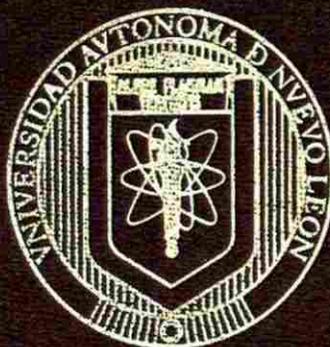


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**"REGULACION DE LA EXPRESION DE LA
ANEXINA I POR EL ONCOGEN WNT1
EN CELULAS PC-12"**

Por

Q.F.B. JUAN MANUEL LEYVA CASTILLO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
**MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA**

AGOSTO 2006

TM

QH506

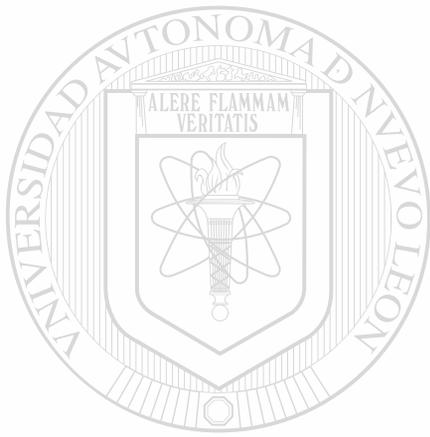
.L4

2006

c.1



1080146423



UANL

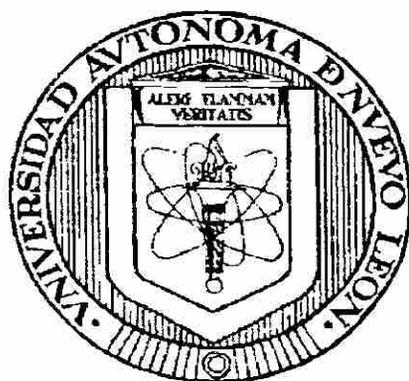
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA
ANEXINA I POR EL ONCOGEN WNT I
EN CÉLULAS PC-12”.**

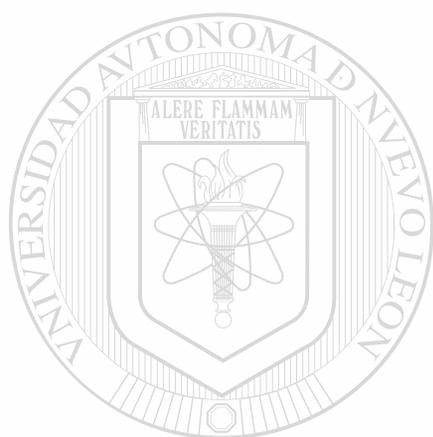
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por: **Q.F.B. Juan Manuel Leyva Castillo**

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética

Agosto, 2006



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



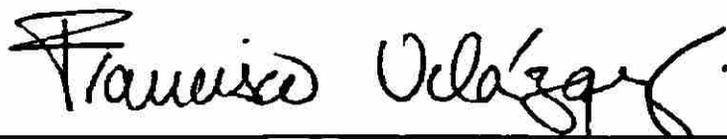
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



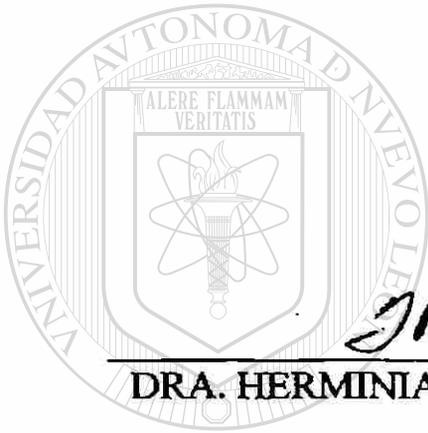
**FONDO
TESIS MAESTRIA**

**“REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ANEXINA I
POR EL ONCOGEN WNT I EN CÉLULAS PC-12”**

Aprobación de la tesis:



DR. JUAN FRANCISCO VELÁZQUEZ VADILLO.
Director de Tesis



DRA. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Co-Director de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DRA. ANA MARÍA RIVAS ESTILLA
Co-Director de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

CONTENIDO.

