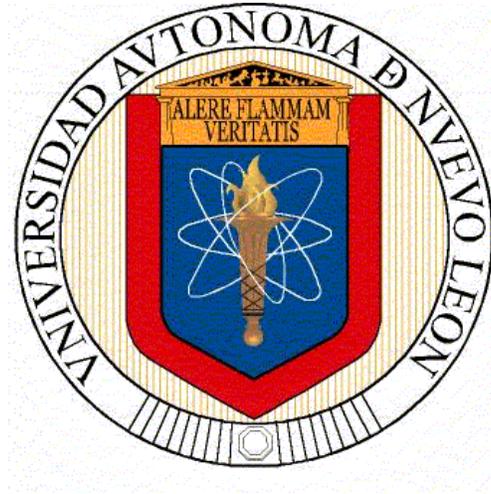


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE UN PROMOTOR
EUCARIÓTICO QUE CONTROLA LA EXPRESIÓN DE GENES
HETERÓLOGOS EN CONDICIONES DE HIPOXIA

Por

Q.B.P LUIS DANIEL TERRAZAS ARMENDÁRIZ

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS
CON ACENTUACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

Julio 2015

CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE UN PROMOTOR EUCARIÓTICO QUE
CONTROLA LA EXPRESIÓN DE GENES HETERÓLOGOS EN
CONDICIONES DE HIPOXIA

Comité de Tesis

Presidente

Dr. Juan Manuel Alcocer González

Secretario

Dra. Itza Eloisa Luna Cruz

Vocal 1

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

Vocal 2

Dr. Pablo Zapata Benavides

Vocal 3

Dr. Ricardo Gómez Flores

CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE UN PROMOTOR EUCARIÓTICO QUE
CONTROLA LA EXPRESIÓN DE GENES HETERÓLOGOS EN
CONDICIONES DE HIPOXIA

Dirección de tesis

Director

Dr. Juan Manuel Alcocer González

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Juan Manuel Alcocer González asesor de mi tesis, así como también a la Dra. Itza Eloisa Luna Cruz, a la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales, al Dr. Pablo Zapata Benavides y al Dr. Ricardo Gómez Flores por formar parte del comité de tesis, por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) por su apoyo económico, por permitirme el uso de su equipo y su invaluable ayuda de este trabajo.

A mis padres por el apoyo económico y moral, siempre estuvieron ahí cuando los necesite.

A mis hermanos Carlos, Edgar y Dulce por su apoyo incondicional, espero ser un buen ejemplo para ustedes

A mi novia de toda la vida Adriana Martha por aguantarme en mis peores y mejores momentos.

A la Dra. Itza Luna por compartir un poco de su conocimiento con migo, por darme las herramienta para ser un digno investigador.

A mis compañeros de laboratorio David, Cynthia, Luis, Hernán, Josué, Manuel, Zyanya, Carolina, Brenda, Alan, Carlos, Gris, Liz, Raúl, Edwin, Arturo, Ana por siempre poder contar con ustedes en lo académico y lo personal.

A mis compañeros de posgrado Álvaro, Carlos Barriga, Alberto, Tere, Arturito, Rodrigo, Lalo, Jorge, Mariana, Cesar, Julián por siempre darme ánimos de seguir adelante.

A muy buenos amigos Álvaro, Alberto, Carlos Barriga por su apoyo incondicional, pasamos momentos muy agradables, muy buenas pláticas, Álvaro y Barriga siempre hablando de plantas y animales, beto y yo defendiendo a los microorganismos.

A mis grandes amigos y además compañeros de laboratorio Alan, Luis, Hernán, Raúl, y el último que se incorporó Arturo, siempre hablando de buenos temas de ciencia en nuestras juntas de consejo, de amores y desamores. Gracias por confiar en mi algunos de sus secretos, siempre ocuparan un lugar muy especial en mi corazón.

A un gran amigo Hernán Jiménez la persona más brillante que he conocido aprendimos muchas cosas juntos como hermanos de tesis, me enseñaste que aunque parezca que no hay esperanza siempre existe una luz en la vida y que por muy desfavorable que sea el panorama si te esfuerzas habrá resultados, eres un gran ejemplo de vida.

DEDICATORIA

El presente trabajo que realice durante estos años que me ha costado literalmente sangre y sudor lo dedico a las siguientes personas:

A mis hermanos: Edgar, Carlos y Dulce ya que fueron una de mis inspiraciones y fortaleza se para terminar este trabajo, quiero ser un buen ejemplo para ustedes.

A mis padres: Luis Terrazas y Alicia Armendáriz que siempre han creído en mí, me han inculcado buenos valores , me han apoyado siempre y a la misma vez me dieron lecciones de vida, dejando que aprenda a levantarme cuando tropiezo y cuando no pude levantarme, me dieron una mano. Gracias por enseñarme que todo lo que te propones lo puedes lograr no importa cuánto tengas y quien seas. Son un ejemplo de perseverancia.

A mi novia: Adriana Martha quien siempre me ha apoyado, quien creyó en mí cuando muchos no, con quien puedo entablar una buena platica sobre ciencia, quien estuvo con migo en mis peores momentos cuando todo era gris, ella me hizo ver una luz, ella quien me ha reglado muchos de los mejores momentos en mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	vi
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
NOMENCLATURA	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades del cáncer	3
2.2 Hipoxia y su relación con el cáncer	3
2.3 Factor inducible por hipoxia HIF	5
2.3.1 Estructura y dominios.....	6
2.3.2 Regulación de la síntesis de HIF 1 α	8
2.3.3 Cambios post-traduccionales en HIF-1 α	10
2.3.4 Importancia de HIF/HRE	13
2.4 Uso de vectores para terapia génica	14
2.4.1 Definición de vector	14
2.4.2 Características de vectores génicos	15
2.4.3 Vectores génicos y HRE	18
3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVOS	20

4.1	Objetivo general	20
4.2	Objetivos particulares	20
5.	MÉTODOS	21
5.1	Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	21
5.2	Descripción de vectores	21
5.3	Preparación de las células competentes.....	25
5.4	Transformación de células competentes.....	25
5.5	Extracción de ADN plasmidico	26
5.6	Digestiones enzimáticas	26
5.7	Electroforesis de ADN	27
5.8	Purificación de fragmentos de ADN	28
5.9	Ligación de ADN	28
5.10	Caracterización por PCR	29
5.11	Condiciones de cultivo de la línea celular B16F10	29
5.12	Preparación de complejos PEI-ADN.....	30
5.13	Cuantificación de luciferasa en células B16	30
5.14	Análisis estadístico	31
6.	RESULTADOS	32
6.1	Identificación de los elementos de respuesta a hipoxia	32
6.2	Construcción del vector que responde a hipoxia	34
6.3	Cuantificación de luciferasa en células B16	39
7.	DISCUSIÓN	43
8.	CONCLUSIONES	45
	PERSPECTIVAS	45
	LITERATURA CITADA	46

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Características de los vectores más utilizados para el envío de material genético.....	16
2. Reacción de digestión de pNFkB-Luc	27
3. Reacción de digestión de pUC-IDT-TK	27
4. Reacción de digestión de pUC-IDT-HRE	27
5. Reacción de digestión de pHRE-Luc	27
6. Oligonucleótidos utilizados para la caracterización de pHRE-Luc	29

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Microambiente tumoral	4
2. Elementos de respuesta a hipoxia	7
3. Estructura de HIF1- α y HIF-1 β	8
4. Regulación de la síntesis de la proteína HIF-1 α	9
5. HIF-1 α en niveles normales de oxígeno	11
6. HIF-1 α en condiciones de normoxia e hipoxia	13
7. Vectores no virales	17
8. Mapa del vector pNFkB-Luc	21
9. Mapa del vector pUC-IDT-TK	22
10. Mapa del vector pUC-IDT-6HRE	23
11. Mapa del vector pHRE-Luc	24
12. Fórmula para ligaciones de ADN	28
13. Secuencia de las 6 repeticiones en tándem de los HRE	32
14. Sitios de unión a HIF	33
15. Secuencia del promotor mínimo de la Timidina quinasa humana.....	34
16. Caracterización enzimática de los vectores	35
17. Mapa de la construcción del vector hipóxico	36
18. Clonas de pHRE-Luc	37
19. Digestiones enzimáticas de las clonas pHRE-Luc	38
20. Caracterización de pHRE-Luc por enzimas de restricción	38
21. Caracterización de pHRE-Luc por PCR.....	39

22. Concentraciones de CoCl_2	40
23. El vector pHRE-Luc en condiciones de normoxia e hipoxia	41
24. Efecto de pRNAi-HIF en la cuantificación de luciferasa de pHRE-Luc	42

NOMENCLATURA

aa	Aminoácidos	IGF2	Factor de crecimiento insulínico 2
ADN	Ácido desoxirribonucleico		
ADP	Adenosín difosfato		
ARD1	Acetil transferasa 1		
ATP	Adenosín trifosfato	MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
BAL	Bacterias ácido lácticas	MCF-7	Fundación 7 de cáncer en Michigan
BSA	Albúmina de suero bovino		
Ca	Calcio		
CBP	Proteínas de unión	NFkB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B
DMEM	Medio de Eagle's modificado por Dulbecco's		
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	NLS	Señales de localización nuclear
EGFR	Receptor de factores de crecimiento insulínico 1	ODDD	Dominio de degradación dependiente de oxígeno
FH	Fumarato hidratasa		
FIH	Factor inhibidor de HIF	PBS	Tampón fosfato salino
GDV	Vehículos para la entrega de genes	PC-3	Cáncer de próstata
HIF	Factor inducible por hipoxia	PH	Prolina hidroxilasa
HRE	Elementos de respuesta a hipoxia	PIP3	Fosfatidilinositol 3 quinasa
		RCC	Células renales de carcinoma
		RLU	Unidades relativas de luz

RNA	Ácido ribonucleico
SDH	Succinato deshidrogenasa
SV40	Virus del simio 40
TAD	Dominio de transactivación
TCA	Ciclo tricarboxílico
TGF	Factor transformante de crecimiento
TK	Timidina quinasa
U	Unidades
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VHL	Von Hippel-Lindau
2OG	2-oxoglutarato

RESUMEN

La hipoxia es una característica común en los tumores sólidos, contribuyendo local y sistémicamente a la progresión tumoral, además de la falta de respuesta a la radioterapia y quimioterapia. La presencia de regiones hipóxicas en neoplasias malignas es uno de los factores predictivos más importantes, debido a que induce una amplia gama de respuestas fisiológicas y desempeña un papel crucial en la patogénesis de varias enfermedades humanas. Paradójicamente la hipoxia también es un blanco terapéutico atractivo ya que se produce hipoxia severa solo en el tejido del tumor sólido. El sistema de regulación HRE/HIF1 es común en todas las células de mamíferos y tejidos humanos, se puede utilizar para lograr la expresión selectiva de genes terapéuticos en condiciones de hipoxia. Cuando HREs derivados de diferentes genes se colocan en plásmidos y sistemas de vectores virales, confieren inducibilidad hipóxica sobre los promotores heterólogos en varios tipos de células por lo que la hipoxia puede ser explotada para el tratamiento de cáncer selectivo. En el presente trabajo se creó y caracterizó el vector hipóxico pHRE-Luc y se comprobó su funcionalidad en la línea celular B16F10 mediante la medición de la expresión génica del gen reportero luciferasa en condiciones de hipoxia y normoxia bajo la influencia de 6 copias de elementos sensible a la hipoxia (HRE) del gen de la eritropoyetina (Epo). Los resultados muestran que en condiciones de hipoxia, el vector pHRE-Luc (6HRE-Luc) fue 4 veces más eficiente que en normoxia para inducir la expresión génica. Este vehículo proporciona las bases para plantear un sistema sitio dirigido a las regiones hipóxicas de los tumores para terapia génica específica del cáncer.

ABSTRACT

Hypoxia is a common feature in solid tumors that contributes locally and systemically in tumor progression, in addition to lack of response to radiotherapy and chemotherapy. The presence of hypoxic regions in malignant tumors is one of the most important predictors, also induces a wide range of physiological responses and plays a crucial role in the pathogenesis of several human diseases. Paradoxically hypoxia is also an attractive therapeutic target since severe hypoxia occurs only in solid tumor tissue. The regulation system HRE / HIF1 is common in all mammalian cells and human tissues, it can be used to achieve selective expression of therapeutic genes under hypoxic conditions. When HREs derived from different genes are placed on plasmids and viral vector systems confer hypoxic inducibility on heterologous promoters in several cell types. Hypoxia can be exploited for selective treatment of cancer. In this work, it was created and characterized a hypoxic vector pHRE-Luc, and its functionality was confirmed in the cell line B16F10 by measuring gene expression of the luciferase reporter gene in the hypoxia and normoxia condition under the influence of six copies of a hypoxia responsive elements (HRE) from the erythropoietin gene (Epo). The results show that under hypoxia, the pHRE-Luc (6HRE-Luc) vector was 4 times more efficient than in normoxia to induce gene expression. This vehicle provides the basis for raising a site system designed to hypoxic regions of tumors for specific cancer gene therapy.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un grupo de enfermedades que constituye un crecimiento anormal de las células causado por múltiples cambios en la expresión de genes que conducen a una pérdida del equilibrio de la proliferación y muerte celular. Los tumores sólidos se caracterizan por una baja tensión de oxígeno en células y tejidos que se conoce como hipoxia, contribuyendo local y sistemáticamente a la progresión tumoral, además de la falta de respuesta a la radioterapia y quimioterapia, la cual promueve la inducción transcripcional de una serie de genes que participan tanto en la angiogénesis, el metabolismo del hierro y la glucosa, así como en la supervivencia y la proliferación celular.

El factor de transcripción HIF-1 es el mayor regulador de la adaptación del tumor a la hipoxia, induciendo la expresión de muchos genes que permiten a las células sobrevivir en estas condiciones (Arvelo y Cotte, 2009; Monti y Gariboldi, 2011). La presencia de regiones hipóxicas en neoplasias malignas es uno de los factores predictivos y más importantes, también induce una amplia gama de respuestas fisiológicas y desempeña un papel crucial en la patogénesis de varias enfermedades humanas (Lee *et al.*, 2006).

Muchos genes sensibles a hipoxia son regulados por elementos de respuesta a hipoxia (HRE) y el dominio (bHLH-PAS), localizados dentro de regiones potenciadoras de estos promotores, las secuencias contienen 5' (A/G) CGT (G/C) (G/C) -3', estos elementos se encuentran a diferentes distancias y orientaciones de las regiones codificantes de varios genes regulados por hipoxia. Típicamente contiene varios sitios de unión de factores de transcripción, uno de los cuales es esencial para la hipoxia mediante la unión de HIF 1 (Greco *et al.*, 2002).

Paradójicamente la hipoxia también es un blanco terapéutico atractivo, ya que se produce hipoxia severa solo en el tejido del tumor sólido (Denny, 2000; Baumann *et al.*, 2008).

El sistema de regulación HRE/HIF1 es común en todas las células de mamíferos y tejidos humanos, se puede utilizar para lograr la expresión selectiva de genes terapéuticos en condiciones de hipoxia. Cuando HREs derivados de diferentes genes se colocan en plásmidos y sistemas de vectores virales, confieren inducibilidad hipóxica sobre los promotores heterólogos en varios tipos de células, por lo que la hipoxia puede ser explotada para el tratamiento de cáncer selectivamente. En este estudio se construyó el vector pHRE-Luc que cuenta con un promotor regulado por hipoxia, el cual contiene 6 repeticiones en tándem de los HRE. El vector fue transfectado a células de melanoma murino en condiciones de normoxia e hipoxia mimética durante 24h, obteniendo una mayor expresión del gen reportero en condiciones de hipoxia. También se probó un RNA de interferencia dirigido a HIF, que es una proteína necesaria para la activación del promotor de pHRE-Luc, el RNA de interferencia redujo significativamente la expresión del gen reportero en condiciones de hipoxia, esto comprueba que el promotor de hipoxia es dependiente de HIF.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del cáncer.

