desnaturalización del RNA:*

En un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezcló:

5.0 µg de RNA (liofilizarlo y usar el mismo tubo para añadir los demás reactivos)

2.0 µl de DEPC:H₂O

12.0 µl de RDB (RNA denaturing buffer: -700 µl de formamida al 100%

-300 µl de formaldehído al 37%

-150 µl de MOPS 10X

1.0 µl de bromuro de etidio 2mg/ml

Se incubó a 65°C por 10 min, y se colocó en hielo inmediatamente añadiendo enseguida:

6.0 µl de GLB (Gel-loading-buffer: 50% de Glicerol/1mM de EDTA/0.25% de Azul de bromofenol/0.25% de Xilencianol)

c) Finalmente las muestras se aplicaron en los carriles del gel para ser resueltas por electroforesis usando MOPS 1X como buffer de electroforesis.

4.3.1.2. Síntesis del DNAc por RT

La enzima del Virus de la Leucina Murina de Maloney (M-MLV), es una DNA polimerasa-dependiente de RNA (retrotranscriptasa), lo cual posibilita realizar el proceso de síntesis de la primera cadena de DNAc, empleando como templado RNA (de cadena sencilla) y un oligonucleótido corto que actúa como donador de un 3'-OH (necesario para el inicio de la polimerización). De esta manera, se produce una población heterogénea de híbridos RNA-DNAc, dentro de los cuales se obtiene el producto de interés.

Los reactivos empleados para la reacción de RT forman parte del conjunto enzimático de la compañía BRL, el cual está basado en la técnica descrita por Gubler y Hoffman (tabla II)(63)

TABLA II. COMPONENTES DE LA REACCION DE RT:

(mezclar en un vol. final de 30 μ l)

RNA molde(2.5 μ g)	redisolto en 18.5 μ l de DEPC:H ₂ O
Amortiguador 5X	6.0 μ l
Hexámeros al azar (0.3 μ M)	1.0 μ l
dNTP's(10mM)	1.5 μ l
DTT 0.1M	1.0 μ l
MMLV-RT (400U/ μ l)	0.5 μ l

Como paso inicial de este proceso, el volumen (en μ l) equivalente a 2.5 μ g de RNA, fue evaporado (para eliminar el etanol en el cual se mantenía almacenado a -70°C) y resuspendido en 18.5 μ l de DEPC:H₂O. Luego se sometió a desnaturalización durante 5 min a 95°C e inmediatamente después el tubo de reacción se colocó en hielo por 5 min. Enseguida se le añadió la mezcla de reacción antes descrita y finalmente se incubó a 37°C por 30 min (64).

4.3.1.3. Amplificación específica del DNAC de *FCGH* empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Haciendo uso de este proceso enzimático de síntesis de DNA *in vitro*, que involucra la síntesis de millones de copias de un segmento de DNA específico (65), se logró copiar y amplificar en forma exponencial el DNAC que codifica para *FCGH* (tabla III), cuya longitud quedó delimitada por el par de oligonucleótidos específicos previamente diseñados, los cuales introdujeron los sitios de restricción artificiales *EcoRI* en el extremo 5' del fragmento amplificado y *Hind III* en 3'.

Además, para abarcar también la secuencia de la región 3' no-traducible (NT), se empleó un tercer oligo específico para la cola de poli A de los RNAm eucarióticos, el cual, junto con el oligo 5' permitió amplificar el DNAC de *FCGH* desde el codón de iniciación (ATG), hasta la región de poli A (ver fig. 5).

TABLA III. COMPONENTES DE LA REACCION DE PCR:

(mezclar en un volumen final de 50 μ l):

Milli-Q:H ₂ O	37.0 μ l
DNA-RNA(templado)*	3.0 μ l
Amortiguador de Rx 10x	5.0 μ l
MgCl ₂ (25mM)	3.0 μ l
dNTP's (10mM)	1.5 μ l
iniciador 5'(2.5 μ M)	1.1 μ l
iniciador 3'(2.5 μ M)	1.1 μ l
Polimerasa Taq(5U/ μ l)	0.5 μ l

*1/10 del volumen de la reacción de RT

A la mezcla de reacción anterior se le añadieron 50 μ l de aceite mineral y fue sometida a 30 ciclos sucesivos de amplificación en el aparato termociclador (MJ Research, Inc. PT-100), empleando el siguiente programa: **Desnaturalización** a 94°C/1 min, **Apareamiento** a 55°C/1.30 min y **Extensión** a 72°C/1.30 min. Los resultados de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

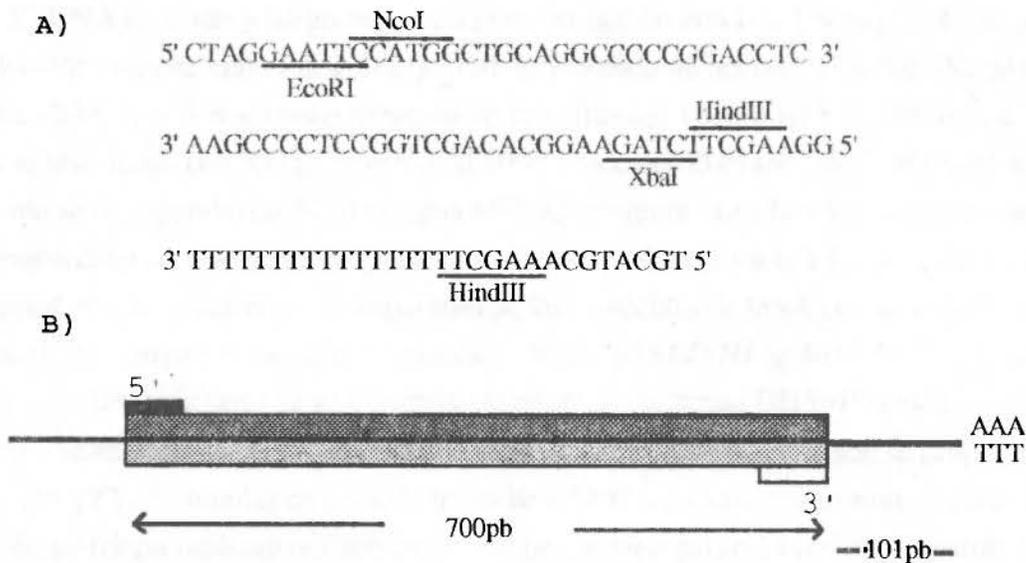


Figura. 5. Iniciadores consenso para DNAc. A) Se muestra la secuencia de los tres oligonucleótidos empleados para amplificar el DNAc. B) Se esquematiza también, el sitio específico de unión de los oligos al inicio y final de la región codificante del DNAc, así como a su cola de poli A.

4.3.1.4. Clonación del producto amplificado

Se eligió clonar el producto amplificado en el vector M13 (mp18 y mp19), porque su genoma de cadena doble, nos permite clonar fragmentos de DNA bicatenario y su forma infectiva o filamentosa ofrece la gran ventaja de poder producir grandes cantidades de DNA de cadena sencilla, conveniente para secuenciación.

Tomando en cuenta lo anterior, el producto amplificado (1 μ g de DNAc de cadena doble) y el vector (500 ng de cada uno de los fagos M13) se sometieron a una doble digestión con las enzimas *EcoRI* y *Hind III* (en un volumen de reacción de 10 μ l). Ambos sitios de restricción fueron introducidos por PCR en los extremos del inserto, mientras que en el vector se sitúan en los extremos del sitio múltiple de clonación (MCS).

El DNA digerido y luego purificado por extracción con fenol-Sevag (1:1), se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol al 100% y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M, pH 5.2. Se incubó a -20°C por 1 h y posteriormente se centrifugó a 13,500 rpm por 10 min a 4°C. La pastilla se lavó luego con 500 µl de etanol al 70%, se secó en el evaporador centrifugó al vacío y finalmente se resuspendió en 50 µl de agua Milli-Q ultrapura. Los DNAs purificados se usaron para llevar a cabo las reacciones de ligación (1:5) (66), en las cuales la T4 DNA ligasa cataliza la unión covalente de los extremos compatibles de las moléculas de DNA (vector-inserto). De esta manera se dió origen a las construcciones: M13mp18*FCGH* y M13mp19-*FCGH*.. Los productos de las ligaciones se usaron para transformar bacterias DH5αF⁺-calcio competentes (67),(68). Se seleccionaron 18 colonias de cada una de las construcciones, se propagaron en 4 ml de caldo 2YT, dejándolas crecer toda la noche a 37°C y en agitación continua, para recuperar el fago en su forma replicativa (doble cadena) por minipreparación por lisis alcalina (69) y el DNA obtenido de cada una de las colonias de crecimiento lento en agar LB suave, se caracterizó con enzimas diagnósticas y los resultados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Se eligieron aquellas clonas que resultaron positivas y los cultivos se emplearon para preparar DNA (de cadena sencilla) de las partículas virales expulsadas al medio de cultivo por las bacterias.

4.3.2 CLONACION MOLECULAR DEL PROMOTOR DEL GEN DE *FCGH* POR PCR

4.3.2.1 Extracción de DNA genómico a partir de tejido sanguíneo

El DNA genómico de gato se aisló empleando la técnica DTAB-CTAB (70), desarrollada originalmente para bacterias por De Sal y cols. en 1989 (71). Por medio de este proceso se aisló DNA en cantidad suficiente para realizar los experimentos de amplificación.

En primer término, se llevó a cabo la **lisis y desnaturalización** del tejido sanguíneo en baño de agua a 68°C por 5 min. añadiendo para ello 600 µl del detergente catiónico DTAB al 8%, posteriormente se realizó un paso de **desproteínización**, añadiendo al mismo tubo, pero a temperatura ambiente, 900 µl de cloroformo. Se mezcló por inversión 3 veces y se centrifugó por 2 min a 10,000 rpm., se separó la fase acuosa y el DNA contenido en ella se **precipitó** selectivamente con 100 µl del detergente CTAB y 300µl de cloruro de sodio 0.4M. Se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 2 min, la pastilla se resuspendió en 750 µl de etanol al 100%, se centrifugó 10 min a 10,000 rpm, se lavó con 300µl de etanol al 70% , se secó en el SAVANT y finalmente se resuspendió en 300 µl de agua Milli-Q ultrapura.

El DNA genómico se cuantificó espectrofotométricamente y se determinó la relación de absorbancia 260/280 para establecer su calidad, además de verificar su integridad por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

4.3.2.2. Amplificación del promotor empleando oligonucleótidos consenso

Los oligonucleótidos que se emplearon para lograr la amplificación del promotor, fueron diseñados en la U.L.I.E.G., con la finalidad de poder aislar los promotores de los genes GH de mamíferos superiores. En la fig 6 se muestra su secuencia, además del sitio específico al cual se unen dentro del gen.

TABLA IV. COMPONENTES DE LA REACCION DE PCR:

(mezclar en un volumen final de 50 µl)

Agua Milli-Q	37.0 µl
DNA genómico(500ng/µl)	1.0 µl
Amortiguador de Rx 10x	5.0 µl
MgCl ₂ (25mM)	3.0 µl
dNTP's (10mM)	1.5 µ
oligo 5' (2.5µM)	1.1 µl
oligo 3' (2.5µM)	1.1 µl
Polimerasa taq (5.0 U/µl)	0.5 µl

A la mezcla de reacción anterior se le añadió 50 µl de aceite mineral, los tubos de reacción fueron colocados en el aparato termociclador y se sometieron al programa de amplificación de 30 ciclos, cada uno de los cuales abarcó 3 etapas: 1 min de **desnaturalización** a 94°C, 1 min de **apareamiento** a 58°C y 1 min de **extensión** a 72°C. El producto de la amplificación fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Iniciador 5'
5'-gaactgaattctaaattatcca!tagcac-3'

Iniciador 3'
5'-gtaagaagcitatcctgcagccat-3'

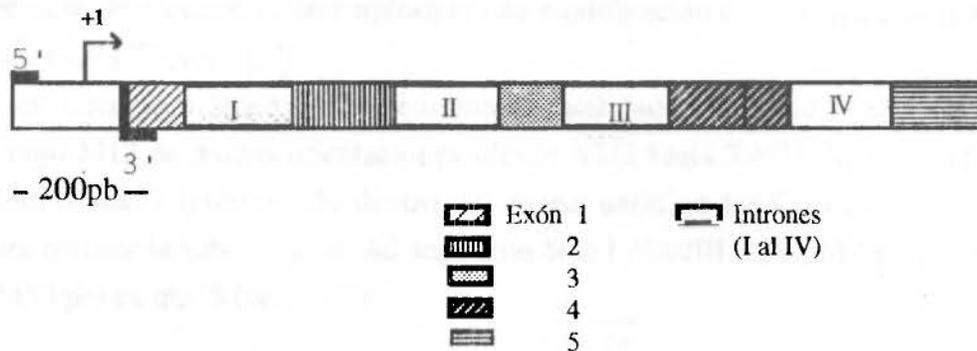


Figura 6. Oligonucleótidos consenso para promotor La secuencia del oiigo 5' corresponde a una región conservada, localizada a -140 pb del sitio de inicio de la transcripción de los genes de GHs, mientras que el iniciador 3' se aparea dentro de la unidad transcripcional, en los límites del primer intrón.

4.3.2.3. Clonación del producto amplificado en los vectores M13

Tanto el producto amplificado, como los vectores de clonación, fueron digeridos con las enzimas *EcoRI* y *Hind III*, para poder unir ambas moléculas en las posteriores reacciones de ligación que se llevaron a cabo. Los productos de las ligaciones se usaron para transformar células DH5 α F' calcio competentes, y las colonias resultantes de cada transformación se propagaron toda la noche a 37°C con agitación continua en 4ml de caldo 2YT. Mediante la técnica de minipreparación por lisis alcalina se obtuvo el DNA de los fagos en su forma replicativa y cada uno de ellos se caracterizó con endonucleasas de restricción diagnósticas (*EcoRI-Hin dIII*, *Sma I* y *Pvu II*) para establecer la presencia o ausencia del inserto de interés. Las clonas que resultaron positivas, se propagaron para preparar DNA de cadena sencilla, el cual se cuantificó espectrofotométricamente y se usó para realizar las reacciones de secuenciación.

4.3.3. SECUENCIACION DEL DNAc y DEL PROMOTOR POR EL METODO DE TERMINACION DE CADENA CON ddNTP's

La secuencia nucleotídica de cada una de las clonas seleccionadas, tanto las que contenían el DNAc, como las que tenían clonado el segmento correspondiente al promotor, fueron sometidas al proceso de secuenciación empleando una modificación a la técnica descrita por Sanger y cols. en 1977 (72)(ver fig 7).

Cabe mencionar aquí, que para leer con mayor facilidad la longitud total del DNAc clonado en el fago M13 en ambas orientaciones (desde ATG hasta TAG), se aprovechó la existencia del sitio *Sma* I (conservado dentro del cuarto exón en las GHs de mamíferos superiores), para realizar la subclonación del segmento *Sma* I-*Hind*III (200 pb) en mp19 y de *Sma* I-*Eco* RI (450 pb) en mp18 (ver Fig 8).

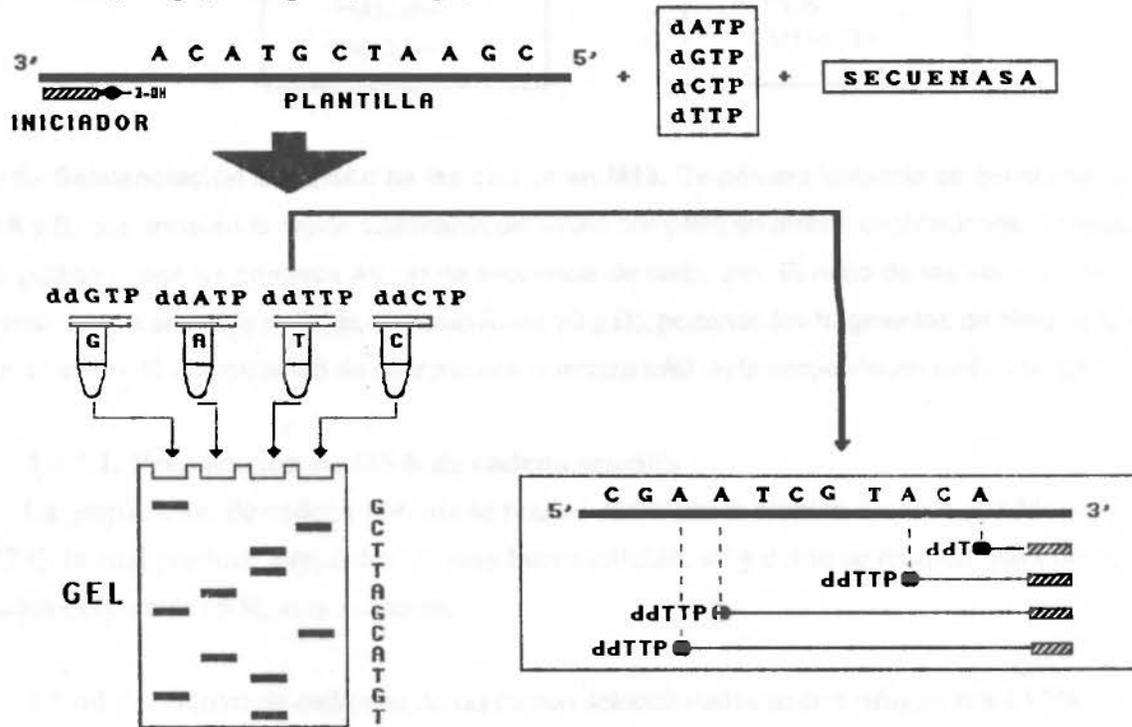


Figura 7. Reacción de secuenciación. Mediante un paso sencillo de **apareamiento** de los templados de cadena sencilla de cada una de las construcciones con el primer "M13 Universal" a 65°C; seguido de una etapa de **polimerización** de la cadena complementaria al templado usando la enzima "Secuenasa", la cual incorpora dNTP's [uno de los cuales se emplea marcado radiactivamente ($^{35}\text{SdATP}$)] y finalmente un paso de **terminación** de la polimerización mediante la adición de ddNTP's, fue que se leyó la secuencia de los fragmentos de interés. El producto de cada reacción (una para cada tipo de ddNTP) se resolvió por electroforesis en gel de poliacrilamida-urea al 8%. Se corrieron múltiples muestras a diferentes intervalos de tiempo con el propósito de leer de forma total la secuencia de los fragmentos clonados.