	PÁGINA
CONTENIDO	i
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vii

CAPITULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Introducción	1
1.2 Modulación de la expresión génica	1
1.2.1 Regulación de la iniciación de la transcripción.	1
1.2.2 Modulación de la transcripción	2
1.2.3 Regulación post-transcripcional	3
<hr/>	
1.3 Antecedentes generales	4
1.3.1 Oncogen Wnt1	4
1.3.2 Relación de la vía canónica Wnt y procesos tumorales	8
1.3.3 Resistencia a antineoplásicos de células tumorales	10
1.3.4 Gen de la anexinal	11
1.4 Antecedentes directos	12
1.4.1 Anexinal y resistencia a antineoplásicos	12
1.4.2 Relación entre anexinal y el oncogen Wnt	13
1.5 Justificación	14

CAPITULO II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general	15
2.2 Objetivos específicos	15

CAPITULO III. MATERIALES Y METODOS.

3.1 Área de trabajo	16
3.2 Reactivos y material diverso	16
3.3 Equipo utilizado	20
3.4 Estrategia general	21
3.5 Descripción del sistema experimental	22
3.6 Confirmar que Wnt1 modula positivamente los niveles del RNAm y proteína en células PC12: RT-PCR y western-blot	24
3.7 Caracterizar funcionalmente el promotor de la anexinal en las células del sistema experimental	28
3.8 Caracterizar funcionalmente la región 3'UTR de la anexinal en las células del sistema experimental	34

CAPITULO IV. RESULTADOS

4.1 Wnt1 modula positivamente los niveles del RNAm de la anexinal en células PC12: RT- PCR y western-blot	37
4.2 Aislamiento de la región promotora de la anexinal por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa.	39
4.3 Construcción del vector de expresión eucariótico que contiene el gen reportero de luciferasa dirigido por una región de 1.6Kb del promotor de la anexinal.	42
4.4 Ensayos de transfección para la región promotora de la anexinal.	44
4.5 Aislamiento de la región 3' UTR del gen de la anexinal por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa.	48
4.6 Construcción del vector de expresión eucariótico que contiene la región 3'UTR del gen de la anexinal río abajo del gen reportero de luciferasa	50
4.7 Ensayos de transfección para la región 3'UTR del gen de la anexinal	51

CAPITULO V. DISCUSIÓN 53

CAPITULO VI. CONCLUSIONES 56

CAPITULO VII. PERSPECTIVAS 57

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 58

ANEXOS 64

LISTA DE TABLAS.

Tabla1.	Iniciadores utilizados para determinar el efecto de Wnt1 sobre la anexinal	25
Tabla2.	Iniciadores específicos del promotor del gen de la anexinal	28
Tabla3.	Iniciadores específicos para la región 3'UTR del gen de la anexinal	34

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1.	Vía canónica Wnt	6
Figura 2.	Análisis de células MCF-7 transfectadas con anexinal	12
Figura 3.	Estrategia general	21
Figura 4.	Protocolo esquematizado del kit PARIS (Ambion)	24
Figura 5.	Purificación a partir del gel de agarosa	30
Figura 6.	Protocolo de clonación en pGEMT-easy	30
Figura 7.	Diagrama de flujo de secuenciación	31
Figura 8.	Diagrama de flujo de transfección mediante el reactivo transfast	32
Figura 9.	Diagrama de flujo para la determinación de luciferasa por DLR	33
Figura 10.	Wnt1 regula positivamente la expresión de la anexinal en el modelo de estudio	31
Figura 11.	Gel SDS-PAGE y Western-blot	32
Figura 12.	Secuencia del promotor de la anexinal	33
Figura 13.	Aislamiento y caracterización del promotor de la anexinal	34
Figura 14.	Caracterización de vector PGEM-PromANXI	35
Figura 15.	Alineamiento de la secuencia obtenida utilizando el programa BLAST	35
Figura 16.	Construcción del vector de expresión eucariótico PGL-PromANXI	36
Figura 17.	Caracterización de vector PGL3-PromANXI	37
Figura 18.	Transfecciones del vector pCMV-LUC en el modelo de estudio	38
Figura 19.	Transfecciones del vector pGL3-Basic en el modelo de estudio	39
Figura 20.	Transfecciones de vectores pCMV-LUC y pGL3-Basic	40
Figura 21.	Transfecciones de vectores pTOPFLASH y pFOPFLASH	41
Figura 22.	Transfecciones de vectores pGL3-PromANXI y pGL3-Basic	42

