



Disección transcripcional del *Locus GH* del genoma humano

M. CANIZALES ESPINOSA*, H.G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**, J.L. CASTILLO ***,
EGLY JEAN MARC****, H. A. BARRERA SALDAÑA**



La hormona del crecimiento (*hGH*) y el lactógeno placentario (*hPL*) se sintetizan en un grupo de cinco genes localizados en la banda q22.4 del cromosoma humano 17.¹ Éstos presentan >90% de similitud en sus secuencias nucleotídicas en su región codificante, así como en las regiones proximales 5' y 3' que los flanquea.² Las soformas de 22-kDa son las proteínas mejor conocidas que se derivan de esta familia multigénica.³

A pesar de su alta similitud en secuencia (> 90%) y su cercana proximidad en el genoma (<13 kb), se expresan en diferentes tejidos y en diferentes niveles, lo que hace al *locus* un excelente modelo para estudiar los mecanismos moleculares del control de la expresión génica. Mientras *hGH-N* es preferentemente expresado en pituitaria, el resto de la familia se expresa en la placenta, pero a diferentes niveles: la expresión de *hPL-2* y *hPL-3* es 100 veces

más que la de *hPL-1* y 1,000 veces más que *hGH-V*.² En este contexto, *hPL-2* es siempre ligeramente más alta que *hPL-3*, variando más de seis veces de una placenta a otra.⁴

Por estudios previos sobre el control transcripcional del gen *hGH-N* en pituitaria, sabemos que su expresión es influenciada, principalmente, por el factor transcripcional Pit-1.⁵ Se conoce menos sobre la regulación en placenta del gen *hGH-V* y los genes *hPL*, sin embargo, factores transcripcionales, tales como Sp1(6), *hPLA-1* y elementos *cis*, como el elemento iniciador (*InrE*)⁷ localizados en los primeros 500 nucleótidos del promotor de los genes *hPLs* activos, se han visto implicados en la regulación en la placenta. Otro tipo de moléculas regulatorias, tales como T3 y ácido retinoico,⁸ glucocorticoides⁹ y AMPc o éster de forbol,¹⁰ modulan la expresión de uno o varios de estos genes placentarios.

El presente artículo está basado en la investigación "Disección transcripcional del *Locus GH* del genoma humano", galardonada con el Premio de Investigación UANL 2006 en la categoría de Ciencias de la Salud, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario de la UANL, en septiembre de 2006.

*Departamento de Genética, Facultad de Medicina, UANL.

**Departamento de Bioquímica, ULIEG, FM, UANL.

***Universidad Autónoma de Madrid, Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa".

****Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, Francia.

contacto: hbarrera@fm.uanl.mx.

En una búsqueda inicial de secuencias potenciadoras en el *locus*, sólo se identificó una, localizada 2.2 kb río abajo del gen *hPL-3*, de función y especificidad de tejido en células de placenta. Después se describieron copias del potenciador en los genes *hPL-2* y *hPL-1*, los cuales presentan una actividad más débil, debido a mutación en secuencias con interacción a factores de transcripción.¹¹

Se asume que la diferencia en los niveles de expresión de los genes placentarios puede deberse en parte a la fuerza de sus respectivos promotores.^{12,13} La mayoría de los estudios llevados a cabo han analizando un promotor a la vez, en donde no fue posible determinar cuáles y la ubicación de los cambios nucleotídicos responsables de las diferencias en su expresión.

En el presente trabajo se informa sobre un estudio comparativo de los cinco promotores de los genes del *locus hGH-hPL* y de algunos elementos que modulan su expresión. Usamos el gen *hGH-N* como gen reportero, el cual pertenece al *locus*, esto con el objetivo de acercarse lo más posible a las condiciones naturales. Se analizaron por expresión transitoria tres versiones de los promotores que difieren en la longitud, en células derivadas de placenta (JEG-3), células de pituitaria (GH3) y en células (HeLa) como control negativo de expresión.