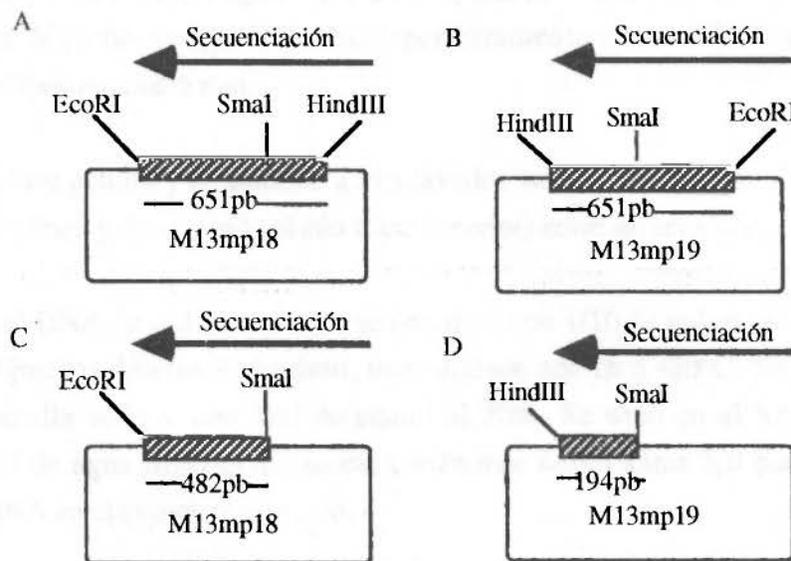


Figura 8.- Secuenciación del DNAC de las clonas en M13. De primera instancia se generaron las clonas A y B, que incluían la región codificante del DNAC completo en ambas orientaciones. En éstas solo se pudieron leer los primeros 480pb de secuencia de cada uno. El resto de las secuencias se obtuvieron de una segunda serie de construcciones (C y D), portando los fragmentos de *Sma* I a *Eco* RI y *Sma* I a *Hind*III, completando de esta manera la lectura total de la secuencia en ambas cadenas.

4.3.3.1. Preparación de DNA de cadena sencilla

La preparación de cadena sencilla se realizó mediante la técnica descrita por Messing y cols. (73), la cual produce templados de muy buena calidad, tal y como se requiere para obtener resultados excelentes en la secuenciación.

1. 1.5 ml del cultivo de cada una de las clonas seleccionadas se centrifugaron a 13,500 rpm durante 5 min. Se removió cuidadosamente el sobrenadante (rico en fagos en su forma filamentosa) y se usaron 50µl para infectar 4 ml de un cultivo de células DH5αF' incubándose por 5-8 h a 37°C en agitación continua. El resto del sobrenadante se almacenó a 4°C.
2. Una vez que los cultivos crecieron, se tomaron 1.3 ml de cada uno y se centrifugaron a las condiciones ya especificadas. Se retiró completamente el sobrenadante y los fagos contenidos en él fueron precipitados añadiendo 230µl de PEG al 30% (preparado en NaCl 1.8 M), mezclando por inversión y dejándose reposar por 30 min a temperatura ambiente.

3. Se centrifugó nuevamente durante 10 min a 13, 500 rpm, se removió el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 120µl de agua Milli-Q ultrapura, además de 60µl de fenol saturado con TE a pH 8.0 y 60µl de Sevag. Se mezcló perfectamente en el vórtex y centrifugó nuevamente a 13,500 rpm durante 5 min.

4. Se separó la fase acuosa y se sometió a tres lavados sucesivos con 1ml de eter-etílico, agitando 1 min en el vórtex y desechando el éter (fase superior) entre un lavado y otro.

5. Finalmente, el DNA de cadena sencilla, se precipitó con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, incubándose por 1h a -20°C. Se centrifugó a 13,500 rpm y la pastilla se lavó con 1ml de etanol al 70%. Se secó en el SAVANT y se resuspendió en 20µl de agua Milli-Q ultrapura, tomándose como antes 2µl para realizar la cuantificación del DNA en el espectrofotómetro.

4.3.3.2 Reacción de Secuenciación

Todos lo reactivos empleados en las tres etapas del proceso de secuenciación, forman parte del estuche "Sequenase 2.0" de USB (74).

a) Rx. de **apareamiento** entre el templado y el primer:

Mezclar:

1.0 µl de primer (M13 "Universal", 0.5 pmol/µl).

2.0 µl de amortiguador de reacción 5X (200mM de Tris-HCl pH 7.5, 100mM de MgCl₂ y 200mM de NaCl)

7.0 µl de DNA (aprox. 1µg)

Se incubó a 65°C por 2 min y se dejó enfriar lentamente hasta llegar a temperatura ambiente (aproximadamente en 30 min.).

b) Rx de **polimerización**: (La mezcla de todos los reactivos debe realizarse en hielo)

Se mezclaron los siguientes reactivos:

10.0 µl de templado-primer (reacción anterior)

1.0 µl de MgCl₂

1.0 µl de DTT 0.1 M

2.0 µl de la mezcla de nucleótidos 1X (diluída 1:5 en agua Milli-Q ultrapura)

1.0 µl de ³⁵SdATP (10.0 µCi)

2.0 µl de Sequenasa versión 2.0 (diluída 1:8 en buffer de dilución)*

Se homogenizaron perfectamente y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente.

* Adicionar siempre la enzima al final.

c) Rx de **terminación**:

4 tubos de 0.5 ml se marcaron como G, A, T, C, se les añadió a cada uno 2.5µl del ddNTP correspondiente y se incubaron 37°C*. Luego se distribuyeron 3.5 µl del contenido de la reacción de polimerización en cada uno de los cuatro tubos marcados con G, A,T y C (una vez que se retiran de su incubación a 37°C) y se mezcló perfectamente (hacer esto para cada reacción).

*Es conveniente preparar estos tubos en el tiempo en que se realiza la reacción de alineamiento para dar tiempo suficiente a que se precalienten a 37°C

Las reacciones se incubaron por 10 min a 37°C para permitir la incorporación de los terminadores en todas aquellas cadenas polimerizadas en la reacción anterior. En seguida se añadieron 4µl de solución "stop" (95% formamida/20mM de EDTA/0.05% de azul de bromofenol/0.05% de xilencianol) a cada tubo de terminación. Finalmente se procedió a calentar las muestras a 80°C durante 2 min antes de aplicar 3-5 µl en cada uno de los carriles del gel (debe prepararse por lo menos con 1 h de anticipación).

Preparación del gel de poliacrilamida al 8%:

Se preparó la mezcla siguiente:

- 70 ml de acrilamida-bisacrilamida al 20% (
- 48 ml de urea 7.7 M (urea grado secuenciación, disuelta en TBE 1X)
- 680 µl de PSA 10% (persulfato de amonio)
- 80 µl de TEMED

Los reactivos perfectamente homogenizados, se vertieron en el molde formado por 2 placas de vidrio previamente lavadas y desengrasadas y se esperó a que polimerizara (aproximadamente 15 min).

4.3.3.3. Análisis computacional

La secuencia nucleotídica leída a partir de las autorradiografías, se analizó mediante el programa DNA Strider1.1 con el cual se construyeron mapas de restricción y se tradujo la secuencia del DNAC de FCGH a aminoácidos.

Mediante el empleo del programa Clustal (vía internet), se obtuvieron los porcentajes de similitud existentes entre FCGH con otras GHs de mamíferos ya reportadas y en base a los resultados, inferir relaciones evolutivas entre las especies.

Finalmente se usó el programa Insigth, mediante el cual se produjeron una serie de estructuras tridimensionales de GH, empleando para ello las coordenadas cristalográficas de la GH bovina, las cuales se encuentran depositadas en el Banco de proteínas de Brookhaeven y a las cuales se tiene acceso a través de Mosaic.

4.3.4. SINTESIS DE FCGH EN *Escherichia coli*

4.3.4.1 Subclonación del DNAc *FCGH* en el vector pMALc

Dado que el DNAc de *FCGH* fue amplificado por PCR usando el mismo par de iniciadores que el de *CFGH* (clonado previamente en la ULIEG), su subclonación en pMALc simplemente consistió en "sacar" (como en un mecanismo de cassette) con *Xho* I y *Hind*III, el DNAc de *CFGH* de pMALc-*CFGH* y sustituirlo por el "cassette" del DNAc de *FCGH*, previamente recuperado también con *Xho* I y *Hind* III del vector M13 (ver fig 9).

EL producto de las digestiones se ligó en el mismo tubo de reacción (a un volumen final de 20 μ l), sin previa purificación de fragmentos, e incubando a 16°C por 8 h y posteriormente se transformaron bacterias (*Escherichia coli*, cepa TB1) calcio competentes.

Se levantaron 20 colonias a partir de la caja de transformación, se dejaron crecer toda la noche en caldo 2YT y se realizó extracción de ADN plasmídico por minipreparación por lisis alcalina. Se caracterizó enzimáticamente cada una de las 20 clonas con enzimas de restricción diagnósticas (*Xho* I-*Hin* dIII, *Eco*RI-*Hin* dIII, *Sma* I y *Afl* II) que nos permitieron establecer cuales de ellas contenían inserto, y de éstas, cuales eran las que contenían el DNAc correspondiente a *FCGH*. El producto de las digestiones se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

4.3.4.2. Síntesis de FCGHr como proteína de fusión.

La clona seleccionada para los ensayos de expresión fue inoculada y crecida en 4 ml de caldo 2YT con ampicilina (10 mg/ml) por 16 h a 37°C en agitación continua. Se tomaron 500 μ l de este cultivo y se inocularon en 4 ml de caldo 2YT fresco. Se dejó crecer a una D.O. de 0.5 a 600nm, se añadió al tubo 40 μ l de IPTG 0.1M y se incubó a 37°C en agitación continua durante 3 h, al final de lo cual se midió nuevamente la A a la misma longitud de onda y se procedió a realizar el análisis de la síntesis de la proteína recombinante en gel de poliacrilamida-SDS. (Fig. 10).

Es importante mencionar que como testigo positivo de inducción se usó una clona bacteriana que contenía el plásmido pBHx (donado por el Dr Daniel Baty del CNRS en Marsella, Francia), dentro de cuya secuencia se encuentra el DNAc que codifica para la HGHr de 22kDa. Conjuntamente con los ensayos de inducción, se procesaron duplicados de éstos, además de testigos negativos, los cuales consistieron de células con el plásmido de interés y con las secuencias codificantes para la FCGH y HGH, pero sin ser sometidas a inducción con IPTG 0.1M.

Todos los parámetros que se usaron en los ensayos de expresión provienen de resultados previamente obtenidos con la expresión de GH humana y bovina en el trabajo realizado por Martínez Torres en la ULIEG (75), usando el mismo sistema de expresión.

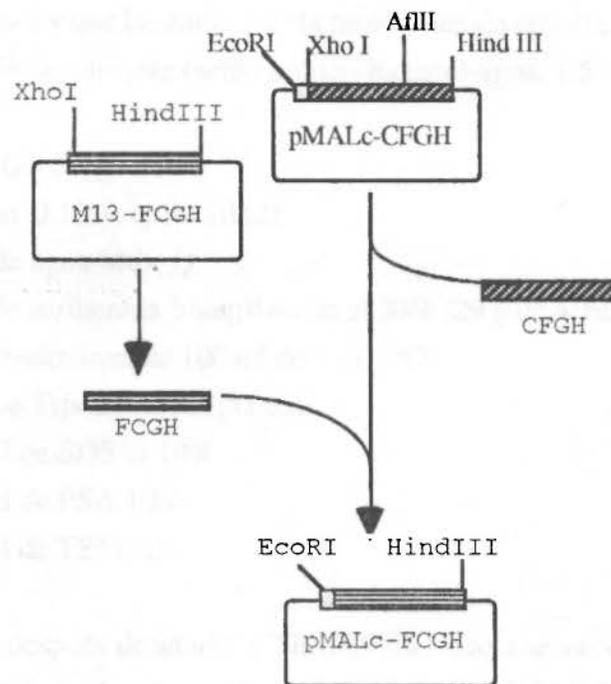


Figura 9. Estrategia para subclonar el DNAc de FCGH en el vector pMALc. Esta construcción se facilitó grandemente al disponer de pMALc-CFGH. El ADNc de CFGH se insertó reemplazando al de CFGH y la proteína recombinante derivada de éste quedó fusionada a la proteína de unión a maltosa.

4.3.4.3. Detección de la proteína de fusión empleando electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

A partir de cada uno de los cultivos inducidos y sin inducir, se tomó 1 ml de caldo, se centrifugó a 13,500 rpm., se recuperó el paquete celular y se resuspendió en amortiguador de muestra (Tris-HCl 50mM, pH 6.8/ β -mercaptoetanol 5%/ SDS 2%/azul de bromofenol 0.1%/glicerol 10%). Las muestras se calentaron a ebullición durante 5 min y se aplicaron 30 μ l de cada una de ellas en los carriles de un gel de poliacrilamida-SDS en gradiente, al 12 y 5%. Se empleó buffer de electroforesis 1X (Tris 0.25M/glicina 2.0M/SDS 1%) para realizar la electroforesis por 2 h, iniciando a 80v y aumentando luego a 100v, cuando las muestras salieron del gel concentrador (5%) y entraron al de resolución (12%).

Posteriormente, el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie (0.25% en solución decolorante) por media hora y se colocó por medio hora más (o hasta que la poliacrilamida esté lo suficientemente incolora y que las bandas de la proteína unida con el colorante sean fácilmente distinguibles) en solución decolorante (ácido acético-metanol-agua, 1:5:4).

Preparación del gel PAGE-SDS:

Gel de resolución al 12%: (para 10ml)

- 3.3 ml de agua Milli-Q
- 4.0 ml de acrilamida-bisacrilamida al 30% (29 g de acrilamida/1 g de N, N metilén-bisacrilamida/ 100 ml de TBE 1X)
- 2.5 ml de Tris:Cl 1.5M (pH 8.8)
- 0.100 μ l de SDS al 10%
- 0.100 μ l de PSA 10%
- 0.004 μ l de TEMED

Inmediatamente después de añadir el TEMED, la mezcla se vació entre las dos placas de vidrio perfectamente limpias y desengrasados, cubriendo hasta el 80% de su capacidad.

Gel concentrador al 5%: (para 3 ml)

- 2.1 ml de agua Milli-Q
- 0.5 ml de acrilamida-bisacrilamida al 30%
- 0.380 ml de Tris:Cl 1.0M (pH 6.8)
- 0.030 ml de SDS 10%
- 0.030 ml de PSA 10%
- 0.003 ml de TEMED

Una vez polimerizado el gel de resolución al 12%, se procedió a verter la poliacrilamida para el gel concentrador encima del primero y cubriendo ahora el total de la superficie. Enseguida se colocó el peine y se esperó hasta su total polimerización.

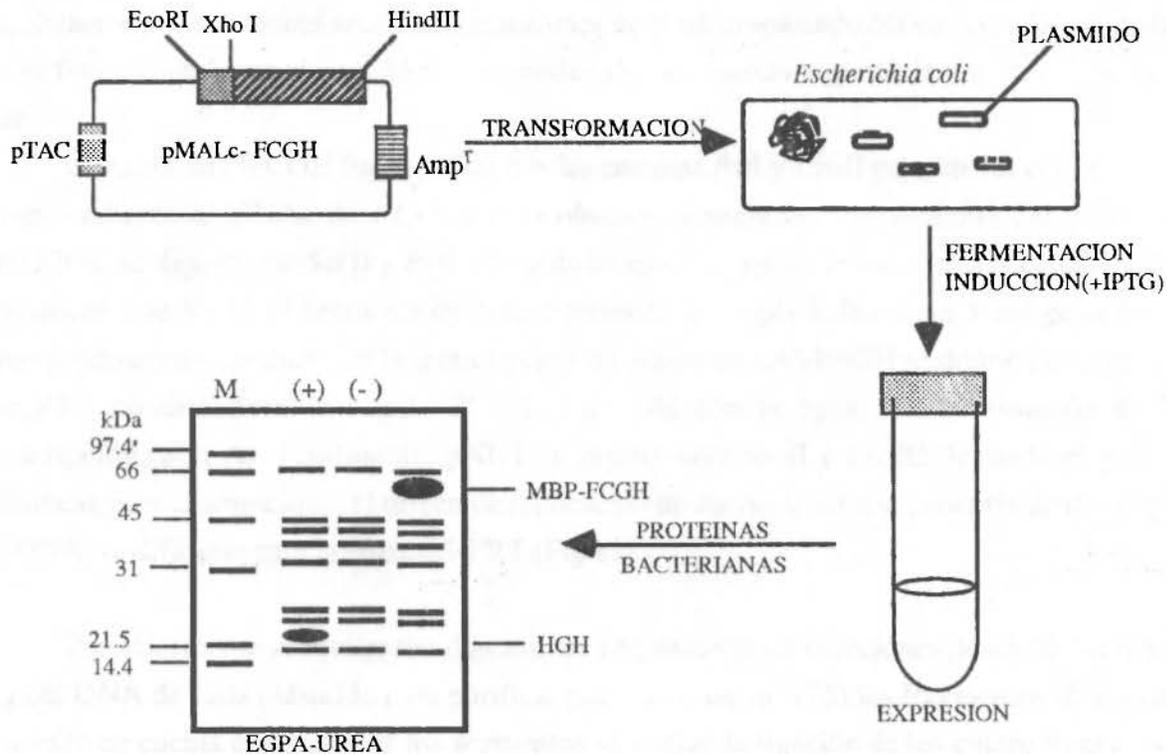


Figura 10. Estrategia general de inducción y análisis de la expresión. Se transformaron bacterias *Escherichia coli* cepa TB1, calcio competentes con la construcción pMALc-FCGH. Una vez obtenidas las clonas, se fermentaron en matraz para crecerlas y se las indujo con isopropil- β -tiogalactósido-piranososa para fomentar la síntesis de FCGH como proteína de fusión con MBP. Dicha proteína fusionada se logró detectar en geles desnaturalizantes de poliacrilamida teñidos con azul brillante de Coomassie, en los que también se corrieron testigos positivos (+), testigos negativos (-) y marcadores de peso molecular (M).