Figura 23. Aislamiento y caracterización de la región 3'UTR del gen de la anexinal	43
Figura 24. Alineamiento de la secuencia obtenida utilizando el programa BLAST	43
Figura 25. Construcción del vector de expresión eucariótico PGL3-3'UTRANXI	44
Figura 26. Transfecciones del vector pCMV-LUC-3'UTRSV40 en el modelo de estudio	45
Figura 27. Transfecciones de vectores pGL3-3'UTRANXI	46

LISTA DE ABREVIATURAS.

ABC	ATP Binding cassette
APC	Adenomatosis polyposis coli
ATP	Trifosfato de adenosina
BCRP	Proteína de resistencia en cáncer de mama
BLAST	The Basic Local Alignment Search Tool
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNAc	DNA complementario
DNAg	DNA genómico
DNAp	DNA plasmídico
G418	Geneticina
GSK-3β	Glicógeno sintetasa cinasa 3 β
Kpb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
LEF	Factor potencializador linfoide
MDR1	Resistencia a multidroga 1
μg	Microgramos

μl	Microlitros
MRP1	Proteína de resistencia a multidroga 1
NCBI	National Center for Biotechnology Information
neo	Neomicina
ng	Nanogramos
NGF	Factor de crecimiento neuronal
pb	Pares de bases
pCMV-LUC	Plásmido que contiene el gen reportero de luciferasa dirigido por el promotor de citomegalovirus
pCMV-REN	Plásmido que contiene el gen reportero de renilla dirigido por el promotor de citomegalovirus
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Poli-A	Poliadenilación
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR	Retrotranscripción- reacción en cadena de la polimerasa
SDS-PAGE	Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes
TCF	Factores transcripcionales de células T
UTR	Región no traducida
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
Wnt1	Wingless-type MMTV integration site family, member 1

RESUMEN.

Q.F.B. Juan Manuel Leyva Castillo

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina.

Fecha de graduación. Agosto 2006

Área de estudio: Biología Molecular

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Número de páginas: 74

Título del estudio: "Regulación de la expresión de la anexinal por el oncogen Wnt 1 en células PC-12".

Introducción.

Las proteínas Wnt influyen un amplio rango de tejidos y afectan procesos como determinación de las características celulares, crecimiento celular, muerte celular programada y diferenciación. La activación aberrante de la vía de señalización es una de las anomalías más frecuentes conocidas en neoplasias humanas. La activación de la vía conlleva a una acumulación de β -catenina, la cual activa genes responsivos a la familia de factores transcripcionales TCF/LEF, con los que la β -catenina interacciona. Entre los genes blanco de esta vía de señalización se encuentran genes que están implicados en los procesos tumorales, como c-myc, ciclinaD1 y MDR1, este último uno de los genes más estudiados que confieren resistencia a antineoplásicos. La anexinal está involucrada en muchos procesos celulares. Interesantemente, la expresión de la anexinal confiere resistencia a antineoplásicos en células MCF-7.