Encontramos que la versión promotora larga del gen *hPL-2* rinde los niveles de expresión más altos de la proteína reportera en el ensayo con células de placenta, lo cual corresponde a los reportes en la bibliografía. Asimismo, la versión más larga del promotor del gen *hGH-N* fue la única activa en las células de pituitaria. Sorpresivamente, el promotor del gen *hGH-V*, el miembro del *locus* que menos se expresa en placenta, resultó entre los más activos de todos los promotores largos investigados, y el promotor del pseudogen *hPL-1* se comportó muy similar a su homólogo de *hPL-3*. Asimismo, se evidenció la acción de elementos silenciadores en las versiones promotoras analizadas. Por otro lado, se detectó que el ácido retinoico fue el principal modulador activador seguido de T3 y AMPc en forma muy similar y, por último, el éster de forbol. El factor de transcripción ubicuo SP1 y el factor POU, hPLA de expresión placentaria transactivan, preferentemente, los genes placentarios, mientras

Pit-1 lo hace sobre *hGH-N* en células de pituitaria.

Objetivo

Investigar la regulación de la familia multigénica *hGH-hPL* mediada por deleciones en sus regiones promotoras, por hormonas y por factores de transcripción.

Material y métodos

Cultivo celular. Las células HeLa y GH-3 se mantuvieron en DMEM, las células JEG-3, BeWo y JAR en RPMI-1640 (Life Technologies; Inc., Gaithersburg, MD). Ambos medios fueron enriquecidos con 2 mM de glutamina, 10% de suero fetal bovino y antibióticos. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C, en atmósfera húmeda, con una mezcla de 5% de CO₂ y 95% de aire.

Placenta. Se obtuvo muestra de tejido placentario de un embarazo normal a término del Hospital Universitario, Monterrey, N.L., México.

Clonas de los genes *hPL* y *hGH*. Las secuencias promotoras se obtuvieron de fragmentos de DNA genómico humano clonados en el vector SuperCos (H.B. Barrera-Saldaña, datos no publicados).

Los fragmentos de DNA de interés se recuperaron por digestión con enzimas de restricción, separados electroforéticamente en geles de agarosa y recuperados con un kit de purificación a partir del gel (Gene-Clean Bio 101). Los fragmentos purificados se ligaron al plásmido pBlueScript SK(+) (pBS; Promega, Co.). La identificación de clonas se hizo por PCR y mapas de restricción (figura 1). Las clonas de interés fueron utilizadas para obtener los fragmentos requeridos y generar las versiones de deleciones de los promotores de los genes *hGH-hPL*.

Construcción de las series de deleciones de los promotores. Las clonas descritas previamente se usaron para obtener las versiones promotoras de los genes *hPL-1*, *hPL-2*, *hGH-V*, *hPL-3* y *hGH-N*. Las versiones largas (longitud entre 2,200 a 3,100 nucleótidos) se generaron por unión de las porciones distales (delimitadas por *Xba*I en el 5' y *Eco*RI en el 3' a la altura de la posición -496), con las regiones proximales de los promotores (delimitadas por

EcoRI en su extremo 5' y el sitio *BamHI* en la posición +2) de los genes *PL-2*, *PL-3* y *GH-V*. Los promotores reconstruidos fueron insertados entre los sitios de clonación *Xba I* y *Bam HI* del vector pAVE-*hGH-N*¹⁷ en sustitución del promotor viral original (*hCMVp*, figura 2D). En el caso del gen *hPL-1*, se recurrió al sitio *AatII* localizado en la posición nucleotídica +346, que se ubica en el sexto codón del péptido señal, debido a que el sitio *BamHI* en +2 está ausente (ver figura 2A, línea 1). Finalmente, la construcción equivalente del promotor largo de *hGH-N* (figura 1A, Fragmento N) consistió en el fragmento *ScaI-ScaI* (-2,324 a +4,311) previamente clonado. De esta manera, todos los promotores completos subclonados llevaban la unidad transcripcional del gen *hGH-N* como gen reportero. La serie de versiones promotoras cortos (figura 2B, C) fue construida en pBS. Para obtener las deleciones de los promotores de 496 pb (figura 2B), se obtuvieron fragmentos de 496 pb de las subclonas iniciales portadoras de los genes, por digestión con *EcoRI* (-496) y *PvuII* (+468pb). Éstos se insertaron entre los sitios *EcoRI* (5') y *HincII* (3') de pBS.