4.3.5. PRODUCCION DE FCGH EN CELULAS COS-7

4.3.5.1. Construcción del vector pNUTFCGH

El primer paso para lograr "ensamblar" todos los elementos necesarios para construir el minigen FCGH que quedaría finalmente unido al vector de expresión pNUT, consistió en realizar la caracterización enzimática de los plásmidos pNUT20k, pAVEhGH y pNUT mediante la realización de digestiones analíticas (reacciones de 10 μ l, empleando 500ng de cada plásmido) con el fin de corroborar el tamaño y la identidad de los insertos a purificar y posteriormente a ligar.

El vector M13FCGH fue digerido con las enzimas *Pst*I y *Pvu*II para liberar el fragmento correspondiente al DNAC de *FCGH*. Para obtener el segmento proveniente del plásmido pNUT20K, se digirió con *Sac*II y *Pst*I, llevando en este fragmento la secuencia del potenciador ("enhancer") de SV40, el promotor de la metalotioneína y 78pb de la región 5' del gen hPL-3, conteniendo el sitio de inicio de la transcripción. El plásmido pAVEhGH se digirió con *Pvu* II y *Eco* RI, obteniéndose la región 3' del gen hGH con la señal de terminación de la transcripción.(poli A). Finalmente, pNUT se digirió con *Sac*II y *Eco*RI llevando el gen de resistencia para la ampicilina, el origen de replicación de *Escherichia coli*, además de una copia del DNAC codificante para la enzima HPRT.(Fig 11).

Posteriormente se realizaron digestiones preparativas en reacciones de 25 μ l, cortando 3 μ g del DNA de cada plásmido para purificar por "Gene clean" (76) los fragmentos de interés. Tomando en cuenta el tamaño de los segmentos se realizó la ligación de los cuatro fragmentos en una reacción de 20 μ l, incubando por 8h a 16°C y empleando 40U de T4 ligasa. Con la quinta parte de esta reacción se transformaron bacterias DH5 α calcio competentes. Se levantaron 20 colonias a partir de la placa de transformación y se realizó extracción de ADN plasmídico a partir del cultivo de cada una de las colonias. Posteriormente se realizaron caracterizaciones enzimáticas empleando endonucleasas de restricción diagnósticas (*Eco*RI-*Bam*HI,*Pvu* II y *Sma* I) y se lograron identificar 2 clonas portadoras del plásmido pNUTFCGH. Finalmente se realizó la purificación del mismo por gradiente en cloruro de cesio (77), además de someterse al mismo proceso los plásmidos empleados como testigos, con el fin de obtener DNA de calidad excepcional para los posteriores ensayos de transfección.

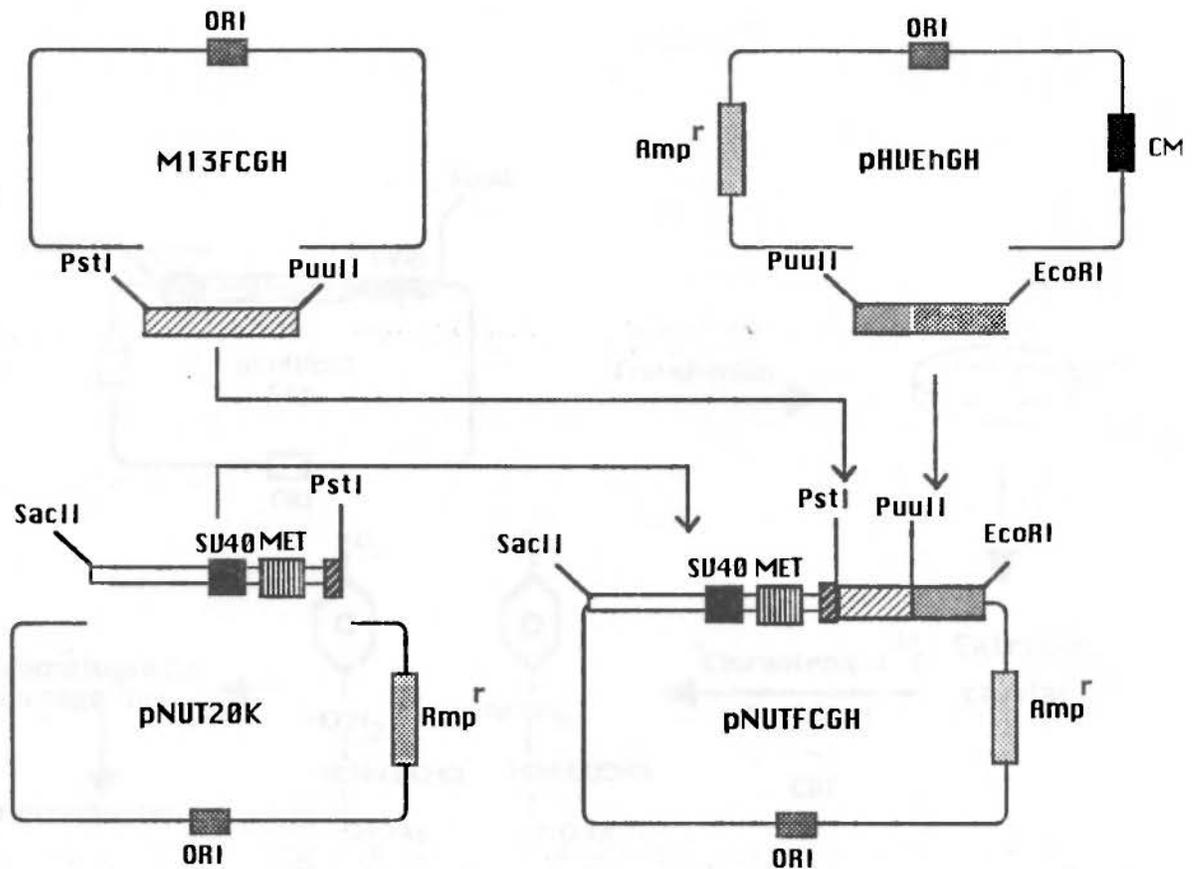


Figura. 11. Construcción de pNUTFCGH. En este diagrama se esquematizan los principales pasos de clonación efectuados para llegar a ensamblar el minigen FCGH con los fragmentos indicados, en el vector pNUT.

4.3.5.2. ENSAYOS DE TRANSFECCION EN CELULAS COS-7

Las células COS-7 empleadas para los ensayos de transfección fueron cultivadas en cajas de 33mm con 2 ml de medio D-MEM suplementado con 5% de SBF y ampicilina (100.µg/ml), manteniéndose en incubación a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

Tanto el plásmido **pNUTFCGH**, como los plásmidos **pNUT22K** [testigo (+) de expresión], **pNUT_hPL-3** [testigo (-) de expresión] y **pNUT** [testigo (-) total], fueron co-transfectados con el plásmido **pCMVcat**, con la finalidad de poder determinar mediante un ensayo indirecto [en el cual se valora la actividad para la enzima cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT)] (78) la eficiencia de transfección en las células COS-7 (ver fig 12).

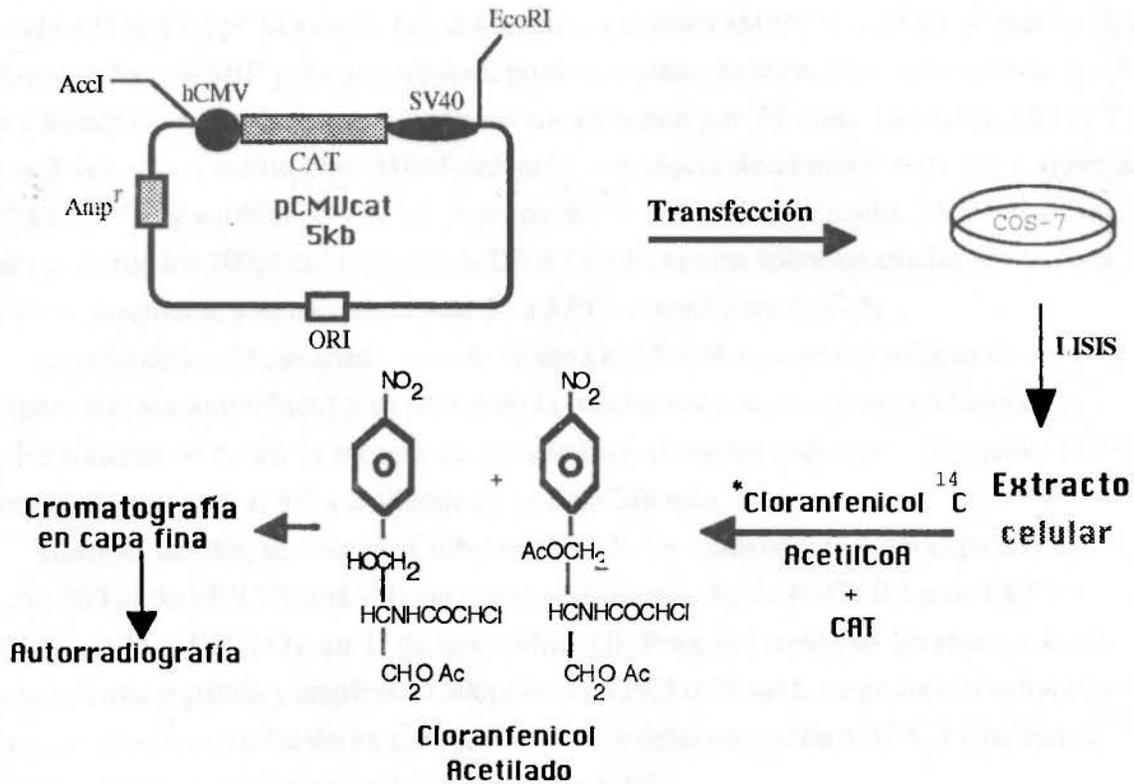


Figura 12. Ensayo CAT. El plásmido pCMVcat tiene incluido dentro de su secuencia el DNAc que codifica para la enzima cloranfenicol-acetil-transferasa. De tal manera que al introducirlo en células COS-7, es posible detectar la producción y actividad de la enzima CAT, si se la libera del citoplasma (donde se almacena) mediante lisis celular y se le pone en contacto con Cloranfenicol (sustrato) y Acetil-CoA (donador de grupos acetilo). Tomando en cuenta que el cloranfenicol se usa marcado radiactivamente con ^{14}C , al resolver las formas acetiladas por cromatografía en capa fina, es posible hacer luego una autorradiografía de las mismas.

A continuación se describe el procedimiento empleado para ensayos de expresión transitoria en células en monocapa, empleando el reactivo LIPOFECTAMINE de la compañía Gibco-BRL (79): Se diluyeron (en 2 tubos Eppendorf por separado) 1µg de DNA (0.5µg del plásmido de interés y 0.5µg de pCMVcat) y 6µl del reactivo LIPOFECTAMINE* en 100µl de medio Opti-MEM-reducido (sin SBF y sin antibiótico), posteriormente, se mezcló el contenido de los dos tubos y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 min. Las células COS-7 se lavaron 3 veces con medio Opti-MEM-reducido con objeto de eliminar toda traza de medio DMEM con SBF y antibiótico y se les dejó con 800µl del medio reducido. Después de los 30 min se agregaron los 200µl de la mezcla de DNA-Lipofectamina sobre las células recién lavadas, se mezcló suavemente y se incubó durante 5h a 37°C en atmósfera de CO₂.

Al cabo de las 5 h, se añadió 1ml de medio Opti-MEM adicionado solamente con SBF al 10% (pero aún sin antibiótico) y se prosiguió la incubación a las mismas condiciones por 24h más. Finalmente se retiró la mezcla sustituyéndose el medio reducido con medio DMEM suplementado con SBF al 5% y antibiótico y se dejó 24h más.

Después de 48h, se colectó el sobrenadante de los cultivos y la monocapa de células se lavó con 500 µl de PBS 1X (pH 7.4) sin calcio y magnesio (8g de NaCl/ 0.2 g de KC/ 1.44 g de Na₂HPO₄/ 0.24 g KH₂PO₄/ en 1l de agua Milli-Q). Posteriormente se levantaron mediante raspado con una espátula y empleando 500µl de Tris-HCl 0.25 mM, luego fueron sometidas a 3 ciclos sucesivos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 37°C y finalmente 10µl de cada extracto se usaron para realizar los ensayos CAT.

*La cantidad de lipofectamina empleada para los ensayos de transfección, se determinó mediante la realización de experimentos previos en los cuales se compararon 1, 2, 3, 6, 9 y 12 µl, observándose mayor cantidad de producto acetilado (tomando como referencia los ensayos CAT) y mayor cantidad de proteína recombinante (cuantificada por ELISA), con 6 µl del reactivo. Se mantuvieron constantes los siguientes parámetros:

Cantidad de DNA. 1µg (0.5 µg del plásmido de interés y 0.5 µg del plásmido con el gen de referencia.

Número de células. siempre se partió de 3x10⁵ céls. y un 80% de confluencia para cajas de 33 mm.

Tiempo de incubación sin suero y sin antibiótico. 5 h

Tiempo de incubación con los complejos DNA-lipofectamina. 24 h

Medio de cultivo: D-MEM completo, para llevar las células hasta confluencia

Opti-MEM reducido, sin suero y sin antibiótico para incubar 5 h con la mezcla DNA-lipofectamina.

Opti-MEM reducido con SBF al 10%, pero sin antibiótico para proseguir la incubación con la mezcla por 24 h más.

D-MEM completo, hasta terminar la transfección a las 48h.

4.3.5.3. Análisis de la expresión por ELISA Y ELISPOT

Se realizaron ensayos de ELISA tipo "sandwich" empleando el sistema comercial de la compañía Gibco-BRL, el cual se basa en el método desarrollado por Alam y Cook (80). Para preparar las muestras de la curva de calibración se realizaron 7 diluciones sucesivas en medio D-MEM (de 1:2 hasta 1:16), comenzando por añadir 50µl del estándar hGH(500ng/µl) en 450µl de medio. Para realizar el ELISA de cada muestra, se añadieron primeramente, 100µl de cada una de las diluciones de la curva y de cada una de las muestras problema (sobrenadantes sin diluir), en los pocillos de la placa para ELISA y se incubaron por 30 min a 37°C. Posteriormente se realizaron 5 lavados con amortiguador de lavado 2X y se añadió enseguida, 200µl del primer anticuerpo(anti-hGH creado en ratón), incubándose nuevamente por 30 min a 37°C. Se aplicó amortiguador de lavado 5 veces y se incubó de igual manera con 200µl del segundo anticuerpo (conjugado con peroxidasa), después de lo cual se lavó nuevamente 5 veces y se incubó por 30 min con 200µl del sustrato OPD a temperatura ambiente. Finalmente se añadieron 100µl de Ácido sulfúrico 2N y se leyó la absorbancia de cada muestra en el lector de ELISAS a 492nm.

Mediante el empleo del programa Microsoft Excel, se realizó el análisis de los datos y se construyó una curva de puntos x, y. Las concentraciones de las muestras problemas de calcularon en base al r^2 obtenido.

Por otro lado, se realizaron ensayos tipo "ELISPOT" [según la técnica descrita por Monroe (81)] empleando HGH, como testigo (+), con el fin de lograr establecer la identidad de cada una de las proteínas recombinantes producidas por las células COS-7 y secretadas al medio de cultivo.

Las proteínas presentes en 1 ml del sobrenadante de cada una de las transfecciones, se precipitaron con 3 volúmenes de acetona por 12 h a -20°C. Estas proteínas precipitadas, se fijaron a la membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de vacío, empleando para ello, el aparato para dot-blot.. Posteriormente, la membrana de nitrocelulosa se puso en contacto con la solución de bloqueo (leche sveltex al 5% en TBST) por 2h con agitación suave a 4°C. Luego, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con solución TBST y se procedió a poner en contacto la membrana con el primer anticuerpo, anti-bGH, seguido de la incubación por 2 h más con un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (anti-conejo, obtenido en cabra). lavando 3 veces con TBST entre uno y otro Ac. Por último se realizó el revelado mediante la reacción de coloración que se desarrolla añadiendo NBT y BCIP como sustratos para la enzima.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Clonación molecular del DNAC de *FCGH*

a) Extracción de RNA a partir de hipófisis de gato

A partir de los 600 mg de tejido hipofisiario recolectado, se recuperaron 50 μ g de RNA. Una alícuota de este RNA recién extraído, se analizó en un gel de agarosa-formaldehído-MOPS al 1%, lográndose visualizar perfectamente las 3 subunidades correspondientes a los RNAs ribosomales (dado que éstos son los más abundantes en la célula)(ver fig. 13), Otra alícuota se usó para determinar su calidad, inferida por la relación de absorbancia espectrofotométrica 260/280, la cual fue de 1.8 (se considera buena entre 1.8 y 2.0).