Objetivo. Determinar la participación de la región promotora y 3' UTR del gen de la anexinal en la regulación positiva por el oncogen Wnt1

Materiales y Métodos. A partir del DNA de la línea celular Wnt1, se aisló la región promotora de la anexinal; mediante PCR y se clonó río arriba del gen reportero de la luciferasa, en el vector pGL3-Basic. La región 3'UTR de la anexinal se aisló del RNA total de la línea celular HB+; mediante RT-PCR, se clonó río abajo del gen reportero de la luciferasa en el vector pCMV-LUC. Con los vectores resultantes se realizaron ensayos de transfección en el sistema experimental, para observar la participación de estas regiones en la regulación de este gen.

Resultados. Se identificaron 4 posibles sitios de interacción con los factores transcripcionales TCF/LEF en la región promotora de la anexinal. Se identificó un posible elemento rico en adeninas y uracilos (ARE) en la región 3'UTR de la anexinal. Los ensayos de transfección demostraron que tanto la región promotora como la región 3'UTR del gen de la anexinal están involucradas en la regulación positiva mediada por el oncogen Wnt1.

Conclusiones. Debido a que la región promotora está involucrada en la regulación positiva del gen de la anexinal mediada por el oncogen Wnt1, éste podría ser un blanco directo de la vía canónica Wnt. La mayor expresión del gen reportero de luciferasa en las líneas celulares que expresan el oncogen Wnt1 comparadas con la línea celular parental, sugiere una relación funcional entre Wnt1 y la región 3'UTR de la anexinal.

DR. FRANCISCO VELÁZQUEZ
Director de tesis.

DRA. HERMINIA G. MTZ.
Co-director de tesis

DRA. ANA M. RIVAS
Co-director de tesis

CAPITULO I. MARCO TEÓRICO.

1.1 INTRODUCCIÓN.

La regulación de la expresión genética es una característica esencial de células vivientes y se refiere al proceso por el cual el genoma o material genético es empleado para dar origen a cierto fenotipo. De la cantidad de información genética contenida en todas las células, solo una pequeña fracción es expresada como proteínas en cada organismo. En organismos pluricelulares, los mecanismos de control son muy finos permitiendo la diferenciación celular y la adaptación al medio ambiente.

La expresión de los genes se puede llevar a cabo a diferentes etapas del flujo de la información genética, en este trabajo nos enfocaremos en la síntesis del RNAm o inicio de la transcripción y a nivel post-transcripcional donde tienen gran importancia las regiones no traducidas del RNA mensajero, ya que en éstas se encuentran secuencias de unión a proteínas que estabilizan o desestabilizan a estos RNA mensajeros.

1.2 MODULACION DE LA EXPRESION GÉNICA.

1.2.1 Regulación de la iniciación de la transcripción.

La activación transcripcional de los genes eucarióticos durante el desarrollo o en respuesta a señales intracelulares involucra el ensamblaje regulado de complejos multiproteicos sobre las regiones reguladoras: promotores, y regiones potenciadoras (enhancers) o inhibidoras (silenciadores). La iniciación de la transcripción, es uno de los puntos de control más importantes de la regulación de la expresión genética. Esta regulación está dada principalmente por

interacciones entre secuencias específicas del DNA que pueden localizarse a distancias variables del sitio de iniciación y una colección de proteínas, muchas de las cuales se unen a estas secuencias (llamados factores transcripcionales) y que actúan en trans induciendo o reprimiendo la expresión¹.

Más de una docena de factores transcripcionales están implicados tanto en la formación del complejo de transcripción basal de los RNA mensajeros como en su estabilización. Estas proteínas se ensamblan sobre el promotor de los genes por etapas. El complejo final, controla el grado en el cual la enzima RNA polimerasa II lleva a cabo un paso central en la síntesis de una proteína, la iniciación de la transcripción¹.

Entre los elementos cis más importantes que reconocen el aparato de transcripción basal en el promotor de un gran número de genes está una secuencia consenso llamada "caja TATA" que se localiza 30 bases río arriba del sitio del inicio de la transcripción. El primer paso en la formación del complejo de

transcripción basal es la unión del factor TBP (Proteína de unión a TATA) a la secuencia TATA. Una vez que TBP se une al DNA se unen otras subunidades llamadas TAFs (factores asociados a TBP)¹.