Las versiones de los promotores de -140 pb (figura 2C) se recuperaron de las clonas de longitud de 496 pb como fragmentos acortados en sus extremos 5' con *NspI* (terminación romo) y en sus extremos 3' por *KpnI* (parte del sitio de policlonación del vector), los cuales fueron reinsertados en pBS entre los sitios *HincII* (5' romo) y *KpnI* (3'). Finalmente, la unidad transcripcional del gen *hGH-N* fue adicionada a las versiones -496 y -140, usando la posición -23 (*ApaI*) presente en todos los promotores hasta la posición +2,134 (*EcoRI*) del gen *hGH-N*. Los quince plásmidos recombinantes resultantes se expandieron en bacterias y purificados a gran escala en CsCl.¹⁴

Transfección celular. Las células en cultivo fueron cotransfectadas por electroporación (240 V y 960 mF para células JEG-3 y 350 V/500 mF para células HeLa) como se ha descrito previamente,¹⁵ usando 5×10^6 células/200 ml en medio RPMI sin suero, mezcladas con 12 mg de plásmido recombinante de interés y con 5 mg del control interno, usando el plásmido pGL2Luc-Ctrl (Promega) o pCMVbGal como control interno para normalizar la eficiencia de la transfección. Los experimentos se realizaron

por triplicado empleando tres preparaciones diferentes de cada una de las construcciones plasmídicas.

Bioensayo de luciferasa y β galactosidasa. Después de lavar con PBS las células transfectadas, fueron centrifugadas a 35,000 rpm por cinco minutos y la actividad de luciferasa fue determinada en la pastilla celular, de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial (Promega), mientras β galactosidasa se usó el método colorimétrico de reducción del sustrato CPRG y absorción en I de luz Vis.

Bioensayo de la proteína reportera HGH. La concentración de HGH se cuantificó por radioinmuno ensayo, utilizando el kit DPC (Diagnostic Products Co.) en el sobrenadante de las células transfectadas, colectadas 48 hrs. después de la electroporación.

Normalización de los bioensayos de transfección. Los valores de la concentración de HGH fueron normalizados con los valores de actividad de luciferasa o β galactosidasa, por mg de extracto celular de proteína total y substrayendo el valor de HGH del control negativo (células no transfectadas), para corregir la variación en la captación del DNA por las diferentes células transfectadas.

Activación de los recombinantes por hormonas y metabolitos. Los moduladores empleados (AMPc, éster de forbol, triiodotironina y ácido retinoico) fueron preparados siguiendo las instrucciones de la casa comercial y adicionados al medio de cultivo a una concentración final de 0.1 mM, 5 nM, 1.5 mM y 50 mM respectivamente, por 48 hrs.

Transcripción reversa acoplada a PCR anidada. Los niveles de transcripción de los genes placentarios se midieron por transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa anidada (RT-nPCR). El RNA total de diversas líneas celulares derivadas de placenta (JEG-3, HeLa, BeWo y JAR), así como de tejido placentario a término se extrajo¹⁴ y se analizó para buscar los transcritos *hPL* y *hGH-V* endógenos. Para la síntesis de DNAc en la RT se utilizó MMLV-RT (Promega) e iniciadores al azar. La primera PCR se hizo con los oligos: 5'-TCAGGGTACCTGTGGACAGCTCACCTA-3' y 5'-CTGAATTCTATTAGGACAAGGCTGGTGGG-3',⁴ específicos para *hGH* y para *hPL* que flanquean las unidades transcripcionales desde el primer exón hasta la señal de poliadenilación bajo las siguien-

tes condiciones: desnaturalización a 94°C por un minuto, alineamiento a 58°C por un minuto, y extensión a 72°C por un minuto. Después de la primera reacción, una alícuota de cada tubo (2 ml) se diluyó (1/100) y se hizo una PCR anidada con otro oligo antisentido, que tiene hibridación 40 pb hacia el 5' del producto derivado del primer PCR (5'-CCGAATTCAGGAGAGGCACTGGG-3') y las mismas condiciones descritas anteriormente.¹⁵ El producto de la segunda PCR (740 pb) se purificó y se sometió a digestión con la enzima *PstI* para detectar los productos de transcripción de los genes *hGH* y *hPL*. Los productos de digestión se visualizaron en un gel de agarosa a 1%, teñido con bromuro de etidio.