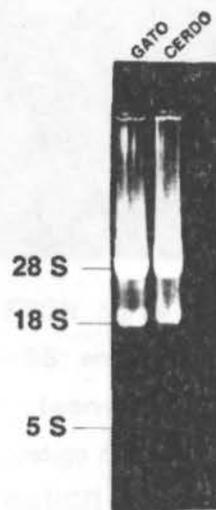


Figura 13. Perfil electroforético de RNAs extraídos de hipófisis. 5 μ g de RNA de gato y una cantidad igual de RNA de cerdo [testigo (+)] se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa-formaldehído-MOPS al 1%. Se lograron visualizar bajo la luz ultravioleta las 3 bandas correspondientes a las subunidades 28S, 18S y 5S de los RNAs ribosomales, se tomó ésto como indicio de que el material se recuperó en buenas condiciones; además de que no se observaron fragmentos de degradación en la parte inferior de los carriles del gel.

b) Síntesis y amplificación del DNAc

Se emplearon 2.5µg de RNA para realizar la reacción de transcripción reversa mediante la cual se sintetizó la cadena complementaria a los mensajeros extraídos de hipófisis. Posteriormente, usando el par de oligonucleótidos consensos (descritos en materiales y métodos) y 1/10 de la reacción de RT, se amplificó selectivamente un fragmento de aproximadamente 700 pb, correspondiente al DNAc de *FCGH* (ver fig 14). Esta banda se esperaba, suponiendo que el RNAm de la GH de gato tuviera la longitud semejante a los DNacs de GHs de mamíferos, para los cuales fueron diseñados los iniciadores.

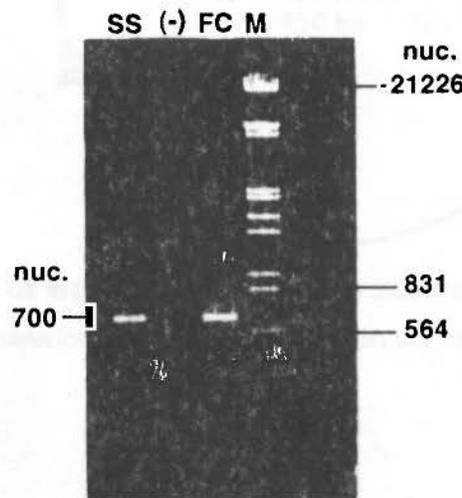


Figura 14. Amplificación del DNAc de *FCGH*. 5µl de la reacción de PCR practicado con los DNacs de hipófisis del gato (**FC**) y del cerdo (**SS**; empleado como testigo positivo), se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, observándose claramente en ambos carriles las bandas de amplificación de 700 pb. **(-)**, indica el testigo negativo de amplificación, el cual contiene todos los reactivos empleados para la reacción de PCR excepto DNA; **M**; corresponde al marcador de peso molecular (DNA del fago λ, digerido con *Eco* RI y *Hind* III).

c) Clonación del producto amplificado en los vectores M13

Se seleccionaron y caracterizaron con enzimas de restricción 20 colonias blancas obtenidas a partir de la transformación de bacterias calcio competentes con los productos de cada una de las ligaciones (el producto amplificado, unido a M13mp18 y a mp19)(Fig 15). 5 clonas recombinantes de cada vector que liberaron el fragmento de 700 pb cuando se digirieron con *Eco* RI y *Hind* III, se eligieron para preparar DNA de cadena sencilla y determinar la secuencia a sus insertos.

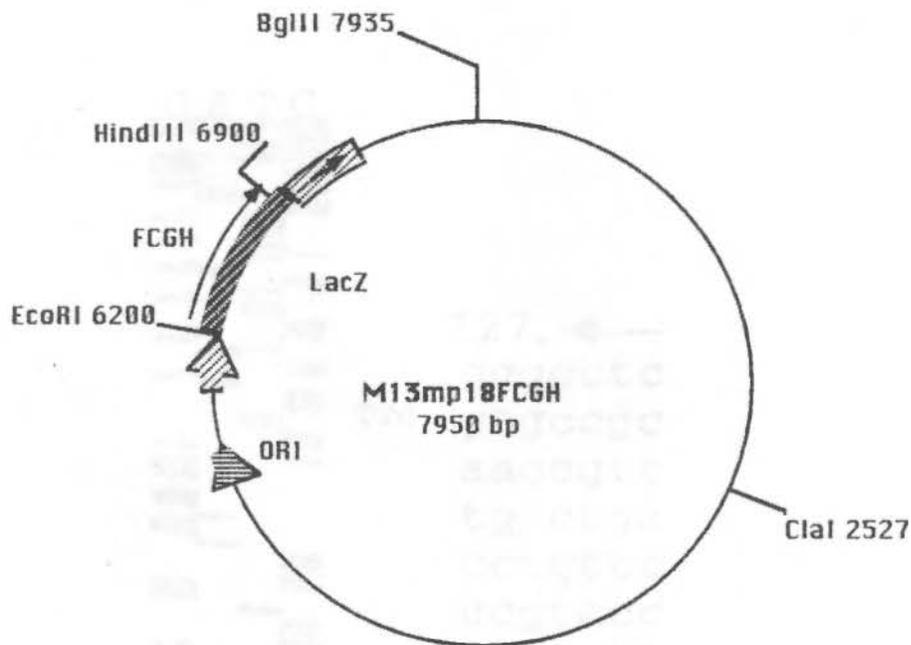


Figura 15. Mapa de restricción de M13FCGH. En la figura se muestra el mapa de la construcción del DNAc en M13mp18. En la construcción en mp19 la orientación del fragmento clonado va de *HindIII* (6200) a *EcoRI* (6700).

d) Secuencia nucleotídica del DNAc

La secuencia completa del DNAc [desde el codón de iniciación (ATG), pasando por el de terminación (TAG) e inclusive abarcando la cola de poli A se leyó en ambas orientaciones a partir de por lo menos 3 clonas distintas, con la finalidad de identificar la secuencia real y distinguirla de mutaciones y artificios que pudieran haber sido generados durante el proceso de amplificación y/o clonación. En la siguiente serie de figuras (16,17,18, y 19), se muestran las autorradiografías obtenidas de los diferentes geles de poliacrilamida-urea al 8%, en los cuales fueron resueltos los productos de las reacciones de secuenciación y a partir de donde se leyó la secuencia nucleotídica. Las dos primeras figuras corresponden a fragmentos clonados en M13mp19 y las últimas dos a fragmentos en M13mp18.

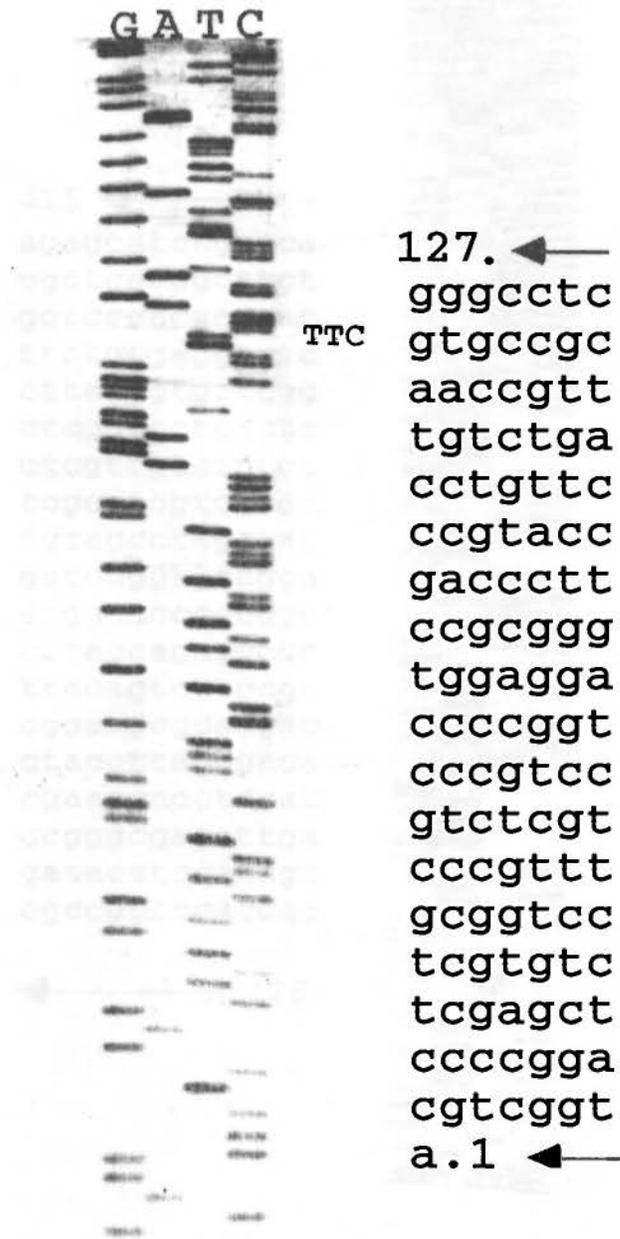


Figura 16. Secuencia del DNAc de FCGH del nucleótido 1 al 127.

En esta figura se muestran dos sitios importantes dentro de la secuencia del DNA complementario; uno de ellos es el codón de iniciación, señalado en la parte inferior de la figura como "ATG" y el otro es el codón "TTC" que se traduce a fenilalanina, la cual es el primer residuo aminoacídico de la GH madura. La región que abarca desde el codón de iniciación hasta uno antes del ttc, corresponde a los nucleótidos que codifican para los 26 aminoácidos que forman el péptido señal o líder de la hormona.

GATC

415 ←

agagcatctggcca
 ggctcacggcttgt
 ggtccgacaaccac
 ttctgggaggactc
 cttaacgtgccggg
 ctcggtgctgacta
 ctcgtcgtctctct
 tcgcctcgtcgaga
 tgcagcctagagac
 gacccggagcagga
 acggcacccccggc
 cctaccagaggctc
 ttccagtcttccgt
 cggacgcgcaagac
 ctaccttatggaga
 cgaaggccctacat
 gcgggcgagtttga
 gaaacatccacagc
 cgccggttgaccac

← 128

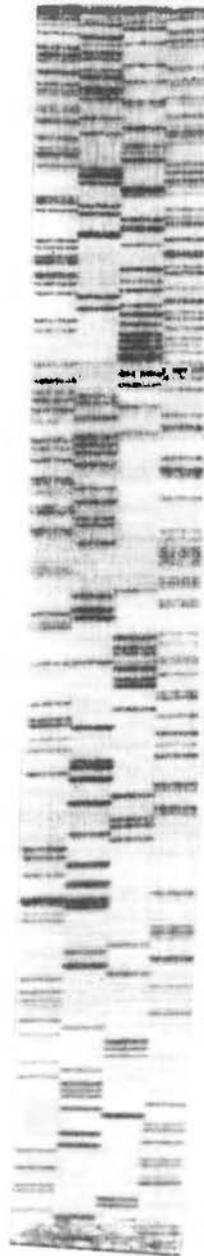


Figura 17. Secuencia del DNAC de *FCGH* del nucleótido 128 al 415.

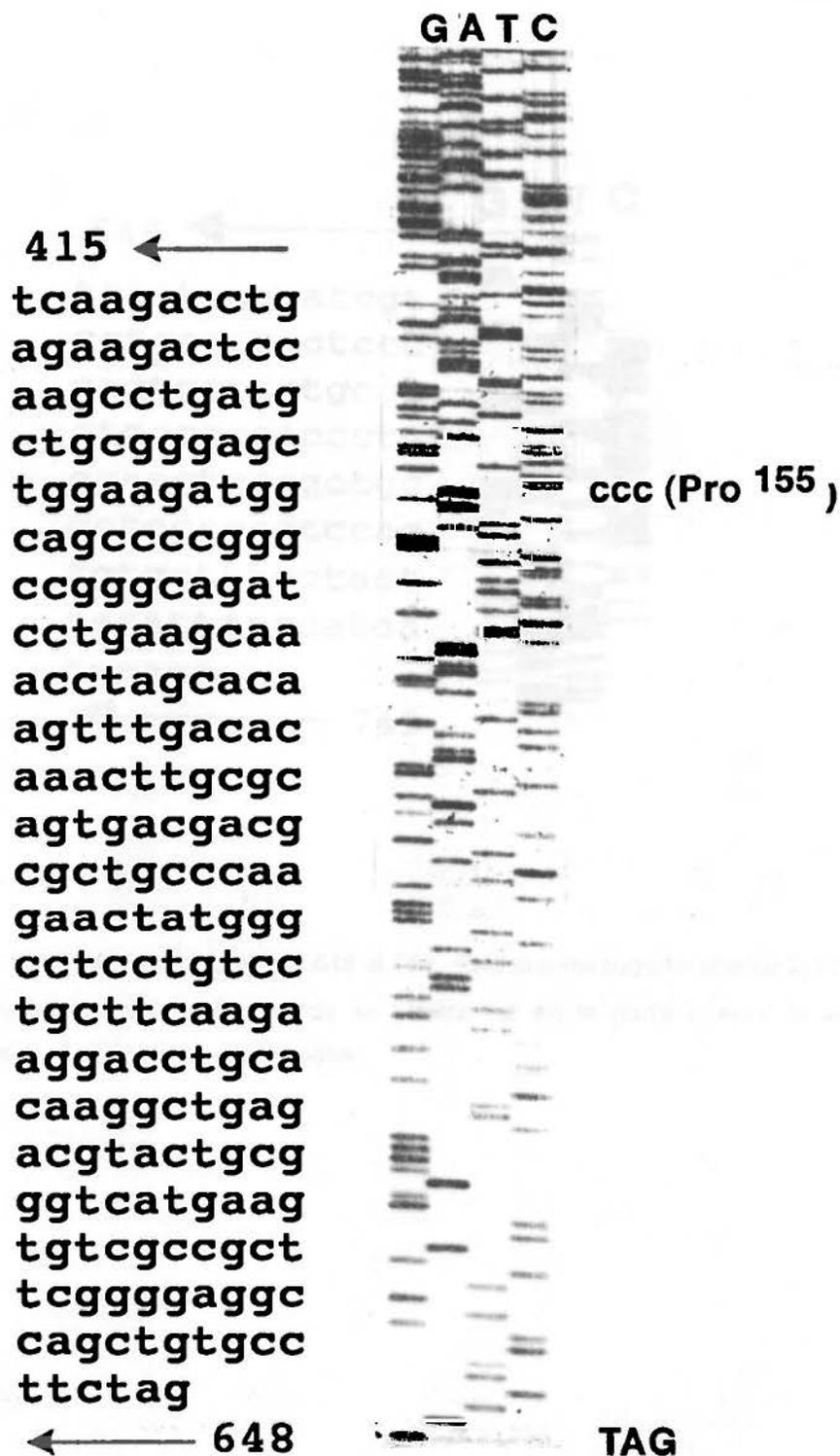


Figura 18. Secuencia del DNAC de *FCGH* del nucleótido 415 al 648. En esta figura se muestra la autorradiografía, en la cual se puede apreciar perfectamente el codón de terminación (TAG), y el trinucleótido CCC de la posición 479, cuya traducción es un residuo prolina (155), mismo que constituye la única diferencia amonoacídica entre *FCGH* y *CFGH*.



Figura 19. Secuencia del DNAC del nucleótido 649 ai 749. Esta autorradiografía abarca la secuencia de la región 3' no-traducible del DNAC, donde se puede ver en la parte inferior la señal de poliadenilación (aataaa) y el inicio de la cola de poliA.

e) Características del DNAc y de la proteína codificada por éste

De los 749 pb que se leyeron, 78 codifican para el péptido líder (26 aminoácidos del extremo amino-terminal), 570 comprenden la secuencia de la proteína madura de 190 aminoácidos (excepto los últimos 3 nucleótidos que codifican para el codón de terminación) y 101 nucleótidos forman la región 3' no-traducible (fig 20).

```

***          10          20          30          40          50
1  ATGGCTGCAGGCCCGGACCTCTGTGCTCCTGGCGTTTGCCCTGCTCTGCCTGCCC
58 TGGCCCCAGGAGGTGGGCGCCTTCCCAGCCATGCCCTTGTCAGTCTGTTTGCCAAC
115 GCCGTGCTCCGGGCCAGCACCTGCACCAGTTGGCCGCCGACACCTACAAAGAGTTT
172 GAGCGGGCGTACATCCCGGAGGGACAGAGGTATTCCATCCAGAACCGCGCAGGCTGCC
229 TTCTGCTTCTCGGAGACCATCCCAGCCCCACGGGCAAGGACGAGGCCAGCAGAGA
286 TCCGACGTAGAGCTGCTCCGCTTCTCTGCTGCTCATCCAGTCGTGGCTCGGGCCC
343 GTGCAATTCCTCAGCAGGGTCTTACCAACAGCCTGGTGTTCGGCACCTCGGACCGG
400 GTCTACGAGAAGCTCAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCAAGCCCTGATGCGGGAGCTG
457 GAAGATGGCAGCCCCCGGGCCGGCAGATCCTGAAGCAAACCTACGACAAGTTTGAC
514 ACAAACTTGCGCAGTGACGACGCGCTGCCAAGAACTATGGGCTCCTGTCCTGCTTC
571 AAGAAGGACCTGCACAAGGCTGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGTCGCCGCTTC
628 GTGGAGAGCAGCTGCGCCTTCTAG
***
652 TTGCTGGGCATCGTGGTCAGCCCCTCCCCAGTGCCTCTGCCTCCCCCAACCCTGGGA
709 AGTGCCGCTGCGCTCCAGGGTCCACTGTGCTTTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCAT
766 AAAAAA

```

Figura 20. Secuencia nucleotídica del DNAc de FCGH. Los codones del péptido señal se muestran subrayados. Los codones de iniciación (ATG) y terminación (TAG) se destacan con tres asteriscos, mientras que la región 3' no-traducible se muestra un renglón abajo de éste último. Al final de la misma se resalta subrayada la señal de poliadenilación.