Cáncer es el nombre general para un grupo de más de 100 enfermedades, aunque hay muchos tipos de cáncer, en un inicio las células anormales crecen descontroladamente, los cánceres no tratados pueden causar enfermedades graves e incluso la muerte. El crecimiento celular del cáncer es diferente al de las células normales, en lugar de morir, continúan creciendo y forman nuevas células anormales, las cuales pueden invadir otros tejidos, algo que las células normales no pueden hacer. Las células se transforman en células cancerosas debido a cambios en su ADN (ácido desoxirribonucleico) el cual se encuentra en cada célula y dirige todas sus acciones. En una célula normal, cuando el ADN se daña la célula repara el daño o muere. En las células cancerosas el ADN dañado no se repara, la célula no muere y se pueden dividir sin parar formando tumores.

Una característica de los tumores, es el nivel bajo de oxígeno lo que genera hipoxia. La hipoxia intratumoral se ha considerado una fuerza que conduce a la progresión tumoral con pronóstico negativo en los pacientes (Greijer y Wall, 2004; López, 2006; Monti y Gariboldi, 2011; Xu *et al.*, 2013).

2.2 Hipoxia y su relación con el cáncer.

El suministro adecuado de oxígeno a los tejidos es esencial para el mantenimiento de la función de las células de mamíferos (Greer *et al.*, 2012). La hipoxia tisular se produce cuando hay un desequilibrio entre la oferta y el consumo de oxígeno (Gilany y Vafakhah, 2010). La deficiencia en este suministro caracteriza aquellas situaciones fisiopatológicas tales como insuficiencia circulatoria, el infarto y la isquemia cerebral en la cuales existe insuficiente flujo sanguíneo para proporcionar la oxigenación necesaria (Zitta *et al.*, 2010; Greer *et al.*, 2012).

La creciente evidencia, estudios clínicos y experimentales señala el papel fundamental y fisiopatológicos de la hipoxia en el cáncer (Gilany y Vafakhah, 2010). Las células tumorales muy proliferativas forman rápidamente masas, que al estar localizadas lejos de los vasos sanguíneos, no alcanzan el aporte necesario de oxígeno y nutrientes, en tales condiciones el factor inducible por hipoxia (HIF) se activa y, a su vez, activa o reprime la expresión de una amplia variedad de genes que inician la formación de nuevos vasos sanguíneos y modifican el metabolismo, estableciendo así las condiciones favorables para el desarrollo de la masa tumoral y su proliferación (Denny, 2010).

La hipoxia que se observa con frecuencia en los tumores sólidos (Figura 1), ha sido identificada como un importante pronóstico negativo. Debido a una menor disponibilidad del oxígeno en el tumor, aumenta la resistencia a radioterapia, quimioterapia, fármacos, además activa una cascada señalizadora que promueve la inducción o represión de la transcripción de una multitud de genes implicados en eventos tales como: la angiogénesis, metabolismo del hierro y la glucosa, recurrencia local, aumento de metástasis, muerte celular y baja supervivencia en los pacientes (Boticario y Cascales, 2010; Denny, 2010; Xu *et al.*, 2013).

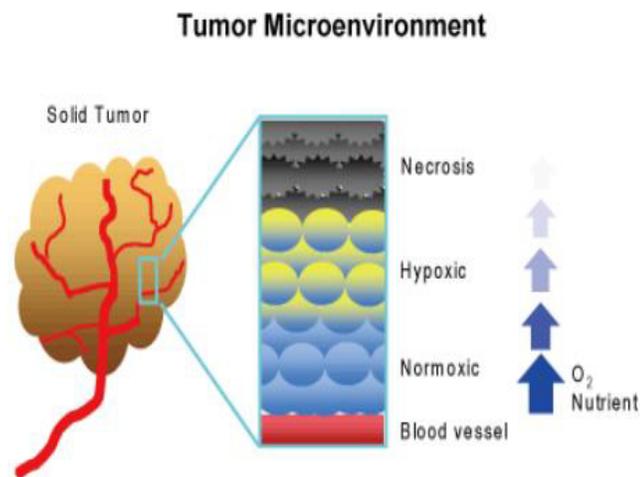


Figura 1. Microambiente tumoral. Concentración de oxígeno en tumor sólido (Thomas Stefani *et al.*, 2013).

Existen cinco grupos de genes que son de importancia relevante para el desarrollo del cáncer, cuya expresión se induce por HIF-1 y codifican las siguientes proteínas: factores angiogénicos, transportadores de la glucosa, enzimas glucolíticas, factores de supervivencia y factores de invasividad (Aquino y González, 2010). La modulación de los genes estimulados por el HIF, implicados en el metabolismo tumoral y el control de pH intracelular, pueden ser de gran utilidad en la terapia del cáncer. Sin embargo, antes de intentar profundizar en la aplicación clínica es esencial poseer mayor conocimiento básico de la vías señalizadoras, de los mecanismos moleculares que regulan HIF y de las consecuencias biológicas de su acción en el metabolismo tumoral, crecimiento e invasión (Boticario y Cascales, 2010; Greer *et al.*, 2012).

2.3 Factor inducible por hipoxia (HIF).

Los estudios sobre el elemento de respuesta a hipoxia del gen de la eritropoyetina condujeron a Samenza y Wang en 1992, al descubrimiento de HIF-1 y en 1995 a su aislamiento y purificación a partir de extractos nucleares (Hu *et al.*, 2013). HIF es un factor de transcripción regulador maestro de la adaptación celular a la falta de oxígeno. HIF funciona cuando el nivel de oxígeno en los tejidos es bajo y no funciona cuando dicho nivel se eleva (Liu *et al.*, 2012). HIF es una proteína α/β heterodimérica que comprende una subunidad α lábil, que depende del oxígeno, y una subunidad β estable no dependiente del oxígeno, también denominada ARNT (Srinivasan y Dunn, 2011; Zhou *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2013). Una tercera proteína relacionada es HIF-3 α , que parece funcionar inhibiendo la HIF-1 α (Aquino y González, 2010).

La subunidad HIF-1 β , se expresa constitutivamente y la subunidad HIF-1 α la cual es codificada por dos genes en mamíferos (HIF1 α , HIF2 α) se expresa de forma ubicua en el organismo, mientras HIF2- α su distribución tisular es más restringida incluyendo células endoteliales vasculares, células renales, hepatocitos y miocardiocitos, la expresión de estas subunidades alfa se encuentra enormemente regulada (Aquino y González, 2010; Monti y Gariboldi, 2011).

La expresión de ésta última la determina el ritmo de su síntesis y degradación. La síntesis de HIF-1 α está regulada por mecanismos independientes del oxígeno, mientras su degradación es regulada principalmente por mecanismos que dependen del oxígeno. A la fecha se han identificado más de 200 genes cuya expresión se activa por HIF (Hu *et al.*, 2013).

La expresión de varios de los genes blancos de HIF-1, tales como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), se induce por hipoxia en la mayoría de tipos celulares. Sin embargo, para la mayoría de los genes blanco de HIF-1, la expresión se induce por hipoxia de manera específica al tipo celular. Como la actividad de HIF-1 se induce por hipoxia en casi todos los tipos celulares, está claro que HIF-1 por sí solo, no puede explicar la expresión génica específica, más bien, es la interacción funcional del HIF-1 con otros factores de transcripción y cofactores como: PACF, P300 / CBP factor asociado y hsp90, lo que determina el subgrupo de genes blanco de HIF-1 que se activa en cualquier célula hipóxicas particular. HIF-1 puede ser considerado como un mensajero que se traslada al núcleo para activar la respuesta a la hipoxia a nivel transcripcional (Boticario y Cascales, 2010).

2.3.1 Estructura y dominios.

El gen de HIF-1 α está localizado en el cromosoma 14q2124, compuesto por 15 exones en una región de 53Kb de ADN genómico. Este gen codifica para una proteína de 826 aminoácidos con un peso molecular de 120-130 kDa (Aquino y González, 2010).

La mitad del dominio N-terminal contiene motivos bHLH-PAS implicadas en la respuesta a la hipoxia y necesarios para la dimerización, cuya región básica es la que proporciona la unión específica al HRE (elementos de respuesta a hipoxia), en la secuencia de reconocimiento 5 T/A/G-CGTGH-3 (Figura 2).

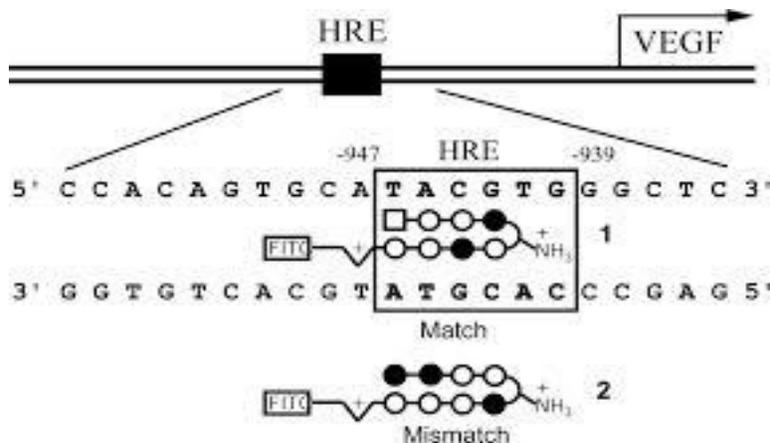


Figura 2. Elementos de respuesta a hipoxia. Secuencia de reconocimiento a HIF-1 (Olenyuk *et al.*, 2004).

La presencia de un sitio de unión al DNA- HIF-1 es necesaria, pero no suficiente, para dirigir la expresión de genes en respuesta a la hipoxia, lo que sugiere que HIF-1 ha de interactuar con otros factores de transcripción que se unen a DNA en sitios adyacentes. PAS es un dominio Per-Arnt-Sim con sus repeticiones A y B, que se encuentran en ambas subunidades. TAD, el dominio de transactivación, se encuentra en ambas subunidades en el extremo C-terminal, pero la subunidad hHIF-1 α , posee otro dominio N-TAD más cercano al N-terminal.

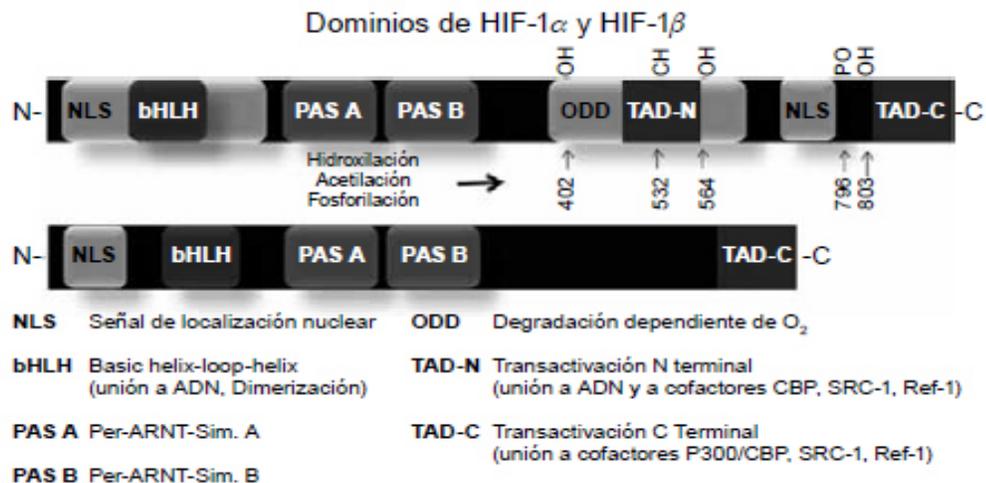


Figura 3. Estructura de HIF-1 α y HIF-1 β (Aquino y González, 2010).

El C-TAD del HIF-1 α es el lugar de hidroxilación de la asparagina por el factor inhibidor del HIF (FIH), que inhibe la actividad transcripcional de esta subunidad. Ambas subunidades poseen también motivos NLS o señales de localización nuclear en el N-terminal y HIF-1 α , posee otro NLS cercano al C-terminal. Además contiene un único dominio en HIF-1 α llamado dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), que se localiza en los residuos de aminoácidos 401 +/- 603 (Figura 3) (Aquino y González, 2010; Monti y Gariboldi, 2011; Hu *et al.*, 2013).

2.3.2 Regulación de la síntesis de HIF-1 α

Los organismos aeróbicos están constantemente obligados a consumir oxígeno. Cuantas más células están presentes en un tejido más oxígeno se necesita. Cuando una célula se divide y da lugar a dos células hijas, el consumo de oxígeno se eleva, por tanto no sorprende que las vías principales que transducen señales proliferativas y de supervivencia a partir de receptores de factores de crecimiento, también han de inducir la expresión de HIF-1 α como estrategia para el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno. Las células proliferantes expresan el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), que estimula la angiogénesis con el objeto de proporcionar la perfusión adicional requerida para mantener la oxigenación de un número mayor de células.

Además las células proliferantes para generar ATP utilizan la ruta glucolítica en lugar del metabolismo oxidativo. La inducción de la angiogénesis y la glucolisis, paralela con la proliferación celular, está mediada en parte por activación de la síntesis del HIF-1. La elevación del HIF-1 en respuesta al estímulo de receptores de factores de crecimiento, difiere de la elevación del HIF-1 α en respuesta a la hipoxia en dos aspectos importantes. Primero, mientras la hipoxia eleva HIF-1 α en todos los tipos celulares, el estímulo mediante factores de crecimiento induce la expresión de HIF-1 α de manera específica del tipo celular. Segundo, mientras la hipoxia se asocia con la menor degradación del HIF-1 α , los factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas señalizadoras estimulan la síntesis de HIF-1 α vía activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) o de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Figura 4) (Boticario y Cascales, 2010).

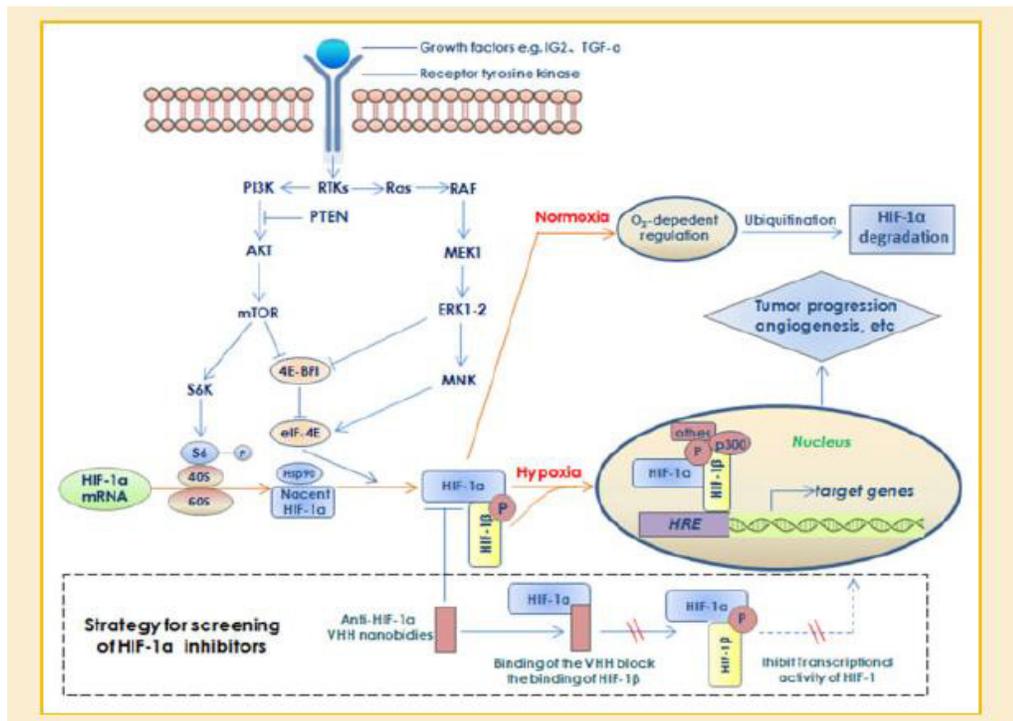


Figura 4. Regulación de la síntesis de la proteína HIF-1 α . (Hu *et al.*, 2013).