Análisis estadístico. Las diferencias de los resultados obtenidos entre las construcciones descritas se presentan como medias \pm SD para el número de determinaciones indicado. La significancia entre los diferentes grupos fue determinada por un ensayo de ANOVA, con una significancia de $p < 0.05$.

Resultados

Construcción de plásmidos recombinantes derivados de los cinco genes del locus *hGH-hPL*

Cada uno de los cinco genes *hGH-hPL*, junto con las secuencias flanqueantes, se recuperaron como fragmentos de restricción de tres diferentes cósmidos yuxtapuestos y subclonados en pBS (figura 1).

Estas subclonas génicas se usaron para derivar las tres series de plásmidos con diferencias en la longitud del promotor (> -2,200, -496 y -140) que se describen en la figura 2. Las versiones fueron clasificadas como largas, cortas y basales. La importancia de cada una de estas versiones radica en los siguientes puntos:

Las regiones promotoras largas fueron incluidas, debido a que ejemplifican lo más próximo a las condiciones nativas de regulación a las que se ven sometidos los genes del complejo, la versión promotora de -496 pb, porque posee sitios de unión para las principales moléculas regulatorias activas encontradas a la fecha. Las versiones basales de -140 pb se incluyeron porque están presentes, por lo

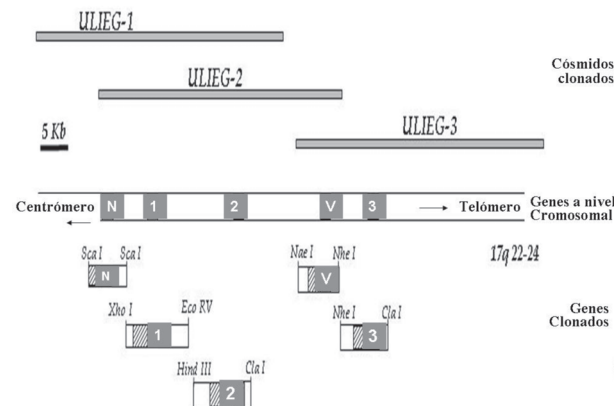


Fig. 1. Clonación de los genes *hGH-hPL*. De tres cósmidos traslapados aislados de una librería de DNA genómico humano construida en un SuperCos (arriba), los miembros de la familia de genes *hGH-hPL* (centro) fueron obtenidos por digestión con la enzima de restricción indicadas (abajo). Las letras y números dentro de los cuadros negros identifican los cinco genes (N=*hGH*, 1=*hPL-1*, 2=*hPL-2*, V=*hGH/V* y 3=*hPL-3*). Los insertos de los plásmidos subclonados se muestran esquemáticamente en la base, con cuadros entrecruzados identificando las secuencias de los promotores analizados en el presente estudio.

menos, en un sitio de unión para elementos regulatorios descritos previamente como importantes para la expresión de los genes *hPL* (Sp1) o *hGH* (Pit-1). Las quince construcciones promotoras se unieron a la unidad transcripcional *hGH-N* como gen reportero y se utilizaron para investigar las diferencias tanto de la fuerza transcripcional como de la especificidad tisular.