La secuencia nucleotídica del DNAc se analizó mediante el programa DNA Strider 1.1 (82), el cual permitió identificar los sitios de restricción únicos y característicos de las hormonas del crecimiento [(*Pst* I (5), *Sma* I (470) y *Pvu* II (636)](ver fig. 21).

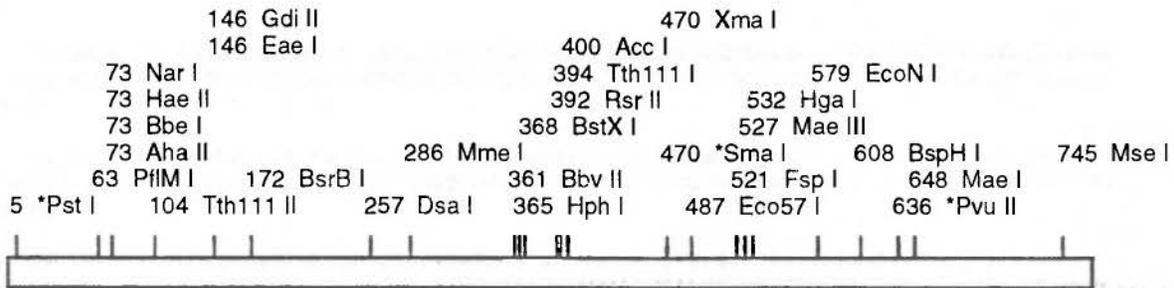


Figura 21. Mapa de restricción del DNAC de *FCGH*. En este diagrama se muestran solamente los sitios de restricción únicos localizados mediante el programa computacional DNA Strider 1.1, dentro del fragmento de 749 pb.

Ahora bien, la comparación de las secuencias nucleotídica del DNAC de *FCGH* con las de las GHs ya existentes en los bancos de genes y proteínas (empleando el programa Clustal, vía Internet)(83), permitió identificar similitudes y diferencias. Particularmente evidente resultó la similitud encontrada entre los DNACs de las GHs del gato y del perro (98.5%). Aunque se puede observar un buen número de diferencias nucleotídicas (35 cambios), la mayoría de las veces corresponden a cambios que ocurren a nivel de la segunda y última base del codón y no son suficientes para provocar cambios aminoacídicos, a excepción de la posición 155, en donde cambia Prolina (en gato) por Leucina (en perro) (ver fig. 22).

En la tabla V, se muestran los porcentajes de similitud aminoacídica encontrados entre *FCGH* y otras GHs de especies relacionadas, poniéndose de manifiesto claramente el alto grado de conservación existente entre esta hormona y la de carnívoros como el perro, visón y el zorro del ártico (cánidos). Por desgracia, aún no existe ninguna otra especie de la familia Felidae, con la cual establecer comparaciones.

-26 MetAlaAlaGlyProArgThrSerValLeuLeuAlaPheAlaLeuLeuCysLeuProTrpProGlnGluValGlyAla
 Gato ATGGCTGCAGGCCCTCGAGCTCTGTGCTCCTGGCGTTTGCCTGCTCTGCCTGCCCTGGCCCCAGGAGGTGGGCGCC
 Perro CG C C T T

+1 PheProAlaMetProLeuSerSerLeuPheAlaAsnAlaValLeuArgAlaGlnHisLeuHisGlnLeuAlaAlaAsp
 Gato TTCCAGCCATGCCCTTGTCCAGTCTGTTTGCCAACGCCGTCTCCGGGCCAGCACCTGCACCAGTTGGCCGCCGAC
 Perro G C C T

27 ThrTyrLysGluPheGluArgAlaTyrIleProGluGlyGlnArgTyrSerIleGlnAsnAlaGlnAlaAlaPheCys
 Gato ACCTACAAAGAGTTTGAGCGGGCGTACATCCCGGAGGACAGAGGTATCCATCCAGAACGCCAGGCTGCCTTCTGC
 Perro C C C

44 PheSerGluThrIleProAlaProThrGlyLysAspGluAlaGlnGlnArgSerAspValGluLeuLeuArgPheSer
 Gato TTCTCGGAGACCATCCCGGCCCCACGGGCAAGGACGAGGCCAGCAGAGATCCGACGTAGAGCTGCCTCCGCTTCTCT
 Perro C G C

67 LeuLeuLeuIleGlnSerTrpLeuGlyProValGlnPheLeuSerArgValPheThrAsnSerLeuValPheGlyThr
 Gato CTGTGCTCATCCAGTCTGGCTCGGGCCCGTGCAATTCCTCAGCAGGGTCTTCACCAACAGCCTGGTGTTCGGCACC
 Perro G T A

90 SerAspArgValTyrGluLysLeuLysAspLeuGluGluGlyIleGlnAlaLeuMetArgGluLeuGluAspGlySer
 Gato TCGGACCGGGTCTACGAGAAGCTCAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCAAGCCCTGATGCGGGAGCTGCAAGATGGCAGC
 Perro A T

113 ProArgAlaGlyGlnIleLeuLysGlnThrTyrAspLysPheAspThrAsnLeuArgSerAspAspAlaLeuProLys
 Gato CCCC GGCCGGG CAGATCCTGAAGCAAACCTACGACAAGTTTGACACAAACTTGGCGAGTGACGACCGCGCTGCCAAG
 Perro G C TT G T C

136 AsnTyrGlyLeuLeuSerCysPheLysLysAspLeuHisLysAlaGluThrTyrLeuArgValMetLysCysArgArg
 Gato AACTATGGGCTCCTGTCTGCTTCAAGAAGGACCTGCACAAGGCTGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGTGGCCGC
 Perro G C A T C A

182 PheValGluSerSerCysAlaPhe***
 Gato TTCGTGGAGAGCAGCTGCGCCTTCTAG
 Perro T

Figura 22. Comparación de la secuencia nucleotídica de FCGH con la CFGH. Se muestran las diferencias nucleotídicas existentes entre la región codificante del DNAc de FCGH, con las correspondientes de la GH de perro. En la posición 155 se muestra en "negritas" la única diferencia aminoacídica existente entre FCGH y CFGH.

TABLA V. PORCENTAJE DE SIMILITUD AMINOACIDICA ENTRE FCGH Y GHs DE ESPECIES RELACIONADAS

PERRO	99.4
VISON	98.9
ZORRO DEL ARTICO	98.4

De acuerdo con el resultado de las comparaciones nucleotídicas y amonoacídicas, es lógico deducir que las familias Felidae y Canidae tuvieron un origen común dentro de un mismo orden en la escala evolutiva, dada la alta similitud que se puede observar entre las GHs de estos dos grupos de organismos. Esto concuerda con los estudios paleontológicos y morfológicos aportados por diversos grupos de investigación, que ubican la separación del orden carnívora hace 40-50 millones de años y dentro del cual el gato y el perro (como especies) se estima que sólo difieren en orden de aparición en 0.5 millones de años. (84) (ver fig.23).

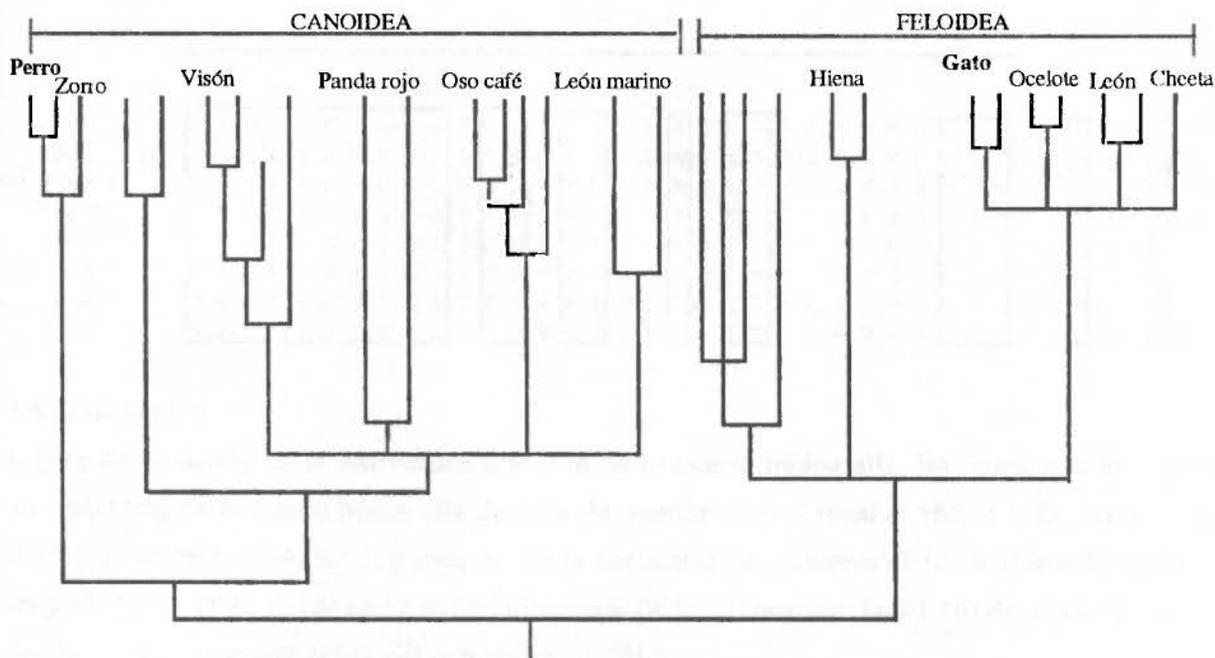


Fig 23. Arbol filogenético de carnívoros. Mediante este diagrama generado a partir de los resultados aportados por datos paleontológicos y morfológicos, se puede visualizar claramente la estrecha relación encontrada entre las secuencias de las GHs del gato, perro, zorro y visón, agrupados todos en el orden carnívora, dentro del cual los dos primeros, encabezan las familias Felidae y Canidae (Tomado de Wayne, 1993).

Por otra parte, resultó de particular interés la presencia del residuo de prolina en la posición 155, no sólo por el hecho de que es, como ya se mencionó, la única diferencia entre FCGH y CFGH, sino además porque es la primera vez que se observa diferencia en esta posición entre las GHs de mamíferos reportadas hasta ahora (ver fig 24) y porque este cambio se presenta dentro de la cuarta hélice alfa de la proteína (ver fig 25), la cual interviene en la interacción de la hormona con el receptor (85).

A pesar de que la posición 155 está situada en el extremo izquierdo de la cuarta hélice alfa, es posible que se produzca algún tipo de modificación en su estructura, tal y como en el caso de la prolina 89, la cual produce el doblez a mitad de la hélice 2. Aún así, es factible que esta modificación aminoacídica pudiera traer como consecuencia la alteración de la unión de FCGH con su receptor.

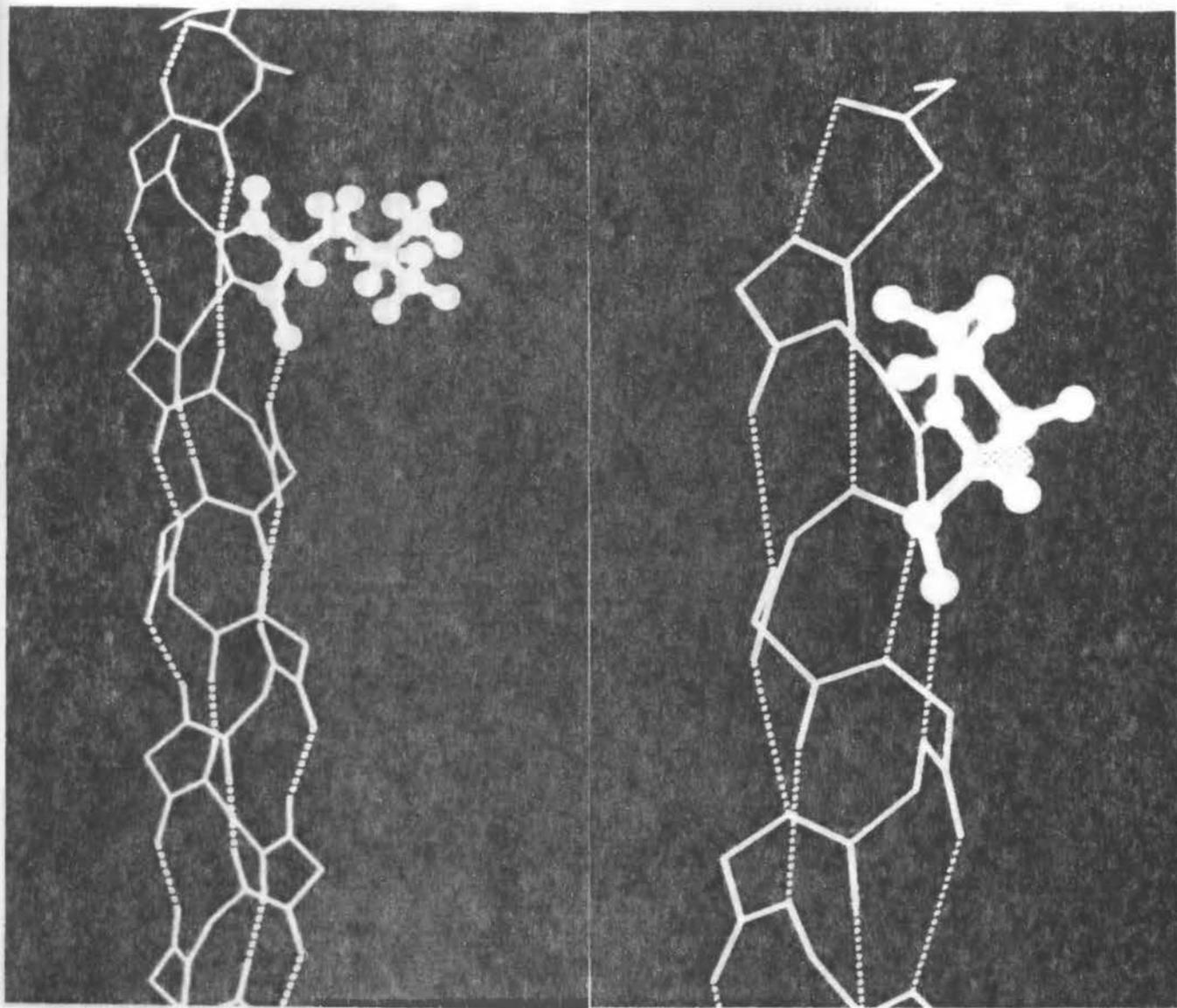
HELICE 4

	*	160	170	180	190																																		
PGH	D	A	L	L	K	N	Y	G	L	L	S	C	F	K	K	D	L	H	K	A	E	T	Y	L	R	V	M	K	C	R	F	F	V	E	S	S	C	A	F
BGH	D	A	L	L	K	N	Y	G	L	L	S	C	F	R	K	D	L	H	K	T	E	T	Y	L	R	V	M	K	C	R	F	F	G	E	A	S	C	A	F
OGH	D	A	L	L	K	N	Y	G	L	L	S	C	F	R	K	D	L	H	K	T	E	T	Y	L	R	V	M	K	C	R	F	F	G	H	A	S	C	A	F
hoGH	D	A	L	L	K	N	Y	G	L	L	S	C	F	K	K	D	L	H	K	A	E	T	Y	L	R	V	M	K	C	R	F	F	V	E	S	S	C	A	F
RGH	D	A	L	L	K	N	Y	G	L	L	S	C	F	K	K	D	L	H	K	A	E	T	Y	L	R	V	M	K	C	R	F	F	A	E	S	S	C	A	F
HGH	D	A	L	L	K	N	Y	G	L	L	Y	C	F	R	K	D	M	D	K	V	E	T	F	L	R	I	V	O	C	R	.	S	V	E	G	S	C	G	F
MGH	D	A	L	L	K	N	Y	G	L	L	Y	C	F	R	K	D	M	D	K	I	E	T	F	L	R	I	V	O	C	R	.	S	V	E	G	S	C	G	F
AGH	D	A	L	L	K	N	Y	G	L	L	S	C	F	K	K	D	L	H	K	V	E	T	Y	L	K	V	M	K	C	R	F	F	G	E	S	N	.	T	I

* Aminoácido 155

Figura 24. Análisis de la estructura primaria de la cuarta hélice alfa. Se muestra la secuencia aminoacídica de la cuarta hélice alfa de GHs de mamíferos (del residuo 152 al 182), indicándose dentro de un rectángulo las regiones donde la secuencia se conserva al 100% (Tomada de Adel-Meguid, 1987). PGH, GH de cerdo; BGH, GH de vaca; OGH, GH de oveja; hoGH, GH de caballo; RGH, GH de rata; HGH; GH humana; MGH; GH de mono; AGH, GH aviaria.