1.2.2 Modulación de la transcripción.

El aparato molecular que controla la transcripción en células eucarióticas consiste de cuatro grupos de componentes. Los factores basales son aquellos esenciales para la transcripción no modulada o transcripción basal, pero no pueden por ellos mismos aumentarla o disminuirla. Esta tarea de modular la transcripción basal recae sobre otros factores transcripcionales conocidos como

activadores o represores, que varían de un gen a otro. Los factores activadores y represores, se unen a secuencias localizadas dentro del promotor. Estos se comunican con los factores basales a través de coactivadores proteicos que están unidos a un complejo hermético a TBP, y van a regular la actividad de los genes blanco².

1.2.3 Regulación post-transcripcional.

Después de que un gen ha sido transcrito, muchos eventos son requeridos antes de que su producto proteico sea sintetizado. Estos eventos post-transcripcionales consisten en el procesamiento del RNA, la exportación del RNA del núcleo al citoplasma, la localización del RNAm, la estabilización del RNAm y la regulación de la traducción³.

La estructura de las regiones 5' no traducida, el marco de lectura abierto, la región 3' no traducida y la cola de poli-A dictan que mecanismo molecular controla la estabilidad del RNAm y su eficiencia de traducción⁴

Aunque los elementos reguladores son encontrados en todas partes del RNAm, es claro que la región 3' no traducida es un lugar de opción para estos[®] elementos. Desde el punto de vista mecanístico, es claro que la región 3' no traducida no es leída por los ribosomas⁵.

Por lo tanto algunas interacciones RNA/Proteínas son llevadas en esta región persistiendo a la traducción, llevándose a cabo la regulación en cualquier momento.

1.3 ANTECEDENTES GENERALES.

1.3.1 Oncogen Wnt 1.

Wnt 1 codifica para una glicoproteína secretada rica en cisteína que actúa como un factor de señalización extracelular. Este gen forma parte de una familia de 19 genes relacionados que codifican para proteínas muy similares, y que en la actualidad son reconocidas como la familia de moléculas más importante de señalización que regulan el desarrollo. Las proteínas Wnt influyen un amplio rango de tejidos y afectan procesos como determinación de las características celulares, crecimiento celular, muerte celular programada y diferenciación⁶.

Las proteínas Wnt han sido identificadas en eucariotes inferiores hasta el humano, y su papel en el desarrollo embrionario ha sido extensivamente estudiado. La conservación evolutiva de los mecanismos de señalización de esta vía ha contribuido ampliamente para comprender estos procesos en vertebrados superiores.

Entre las numerosas funciones en el desarrollo embrionario de la vía de señalización Wnt se incluyen papeles claves tanto en la morfogénesis, como en la polaridad de muchos órganos.

A nivel celular, la vía de señalización Wnt, ha sido implicada en proliferación celular, agregación, diferenciación, migración, morfología y apoptosis.

Evidencias recientes también sugieren que las proteínas Wnt pueden regular el comportamiento de las células troncales o su progenie inmediata. Aunado a esto, los mecanismos de señalización de esta vía están implicados en el establecimiento de polaridad en los tejidos⁷.

La vía de señalización Wnt juega un rol importante en varios procesos del desarrollo temprano y en patogénesis de enfermedades humanas, incluyendo procesos tumorales⁸⁻¹⁰.