Actividad de los promotores en cultivo de células placentarias

Las células en cultivo JEG-3 se transfectaron con las versiones promotoras y su actividad transcripcional se determinó midiendo la producción de la proteína reportera HGH en el medio de cultivo. Se tomaron en cuenta diferencias en la captación de DNA, normalizando los valores de expresión de HGH con el valor de la actividad de la enzima luciferasa (expresada por pGL2Luc-Ctrl) o con la enzima β galactosidasa (pCMV β Gal), y comprobar así que las diferencias reflejaban efectivamente la fuerza de los promotores. Como se muestra en la figura 3, todos los promotores, excepto el largo de *hGH-N*, fueron capaces de expresar el gen reportero en

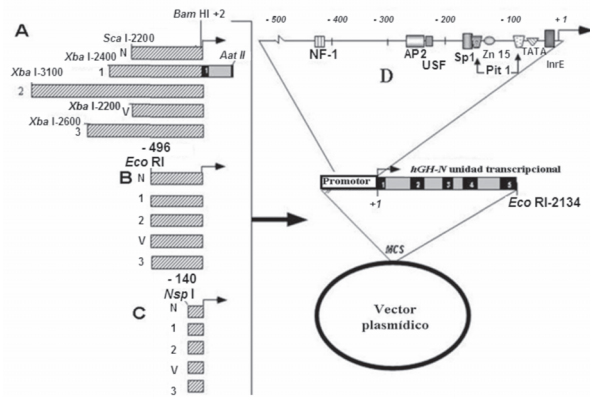


Fig. 2. Series de deleciones de los promotores *hGH-hPL*. versiones largas (A), intermedias de -496 pb (B) y cortas de -140 pb (C); de cada promotor se derivaron las subclonas de plásmidos que llevan cada secuencia promotora génica descrita en la figura 1. Las versiones largas se obtuvieron por unión de su secuencias distantes (>2200) a sus proximales (de -496 pb a el sitio *Bam*HI en +2, en el caso de *hPL2*, *hGH-V* y *hPL3*; o hasta el sitio *Aat*III en +346 pb para *hPL1*, ya que éste último carece del sitio *Bam*HI) e insertadas en el vector de expresión, conteniendo la unidad transcripcional del gen *hGH-N* B) Para los promotores proximales se utilizó a las enzimas *Eco*-R1 y *Bam* HI, C) Las versiones de -140 presentaron variación en la enzima ubicada en el extremo 5'. D) Presentación de la mayoría de los sitios de unión para los factores de transcripción dentro de la región del promotor -496. Los exones de la unidad transcripcional *hGH-N* están representados con cuadros negros.

niveles significativos en células placentarias; contrariamente, los promotores placentarios fueron inactivos en células de pituitaria. Estos resultados reproducen las observaciones *in vivo* y evidencian un elemento silenciador específico de tejido con acción en el promotor de *hPLs* en pituitaria y en el de *hGH-N* en placenta. Además, las versiones de -496 de los cinco genes tuvieron disminución en los niveles de expresión (barras blancas), incluso menores que las versiones promotoras basales (barras grises), sugiriendo un elemento silenciador con acción entre -140 y -496. La actividad transcripcional de las versiones -496 fue entre 75% (*hGH-V*) y 60% (*hPL-2*) menor, respecto a las de los promotores largos, o muy similar a los obtenidos en el caso de los promotores *hPL-1* y *hPL-3* (figura 3).

Se observa una correlación negativa al disminuir la longitud del promotor con la actividad transcripcional. Estos experimentos confirman la presencia de un elemento negativo, localizado entre -140 pb y -496 pb en los cinco promotores, previamente