La expresión de la proteína HIF-1 α es muy sensible a cambios en su ritmo de síntesis debido a su vida media extremadamente corta en condiciones no hipóxicas. Además de los efectos sobre la síntesis de HIF-1 α , se ha demostrado que la activación de la vía señalizadora RAF-MEK-ERK estimula la función del dominio de transactivación de HIF-1 α . Este efecto se debe, al menos en parte, a la fosforilación por ERK del coactivador p300, con el cual interaccionan los dominios de transactivación. A diferencia de la hipoxia, que induce la estabilidad y actividad transcripcional de HIF-1 α en todos los tipos celulares, la regulación de la actividad HIF-1 por señalización por factores de crecimiento es específica de la célula. Las mutaciones oncogénicas que activan las vías de transducción de señales, inducen la actividad de HIF-1 α por varios mecanismos. Las mutaciones de pérdida de función en genes supresores de tumores se asocian con mayor actividad del HIF-1 (Boticario y Cascales, 2010; Hu *et al.*, 2013).

La pérdida de la función VHL origina una elevación notable en la actividad HIF-1 en condiciones no hipóxicas, debido a la alteración en la ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma del HIF-1 α y HIF-2 α . Aunque la regulación, dependiente del O₂, de la transactivación está todavía intacta, HIF-1 puede llegar a ser limitante en condiciones de sobreexpresión de HIF-1 α y HIF-2 α , que conducirían a un incremento en HIF1 transcripcionalmente activo, en condiciones no hipóxicas, en células carentes de VHL. Para algunos otros oncogenes y genes supresores de tumores, la mutación no solo tiene un efecto marcado en la progresión al cáncer, sino también sobre la actividad del HIF-1 (Boticario y Cascales, 2010).

Algunos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento insulínico 2 (IGF2) y el factor transformante del crecimiento alfa (TGF α), son también genes objetivos de HIF-1. La unión de estos factores a sus receptores como el receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1R) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), respectivamente activan vías de transducción de señales que conducen a la expresión del HIF-1 α y a la proliferación y supervivencia celulares. Por tanto, el HIF-1 contribuye a las vías de señalización autocrinas que son cruciales para la progresión al cáncer. Los mecanismos que conducen a los elevados niveles de HIF-1 α han sido esclarecidos mediante experimentos en líneas celulares cancerosas y se han complementado con demostraciones inmunohistoquímicas de sobreexpresión del HIF-1 α en biopsias de cáncer humano (Boticario y Cascales, 2010; Monti y Gariboldi, 2011; Greer *et al.*, 2012).

2.3.3 Cambios post-traduccionales en HIF-1 α

La señalización vía factor inducible por hipoxia 1 α requiere múltiples modificaciones post-traduccionales. Estas modificaciones son las que regulan la vida media del HIF-1 α y van a mediar su desestabilización y degradación. Entre estos cambios post-traduccionales cabe citar: las prolina hidroxilasas, la unión a la proteína VHL, la hidroxilación de la asparagina, la acetilación de la lisina y la acción de las quinasas (Boticario y Cascales, 2010).

Dos prolina hidroxilasas (PH) dependientes de oxígeno, que hidroxilan la subunidad alfa del heterodímero HIF α/β , determinan su estabilidad y actividad. La hidroxilación de los residuos de prolina en el dominio de degradación, dependiente de oxígeno (ODDD) del HIF-1 (prolinas 402 y 564 del HIF-1 α humano), señala la unión del HIF-1 α a un complejo ubiquitina ligasa E3 que contiene la proteína von Hippel-Lindau (VHL). VHL junto con un grupo de proteínas, elongina B, elongina C, Cul 2 y Rbx-1, regula la vida media de HIF-1 α en células bien oxigenadas (Monti y Gariboldi, 2011; Srinivasan y Dunn, 2011; Hu *et al.*, 2013). La interacción del HIF-1 α con VHL se acelera por acetilación del residuo lisina en 532, mediante una acetil transferasa (ARD1). La eliminación del HIF-1 α ocurre mediante la ubiquitinación post traduccional y posterior reconocimiento por la maquinaria destructora del proteosoma (Figura 5). Así que, en presencia de oxígeno y pocos minutos (se estima que en menos de 5 minutos) (Srinivasan y Dunn, 2011) después de su síntesis, la subunidad HIF-1 α sufre hidroxilaciones, se ubiquitina y se degrada por el proteosoma 26s (Monti y Gariboldi, 2011).

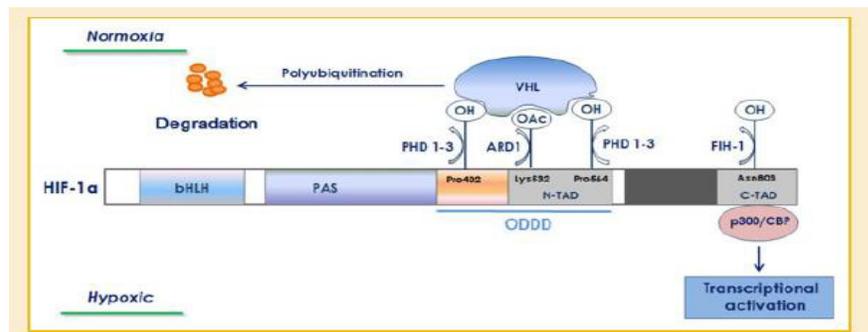


Figura 5. HIF1- α en niveles normales de oxígeno. (Hu *et al.*, 2013).

La PH, de la que existen tres isoformas, se regula a varios niveles. La concentración de oxígeno, no solo determina la actividad PH sino también su expresión, ya que los genes *phd2* y *phd3*, pero no *phd1*, se regulan por hipoxia/HIF. Esta regulación *feedback* asegura la rápida intervención cuando la concentración de oxígeno se restablece a un nivel elevado (Hu *et al.*, 2013).

Al igual que ocurre con el HIF-1 α , la PH está sometida a la degradación por el sistema ubiquitina-proteosoma, pero por diferentes ubiquitina E3 ligasas, Siah1 y Siah2, las cuales a su vez, se regulan también por el HIF. Además de oxígeno elevado, las PH requieren 2-oxoglutarato (2-OG) como cosustrato y ascorbato y Fe₂₊ como cofactores (Monti y Gariboldi, 2011; Greer *et al.*, 2012). El 2-OG es un metabolito del ciclo tricarboxílico (TCA), cuya concentración está regulada por el propio ciclo TCA. Para añadir otro nivel de complejidad, el succinato producido por la reacción hidroxilasa y por el ciclo TCA, actúa como inhibidor.

Es interesante destacar que las mutaciones en enzimas del ciclo TCA, tales como la succinato deshidrogenasa (SDH) y la fumarato hidratasa o fumarasa (FH), se encuentran conectadas con la tumorigénesis. Tanto la SDH como la FH se han identificado como supresores de tumores y la pérdida de su función por mutaciones, conduce a la acumulación de succinato y fumarato, respectivamente (Hu *et al.*, 2013).

En estas condiciones el HIF-1 α es estable y el HIF-1 activa o reprime genes. Si por cualquier razón el flujo de eventos que conduce a la destrucción del HIF-1 α no se completara o fuera defectuoso, y alguna proteína HIF-1 α escapara de la degradación, la actividad HIF-1 α sería, no obstante, inhibida por otra hidroxilasa dependiente de oxígeno, denominada factor inhibidor del HIF-1 (FIH). La hidroxilación por este enzima se verifica en un residuo asparagina (813), situado en el dominio de activación transcripcional, que se encuentra en el C-terminal (C-TAD) de la subunidad HIF-1 α , con la inhibición resultante de la interacción con las proteínas de unión (CBP) a los coactivadores transcripcionales (CREB) y p300. Así que, las células han desarrollado un mecanismo adicional en el caso de malfuncionamiento de la PH, aunque esto puede reflejar también un mecanismo para la inducción selectiva de genes (Boticario y Cascales, 2010).

En presencia de bajos niveles de oxígeno (hipoxia), o en condiciones de elevadas concentraciones de especies reactivas de oxígeno, estas enzimas no funcionan, el HIF1 α es estable y tiene la capacidad de translocarse al núcleo donde interacciona con la subunidad beta que se expresa de manera constitutiva no influenciada por la concentración de oxígeno (Figura 6) (Monti y Gariboldi, 2011; Srinivasan y Dunn, 2011; Hu *et al.*, 2013).

El complejo α/β HIF se une a secuencias consenso del ADN 5'-(A/G)CGTG-3' denominadas: elementos de respuesta a hipoxia (HRE) que se encuentran presentes en las regiones promotoras de los genes cuya transcripción va a ser regulada por HIF-1 α (Aquino y González, 2010).

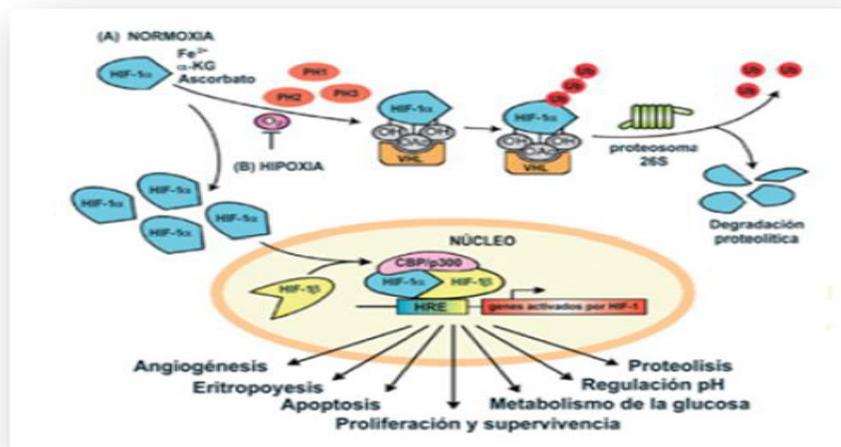


Figura 6. HIF-1 α en condiciones de normoxia e hipoxia (Boticario y Cascales, 2010).

2.3.4 Importancia de HIF/HRE

Cada vez son más los genes identificados, y se ha demostrado que al menos 70 son activados por el complejo HIF. Los más investigados son aquellos implicados en la angiogénesis, vasodilatación, eritropoyesis, metabolismo anaeróbico de la glucosa, apoptosis proliferación y supervivencia. Aunque el HIF aumenta la actividad transcripcional de la mayoría de genes, también puede reprimir la transcripción de otros, mediante mecanismos aún poco estudiados.

HIF-1 juega un papel clave en la reprogramación del metabolismo en el cáncer al activar los genes que codifican los transportadores de la glucosa y las enzimas glucolíticas, que incorporan la glucosa y la convierten en lactato, el desvío del metabolismo oxidativo hacia metabolismo glucolítico, es lo que permite el mantenimiento de la homeostasis redox y la supervivencia celular en condiciones de hipoxia prolongada. Los niveles bajos de oxígeno son un blanco terapéutico atractivo ya que se produce severa hipoxia solo en el tejido del tumor sólido (Denny, 2000; Baumann *et al.*, 2008). El descubrimiento de los complejos HIF/HRE, que median las respuestas transcripcionales a los cambios en la concentración de oxígeno, ha renovado el interés por descubrir y desarrollar terapias dirigidas en base al microambiente hipóxico tumoral. Dentro del tratamiento de pacientes con cáncer la terapia génica se presenta como una alternativa importante, sin embargo el éxito de esta terapia depende en gran medida del desarrollo de un vector o vehículo de envío que sea capaz de entregar de forma eficiente y selectiva el material genético deseado en las células diana, esto se puede lograr con un vector específico que se active solo en las zonas hipóxicas del tumor sólido (Song *et al.*, 2006; Boticario y Cascales, 2010).

2.4 Uso de vectores para terapia génica.

2.4.1 Definición de vector

Se define vector como el vehículo que transporta un gen al interior de uno o varios hospedadores y permite su replicación y/o expresión. Para actuar como vehículos, los vectores deben ser capaces de introducirse en la célula hospedadora y, una vez dentro, replicar y producir múltiples copias de sí mismo (Kok *et al.*, 1984). Todo vector consta de una unidad básica de replicación, uno o varios genes que permiten su selección en la célula o células hospedadoras y sitios de restricción que permiten la incorporación del ADN exógeno (Simon y Chopin, 1988).

El replicón básico puede provenir de un plásmido o de un bacteriófago de ADN de cadena doble, o de cadena sencilla si tiene intermediarios de replicación de doble cadena. En ocasiones, en la construcción de un vector se combinan más de un replicón.

Algunos vectores poseen promotores inducibles, que impiden la sobre-expresión prematura del producto, lo que resulta necesario cuando el producto puede ser tóxico para la célula hospedadora o alcanzar niveles que interfieran con la división celular (Simons *et al.*, 1990; Pouwels *et al.*, 1994).

Podemos mencionar también los vectores lanzadera (“*shuttle vector*”); denominando con este término a vectores de clonación que se multiplican en al menos dos hospedadores diferentes, frecuentemente poco relacionados.

2.4.2 Características de Vectores génicos.

Dentro del tratamiento de pacientes con cáncer la terapia génica se presenta como una alternativa importante, sin embargo el éxito de esta terapia depende en gran medida del desarrollo de un vector o vehículo de envío que sea capaz de entregar de forma eficiente y selectiva el material genético deseado en las células diana, además que este vehículo presente un mínimo de toxicidad para las células normales (St George, 2003).

Muchas formas de microorganismos han evolucionado para infectar las células con eficacia y de forma estable, mientras que evaden la respuesta inmune del huésped. Además, muchos de estos microorganismos son tolerados por el sistema inmune, incluyendo las bacterias comensales en el intestino y virus transmitidas por transfusión en el hígado. El vehículo "ideal" de suministro de genes especializados (GDV) por sus siglas en inglés "specialized gene delivery vehicles", debe tener el tamaño apropiado para el embalaje de carga, la capacidad para evadir el reconocimiento inmune, especificidad de la célula diana, y entrega eficiente de la carga (Min *et al.*, 2010).