A)



B)

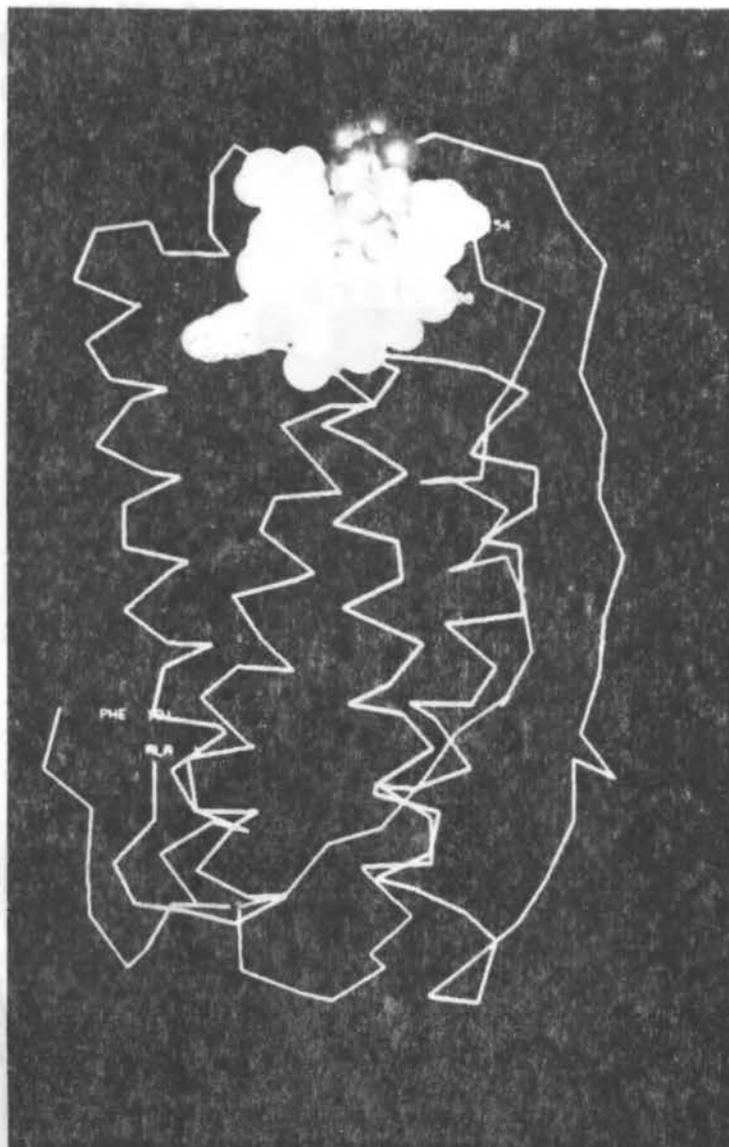


Fig 25. Análisis de la estructura terciaria de la proteína. Mediante el uso del programa computacional Insigh, empelado para el modelaje de la estructura tridimensional de moléculas y tomando como base las coordenadas cristalográficas de la bGH [depositada en el banco "Brookhaeven protein 3D Structure" o PDB con la clave de acceso 1BST) y la asistencia del Dr Alfredo Jacobo Molina, se lograron generar una serie de imágenes en las cuales se reemplazó la leucina de la posición 155, por un residuo de prolina. **A)** En las dos primeras figuras se muestra la orientación de la Leu y Pro dentro de la helice 4, observándose claramente que a pesar del cambio de residuo, no se produce ningún cambio en el patrón de puentes de hirógeno con los átomos localizados a su alrededor. **B)** En la tercer figura se muestra la ubicación y el acomodo que toma la prolina y los residuos con los cuales tiene contacto.

5.2 Promotor

A partir de 500 ng del DNA genómico extraído de células sanguíneas, se amplificó por PCR un fragmento de aproximadamente 200 pb correspondiente al promotor del gen (ver fig. 26).

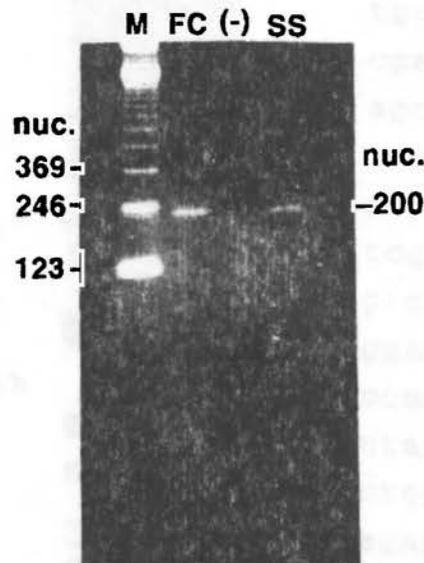


Figura 26. Producto amplificado del promotor del gen *FCGH*. 1/10 del volumen de los productos de la PCR con los oligonucleótidos consensos, pero en este caso para promotores de genes GHs de mamíferos y empleando DNA genómico como sustrato, fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%. **FC**; producto amplificado del promotor de gato, **SS**; producto amplificado del promotor de cerdo [testigo positivo] , **(-)**; Testigo negativo de amplificación y **M** (marcador de peso molecular).

Con el producto de las ligaciones realizadas entre el fragmento amplificado con ambos vectores M13, se transformaron células DH5 α F' calcio-competentes. A partir de las placas de crecimiento lento, se seleccionaron y se caracterizaron 18 colonias blancas. 5 de ellas, que liberaron el fragmento de 200pb al ser digeridas con *Eco* RI y *Hind*III, se seleccionaron para preparar DNA de cadena sencilla para secuenciación.

Dado que el fragmento clonado es pequeño (191 pb), fue posible leer toda la secuencia nucleotídica de cada una de las dos hebras de DNA, a partir de una sola autorradiografía. Sin embargo, con el objetivo de corroborar la secuencia correcta del fragmento, se obtuvieron autorradiografías de la secuencia de 5 clonas independientes. En la fig. 27, se muestra la secuencia nucleotídica leída a partir de una de ellas.

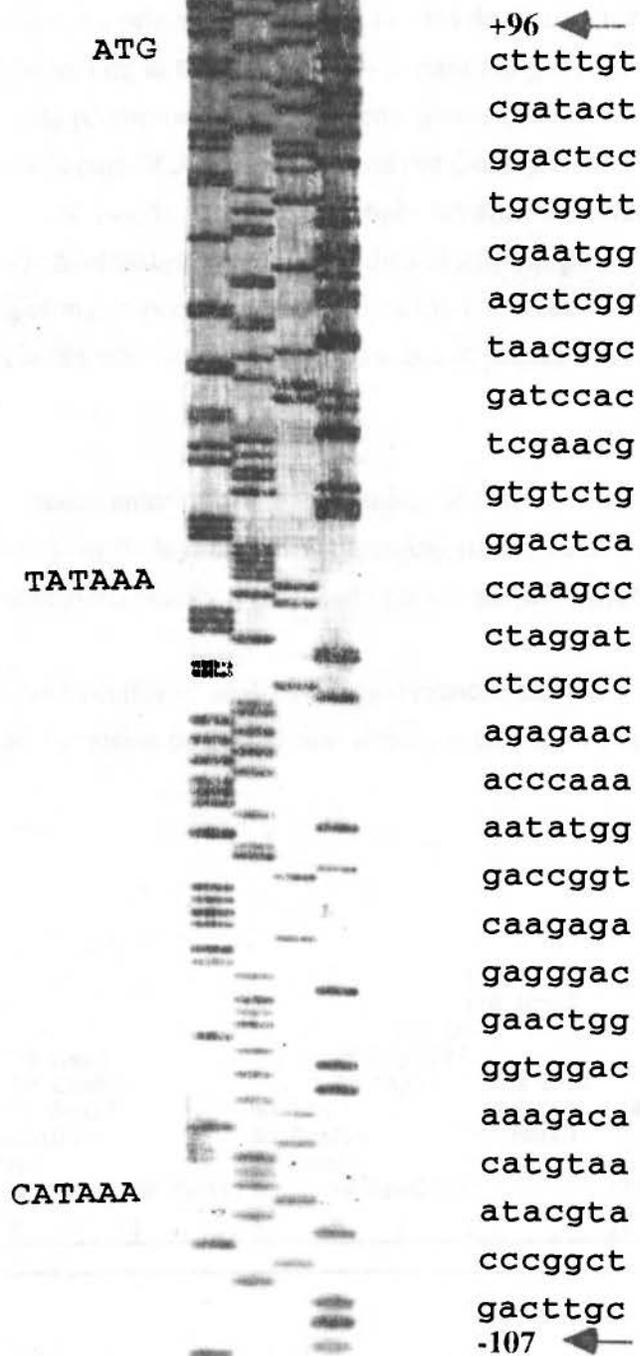


Figura 27. Secuencia nucleotídica del promotor del gen de la *FCGH*. Se indica en la parte inferior de la figura el sitio que ocupa la caja "CAT" dentro de la secuencia. Señalada en la región central se muestra la caja "TATA". Finalmente, el trinucleótido ATG, primer codón de la secuencia que codifica para la pre-hormona.

Dentro de la secuencia de 191pb , se identificaron y situaron cuatro elementos estructurales importantes. El primero de ellos es el sitio de restricción para la enzima **BamHI**, que señala el sitio de inicio de la transcripción (+1) para los genes GHs. El segundo es la caja "TATA", situada en este promotor a -30pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (+1). Otro elemento es la caja "CAT" identificada por Chen y cols.(93) como parte esencial de los promotores GH (se le puede localizar a -86pb del sitio de inicio de la transcripción) y finalmente, la secuencia 5'-ataaatgtgcac-3', que indica el sitio **pit proximal**, al cual reconoce y se une el factor transcripcional específico de hipófisis Pit-1. Desafortunadamente, no fue posible corroborar la secuencia del sitio pit distal, debido a que el primer 5' se alinea justo en esa región dentro del promotor.

Además de los datos anteriormente mostrados, se corroboró la secuencia de los primeros nucleótidos del péptido líder de la hormona (atggetgcaggt), los cuales se habían leído solamente como parte de la secuencia del primer 5' empleado para la amplificación del DNAc.

La secuencia nucleotídica se analizó de igual manera, mediante el programa DNA Strider 1.1. y se identificaron los sitios de restricción únicos y distintivos de este fragmento clonado (ver fig 28).

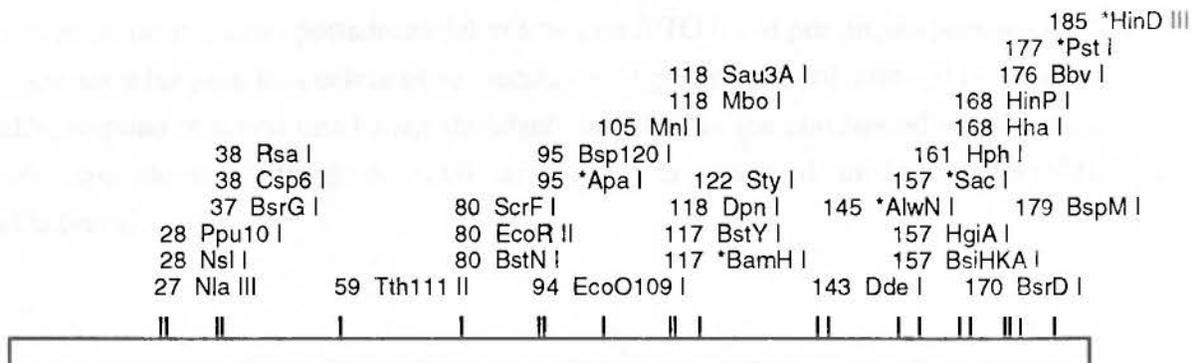


Figura. 28. Mapa gráfico de los sitios de restricción del promotor. Se muestran los sitios de restricción únicos dentro de la secuencia, destacando los sitios *NsiI*, *RsaI*, *Apal* y *BamHI*, característicos de los promotres de genes GH.

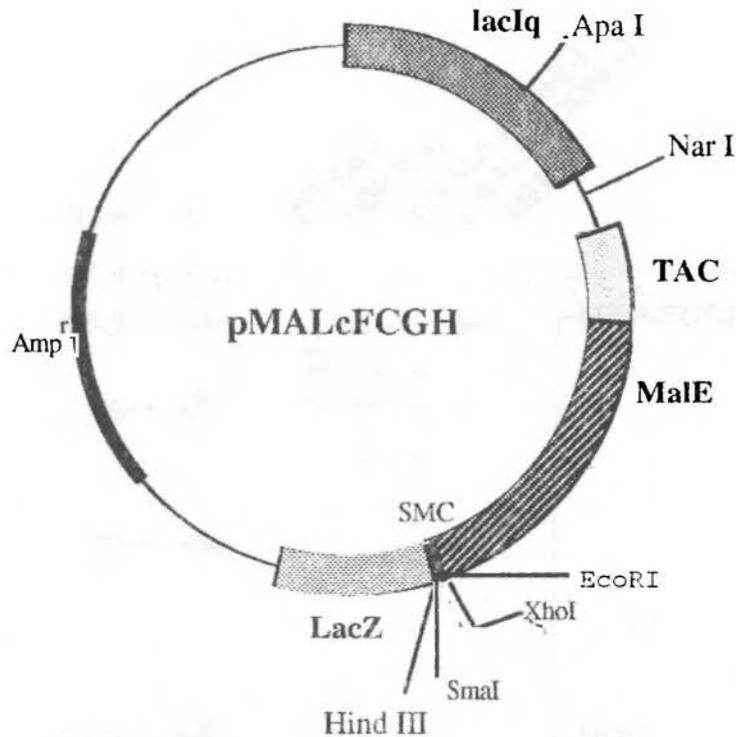
5.3 Síntesis de FCGHr

a) En *Escherichia coli*

Las colonias bacterianas que crecieron en las placas de LB con ampicilina, después de realizar la transformación de células competentes con los productos de la ligación hecha entre los productos de la digestión de pMALcCFGH y M13FCGH, se procesaron para realizar extracción de DNA genómico y poder caracterizar cada una de ellas con endonucleasas de restricción diagnósticas. La primera caracterización se realizó mediante cortes enzimáticos con *XhoI* y *HindIII*, lo cual nos permitió identificar de primera instancia las clonas portadoras del plásmido de interés, independientemente de si el inserto clonado era CFGH o FCGH. Las clonas que liberaron el inserto de 700pb, se sometieron luego a digestión con la enzima *AflII*, la cual solo está presente en el DNAC de la hormona del crecimiento canino, pero ausente en la del gato. De esta manera, 2 clonas que sí liberaron el fragmento pero que no fueron digeridas con la enzima *AflII*, fueron seleccionadas y usadas posteriormente para realizar los ensayos de inducción y síntesis de la proteína recombinante. En la fig 29 se muestra el mapa de restricción del plásmido portador del DNAC de *FCGH* y el análisis electroforético de la caracterización enzimática del mismo.

Una vez que se estableció la identidad del plásmido, se realizaron los ensayos de inducción de las bacterias portadoras del mismo con IPTG 0.1M por 3h, después se cosecharon las bacterias y las proteínas celulares se analizaron en gel de poliacrilamida-SDS. A la altura de 66 kDa, se pudo observar una banda abundante de proteína que correspondía perfectamente al tamaño esperado para la fusión de FCGH de 22 kDa y la proteína de unión a maltosa (MBP) de 44 kDa (ver fig 30).

A)



B)

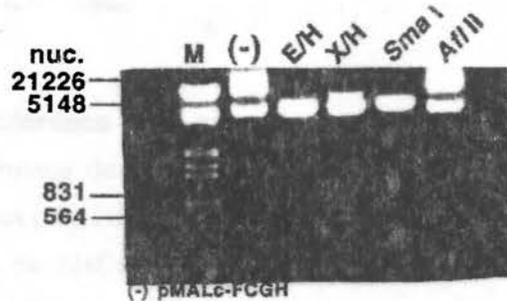


Figura 29. Mapa de restricción y caracterización enzimática de pMALcFCGH. A) Se esquematiza la ubicación de los sitios de restricción mas importantes dentro de la secuencia del plásmido, y la posición que ocupa el DNAc, dentro de su secuencia. B) El primer carril corresponde al patrón electroforético del marcador de peso molecular (fago λ , cortado con *EcoRI-HindIII*). En el carril dos se muestra el testigo (-) de digestión (el plásmido pMALcFCGH superenrollado). Este plásmido al ser digerido con *EcoRI* y *HindIII*, que son sitios localizados en los extremos del DNAc clonado, produce la liberación de un fragmento de 700 pb, tal y como se observa en el carril 3. En el cuarto carril se muestra la liberación de un fragmento de 680 pb, producto de la digestión del plásmido recombinante con *XhoI* (situado corriente abajo de *EcoRI*) y *HindIII*. Enseguida (quinto carril), se observa la linearización del plásmido al ser cortado con *SmaI*, presente en la posición 470 dentro de la secuencia del DNAc y finalmente la digestión con *AflII*, cuyo sitio de reconocimiento no presenta el plásmido ni el inserto clonado en él, pero sí el DNAc de CFGH.