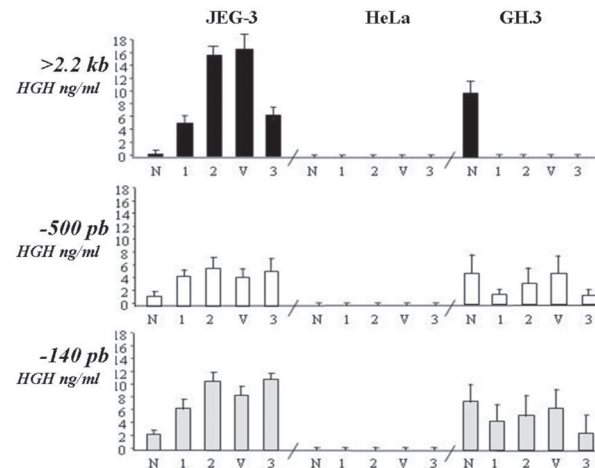


Fig. 3. Comparación de la producción de la proteína reportera por las series de promotores transfectados en tres diferentes tipos de células. En cada versión fue mezclado plásmido control (pGL2Luc) e introducido a los cultivos celulares por electroporación (células JEG-3 y HeLa) o por lipofección (GH3) en placas de 60 mm. Se evaluó la producción de HGH secretada al medio de cultivo por RIA 48 hrs. después. Los valores fueron normalizados por la actividad de luciferasa calculada por mg de proteína total del extracto celular, y se sustrajo el valor de HGH del control negativo (células no transfectadas). Cada versión de promotor se analizó por triplicado. La desviación estándar se muestra sobre las barras. La significancia de las diferencias entre grupos se determinó por ANOVA de una vía.

reportados sólo para los genes *hPL-3* (11), *hPL-2*(13) y *hGH-N*¹⁶ en la misma versión. La disminución de la fuerza transcripcional de las versiones de -496, comparada con la de los promotores largos, se relaciona posiblemente con la eliminación de secuencias de unión a receptores para factores de transcripción u hormonas que modulan la actividad transcripcional.^{8,9} Para ensayar esto, a las células transfectadas con las versiones largas se les adicionó algún elemento hormonal o metabolito, descritos como activadores observándose lo siguiente (figura 4).

Asimismo, se evaluó el efecto de factores de transcripción en las versiones promotoras cortas (figura 5).

Por último, para evidenciar que efectivamente los genes estudiados se encuentran activos en las células de placenta ensayadas, se analizó la expresión endógena por RT-PCR anidada, debido a sus bajos niveles de expresión (figura 6).

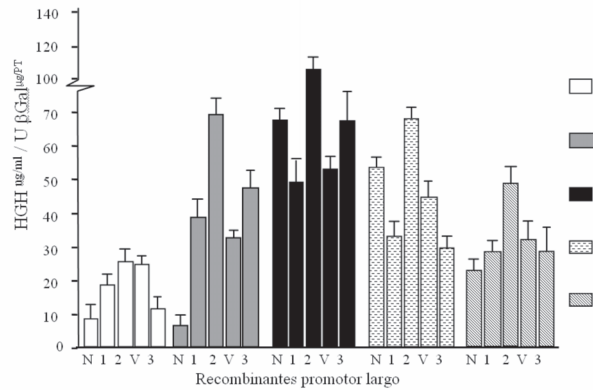


Fig. 4. Efecto de moduladores en la potenciación transcripcional. Se evaluó la producción de la proteína reportera por las series de promotores largos transfectados en células JEG-3 bajo el efecto de moduladores de la transcripción. Cada construcción, después de transfectarse, fue sometida a la presencia de metabolitos (éster de forbol), moduladores hormonales (T3, ácido retinoico) o segundos mensajeros (AMPc) para medir el índice de activación del promotor. El principal activador fue ácido retinoico seguido por AMPc y triiodo tironina sobre el promotor del gen hPL-2.

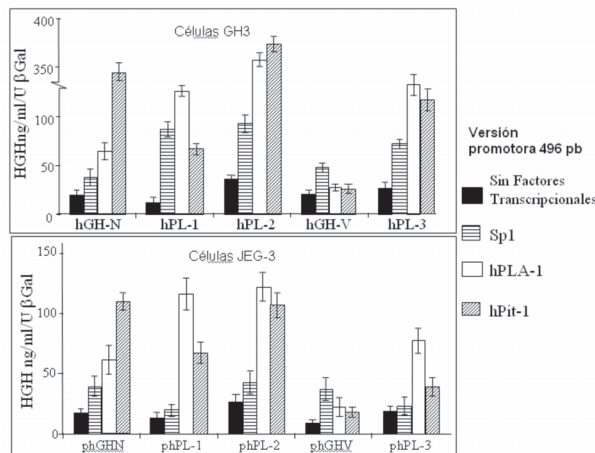


Fig. 5. Efecto de factores transcripcionales en células GH3 y JEG-3. Los recombinantes con versión promotora de -496 pb fueron cotransfectados con vectores de expresión de factores transcripcionales en proporciones 2:1 (factor transcripcional: recombinante) y pCMVSPORTBGal. El análisis se hizo cuantificando HGH en el medio de cultivo y el valor, normalizado por unidad de β galactosidasa determinada en el extracto celular.