Uno de los vehículos que se han estudiado ampliamente para el envío de material génico son los virus, los cuales son eficientes en la transfección a las células tumorales, en ellos han sido desarrolladas diferentes estrategias a manera de obtener un sistema eficaz de expresión genética, los cuales incluyen la orientación específica al tejido de interés, minimizar o eliminar la expresión de genes virales que podrían llevar a la pérdida de la señal transducida, así como métodos de identificación de dosis respuesta para los distintos tipos de cáncer, todo esto se ha realizado para lograr obtener el mayor beneficio terapéutico, pese a ello no se ha conseguido desarrollar un modelo idóneo, ya que en muchos de los modelos virales se presenta cierta tasa de respuesta inmunológica hacia el vehículo lo cual disminuye el potencial del sistema, otro punto donde se encuentra una desventaja a estos modelos es la transfección inespecífica, esto es, que presentan cierta citotoxicidad a células normales (St George, 2003) (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los vectores más utilizados para el envío de material genético (Min *et al.*, 2010).

	Vectores virales	Vectores bacterianos	Bacteriófagos	Mini células
Orientación natural al cáncer	±	+++	±	±
Seguro	+	+	+++	+
Eficiente	+++	+	+	+
Baja producción de costo	+	+++	+++	+
Producción simple	+	+++	+++	+
Entrega simple	++	+++	+	+++
Cantidad de carga molecular	++	+++	+	+++

Por estas propiedades no deseadas se ha buscado utilizar otros métodos de envío de material genético en los cuales puedan evadirse contrariedades como estas. Un par de décadas atrás se ha puesto gran interés en los denominados vectores no virales, demarcando que son adecuados para utilizarlos como vehículos de envío en terapia génica respecto a su facilidad de uso, producción a gran escala y la falta de respuesta inmune específica considerable hacia ellos, por esto se ha tomado en interés a una variedad de sistemas no virales para utilizarlos en terapia génica, entre ellos se han puesto especial atención en las bacterias (Li y Huang, 2000) (Figura 7).

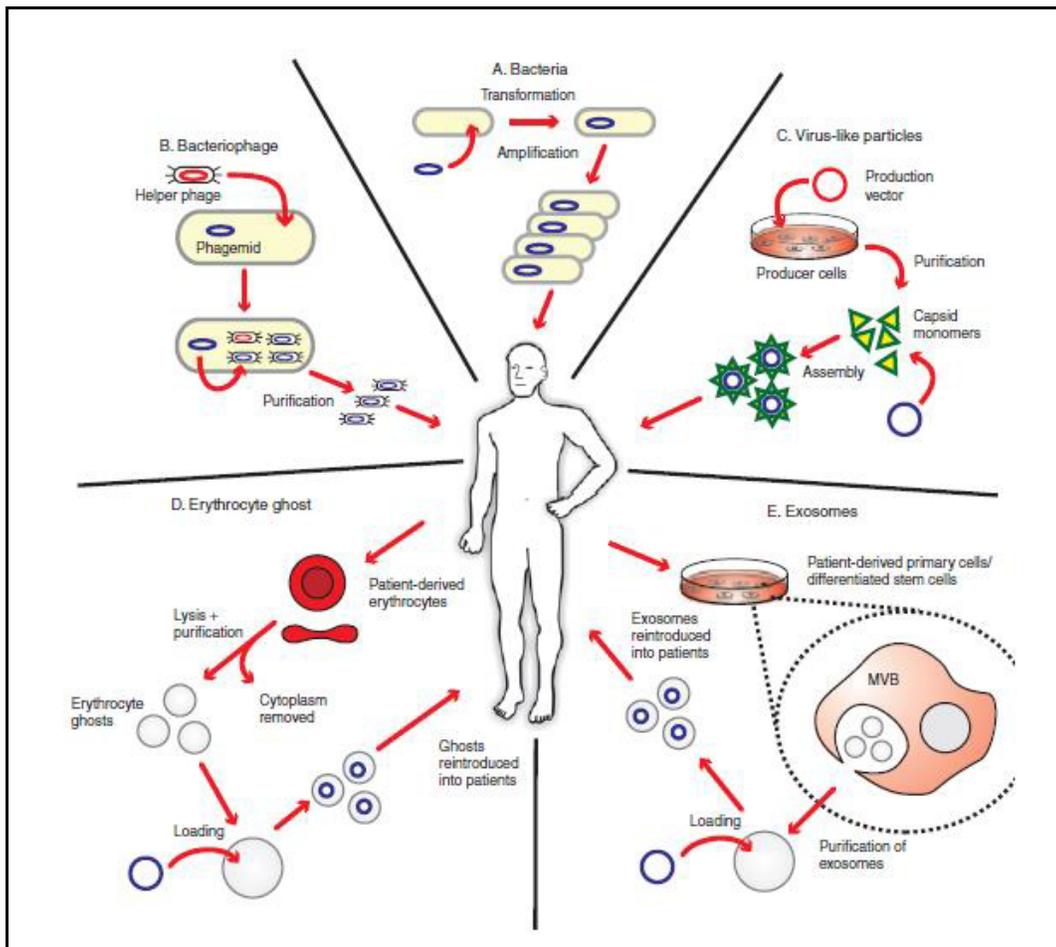


Figura 7. Vectores no virales. Representación de algunas de las diferentes alternativas de vehículos biológicos utilizados para el envío de plásmidos y/o transfección de células.

2.4.3 Vectores génicos y HRE.

El uso de hipoxia como blanco terapéutico es de reciente interés, por lo que no se ha explotado el uso de estos vectores como tratamiento selectivo de cáncer. Sin embargo varios estudios indican que el ambiente hipóxico puede ser usado para activar la expresión génica heteróloga impulsada por los HRE. Las secuencias HREs le confieren al vector inducibilidad hipóxica sobre los promotores heterólogos en varios tipos de células (Lee *et al.*, 2006).

Algunos de los estudios que se han realizado es el de Dachs y colaboradores, quienes mostraron que un HRE del gen fosfoglicerato quinasa 1 de ratón puede ser usado para el control de expresión de un gen terapéutico *in vitro* e *in vivo*, Shibata y colaboradores desarrollaron un vector sensible a hipoxia con 5 repeticiones de HRE derivados del gen VEGF el cual tiene una mayor regulación de los genes heterólogos en condiciones de hipoxia (Ruan H *et al.*, 2001). Otro estudios donde los HRE regulan la expresión de un gen reportero fue realizado por Lee y colaboradores donde ellos demostraron mediante un promotor quimérico que contiene elementos de respuesta a metales y los HRE rio arriba del promotor de CMV, es capaz de de lograr una alta expresión del gen heterólogo en áreas específicas donde existen las condiciones de hipoxia, demostrando así el potencial de los HRE en la terapia génica (Lee *et al.*, 2006).

3. HIPÓTESIS

Los elementos genéticos mínimos de respuesta a hipoxia identificados en algunos genes eucarióticos pueden ser usados para construir un promotor que sea capaz de controlar la expresión de genes heterólogos en condiciones de hipoxia.

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general.

Construir un vector utilizando secuencias genéticas de respuesta a hipoxia sintéticas y analizar su capacidad de controlar la expresión de luciferasa en células transfectadas bajo condiciones inducidas de hipoxia.

4.2 Objetivos particulares.

Seleccionar un promotor eucariote en base a las secuencias de elementos de respuesta a hipoxia.

Diseñar el vector que responde a hipoxia.

Analizar la regulación del gen reportero adyacente a las secuencias génicas de respuesta a hipoxia en condiciones de normoxia y niveles bajos de oxígeno, en células.

Demostrar la capacidad de activación del promotor en respuesta a condiciones de hipoxia utilizando un ARN de interferencia.

5. MÉTODOS

5.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.

Se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli*, para su crecimiento se empleó medio de Luria-Bertani (LB) (10g de triptona, 5g de extracto de levadura y 5g de NaCl por litro). Los medios se inocularon de una azada de *E. coli* proveniente de medio sólido y se incubaron a una temperatura de 37°C con una agitación de 200-400 rpm durante un tiempo máximo de 20h aproximadamente. Para su conservación se resuspendió en una mezcla a partes iguales de medio líquido fresco y glicerol al 15% v/v. La cepa se almacenó a -80°C. Para la selección del vector se utilizó ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml.

5.2 Descripción de vectores.

Para este proyecto de utilizaron cuatro diferentes vectores: el primer vector que se utilizó fue pNF κ B-Luc Clontech®, el cual responde al factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF κ B). El vector contiene el gen de luciferasa, así como también tiene múltiples copias de secuencias consenso del NF κ B fusionadas a la región promotora de la Timidina Quinasa del Virus del Herpes Simple (HSV-TK), un sitio de clonación y un gen de resistencia a ampicilina (Figura 8).

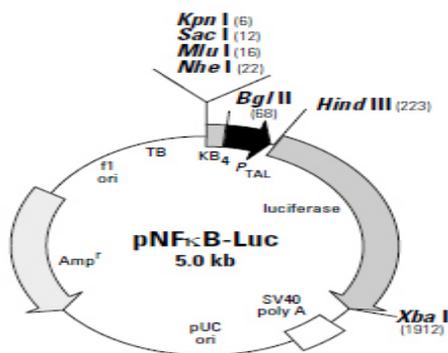


Figura 8. Mapa del vector pNF κ B-Luc.

El segundo vector que se utilizó fue pUC-IDT-TK, que contiene la región promotora del gen Timidina Quinasa de humano, este promotor fue sintetizado e integrado en un vector de la empresa Integrated DNA Technologies® (IDT). El promotor contiene las enzimas de restricción Xho I y Nco I en sus extremos para su posterior clonación en otro vector, además de un gen de resistencia y un replicón para *E. coli*. (Figura 9).

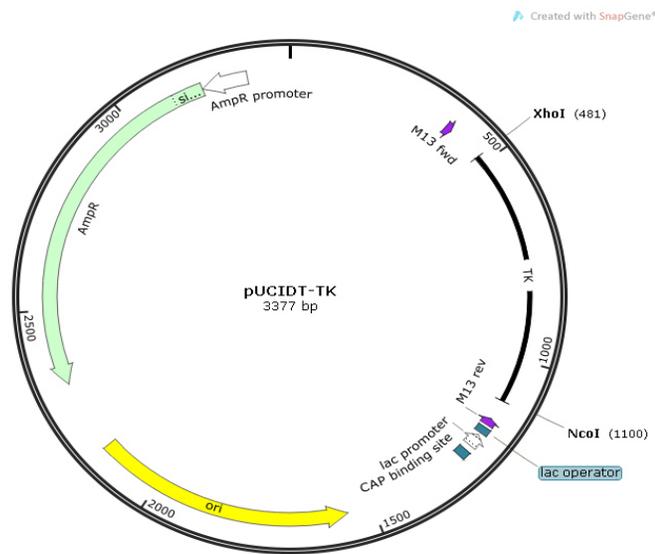


Figura 9. Mapa del vector pUC-IDT-TK.

El tercer vector que se utilizó fue pUC-IDT-6HRE, que contiene secuencias consenso en tándem de los HRE, los cuales son una secuencia de reconocimiento de la proteína HIF-1 α y HIF-2 α , estas secuencias en tándem fueron sintetizadas e integradas en un vector de la empresa IDT. Las repeticiones en tándem 6HBR contiene las enzimas de restricción Nhe I y Xho I en sus extremos para su posterior clonación en otro vector, además contiene un gen de resistencia y un replicón para *E. coli*. (Figura 10).

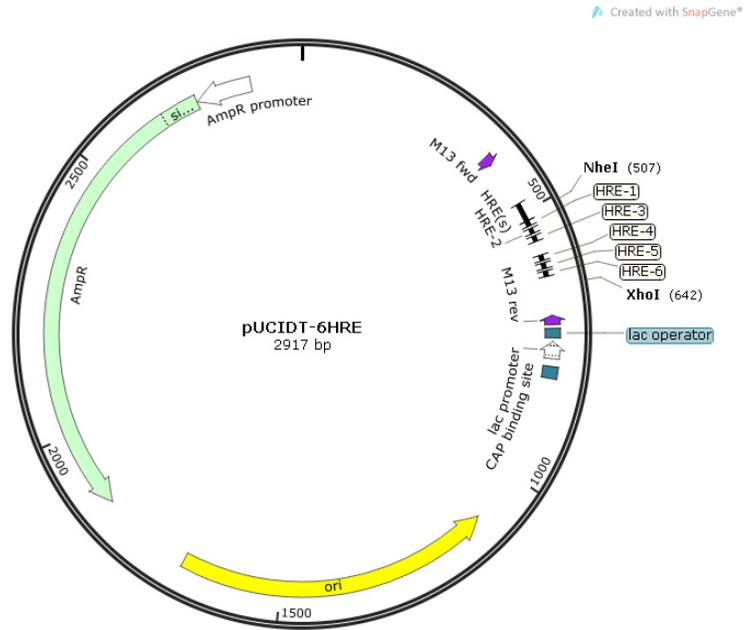


Figura 10. Mapa del vector pUC-IDT-6HRE.

El cuarto y último vector que se utilizó fue pHRE-Luc en el cual se integran las secuencias consenso en tándem de los HRE unidas al promotor mínimo de la Timidina Quinasa humana. Los HRE en tándem le confieren una inducibilidad hipóxica al promotor heterólogo, además de ser una secuencia de reconocimiento de la proteína HIF-1 α y HIF-2 α . Contiene el gen reportero de la luciferasa, una señal de poliadenilación del virus del simio 40 (SV40), un gen de resistencia y un replicón para *E. coli*. (Figura 11). El vector fue utilizado para los ensayos de luciferasa en normoxia e hipoxia.

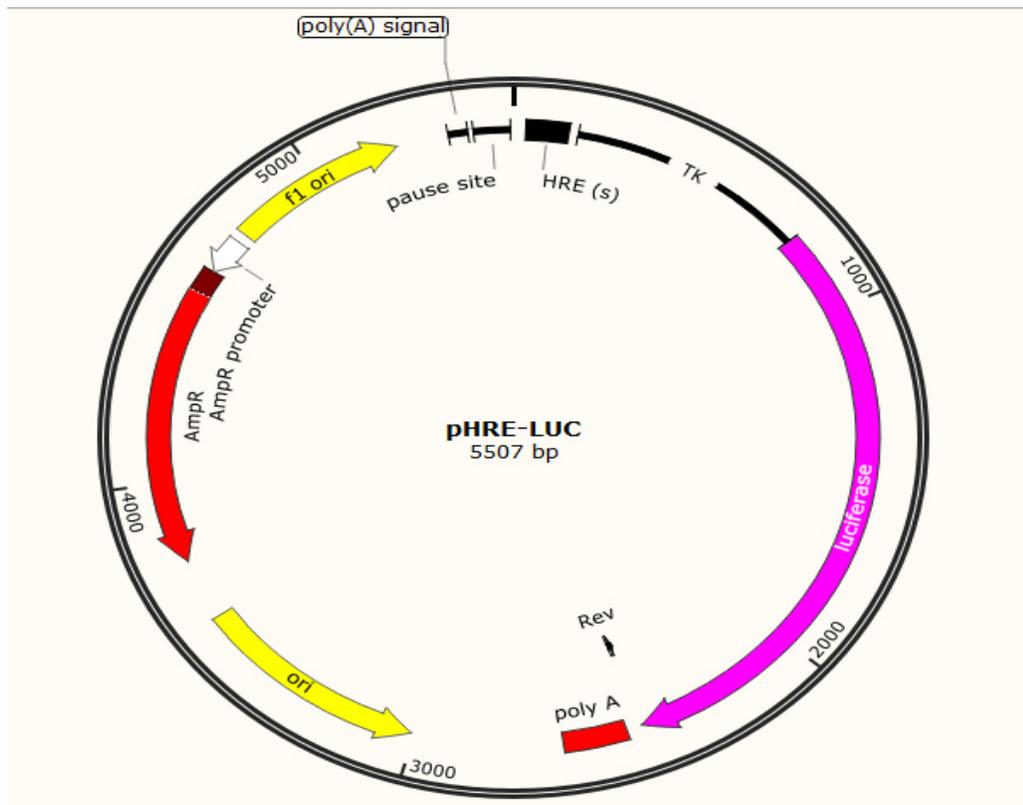


Figura 11. Mapa del vector pHRE-Luc.