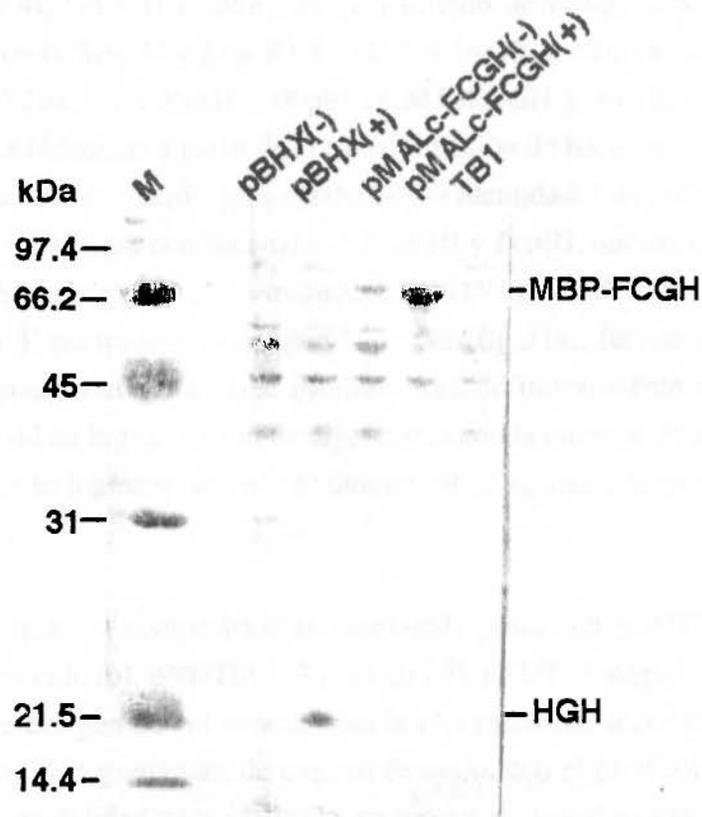


Figura 30. Análisis electroforético de la expresión de FCGH en fusión con MBP. En el primer carril se muestran los extractos de las células bacterianas portadoras del plásmido pBHx que contiene el DNAC que codifica para HGH, sin inducir (-) e inducidas (+). La banda de dicha proteína se puede observar a la altura de 22kDa en la muestra inducida que sirvió como testigo positivo de expresión. En los dos carriles siguientes se pueden ver los extractos de la clona bacteriana portadora del plásmido pMALc FCGH sin inducir e inducida, pudiéndose apreciar en el último claramente la presencia de la proteína de fusión FCGH-MBP a la altura de 66kDa. Por último se muestra el extracto celular total de la bacteria TB1 sin plásmido alguno.

b) En células COS-7

El plásmido pNUTFCGH (7.5kb), es el resultado de la ligación del vector pNUT cortado con las enzimas *Sac* II y *Eco* RI (3.2kb) y los fragmentos *Sac*II-*Pst*I (1.3kb) proveniente de pNUT20k, *Pst*I-*Pvu*II (700pb) de M13FCGH y *Pvu*II-*Eco* RI (643pb) de pAVEhGH. Las clonas obtenidas a partir de la transformación de bacterias competentes fueron analizadas con enzimas de restricción, para establecer su identidad. Las clonas que liberaron el inserto de 1.3 kb al ser digeridas con las enzimas *Bam* HI y *Eco*RI, que corresponde al tamaño del "minigen" portador de la región 5' no-traducible del DNAC de hPL-3, la región codificante de FCGH y la región 3' no traducible del gen hGH (ver fig 31a), fueron seleccionadas para realizar dos cortes enzimáticos más, que establecieran definitivamente su identidad. Esta caracterización consistió en la realización de digestiones con la enzimas *Pvu*II y *Sma*I. (ver fig 31b), a partir de donde se lograron identificar únicamente 3 clonas bacterianas portadoras del plásmido de interés.

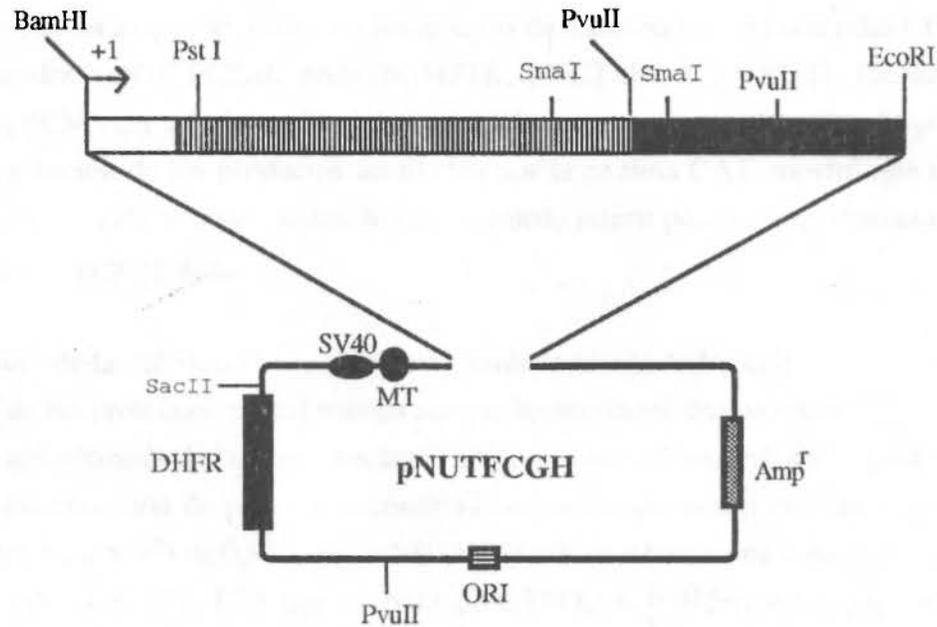
pNUTFCGH (una vez comprobada su identidad), junto con pNUT22k [testigo (+) de expresión en células en cultivo], pNUThPL-3 [testigo (-)], pNUT [testigo (-) total] y pCMVcat (plásmido codificante del gen de referencia para la cloranfenicol acetil transferasa), fueron sometidos a purificación en gradientes de cloruro de cesio, con el propósito de obtener DNA plasmídico de excelente calidad para realizar los ensayos de transfección. En la tabla VI, se muestran los resultados de pureza y rendimiento de los 5 plásmidos.

**TABLA.VI. RESULTADOS DE LA PURIFICACION DE
LOS PLASMIDOS EN GRADIENTE DE CLORURO DE CESIO**

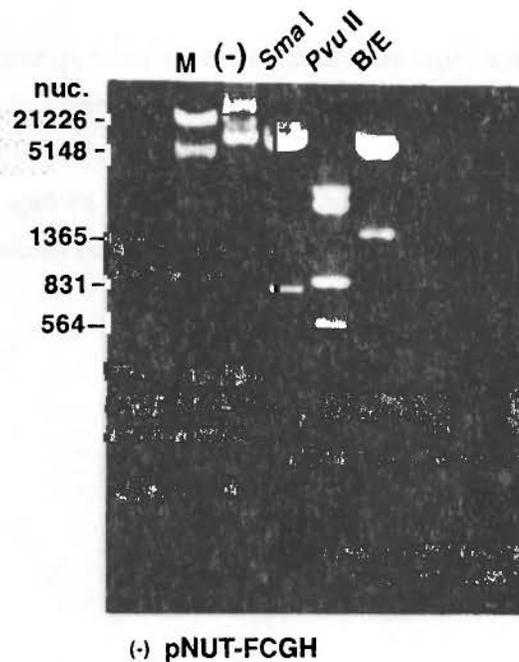
	PUREZA (Abs a 260/280)	RENDIMIENTO (µg/l)
pNUTFCGH	1.8	810
pNUT22k	1.9	970
pNUThPL-3	1.8	950
pNUT (-)	1.9	850
pCMVcat	1.9	700

A)

56



B)



(-) pNUT-FCGH

Figura. 31. A) Mapa y B) Caracterización enzimática de pNUTFCGH. M: indica el marcador de peso molecular. En el segundo carril se muestra al testigo negativo de digestión (plásmido superenrollado), mientras que en los 3 carriles siguientes se muestran los productos de las digestiones del mismo, con la enzima *Sma*I (donde se puede ver claramente la liberación de un fragmento de 700pb, *Pvu*II que produce el fragmento de 497pb que pone de manifiesto la presencia de la GH del gato, y finalmente, *Bam*HI-*Eco*RI que libera el fragmento de 1343 kb, correspondiente a la longitud total del "minigen".

Ya comprobado el grado de pureza de los plásmidos y estandarizada la cantidad de reactivo de lipofectamina a usar, se realizaron los ensayos de transfección en las células COS-7. Los cuatro plásmidos (pNUTFCGH, pNUTGH22K, pNUTPL-3 y pNUT), fueron co-transfectados con pCMVcat y la intensidad de la mancha observada en el autorradiograma, obtenido de la resolución de los productos acetilados por la enzima CAT, mostró que todos entraron a las células con eficiencias iguales, lo cual se puede inferir por el comportamiento del plásmido de referencia (ver fig 32).

48 h después de la transfección se recolectó el sobrenadante de los cultivos y se realizó la cuantificación de las proteínas recombinantes secretadas mediante ensayo de ELISA*. Con los valores de las absorbancias de las muestras analizadas, se contruyó una gráfica de puntos x, y y se calculó la concentración de proteína recombinante por ml de medio de cultivo con un coeficiente de correlación (r^2) de 0.97. Para pNUTGH22K se obtuvo una concentración de 8.55ng/ml, para pNUTFCGH, 1.35 ng/ml, para pNUTPL-3, 0.015ng/ml y para pNUT (concentración basal) 0.007ng/ml. (ver fig 33).

* Es necesario aclarar que los valores mostrados aquí, corresponden solamente a la cantidad de proteína detectada a partir del sobrenadante de un único ensayo. Es importante hacer notar también, que para relizar la cuantificación, se usó un kit comercial con anticuerpos específicos anti-HGH, así que es evidente que el valor registrado para FCGH, en realidad corresponde a una subestimación del valor real.

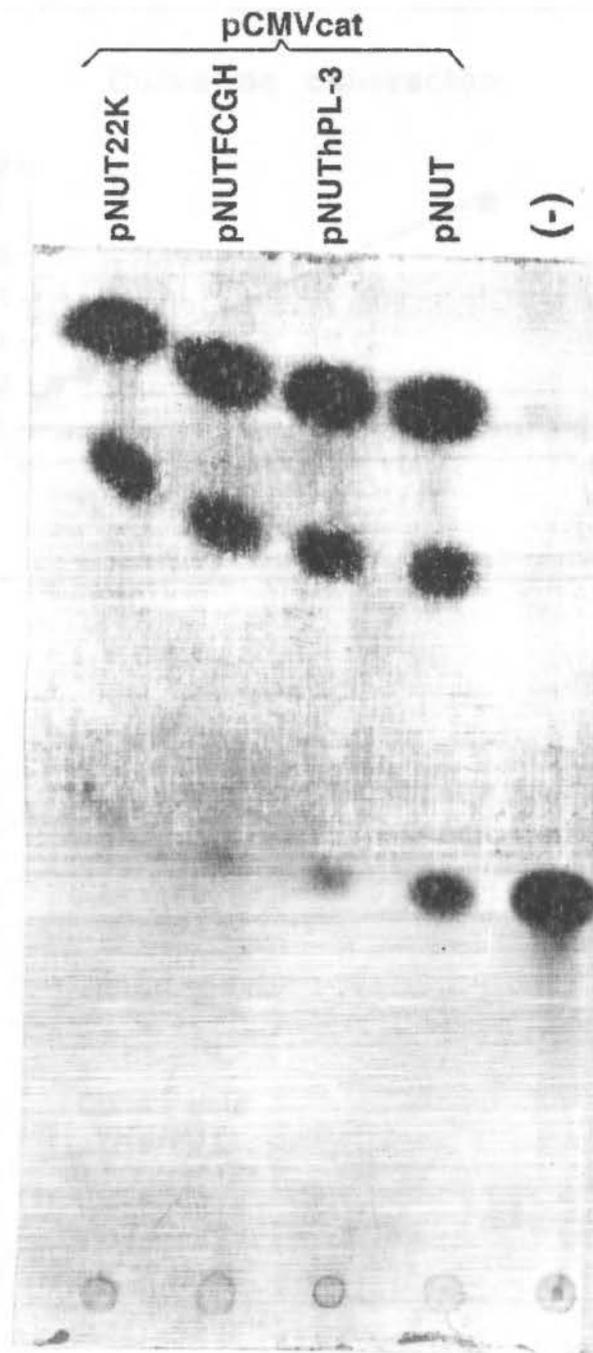
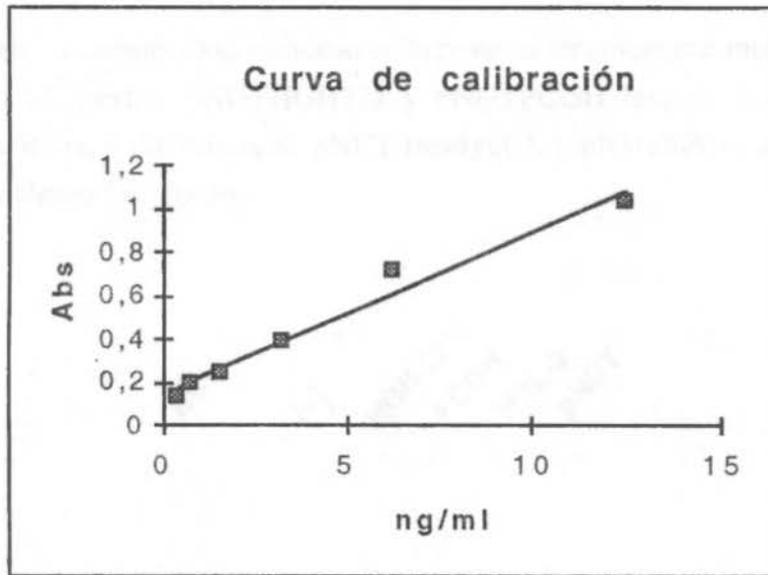


Figura 32. Ensayo de la enzima cloranfenicol acil transferasa. Se muestra la autorradiografía de la cromatografía en capa fina, en la que se pueden observar las formas 1-acetil y 1,3-diacetil (monoacetilada y diacetilada) producto de la actividad de la enzima CAT (producida junto con las demás proteínas recombinantes en las células COS-7) sobre el cloranfenicol marcado con ^{14}C . Como testigo (-) del ensayo se usó el plásmido pNUT sin co-transfectar.

A)



B)

x (ng/ml)	y Abs	Y CALC	
0,39	0,143	0,17790504	r ² 0,97363145
0,78	0,202	0,20693378	pendiente 0,07443265
1,56	0,242	0,26499124	Intercepto 0,14887631
3,21	0,394	0,38780512	
6,25	0,722	0,61408038	
12,5	1,028	1,07928445	

Muestra	Abs.	Conc. calc (ng/ml)
HGH22k	0,782	8,50599412
FCGH	0,25	1,35859318
hPL-3	0,15	0,01509677
pNUTv	0,143	-0,078948

Figura 33. Producción transitoria de hormonas recombinantes en células COS-7 transfectadas con varios plásmidos. A) Se muestra la curva de calibración del ELISA y **B)** las concentración de proteína recombinante (secretada al medio de cultivo), cuantificados 48 h después de la transfección. Se muestran también los valores del coeficiente de correlación ($r^2= 0.9737$), pendiente(0.074)e intercepto (0.14), en base a los cuales se calcularon las concentraciones para cada una de las cuatro muestras (hGH22K, FCGH, hPL-3 y pNUTv).

Finalmente, se corroboró la identidad de la proteína recombinante mediante ensayos tipo "ELISPOT", en los cuales, pNUTHGH22k y pNUTFCGH fueron "reconocidas" por el antisuero contra BGH, a diferencia de pNUT (testigo(-)), y pNUThPL-3, que no produjeron reacción cruzada alguna (ver fig 34).

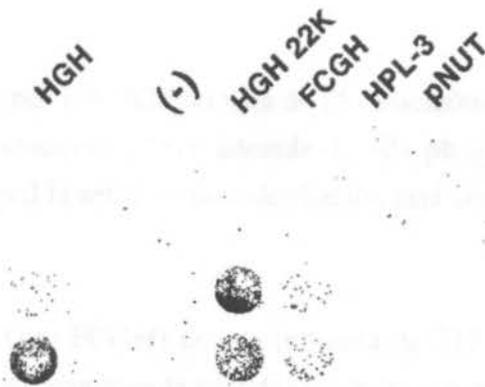


Figura 34. Detección de FCGHr por ELISPOT. Se muestra el resultado por duplicado del análisis ELISPOT, realizado con los sobrenadantes de las células en cultivo. Como testigo (+) se eligió la HGH, como se observa en el primer carril. En el segundo carril se colocó el testigo (-) de expresión, el cual consistió en células COS-7 sin transfectar; en el siguiente carril se ve la fuerte señal dada por la reacción de la HGH con el anti-BGH, seguida por una más débil entre este mismo anticuerpo y la FCGH. Finalmente se observa que HPL-3 no es reconocida por el suero.

VI. CONCLUSIONES

La clonación molecular del DNAC y del promotor del gen de la hormona del crecimiento del gato, se facilitó grandemente por el uso de los dos pares de iniciadores consensos seleccionados a partir de regiones conservadas de DNACs y promotores de GHs ya existentes en los bancos de genes.

El DNAC aislado por RT-PCR, consta de 652 nucleótidos desde el codón de iniciación (ATG) hasta el de terminación (TAG), además de 101 pb que constituyen su región 3' no-traducible, dentro de la cual la señal de poliadenilación está situada 89 bases después del codón de terminación.

La pre hormona (pre-FCGH) es una proteína de 217 aa, 26 de los cuales forman el péptido líder y el resto codifican para la proteína madura, a excepción del trinucleótido 190, que codifica para el codón de terminación.