Discusión

Los resultados concluyen que, aun y con la gran similitud nucleotídica entre los genes placentarios, los elementos regulatorios localizados a lo largo del promotor promueven diferentes niveles de expresi

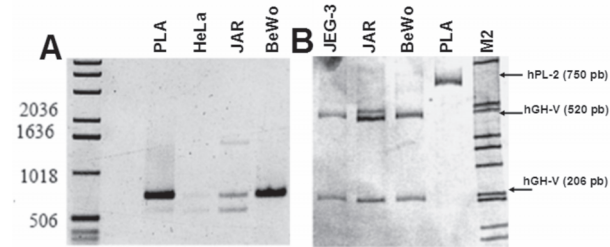


Fig. 6. Determinación de transcritos endógenos de hGHhPL por RT-PCR anidada. RNA total (0.8 mg) extraído de placenta y cultivo celular de HeLa, JAR, JEG-3 y BeWo. El DNAc se sometió a una primera PCR. Una alícuota de cada PCR se diluyó (1/100) y se sometió a una segunda PCR pero anidada. B. Los productos de la segunda PCR fueron digeridos a PstI para diferenciar los transcritos de cada gen. La digestión se separó en agarosa a 2% y teñida con bromuro de etidio. La identificación de las bandas (flechas) corresponde a los productos de digestión esperados para cada tipo de gen. La banda de hPL-2 (no afectado por la enzima PstI) y bandas de hGH-V (520 y 206 pb) se distinguen claramente.

si3n, pues mientras hPL-2 y hPL-3 tienen la mayor actividad en los ensayos de activaci3n, seguidos por hGH-V y hPL-1, la actividad del promotor de hGH-N se ve recuperada con los moduladores en células placentarias. Hay una clara correlaci3n entre la longitud del promotor y el silenciamiento o activaci3n de las diferentes versiones en las células analizadas, evidenciado anteriormente con un promotor de hPL en pituitaria.¹⁸

Resumen

El locus de la hormona del crecimiento humano (hGH) presenta variaciones en los niveles de expresi3n en algunos de sus componentes hasta en tres órdenes de magnitud. Este estudio comparó deleciones (140 a 3,100 pb) y la fuerza de transcripci3n de todos los promotores del locus con un gen reportero (hGH-N) mediante expresi3n transitoria. Los promotores largos tuvieron mayor expresi3n, paradójicamente hGH-V fue uno de los más activos. Se detectaron tres elementos promotores negativos y se evaluó la activaci3n transcripcional diferencial para los diferentes promotores, mediante su respuesta a la acci3n de hormonas y cotransfacci3n de vectores expresores de factores transcripcionales.

Palabras clave: Genes hGH-hPL, Expresi3n dife

rencial, Expresión hGH-V, Activación transcripcional, Expresión tejido específica, Silenciamiento.

Abstract

The human growth hormone gene family (*hGH*) presents changes in the levels of expression. This study compared mutant deletions (140 bp to 3,100 bp) on all the gene promoters of the locus and their strength of transcription using a reporter gene (*hGH-N*) by transient transfection. The long promoters had a larger expression; paradoxically *hGH-V* was one of the most active. Three negative elements were detected within the different versions of gene promoters and the differential transcriptional activation was tested by induction with hormones and co-transfection with vectors that express transcriptional factors.

Keywords: *hGH-hPL* genes, Differential expression, *Hgh-V* expression, Transcriptional activation, Specific tissue activation.