5.3 Preparación de células competentes de la cepa *E. coli* DH5α por cloruro de calcio.

De una cepa previamente activada se inoculó 1ml a 100 ml de caldo LB, se incubó a 37°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.4, una vez alcanzada esta densidad se transfirió a un tubo estéril y se incubó a 4°C por 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 2700g a 4°C, se tiró el sobrenadante, se resuspendió suavemente el pellet en la solución fría de MgCl₂ - CaCl₂ (80mM MgCl₂, 20mM CaCl₂), se incubó 30 min a 4°C, posteriormente se centrifugó a 2700g por 10 min a 4°C y se decantó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 15 ml de CaCl₂ frío al 0.1M, y se incubó por 10 min a 4°C, finalmente se centrifugó a 2700g durante 10 min a 4°C, se decantó el sobrenadante, y se resuspendió en 1ml de CaCl₂ frío al 0.1 M con 10% de glicerol almacenado a -80°C.

5.4 Transformación de células competentes.

Células calcio competentes de la cepa DH5α de *E. coli*. se transformaron por choque térmico añadiendo 20 ng de plásmido o 10 µl de mezcla de ligación, se incubó por 30 min a 4°C, posteriormente se volvieron a incubar a 42°C por 2 min y se colocaron en hielo.

Una vez transformadas, las células se incubaron en 1 ml de medio LB a 37°C durante 1h con agitación constante. Una vez transcurrido el tiempo, se sembraron en placas de agar LB con ampicilina a 100 µg/ml como marcador de selección.

5.5 Extracción de ADN plasmídico

- Se centrifugaron 5 ml de cultivo de bacterias en LB de 12 a 16 h de incubación a 37°C.
- Se resuspendieron las células en 200 µl de solución I (glucosa 50 mM, Tris·HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM) y se agitó brevemente en un mezclador tipo vortex.
- Se agregaron 400 µl de solución II que se prepararon en el momento de usarse (NaOH 0.2N, SDS 1%), se mezcló por inversión y se dejó en hielo por 5 min.
- Se agregaron 300 µl de solución III (acetato de potasio 5M, ácido acético 11% (v/v), pH 4.8), se agitó en un mezclador tipo vortex por 2 seg a máxima velocidad.
- Se colocaron los tubos en hielo por 15 min.
- Se centrifugaron por 10 min a 4 °C para eliminar los restos celulares que contenían ADN cromosómico. Se recuperó el sobrenadante, se le agregó 1 volumen de isopropanol y se colocaron a -20 °C durante 15 min.
- Se centrifugaron a 15000 rpm y se eliminó el sobrenadante.
- Se lavó el precipitado con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente.
- Se resuspendió el precipitado en 40 µl de agua estéril o regulador TE.

Para la purificación de grandes cantidades de plásmido se utilizó un kit comercial (Invitrogene ® Maxi Prep) y se siguieron las recomendaciones del proveedor.

5.6 Digestiones enzimáticas

Las reacciones con enzimas de restricción se llevaron a cabo conforme a las instrucciones de la casa comercial (Promega®). En el caso del DNA plasmidico se utilizaron de 1 a 3 U de enzima por µg de DNA. Las reacciones y enzimas utilizadas se muestran en las tablas 2, 3, 4 y 5.

Tabla 2. Reacción de la digestión de pNFkB-Luc.

Digestión de pNFkB-Luc						
Agua	BSA	Buffer (1x)	Nhe I (0.1µl/U)	BamH I (0.1µl/U)	DNA 2µg/µl	Total
10.5µl	0.5 µl	2 µl	1 µl	1 µl	5 µl	20 µl

Tabla 3. Reacción de la digestión de pUC IDT-TK.

Digestión de pUC IDT-TK						
Agua	BSA	Buffer (1x)	XhoI (0.1µl/U)	NcoI (0.1µl/U)	DNA 2µg/µl	Total
9.5	0.5 µl	2 µl	1 µl	1 µl	6 µl	20 µl

Tabla 4. Reacción de la digestión de pUC IDT-6HRE.

Digestión de pUC IDT-6HRE						
Agua	BSA	Buffer (1x)	NheI (0.1µl/U)	XhoI (0.1µl/U)	DNA 2µg/µl	Total
10.5µl	0.5 µl	2 µl	1 µl	1 µl	5 µl	20 µl

Tabla 5. Reacción de la digestión de pHRE-Luc.

Digestión de pHRE-Luc						
Agua	BSA	Buffer (1x)	NheI (0.1µl/U)	BamHI (0.1µl/U)	DNA 2µg/µl	Total
10.5µl	0.5 µl	2 µl	1 µl	1 µl	5 µl	20 µl

5.7 Electroforesis de ADN.

La separación de plásmidos o de los correspondientes fragmentos de DNA se llevó a cabo en geles de agarosa a concentración de 0.8 - 1.5% en tampón TAE (40mM Tris-base, 1mM EDTA a pH 8.0 y ácido acético glacial).

Las condiciones de electroforesis se modificaron en función del tamaño de los fragmentos, siguiendo las recomendaciones de Sambrook y Russell (2001). Como patrón de peso molecular se utilizó el 1Kb DNA Ladder (Promega®).

El corrimiento del gel de agarosa se realizó en un cámara de electroforesis (Bio-Rad®). Después el gel se tiñó en bromuro de etidio y las bandas de ADN se visualizaron el transiluminador.

5.8 Purificación de fragmentos de ADN.

La purificación de los productos por PCR así como de los fragmentos de DNA por cortes enzimáticos se realizó mediante el kit comercial "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega®), se cortó la banda en el gel de agarosa y se colocó en un eppedonf, después se añadió solución de unión a membrana incubando 10 minutos a 60°C, la columna se centrifugó a 10000 g 1 minuto y se añadió la solución de lavado, finalmente se añadió agua PCR y se recolecto por centrifugación.

5.9 Ligación de ADN.

En las reacciones de ligaciones se utilizó la enzima del fago T4 (Promega®), manteniendo en la reacción una relación de masa entre el vector y el fragmento a ligar de 1:3, la reacción se llevó a cabo en un volumen de 10-20 µl a una concentración de ADN entre 20 y 200 ng/µl. Las mezclas de ligación se incubaron a 4°C por una noche. La fórmula para calcular las concentraciones de inserto vector se muestra en la (Figura 12).

$$\frac{\text{ng del vector} * \text{kb del inserto}}{\text{kb del vector}} * \text{relación inserto / vector}$$

Figura 12. Fórmula para ligaciones de DNA.

5.10 Caracterización por PCR.

Para la caracterización del plásmido pHRE-Luc se recurrió a la técnica de (PCR), siguiendo las instrucciones de los suministradores de la Go Taq® Green Master Mix (Promega®). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Multigene Gradient (Labnet®). Los oligonucleótidos utilizados en la amplificación se sintetizaron en (IDT®) y se detallan en la Tabla 6. Cada una de las reacciones se sometió a 95°C durante 5 min por un ciclo, posteriormente se amplificó por 30 ciclos 1 min a 95°C, 1 min de alineamiento a 60°C y aproximadamente 1 min por cada 1000pb de fragmento a amplificar a 72°C. Seguido de un solo paso a 72° durante 5 min.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la caracterización de pHRE-Luc.

Oligonucleótidos	Secuencia
Fwr 1 NF-HRE	AGTGCAAGTGCAGGTGCCAGAA
Rev 1 NF-HRE	GCGGTTCCATCTTCCAGCGGATAGAA

5.11 Condiciones de cultivo de la línea celular B16F10.

Para los estudios *in vitro* se utilizó la línea celular B16F10 (ATCC® CRL-6322™) de melanoma en ratón. Las células fueron crecidas en Medio (DMEM) por sus siglas en ingles "Dulbecco's Modified Eagle's Medium" suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico antimicótico al 1% (Invitrogen®). Se utilizó Tripsina/EDTA (Invitrogen®) para disgregar las células. Las condiciones de cultivo fueron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% hasta alcanzar una confluencia de 70%-80%.

5.12 Preparación de complejos de polietilenimina (PEI)-DNA y transfección a la línea celular B16F10.

Para este ensayo se utilizó la polietilenimina de 25 kDa (Sigma Aldrich®). La cantidad de PEI se estimó tomando en cuenta: el DNA a transfectar, la relación N/P, y la concentración de NaCl de 150mM. Para formar los complejos de PEI-DNA, se colocaron 11.3 µl de PEI y se aforó a 100 µl de NaCl al 150 mM en un tubo eppendorf, en otro tubo se colocaron 11.3 µg del ADN de cada plásmido y se aforó a 100 µl. Al tubo que contenía ADN se le agregó gota a gota la solución con PEI, posteriormente se incubaron durante 30 min para que formen los complejos y adquirir una carga positiva.

Para las transfecciones se utilizaron 3 plásmidos: pNFkB-Luc, pRNA de interferencia-HIF y pHRE-LUC. Se agregaron 1×10^6 células por pozo y se incubaron a 37°C hasta obtener confluencia de 80%. Las células fueron lavadas con PBS, se agregó 1 ml de medio DMEM junto con los complejos PEI-DNA., se incubaron durante 24 y 48h en condiciones de normoxia. Para inducir la expresión de HIF y simular las condiciones de hipoxia se utilizó CoCl_2 a diferentes concentraciones (100µM, 150µM y 200µM), el cual se ha reportado en múltiples estudios que causa una hipoxia mimética compitiendo por el Fe^{+2} disponible que también actúa como un cosustrato para el funcionamiento de las PH.

5.13 Cuantificación de luciferasa en células B16.

Para determinar los niveles de expresión del gen transfectado bajo la inducción de los HRE adjuntos al promotor se realizó la medición de luciferasa añadiendo ATP y el sustrato luciferina al lisado celular, utilizando el luminómetro OPTOCOMP I® (MGM Instrument, Inc). Para este ensayo se utilizó el kit de Steady-Glo® Luciferase assay system (Promega®), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Las células se incubaron 24h y 48h en condiciones de normoxia e hipoxia, transcurrido este tiempo se removió el medio de los pozos y se lavó con PBS estéril, posteriormente se agregaron 200µl de tampón de lisis en cada pozo, la placa se agitó para homogenizar y se incubó 10 min a temperatura ambiente, después se transfirió la muestra un tubo de ensayo, para agregar 200µl del reactivo reconstituido (que contiene la luciferina) a cada tubo y finalmente se procedió a la cuantificación de luciferasa.

5.14 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en las transfecciones se determinó mediante la prueba de ANOVA y se efectuó una comparación de medias por la prueba de Tukey no paramétrico. Los análisis se realizaron utilizando el programa SPSS versión 17.0.

6. RESULTADOS

6.1 Identificación de los elementos de respuesta a hipoxia.

Se analizaron *in silico* secuencias consenso reguladoras compuestas de un sitio de unión a HIF muy conservado o elementos de respuesta a hipoxia, basados en las secuencias reportadas de los sitios de unión consenso de HIF1 α (5'-CGTG-3') y HIF2 α (5'TRCGGTG3') de los genes Epo y VEGF. Se decidió utilizar en el presente estudio los sitios de unión mínimos de HIF1 α y HIF2 α juntos en una sola unidad de sitio de unión (CGTGTACGTG), seleccionando seis repeticiones de unión a HIF (HBR) separadas por cinco nucleótidos aleatorios (Figura 13).



Figura 13. Secuencia de las repeticiones en tándem 6HRE.

Una vez seleccionadas las secuencias que conforman las repeticiones en tándem de los HRE (6HRE) se analizaron en el programa PROMO de ALGGEN en el cual se identificaron cuatro sitios de unión a factores de transcripción en secuencias de ADN (Figura 14).

6-HBR



Factors predicted within a dissimilarity margin less or equal than 15 % :

1 e-Myb (T00140)	11 USE1 (T00874)	21 ENKTF-1 (T00255)	31 AhR-Amt (T05394)	41 GR-beta (T01924)	51 CRE-2 (T00401)	61 p53 (T00671)	71
12 PPAR-alpha/RXR-alpha (T05221)	12 TFIID (T00824)	18 e-Myb (T00137)	11 E2F-1 (T01542)	12 Sp1 (T00759)	13 E2F (T00270)	14 MAZ (T00490)	15
16 e-Ets-1 (T00112)	17 Elk-1 (T00229)	18 GR-alpha (T00337)	19 e-Ets-2 (T00113)	20 NFIACTF (T00024)	21 CREBbeta (T00381)	22 NF-1 (T00539)	23
24 RXR-alpha (T01345)	25 GR (T05076)	26 RAR-beta (T00721)	27 PEA3 (T00685)	28 YY1 (T00215)	29 XBP-1 (T00902)	30 RAR-beta/RXR-alpha (T05420)	31
32 NF-AT1 (T01948)	33 STAT1beta (T01573)	34 Ik-1 (T02702)	35 HIF-1 (T01609)	36 AP-1 (T00029)	37 e-Jun (T00133)	38 CREBalpha (T00105)	39
40 NF-Y (T00150)	41 GCF (T00320)	42 YDR (T00882)	43 PXR-1/RXR-alpha (T05671)	44 EBF (T05427)	45 NF-kappaB (T00590)	46 RelA (T00594)	47
48 HNF-1A (T00368)	49 HNF-1B (T01950)	50 TFIID (T00820)	51 USE2 (T00878)	52 T3R-beta1 (T00851)	53 PCU2F2 (Oct-2.1) (T00646)	54 IRE-1 (T00423)	55
56 NF-AT1 (T00550)	57 Egr-3 (T00243)	58 TBP (T00794)	59 PR-B (T00696)	60 PR-A (T01661)			

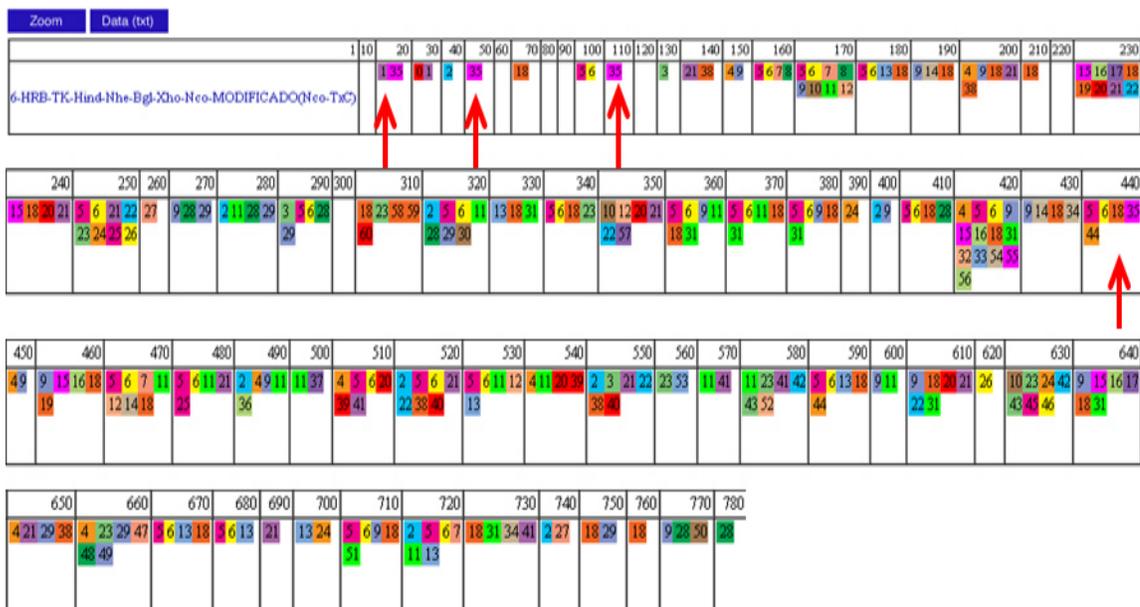


Figura 14. Sitios de unión a HIF-1. Las flechas rojas indican los posibles sitios de unión de HIF-1.