Las comparaciones de secuencias aminoacídicas permiten entablar relaciones filogenéticas más cercanas entre FCGH y la GH del perro, de la cual sólo difiere en el residuo 155 en donde se reemplaza una prolina (gato) por una leucina (perro).

El cambio a prolina en la posición 155, distingue a esta hormona del resto de las GHs de mamíferos reportadas hasta ahora, además de resultar interesante por el hecho de estar localizado dentro de la cuarta hélice alfa de la proteína, la cual parece intervenir en la interacción con el receptor.

Por su parte, el promotor del gen *FCGH* posee elementos estructurales característicos de genes eucarióticos, como lo son la caja TATA (situada a -30pb del sitio de inicio de la transcripción) y la caja CAT (localizada a -86 pb del mismo). Además, posee el sitio de unión proximal para el factor de transcripción específico de hipófisis, Pit-1.

Mediante los experimentos de subclonación del DNAC de FCGH en vectores de expresión, tanto para bacterias como para cultivo celular, y la introducción de dichas construcciones a tales modelos celulares, se demuestra que es posible producir la hormona como proteína de fusión en *Escherichia coli*, así como en células eucarióticas en cultivo como proteína libre secretada al medio extracelular. De manera que tales módulos facilitarán comprender el significado fisiológico de los detalles moleculares descritos en este trabajo por vez primera, para FCGH.

1. ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...
7. ...
8. ...
9. ...
10. ...
11. ...
12. ...
13. ...
14. ...
15. ...
16. ...

VII BIBLIOGRAFIA

1. **Catt, K.J.**; Moffat, B. y Niall, H.D.: Human growth hormone and placental lactogen: structural similarity. *Science* **157**:321, (1967).
2. **Sherwood, L.M.**: Similarities in the chemical structure of human placental lactogen and pituitary growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **58**: 2307-2314, (1967).
3. **Niall, H.D.**; Hogan, M.L.; Sauer, R.; Rosenblum, I.Y. y Greenwood, F.C.: Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68**:866-869, (1971)
4. **Niall, H.D.**; Hogan, M.L.; Tregear, G.W.; Segre, G.V.; Hwang, P. y Friesen, H.: The chemistry of growth hormone and the lactogenic hormones. *Recent. Prog. Horm. Res.* **29**:387-404, (1973).
5. **Seeburg, P.H.**: The human growth hormone gene family: Nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone. *DNA* **1**: 239-249, (1982).
6. **Miller, W.L.**; Eberhardt, N.L.: Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr. Rev.* **4**:97-130, (1983)
7. **De vos, M.A.**; Ultsch, M.; Kossiakoff, A.A.: Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of complex. *Science* **255**:306-312, (1992).
8. **Abdel-Meguid, S.S.**; Shieh, H.S.; Smith, W.W.; Dayringer, H.E.; Violand, B.N. y Bentle, L.A.: Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 6434-6437, (1987).
9. **Carlacci, L.**; Chou, K.Ch.; Maggiora, M.G.: A heuristic to predicting the tertiary structure of bovine somatotropin. *Biochemistry* **30**:4389-4398, (1991).
10. **Clackson, T.**; Wells, J.A.: A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* **267**:383-386, (1995).
11. **Sommers, W.**; Ultsch, M.; De vos, M.A.; Kossiakoff, A.A.: The X-ray structure of a growth hormone-prolactin receptor complex. *Nature*, **372**: 478-481, (1994).
12. **Wells, J.A.**; Cunningham, B.C.; Fuh, G.; Lowman, H.B.; Bass, S.H.; Mulkerrin, M.G.; Ultsch, M.; DeVos, M. : The molecular basis for growth hormone-receptor interactions. *Recent progress in hormone research* **48**:253-274, (1988).
13. **Daughaday, W.H.**: The anterior pituitary. *Willams textbook of endocrinology*. Ed 7. Philadelphia, W.B Saunders, pp 568-613, (1985).
14. **Campbell, K.L.**: Growth hormone-related disorders in dogs. *Compend cont.Educ.Pract.Vet.* **10**:477-482, (1988).
15. **Welsh, T.H.**: Endocrine control of growth : Current and emerging concepts. *Anim. Natur, health.* June-July: 14-19, (1985).
16. **Ingraham, H. A.**; Chen, R.; Mangalam, H.J.; Elsholtz, H.P.; Flynn, S.E.; Lin, C.R.; Simmons, D.M.; Swanson, L.; Rosenfeld, M.G.: A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* **55**:519-529, (1988).

17. **Bodner, M.**; Castrillo, J.L.; Theill, L.E.; Deernick, T.; Ellisman, M., Karin, M.: The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* **55**:505-518, (1988).
18. **McCormick, A.**; Wu, D.; Castrillo, J.L.; Dana, S.; Strobol, J.; Thompson, E.B.; Karin, M.: Extinction of growth hormone expression in somatic cells hybrids involves repression of the specific *trans* - activator GHF-1. *Cell* **55**:379-389, (1988).
19. **Bheringer, R.R.**; Mathews, L.S.; Palmiter, R.D.; Brinster, R.L.: Dwarf mice produced by genetic ablation of growth hormone-expressing cells. *Genes&Development* **2**:453-461, (1988).
20. **Butler, M.**: Mammalian cell biotechnology. A practical approach. Oxford university press.(1991).
21. **Seeburg, P.H.**; Sias, S.; Adelman, J.; De Boer, H.A.; Hayflick, J.; Jhurani, P.; Goeddel, D.V. y Heyneker, H.L. Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormones. *DNA* **2**: 37-45, (1983).
22. **Miller, W. L.**; Martial, J. A. y Baxter, J. D. Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. *J. Biol. Chem.* **255**:7521-7524, (1980).
23. **Woychik, R.P.**; Camper, S.A.; Lyons, R.H.; Horowitz, S.; Goodwin, E.C. y Rottman, F.M. Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. *Nucl. Acids Res.* **10**: 7197-7210, (1982).
24. **Zhvirblis, G.S.**; Gorbulev, V.G., Rubtsov, P.M.; Karapetyan, R.V.; Zhuravlev, I.V.; Fisinin, V.I.; Skryabin, K.G. y Baev, A.A. Genetic engineering of peptide hormones: Cloning and primary structure of cDNA of chicken growth hormone. *Mol. Biol.* **21**:1324-1328, (1987).
25. **Lamb, I.C.**; Galehouse, D.M. y Foster, D.N. Chicken growth hormone cDNA sequence. *Nucleic Acids Res.* **16**:9339-9339, (1988).
26. **Hong, Y.**; Scharl, M.: Sequence of the growth hormone gene from the silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and evolution of GH genes in vertebrates. *Biochimica and Biophysica Acta* **1174**:285-288, (1993).
27. **Ho, W.K.K.**; Tsang, W.H. y Dias, N.P. Cloning of the grass carp growth hormone cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**:1239-1243, (1989).
28. **Chiou, C.S.**; Chen, H.T.; Chang, W.C.: The complete nucleotide sequence of the growth- hormone gene from the common carp (*Cyprinius carpio*). *Biochimica and Biophysica Acta* **1087**:91-94, (1990)
29. **Gonzalez-Villaseñor, L.I.**; Zhang, P.; Chen, T.T.; Powers, D.A.: Molecular cloning and sequencing of coho salmon growth hormone cDNA. *Gene* **65**:239-246, (1988).
30. **Sekine, S.**; Mizukami, T.; Saito, A.; Kawauchi, H.; Itoh, S.: Isolation and characterization of a novel growth hormone cDNA from chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Biochim. Biophys. Acta* **1009**:117-120, (1989).
31. **Rentier-Delrue, F.**; Swennen, D.; Mercier, L.; Lion, M.; Benrubi, O.; Martial, J.A.: Molecular cloning and characterization of two forms of trout growth hormone cDNA: Expression and secretion of tGH-II by *Escherichia coli*.. *DNA* **8**:109-117, (1989).

32. **Lorens, J.B.**; Nerland, A.H.; Male, R.; Lossius, I.; Telle, W.; Totland, G.K.: The nucleotide sequence of atlantic salmon growth hormone cDNA. *Nucleic Acids Res.* **17**:2352-2352, (1989).
33. **Sato, N.**; Watanabe, K.; Murata, K.; Sakaguchi, M.; Kariya, Y.; Kimura, S.; Nonaka, M. Kimura, A.: Molecular cloning and nucleotide sequence of tuna growth hormone cDNA. *Biochim. Biophys. Acta* **949**:35-42, (1988).
34. **Mamota, H.K.**; Kosugui, H.; Ohgai, R.; Hora, H.; Ishioka H.: Sequence of flounder growth hormone deduced from a cDNA sequence. *Nuc.Acids.Res.***16**:10362, (1988).
35. **Linzer, D.I.H.** y Talamantes, F. Nucleotide sequence of mouse prolactin and growth hormone RNAs and expression of these mRNAs during pregnancy. *J. Biol. Chem.* **260**:9574-9579, (1985).
36. **Seeburg, P.H.**; Shine, J.; Martial, J.A.; Baxter, J.D.; Goodman, H.M.: Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. **270**:486-491, (1977).
37. **DeNoto, F.M.**; Moore, D.D.; Goodman, H.M.: Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nuc. Acids Res.* **9**:3719-3730, (1981).
38. **Shoji, K.**; Ohara, E.; Watahiki, M. y Yoneda., Y. Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding the mink growth hormone. *Nucl. Acids Res.* **18**: 6424, (1990).
39. **Ascacio-Martínez, J.A.I.**; Barrera-Saldaña, H.A.: Dog growth hormone complementary DNA codes for mature protein identical to pig growth hormone. *Gene* **143**:277-280, (1994).
40. **Keseth, E.**; Rosner, A.; Bernstein, Y.; Gorecki, M.; Aviv, H.: Cloning of bovine growth hormone gene. *Nuc.Acids.Res.* **9**:19-30, ((1981).
41. **Yamano, Y.**; Oyabayashi, K.; Okuno, M.; Yato, M.; Kioka, N.; Manabe, E.; Hashi, H.; Sakai, H.; Komano, T.; Utsumi, K.; Iritani, A.: Cloning and sequencing of cDNA that encodes goat growth hormone. *FEBS Letters* **228**:301-304, (1988).
42. **Warwick, J.M.**; Wallis, O.C.; Wallis, M.: Cloning, sequence and expression in *Escherichia coli* of cDNA for ovine pregrowth hormone. *Biochim. Biophys. Acta* **1008**: 247-250, (1989)
43. **Stewart, F.**; Tufnell, P.P.: Cloning a cDNA for horse growth hormone and expression in *Escherichia coli*. *J.Molecular Endocrinology* **6**: 189-196, (1991).
44. **Ascacio-Martínez, J.A.I.**; Barrera-Saldaña, H.A.: Sequence of a cDNA encoding horse growth hormone. *Gene* **143**:299-300. (1994).
45. **Pan, F.M.**; Chang, W.Ch.: Cloning and sequencing of bullfrog growth hormone complementary DNA. *Biochimica and Biophysica Acta.* **950**:238-242, (1988)
46. **Chen, H.T.**; Pan, F.M.; Chang, W.C.: Purification of duck growth hormone and cloning of the complementary DNA. *Bioch. Biophysica Acta.* **949**: 247-251, (1988).
47. **O'Brien, S.J.**: Genetic maps. Cold Spring Harbor. Press. 755.

48. **O'Brien, S.J.**; Seuánez, H.N.; Womack, J.E.: Mammalian genome organization: An evolutionary view. *Annu.Rev.Genet.* **22**:323-351, (1988).
49. **Novacek, M.**: Mammalian phylogeny: Shaking the tree. *Nature* **356**:121-125, (1992).
50. **Wallis, M.**: The molecular evolution of prolactin and related hormones. Prolactin secretion. Academic press. pp 4-17, (1984).
51. **Bernardi, G.**; D'Onofrio, G.; Caccio, S.; Bernardi, G.: Molecular phylogeny of bony fishes, based on the amino acid sequence of the growth hormone. *J.Mol.Evol.* **37**:644-649, (1993).
52. **Schmeitzel, L.P.**: Sex hormone-related and growth hormone-related alopecias. *Vet.Clin. of North Am.* **20**:1579-1599, (1990).
53. **Muller, G.H.**; Kirk, R.W.; Scott, D.W.: Small animal dermatology, ed 4. Philadelphia, W.V. Saunders, pp 575-657, (1989).
54. **Lothrop, C.D.**: Pathophysiology of growth hormone responsive dermatosis. *Compend.Cont.Educ.Pract.Vet.* **10**:1346-1352, (1988).
55. **Eigenmann, J.E.**; Patterson, D.F.; Froesch, E.R.: Body size parallels insuline-like growth factor I levels but not growth hormone secretory capacity. *Acta Endocrinol.* **106**:448-453, (1984).
56. **Scott, D.W.**: Histopatologic findings in endocrine skin disorders of the dog. *J.Am.Anim.Hosp.Asoc.* **18**:173-183, (1982).
57. **Eigenmann, J.E.**: Growth hormone deficiency related alopecias in the dog. *Dermatol.Rep.* **4**:2-3, (1985).
58. **Underwood, L.E.**; Van wyk, J.J.: Normal and aberrant growth. Williams textbook of endocrinology, ed 7. Philadelphia, W.B. Saunders. pp 155-205, (1985).
59. **Zachmann, A.G.**; Prader, A.: Interrelations of the effects of growth hormone and testosterone in hypopituitarism. Proceeding of the 3rd International Symposium. Growth hormone and related peptides. *Excerpta Medica*, pp 286-296, (1976).
60. **Kokka, N.**; Garcia, J.F.; Morgan, M. and George, R.: Immunoassay of plasma growth hormone in cats following fasting and administration of insulin, arginine, 2-deoxyglucose and hypothalamic extract. *Endocrinology* **88** (1971) 359-66.
61. **Rush W.**; Mixter R.C.; Russell, R.M.; García, J.F.; Gale, C.C.: Aminergic and thermoregulatory mechanisms in hypothalamic regulation of growth hormone in cats. *Am.J.Physiol.* **233**:61-69, (1977).
62. **Chomczynski, P.**; Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159, (1987).
63. **Gubler, V.**; Hoffman, B.J.: A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene.* **25**:263-269, (1983).
64. **D'Alessio, J.M.**; Noon, M.C.; Ley, H.L. y Gerard, G.F. One-tube double stranded cDNA synthesis using cloned MMLV reverse transcriptase. *Focus.* **9**:1-4, (1987).

65. **Mullis, K.B.:** The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* **262**:43-46.
66. **King, P.V.;** Blakesley, R.W.: Optimizing DNA ligations for transformation. *Focus* **8**:1-3, (1986).
67. **Hanahan, D.:** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**:557-580, (1983).
68. **Dagert, M. y Ehrlich, S.D.** Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*. **6**:23-28, (1979).
69. **Birnboim, H.C.;** Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure for creening recombinant plasmid DNA. *Nuc.Acid.Res.* **7**:1513-1522, (1979).
70. **Gustinich, S.;** Manfiolleti, G.; Del Sal, G; Schneider, C.; Carninci, P.: A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*.**11**:299-304, (1991).
71. **Del Sal, G.;** Manfiolleti, G.; Schneider, C.: The CTAB-DNA precipitation method: A common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques*.**7**:514-518, (1989)
72. **Sanger, F.;** Nicklen, S.; Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467, (1977).
73. **Meesing, J.** M13, the universal primer and the polylinker. *Focus*. **4**:21-26, (1988).
74. **United States Biochemical Corporation.** Step-by-step protocols for DNA sequencing with sequenase version 2.0 T7 DNA polymerase. 8th ed. USB Press, Cleaveland, pp 1-28, (1993).
75. **Martínez-Torres, A.:** Expresión en *Escherichia coli* de las hormonas del crecimiento humano y bovino en fusión con la proteína de unión a la maltosa. Tesis. Facultad de Medicina. UANL.
76. **BIO 101, Inc.** Protocol and information on double geneclean. BIO 101, La Jolla, CA, pp 1-3, (1992).
77. **Clewell, D.B.;** Helsinki, D.R.: Purification of closed circular DNA by equilibrium centrifugation in CsCl-ethidium bromide gradient. *J.Bcteriol.* **110**:1135, (1972).
78. **Neumman, J.R.;** Morency, C.A.; Russian, C.O.: A novel rapid assay for chloramphenicol acetyl transferase gene expression. *Biotechniques*.**5**:44-47, (1987).
79. **Life Thechnologies, Inc.** LIPOFECTAMINE™ reagent. Gibco-BRL. Gaithersburg, MD. pp 1-3, (1994).
80. **Life Thechnologies, Inc.** Non-isotopic immunoassay for transfection proteins. Instruction manual. Gaithersburg, MD. pp 1-25, (1994).
81. **Monroe, D.:** "Elispot". *Biotechniques* **3**:222-229, (1985).
82. **Marck, Ch.;** C.E.A.: DNA Strider™ 1.1: A program for DNA and protein sequences analysis. Département de Biologie. Institut de Recherche Fundamentale-C.E.A. France, (1989).

83. **Higgins, D. G.**; Sharp, P.M.: "Clustal: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer". *Gene* **73**:237-244, (1988)
84. **Wayne, R.K.**: Molecular evolution of the dog family. *Tig June* **9**: 218-224, (1993).
85. **De vos, M.A.**; Ultsch, M.; Kossiakoff, A.A.: Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of complex. *Science* **255**:306-312, (1992).

TM

Z6658

FM

1995

C376

1020113970

FT

AUTOR

CASTRO PERALTA, Felipa

TITULO

Clonación molecular, caracte-
rización y expresión...

FECHA DE
VENCIMIENTO

NOMBRE DEL LECTOR

1020113970