Referencias

1. Harper M.E., Barrera-Saldaña H.A. (1982). Saunders GF. Chromosomal localization of the human placental lactogen-growth hormone gene cluster to 17q22-24. *Am. J. Hum. Genet*; 34: 227.
2. Chen E.Y., Liao Y.C., Smith D.H., Barrera-Saldaña H.A., Gelinas R.E., Seeburg P.H. (1989). The human growth hormone locus: Nucleotide sequences, biology and evolution. *Genomics*; 4: 479.
3. Seeburg P.H. (1982). The human growth hormone gene family: Nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone. *DNA*;1: 239.
4. Martínez-Rodríguez H.G., Guerra-Rodríguez N.E., Iturbe-Cantú M.A., Martínez-Torres A.Y., Barrera-Saldaña H.A. (1997). Expression of human placental lactogen and variant growth hormone genes in placentas. *Arch. Med. Res.* 28: 507.
5. Bodner M., Castrillo J.L., Thiell L.E., Deernick T., Ellisman M., Karin M. (1988). The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox containing protein. *Cell*; 55: 505.
6. Fitzpatrick S.L., Walker W.H., Saunders G.F. (1990). DNA sequences involved in the transcriptional activation of a human lactogen gene. *Mol. Endocrinol*; 4: 1815.
7. Jiang S.W., Shepard A.R., Eberhardt N.L. (1995). An Initiator Element Is Required for Maximal Human Chorionic Somatomammotropin Gene Promoter and Enhancer Function *J Biol Chem* 270:8:3683-3692.
8. Stephanou A., Handwerker S. (1995). Retinoic acid and thyroid hormone regulate placental lactogen expression in human trophoblast cells. *Endocrinol*, 136: 933.
9. Martial J.A., Seeburg P.H., Guenzi D., Goodman H.M., Baxter J.D. (1977). Regulation of growth hormone gene expression: synergistic effect of thyroid and glucocorticoid hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 74: 4293.
10. Oury C., Alsat E., Jacquemin P., Evain-Brion D., Martial J.A., Muller M. (1997). A one-nucleotide difference in a cAMP and phorbol ester response element leads to differential regulation of the human chorionic somatomammotropin A and B gene transcription. *J. Mol. Endocrinol*;18: 87. 12.
11. Rogers B.L., Sobnosky M.G., Saunders G.F. (1986). Transcriptional enhancer within the human placental lactogen and growth hormone multigene cluster. *Nucleic. Acids Res.*; 7647-7659.
12. Nachtigal M.V., Nickel B.E., Cattini P.A. (1993). Pituitary-specific repression of placental members of the human growth hormone gene family. A possible mechanism for locus regulation. *J. Biol. Chem.*; 268: 8473.
13. Nachtigal M.W., Nickel B.E., Klassen M.E., Zhang W.G., Eberhardt N.L., Cattini P.A. (1989). Human chorionic somatomammotropin and growth hormone gene expression in rat pituitary tumor cell is dependent on proximal promoter sequences. *Nucleic Acids Res.*; 17:4327.
14. Sambrook ., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd

- Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
15. Rajas F., Delhase M., de la Hoya M., Verdood P., Castrillo J.L., Hooghe-Peters E.L. (1998). Nuclear factor 1 regulates the distal silencer of the human PIT1/GHF1 gene. *Biochem J.*; 333:77-84.
 16. Chomczynski P., Sacchi N. (1987). Single-Step method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. *Anal. Biochem.*; 162: 156.
 17. Peritz L.N., Fodor E.J., Silversides D.W., Cattini P.A., Baxter J.D., Eberhardt N.L. (1988). The human growth hormone gene contains both positive and negative control elements. *J. Biol. Chem.*; 263: 5005.
 18. Norquay L.D., Yang X., Sheppard P., Gregoire S., Dodd J.G., Reith W., Cattini P.A. (2003). RFX1 and NF-1 associate with P sequences of the human growth hormone locus in pituitary chromatin. *Mol Endocrinol.* Jun;17(6):1027-38.

Recibido: 7 de septiembre de 2006

Aceptado: 15 de septiembre de 2006