Por otra parte también se analizó un promotor el cual por sí solo no es capaz de responder a niveles bajos de oxígeno, por lo que se seleccionó la secuencia del promotor mínimo de la Timidina quinasa humana con acceso a Gen Bank M13643.1 (Figura 15), ya que este promotor se ha utilizado en estudios similares. La secuencia del promotor se presenta a continuación:

CTCGAGCCCCAGCTAACTCCGCCCCAGCCCCTTAGTCCCTCCCTGCAATCCA
CCTACCTCTGCAGCACATCTTCTTCCAAGGAACCTTGCTTGGGCAAACCCAC
ACCAGACACATCCATCATGGCGTCTACAGCCGCATGGGCGTGCGTCCCTCTG
TTTATATGGCCAGAGCCCCGCCTCGCTCGCCCCTTTAAACTTGGTGGGCGGAC
CGAGGCGGGGCCTCAGATCCAGGCCCCACCCCGATCAGCCACGTCCATCGC
CCTGATTTCCAGGCCCTCCCAGTCCCTGGGCGCACGTCCCGGATTCCTCCCA
CGAGGGGGCGGGCTGCGGCAAATCTCCCGCCAGTCAGCGGCCGGGCGCTGA
TTGGCCCCACGGCGGCGGGGCGGCTCGTGATTGGCCAGCACGCCGTGGTTTA
AAGCGGTTCGGCGCGGTGAACCAGGGGCTTACTGCGGGACGGCCTTGGAGAG
TACTCGGGTTCGTGAACTTCCCGGAGGCGCAATGAGCTGCATTAACCTGCCC
ACTGTGCTGCCCCGGCTCCCCAGCAAGACCCGGGGGCAGATCCAGGTGCGG
GGGCCAGCCTGCGCGTGGCTGGGATGAGGTGTCGTGTATACCTTTCAGATCC
CATGG

Figura 15. Secuencia del promotor mínimo de la Timidina quinasa humana.

6.2 Construcción del vector que responde a hipoxia.

Las secuencias del promotor mínimo de la TK y los HREs fueron sintetizados comercialmente y se les realizaron cortes enzimáticos para obtener los fragmentos de interés. En el caso del plásmido pUC-IDT-TK digerido con las enzimas Xho I y Nco I, se obtuvieron dos productos, el primer producto de 2752 pb y el segundo producto de interés fue de 625 pb correspondiente al promotor mínimo TK. Otro plásmido que se utilizó fue el pUC-IDT-6HRE, el cual al ser digerido con las enzimas de restricción Nhe I y Xho I liberó un fragmento de 2752 pb y otro de 135 pb correspondiente a las 6 secuencias en tándem de los HREs, por último se digirió el plásmido circular pNFkB-Luc con la enzimas Nhe I y BamH I el cual liberó un fragmento de 234pb y un fragmento de 4753 pb correspondientes a el promotor hipóxico. A este último se le insertaron las secuencias HREs seguidos del promotor TK (Figura 16 y 17).

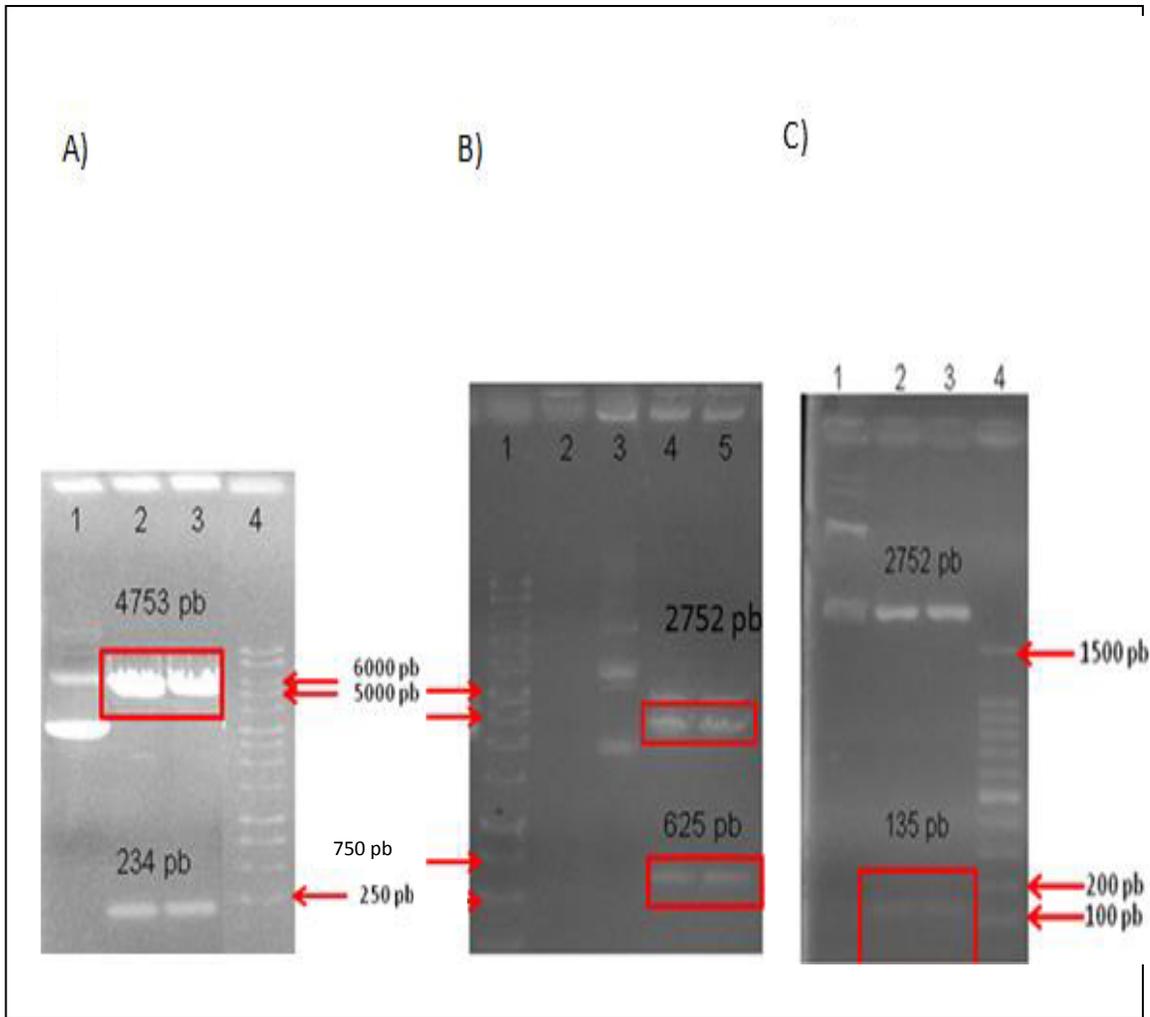


Figura 16. Caracterización enzimática de los vectores. A) Carril 1; Plásmido cerrado pNFkB-Luc, carril 2 y 3; plásmido digerido de pNFkB-Luc, carril 4; marcador de peso molecular 1kb. B) carril 1; marcador de peso molecular 1 Kb, carril 3; plásmido sin digerir pUC-IDT-TK, carril 4 y 5; pUC-IDT-TK digerido C) carril 1; pUC-IDT 6HRE sin digerir, carril 2 y 3; pUC-IDT 6HRE digerido, carril 4; marcador 1 Kb.

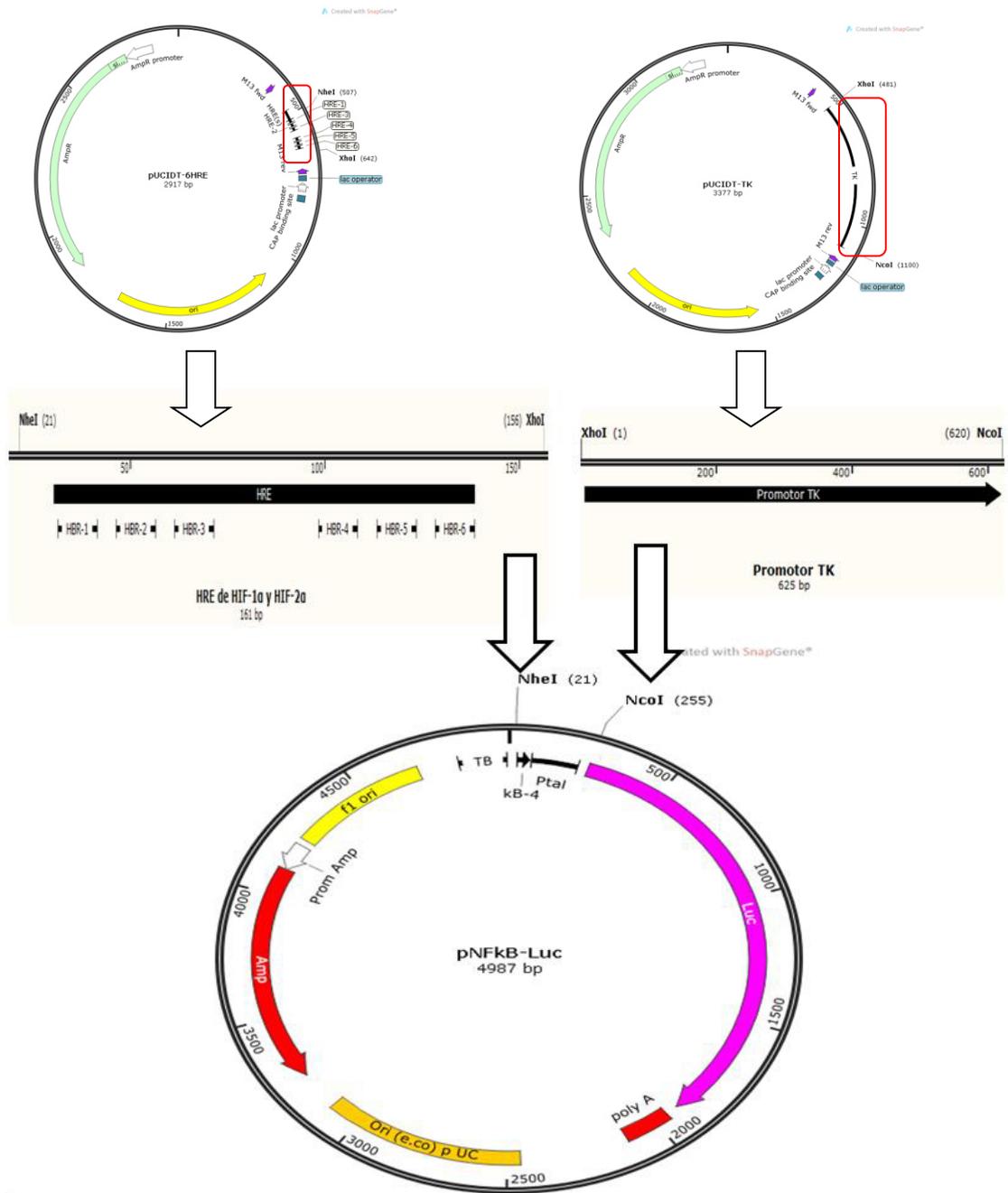


Figura 17. Mapa de la construcción del vector hipóxico. Las repeticiones de 6HRE y el promotor de TK fueron insertados en el vector pNFkB-Luc.

Una vez adquiridos los tres fragmentos de interés se realizó una mezcla de ligación la cual fue introducida a bacterias químicamente competentes para obtener el vector final pHRE-Luc. Se aislaron 20 clones, de las cuales se seleccionaron la número 1, 4, 5, 8, 10, 11, 18, 19 y 20 por presentar un menor tamaño comparado con el control positivo NFkB-Luc (Figura 18).

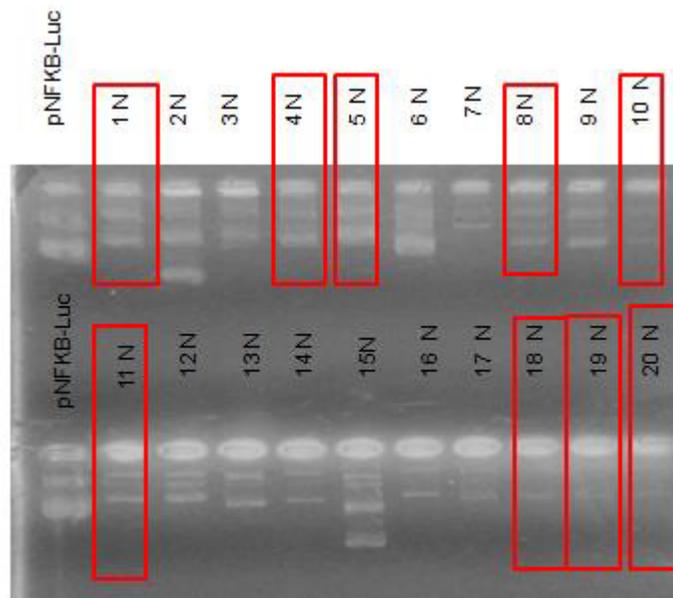


Figura 18. Clonas de pHRE-Luc. Carril 1, pNFkB-Luc, carriles restantes, clonas transformantes con el promotor hipóxico (N). Los recuadros rojos indican las clonas que se seleccionaron.

De las clonas seleccionadas previamente para su caracterización solamente las clonas 1, 4 y 11 fueron positivas al visualizarse el patrón de bandeado esperado de fragmentos de 3232 pb y 2275pb (Figura 19). La clona 1 pHRE-Luc se caracterizó por dos métodos: por enzimas de restricción Nhe I y Nco I, donde se obtuvieron 2 fragmentos: uno de 4783 pb y 754 pb este último fragmento contiene el promotor hipóxico de interés (Figura 20).

En la segunda caracterización se utilizaron los oligonucleótidos FWR1 NF-HRE y REV1 NF-HRE (tabla 6), para la amplificación del promotor hipóxico donde se obtuvo una amplificación de 879 pb correspondiente los HREs y el promotor TK (Figura 21).

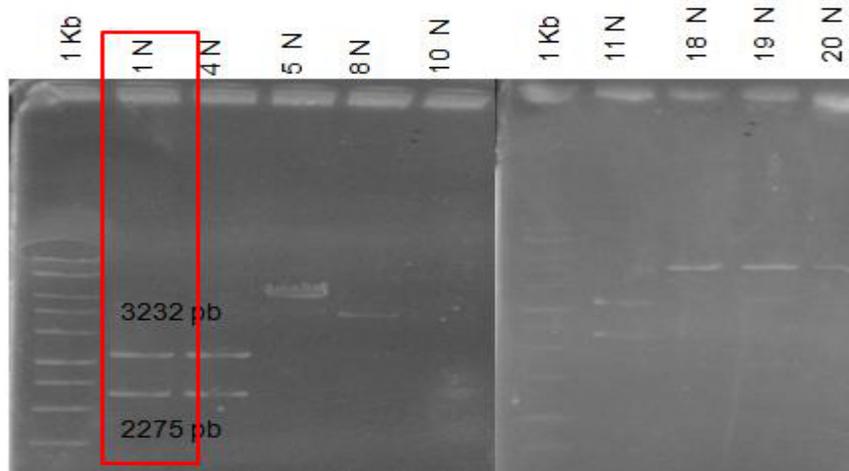


Figura 19. Digestiones enzimáticas de las clonas con el plásmido pHRE-Luc. Carril 1 y 7; marcador de peso molecular 1Kb, carril 2 al 6 y 8 al 11; digestión del plásmido pHRE-Luc de las distintas clonas.

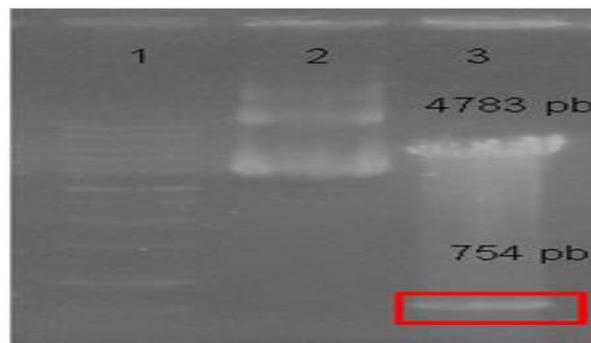


Figura 20. Caracterización de pHRE-Luc por enzimas de restricción. Carril 1, marcador de peso molecular 1 Kb, carril 2, plásmido pHRE-Luc sin digerir, carril 3 digestión de pHRE-Luc.

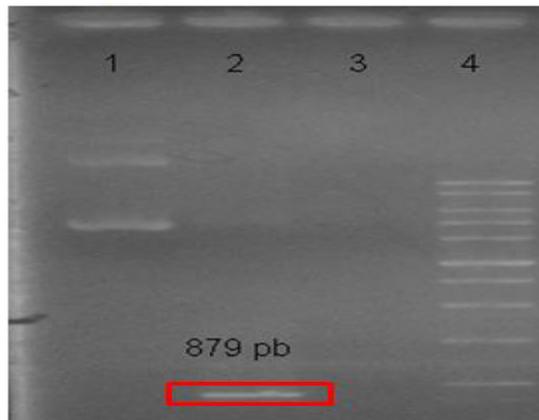


Figura 21. Caracterización de pHRE-Luc por PCR. Carril 1, ADN plasmidico de pHRE-Luc, carril 2, la amplificación del promotor, carril 3, control negativo, carril 4, marcador de peso molecular 1Kb.

6.3 Cuantificación de luciferasa en células B16F10.

Para determinar la concentración adecuada de hipoxia mimetizada con CoCl_2 se transfectó el plásmido pHRE-Luc a células B16F10, y se realizó una cuantificación de luciferasa. Las células fueron sometidas a una hipoxia mimética durante 24h utilizando CoCl_2 (induce la expresión de la proteína HIF) a distintas concentraciones ($0 \mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $150 \mu\text{M}$ y $200 \mu\text{M}$), en la concentración de $0 \mu\text{M}$ o normoxia se obtuvo una cuantificación de 379851 URL, mientras que en la concentración de $100\mu\text{M}$ aumento ligeramente a 410145 URL, en $150 \mu\text{M}$ la cuantificación de luciferasa tuvo su umbral disparándose hasta 1615768 URL comparado con la normoxia y en la concentración de $200 \mu\text{M}$ las URL (s) decayeron más del triple mostrando una cuantificación de 510777 URL (Figura 22). En base a estos resultados se eligió la concentración de $150 \mu\text{M}$ de CoCl_2 para los experimentos posteriores.

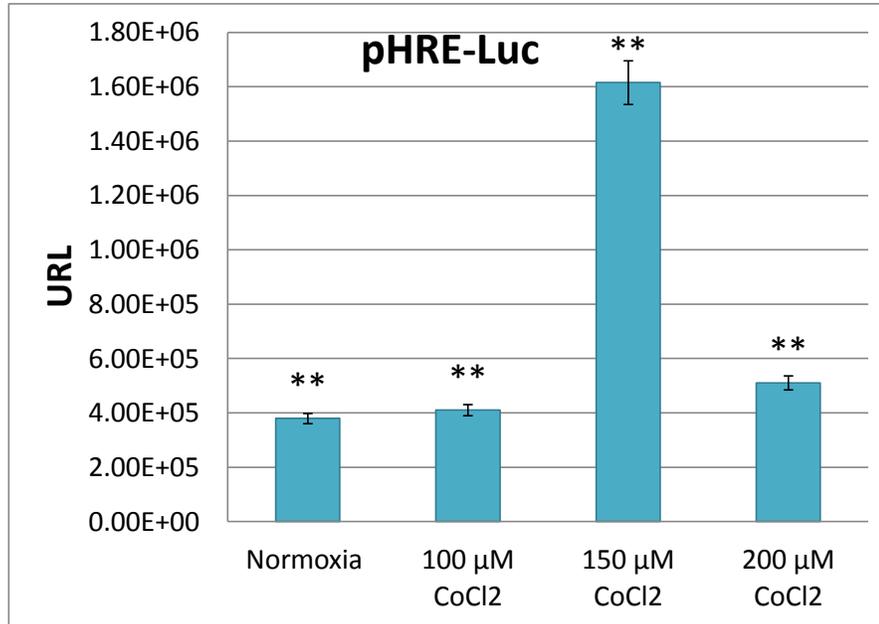


Figura 22. Concentraciones de CoCl₂. Transfección a las 24 horas del pHRE-Luc en la línea celular B16F10 con distintas concentraciones de CoCl₂. Los datos representan la media ± el error estándar de la media de 3 repeticiones. Arriba de la barras se marcan las diferencias entre cada uno de los tratamientos ** (p<0.01).

Se trabajó con todas las medias +/- el error estándar de la media de 3 repeticiones por tratamiento, la concentración de 150 μM de CoCl₂ fue altamente significativa en comparación con las otras concentraciones (100μM y 200μM), los resultados se analizaron mediante un ANOVA con una F de 1878666 y una p<< 0.01. Se realizó una prueba de Tukey comparando todas las concentraciones de CoCl₂ entre sí, todas los tratamientos fueron altamente significativas diferentes con una p<< 0.01.

Para analizar la activación del promotor y la regulación del gen reportero por hipoxia, las células transfectadas con el pHRE-Luc y pNFkB-Luc se sometieron a un ambiente de normoxia e hipoxia mimética durante 24h.

Como control de la expresión del gen luciferasa se transfectó el plásmido pNFkB-Luc que en condiciones de normoxia, donde se obtuvo una cuantificación de luciferasa de 1,666,593 URL, otro vector que se transfectó fue el pHRE-Luc, el cual en condiciones de normoxia se obtuvo una cuantificación de 379,851 URL y en hipoxia mimética (150 μ M CoCl₂) se obtuvo una lectura de 1,615,768 URL, los resultados se analizaron mediante un ANOVA con una F de 1878666 y una $p < 0.01$. Se realizó una prueba de Tukey comparando la expresión de pHRE-Luc en normoxia y en hipoxia, la cuantificación en hipoxia fue significativamente mayor que la cuantificación en normoxia con una $p < 0.01$ (Figura 23).

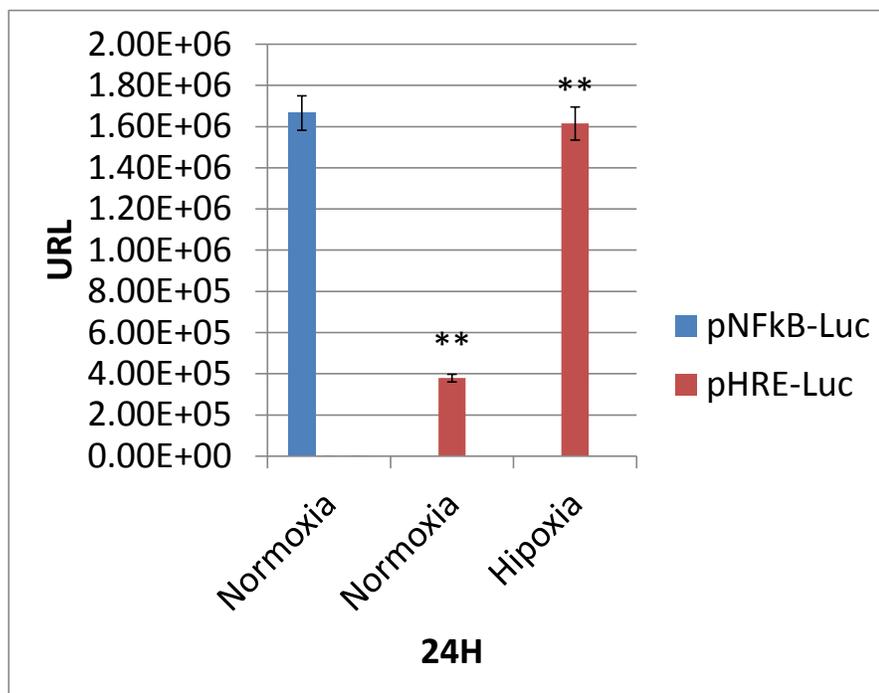


Figura 23. El vector pHRE-Luc en condiciones de normoxia e hipoxia. Transfección del pNFkB-Luc y pHRE-Luc en la línea celular B16F10 en normoxia e hipoxia. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media de 3 repeticiones. Arriba de la barras se marcan las diferencias entre cada uno de los tratamientos ** ($p < 0.01$).

Finalmente otro tratamiento que se aplicó fue la transfección de un plásmido que codifica para un RNA de interferencia el cual va dirigido contra la subunidad 1 α de HIF, (esto para comprobar que la inducibilidad del promotor hipoxico es dependiente de la proteína HIF-1 α y HIF2 α) junto con el plásmido pHRE-Luc, ambos plásmidos fueron transfectados en condiciones de hipoxia mimética (150 μ M CoCl₂) y se obtuvo una cuantificación del pHRE-Luc de 1,615,768 URL, el otro tratamiento el cual contenía pHRE + pRNAi-HIF fue significativamente menor a el tratamiento 1, con una cuantificación de 55939 URL, (Figura 24). Las medias se revisaron por análisis de varianza (ANOVA) con una F de 6423550 y una p< 0.01.

Se realizó una prueba de Tukey para comparar el tratamiento en hipoxia y normoxia, los tratamientos fueron estadísticamente significativos con una p<0.01.

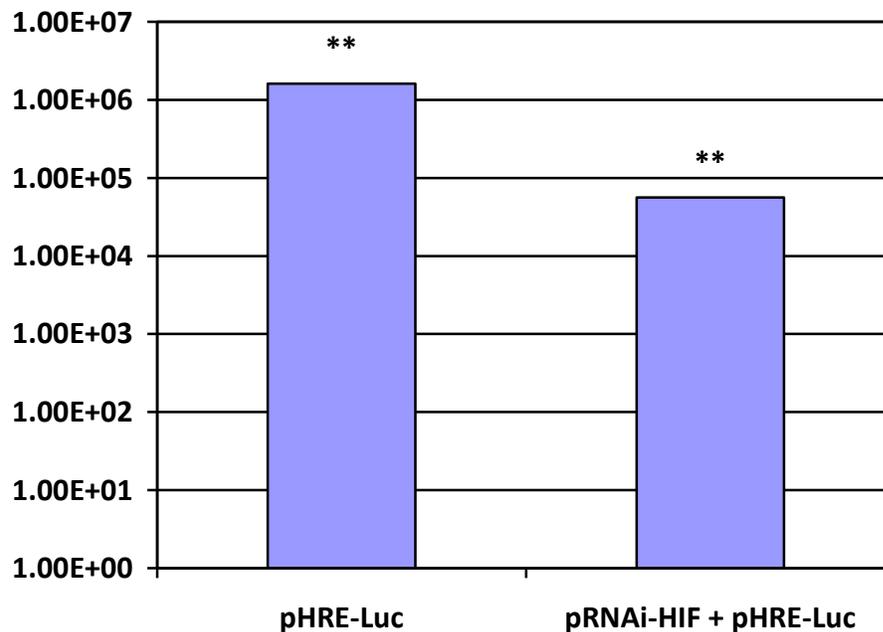


Figura 24. Efecto de pRNAi-HIF en la cuantificación de luciferasa de pHRE-Luc. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media de 3 repeticiones. Arriba de la barras se marcan las diferencias entre cada uno de los tratamientos ** (p<0.01).

7. DISCUSIÓN

Los elementos de respuesta a hipoxia son secuencias consenso reguladoras compuestas de un sitio de unión a HIF muy conservado. Bajo condiciones de hipoxia HIF-1 se une a secuencias consenso del ADN 5'-(A/G)CGTG-3' denominadas elementos de respuesta a hipoxia (HRE) que se encuentran en las regiones promotoras que van a ser reguladas por HIF-1 α . Varios estudios realizados por otros investigadores indican que el ambiente hipóxico puede ser usado para activar la expresión génica heteróloga mediada por HRE (Boticario y Cascales, 2010; Zhou *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se creó y caracterizó un novedoso vector hipóxico, en el cual la expresión de luciferasa es regulada por un promotor eucariote que contiene repeticiones en tándem de los sitios de unión mínimos de HIF1 α y HIF2 α . Mediante el empleo de células transfectadas con el vector pHRE-Luc se demostró, que las células en condiciones de hipoxia las cuales contenían el vector de las 6 repeticiones en tándem tienen una mayor regulación de la expresión de luciferasa que las células en condiciones de normoxia con una $P < 0.01$.

Similar a nuestros resultados encontrados Dachs y colaboradores demostraron que un HRE del gen fofoglicerato quinasa 1 de ratón puede ser usado para controlar la expresión de un gen marcador y terapéutico *in vitro* e *in vivo*. En otro estudio, Shibata y colaboradores desarrollaron un vector que responde a hipoxia, el cual contenía 5XHRE derivados del gen VEGF combinado con el promotor mínimo CMV. Células transfectadas con el vector mostraron un incremento significativo de la expresión del gene en condiciones de hipoxia, similar a el nivel de el promotor CMV intacto (Ruan H *et al.*, 2001).

Además, mediante un iRNA dirigido contra HIF1 α y HIF2 α , se demostró que la activación del promotor hipoxico del vector pHRE-Luc es dependiente de la interacción de las proteínas HIF1 α HIF2 α y los HRE, utilizando una línea celular transfectada con pHRE-Luc se observó que las células en condiciones de hipoxia que contenían el iRNA disminuyeron significativamente la expresión de luciferasa en comparación con las que no contenían el iRNA. En condiciones bajas de oxígeno se inactiva PHD/VHL los cuales intervienen en la degradación de HIF, lo cual conlleva a una acumulación de dicha proteína. Resultados similares fueron vistos por Zhou y colaboradores quienes crearon un vector reportero de HIF (6HRE-GFP) que responde a la acumulación de esta proteína, probaron un iRNA dirigido contra HIF1 α - HIF2 α y observaron que la intensidad de GFP disminuyó notablemente. El vector 6HRE-GFP contiene 6 repeticiones de HRE, el promotor mínimo de la TK y la GFP, al transfectar el vector lentiviral en diferentes líneas celulares en condiciones de hipoxia obtuvieron un incremento significativo de la expresión del gen heterólogo, un incremento similar al que se obtuvo en este trabajo.

El número de copias de HRE es un importante componente en la regulación de la expresión de genes inducida por hipoxia. Nuestros datos indican que el promotor mínimo TK es un promotor basal que puede ser usado en combinación con los potenciadores HRE. Este novedoso vector reportero puede servir como una rápida herramienta para definir la actividad de los niveles de HIF, también se puede utilizar para terapia génica al insertar una proteína terapéutica regulada por los HRE.

8. CONCLUSIONES

-Se logro diseñar el vector pHRE-Luc el cual contiene un promotor que responde al ambiente hipóxico.

-Las secuencias en tándem llamadas elementos de respuesta a hipoxia regulan la expresión del gen reportero adyacente en condiciones de hipoxia.

- La activación del promotor en respuesta a condición de hipoxia es determinada por la proteína HIF.

-El vector pHRE-Luc puede servir como una rápida herramienta para estimar la actividad de los niveles de la proteína HIF.

PERSPECTIVAS

Este estudio representa el soporte experimental que demuestra que el promotor presente en el plásmido pHRE-Luc tiene elementos de respuesta a hipoxia que pueden regular a un gen heterólogo en condiciones de hipoxia. Los datos obtenidos en esta tesis abren una nueva pauta de control espacio temporal de la expresión de genes en tejido específico y proporciona las bases para plantear un sistema sitio dirigido a las regiones hipóxicas de los tumores. Este novedoso promotor hipoxico será una herramienta muy valiosa para la orientación de la expresión génica en áreas específicas de hipoxia. Este vector requiere de más investigación y del vehículo adecuado.

LITERATURA CITADA

Álvarez-Martín P., Flórez A B, Mayo B. 2007. Screening for plasmids among human bifidobacteria species: Sequencing and analysis of pBC1 from *Bifidobacterium catenulatum* L48. *Plasmid* 57: 165-174.

Aquino A, González G. 2010. El papel del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) en la fibrosis pulmonar idiopática. *Neumología y Cirugía de Tórax Medigraphic*. 3:170-177.

Argnani A, Leer RJ, Van-Luijk N, Pouwels PH. 1996. A convenient and reproducible method to genetically transform bacteria of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiology* 142: 109-114.

Arvelo F y Cotte C. 2009. Hipoxia en la malignidad del cáncer revision. *Investigación Clínica*. 50(4):529-546.

Baban CK, Cronin M, O'Hanlon D, O'Sullivan GC, Tangney M. 2010. Bacteria as vectors for gene therapy of cancer. *Bioengineered Bugs*. 1:6, 385-394.

Baumann RP, Penketh PG, Seow HA, Shyam K, Sartorelli AC. 2008. Generation of oxygen deficiency in cell culture using a two-enzyme system to evaluate agents targeting hypoxic tumor cells. *Radiation Research*. 170 (5): 651-660.

Beck T, Weinmann R, Caro G. 1993. Characterization of hypoxia-responsive enhancer in the human erythropoietin gene shows presence of hypoxia-inducible 120-kD nuclear DNA-binding protein in erythropoietin-producing and nonproducing cells. *Blood* 82: 704-711.

Boticario C, Cascales M. 2010. Hipoxia y cáncer. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 76 (3): 379-408.

Bruick RK, McKnight SL. 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294, 1337–1340.

Chopin MC, Chopin A, Rouault A, Galleron N. 1989. Insertion and amplification of foreign genes in the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* chromosome. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 1769-1774.

Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3240-3244.

Denny WD. 2000. The role of hypoxia activated prodrugs in cancer therapy. *Oncology Reviews*.

Denny WA. 2010. Hypoxia activated prodrugs in cancer therapy: progress to clinic. *Future Oncology Reviews*. 6 (3), 419-428.

Dong X, Xin Y, Jian W, Liu X, Ling D. 2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 119-125.

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson K S, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A. 2001. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107, 43–54.

Farré D, Roset R, Huerta M, Adsuara JE, Roselló LI, Albá MM, Messeguer X. 2003. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Research*. 31, 13, 3651-3653.

Fu GF, Li X, Hou YY, Fan YR, Liu WH, Xu GX. 2005. *Bifidobacterium longum* as an oral delivery system of endostatin for gene therapy of solid liver cancer. *Cancer Gene Therapy*. 12, 133-140.

Fujimori M, Nakamura T, Sasaki T, Yazawa K, Amano J, Kano Y, Taniguchi. 2001. *Bifidobacterium longum* as a delivery system for gene therapy. *Gene Therapy and Molecular Biology*. 195.

Gao S, Zhou J, Zhao Y, Toselli P, Li W. 2012. Hypoxia response element (HRE) directed transcriptional regulation of the rat lysyl oxidase gene in response to cobalt and cadmium. *Toxicological Sciences*. 132(2), 379-389.

Garrido D, Barile D, Mills DA. 2012. A molecular basis for bifidobacterial enrichment in the infant gastrointestinal tract. *American Society for Nutrition*. 3: 415-421.

Gasson MJ. 1980. Production, regeneration and fusion of protoplast in lactic streptococci. *FEMS Microbiology Letters*. 9: 99-102.

Gasson MJ, Davies FL. 1979. Conjugal transfer of lactose genes in group N streptococci. *Society General Microbiology* 6: 87.

Gilany K, Vafakhah M. 2010. Hypoxia: a Review. *Journal of paramedical sciences*. Vol 1 No 2 ISSN 2008-496X.

Greco O, Marples B, Dachs GU, Williams KJ, Patterson AV, Scott SD. 2002. Novel chemeric gene promoters responsive to hypoxia and ionizing radiation. *Gene Therapy*. 9:1403-1411.

Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M. 2012. The updated biology of hypoxia inducible factor. *European Molecular Biology Organization*. 31, 2448-2460.

Greijer AE, Wall E. 2004. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of Clinical Pathology*. 57:1009-1014.

Guglielmetti S, Karp M, Mora D, Tamagnini I, Parini C. 2007. Molecular characterization of *Bifidobacterium longum* biovar. *longum* NAL8 plasmids and construction of a novel replicon screening system. *Applied Microbiology Biotechnology*. 74: 1053-1061.

Hu B, Kou L, Li C, Zhu LP, Fan YR, Wu ZW, Wang JJ, Xu GX. 2009. *Bifidobacterium longum* as a delivery system of TRAIL and endostatin cooperates with chemotherapeutic drugs to inhibit hypoxic tumor growth. *Cancer Gene Therapy*. 16, 655-663.

Hu Y, Liu J, Huang He. 2013. Recent Agents Targeting HIF-1 α for Cancer Therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*. 114:498-509.

Kaluz S, Kaluzová M, Stanbridge EJ. 2008. Regulation of gene expression by hypoxia: Integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element. *Clinica Chimica Acta* 395, 6–13.

Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, Addeo R, Makuuchi M, Esumi H. 2000. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia inducible factor-1 activity by nitric oxide. *American society of hematology*. 95: 189-197.

Klijn A, Mercenier A, Arigoni F. 2005. Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 29: 491-509.

Klijn A, Moine D, Delley M, Mercenier A, Arigoni F, Pridmore RD. 2006. Construction of a reporter vector for the analysis of bifidobacterium longum promoters. *Applied Environmental Microbiology*. 74: 7401-7405.

Kok J, van der Vossen J, MB M, Venema G. 1984. Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*. 48: 726-731.

Landate JM, Peirotén A, Rodríguez E, Margolles A. 2013. Anaerobic green fluorescent protein a marker of Bifidobacterium strains. *International Journal of Food Microbiology*. 175, 6-13.

Lee JH, O'Sullivan DJ. 2006. Sequence analysis of two cryptic plasmids from *Bifidobacterium longum* DJO10A and construction of a shuttle cloning vector. *Applied Environmental Microbiology*. 72: 527-535.

Lee J-Y, Lee Y-S, Kim K-L, Lee J-S, Jang H-S, Shin I-S, Suh W, Jeon E-S, Byun J, Kim D-K. 2006. A novel chimeric promoter that is highly responsive to hypoxia and metals. *Gene Therapy*. 13:857-868.

Leenhouts KJ, Kok J, Venema G. 1990. Stability of integrated plasmids in the chromosome of *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology*. 56: 2726-2735.

Li S, Huang L. 2000. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Therapy* 7:31-34.

Li X, Fu GF, Fan YR, Liu WH, Liu XJ, Wang JJ, Xu GX. 2003. Bifidobacterium adolescentis as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy: selective inhibitor of angiogenesis and hypoxic tumor growth. *Cancer Gene Therapy*. 10, 105-11.

Liu W, Shen SM, Zhao XY, Chen GQ. 2012. Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *The International Journal of Biochemistry y Cell Biology*. 3(2):165-178.

López M. 2006. Hypoxia inducible factor 1 as a possible target for cancer chemoprevention. *Cancer Epidemiology, Biomarkers y Prevention*. 15:2332-2335.

Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL. 2005. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105, 659–669.

Matsumura H, Takeuchi A, Kano Y. 1997. Construction of *Escherichia coli-Bifidobacterium longum* shuttle vector transforming *B. longum* 105-A and 108-A. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 61: 1211-1212.

Messeguer X, Escudero R, Farré D, Nuñez O, Martínez J, Albá MM. 2002. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*. 18, 333-334.

Min JJ, Nguyen VH, Gambhir SS. 2010. Molecular Imaging of Biological Gene Delivery Vehicles for Targeted Cáncer Therapy: Beyond Viral Vectors. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 44:15–24.

Missich R, Sgorbati B, Leblanc DJ. 1994. Transformation of *Bifidobacterium longum* with pRM2, a constructed *Escherichia coli-B. longum* shuttle vector. *Plasmid* 32: 208-211.

Monti E, Gariboldi MB. 2011. HIF-1 as a target for cancer chemotherapy, chemosensitization and chemoprevention. *Current Molecular Pharmacology*. 4, 62-77.

Murray AW, Szostak JW. 1983. Construction of artificial chromosomes. *Nature* 305: 189-193.

Olenyuk B, Zhang G, Klco JM, Nickols NG, Kaelin WG, Dervan PB. 2004. Inhibition of vascular endothelial growth factor with a sequence speciic hypoxia response element antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101 16768-16773.

Park MS, Lee KH, Ji GE. 1997. Isolation and characterization of two plasmids from *Bifidobacterium longum*. *Letters Applied Microbiology* 25: 5-7.

Park MS, Shin DW, Lee KH, Ji GE. 1999. Sequence analysis of plasmid pKJ50 from *Bifidobacterium longum*. *Microbiology* 145: 585-592.

Rhim SL, Park MS, Ji GE. 2006. Expression and secretion of *Bifidobacterium adolescentis* amylase by *Bifidobacterium longum*. *Biotechnology Letters* 23:163-168.

Rossi M, Brigidi P, Matteuzzi D. 1998. Improved cloning vectors for *Bifidobacterium* spp. *Letters Applied Microbiology*. 26: 101-104.

Rossi M, Brigidi P, Gonzalez V, Matteuzzi D. 1996. Characterization of the plasmid pMB1 from *Bifidobacterium longum* and its use for shuttle vector construction. *Research in Microbiology* 147: 133-143.

Ruan Hangjun., Hu Lily., Lamborn Kathleen., Kan W., Deen Dennis. 2001. A hypoxia regulated adeno-associated virus vector for cancer specific gene therapy. *Nature*. 3 :255-263.

Safran M, Kim W Y, O'Connell F, Flippin L, Günzler V, Horner JW, De Pinho RA, Kaelin WG. 2005. Mouse model for noninvasive imaging of HIF prolyl hydroxylase activity: Assessment of an oral agent that stimulates erythropoietin production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103: 105-110.

Semenza GL. 2010. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29, 625–634.

Shen F, Fan Y, Su H. 2008. Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia-regulated VEGF gene transfer promotes angiogenesis following focal cerebral ischemia in mice. *Gene Therapy* 15: 30-39.

Shi Q, Zhang P, Zhang J, Chen X, Lu H, Tian Y, Parker TL, Liu Y. 2009. Adenovirus-mediated brain-derived neurotrophic factor expression regulated by hypoxia response element protects brain from injury of transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience Letters*. 465: 220-225.

Simon D, Chopin A. 1988. Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie*. 70: 559-66.

Song X, Liu X, Chi W, Liu Y, Wei L, Wang X, Yu J. 2006. Hypoxia induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1 α gene. *Cancer Chemother Pharmacol*. 58: 776-784.

Srinivasan S, Dunn. 2011. Stabilization of hypoxia inducible factor 1 α in buffer containing cobalt chloride for western blot analysis. *National Institutes of Health*. 416 (1): 120-122.

St George JA. 2003 Gene therapy progress and prospects: adonoviral vectors. *Gene Therapy*. 10:1135-1141.

Sun L, Hao Y, Nie X, Zhang X, Yang G, Wang Q. 2012. Construction of PR39 recombinant AAV under control of the HRE promoter and the effect of recombinant AAV on gene therapy of ischemic heart disease. *Experimental and therapeutic medicine*. 4: 811-814.

Sun Z, Baur A, Zhurina D, Yuan J, Riedel ChU. 2012. Accessing the inaccessible: molecular tools for bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 5035-5042.

Takata T, Shirakawa T, Kawasaki Y, Kinoshita S, Gotoh A, Kano Y, Kawabata M. 2006. Genetically engineered *Bifidobacterium animalis* expressing the *Salmonella* flagellin gene for the mucosal immunization in a mouse model. *Journal of Gene Medicine*. 8:1341-1346.

Tang W, He Y, Zhou S, Ma Y, Liu G. 2009. A novel *Bifidobacterium infantis* mediated TK/GCV suicide gene therapy system exhibits antitumor activity in a rat model of bladder cancer. *Journal of Experimental and Clinical Research*. 28:155.

Theys J, Barbe S, Landuyt W, Nuyts S, Van Mellaert L, Wouters B, Anne J, Lambin P. 2003. Tumor-specific gene delivery using genetically engineered bacteria. *Current Gene Therapy* 3:207-221.

Xu LF, Ni JY, Sun HL, Chen YT, Wu YD. 2013. Effects of hypoxia inducible factor 1 α silencing on the proliferation of CBRH-7919 hepatoma cells. *World Journal of Gastroenterology*. 19 (11):1749-1759.

Xu YF, Zhu LP, Hu B, Fu GF, Zhang HY, Wang JJ, Xu GX. 2007. A new expression plasmid in *Bifidobacterium longum* as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy*. 14, 151-157.

Yazawa K, Fujimori M, Nakamura T, Sasaki T, Amano J, Kano Y, Taniguchi S. 2001 Bifidobacterium longum as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. Breast Cancer Research and Treatment. 66: 165-170.

Yu L, Hales CA. 2011. Long term exposure to hypoxia inhibits tumor progression of lung cancer in rats and mice. BioMed Central Cancer. 11:331.

Zitta K, Meybohm P, Bein B, Rodde C, Steinfath M, Scholz J, Albrecht M. 2010. Hypoxia induced cell damage is reduced by mild hypothermia and postconditioning with catalase in vitro: Application of an enzyme based oxygen deficiency system. European Journal of Pharmacology. 628 11-18.

Zhou W, Dosey TL, Biechele T, Moon RT, Horwitz MS, Baker HR. 2011. Assessment of hypoxia inducible factor levels in cancer cell lines upon hypoxic induction using a novel reporter construct. Plos one 6:11.

Zhu H, Li Z, Mao S, Ma B, Zhou S, Deng L, Liu T, Cui D, Zhao Y, He J, Yi C, Huang Y. 2011. Antitumor effect of sFlt-1 gene therapy system mediated by Bifidobacterium Infantis on Lewis lung cancer in mice. Cancer Gene Therapy. 18, 884-896.