Las proteínas Wnt activan diferentes vías de señalización: la vía Wnt / Ca⁺², donde la transducción de señales es llevada a cabo por cinasas dependientes del ion calcio; la vía Wnt/PCP (Polaridad Planar), donde la señalización lleva a cabo un cambios en el citoesqueleto, con lo que se genera la polaridad de la célula; y la denominada vía canónica Wnt¹¹. En la vía de señalización canónica (Fig.1), las proteínas Wnt se unen al receptor Frizzled y regulan la estabilidad de la β -catenina, el componente clave de esta vía. En ausencia de la señalización por Wnt, la β -catenina es constitutivamente regulada por un complejo multiproteico de destrucción, que contiene la glicógeno sintetasa cinasa 3 β (GSK3 β), la axina y el producto del gen supresor de tumores APC, que promueven su fosforilacion en residuos del extremo amino terminal de la β -catenina, con lo que se promueve su degradación por ubiquitinacion y proteosoma¹²⁻¹³. Utilizando receptores compuestos por la proteína Frizzled en conjunción con una de las proteínas relacionadas a los receptores LDL, LRP5 o LRP6, las proteínas Wnt activan a la señalización intracelular para proceder vía las proteínas Axina y Dishevelled inhibiendo este proceso, llevando a la estabilización de la β -catenina en el citoplasma, y su subsecuente translocación al núcleo¹⁴⁻¹⁶. Una vez localizada en el núcleo, la β -catenina forma un complejo con la familia de los factores transcripcionales de células T (TCF)/factor 1 potencializador linfoide (LEF1) y regula la expresión de genes blancos

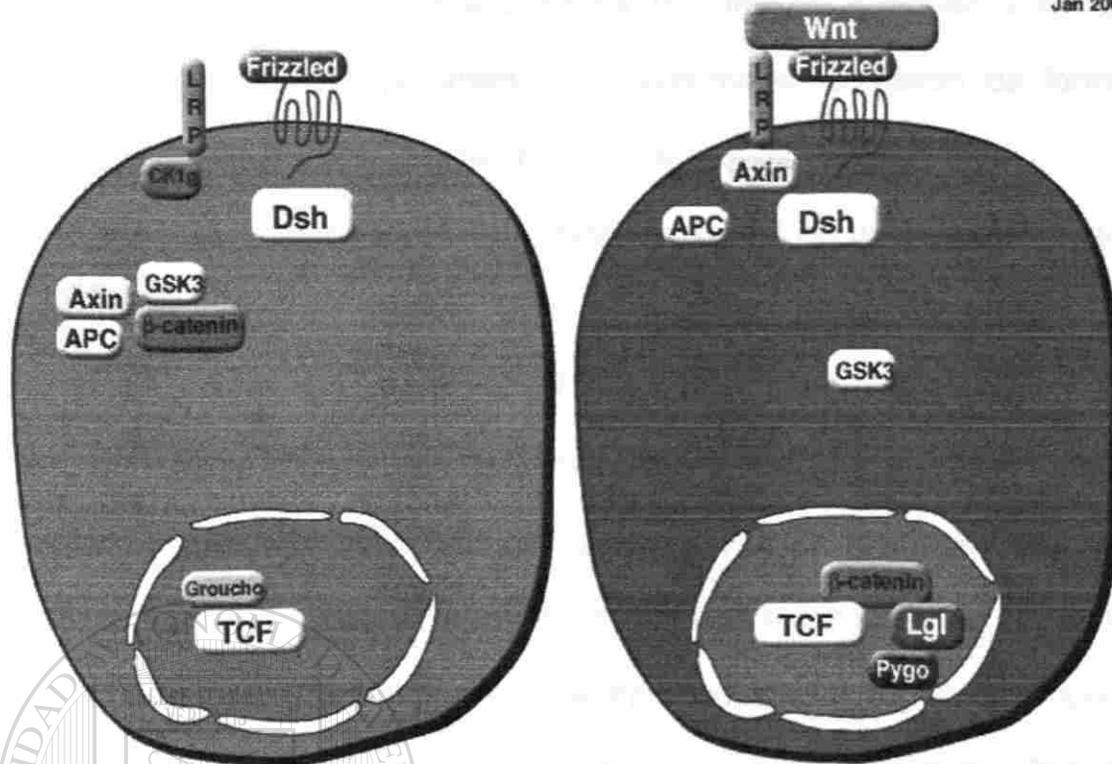


Figura 1. Vía canónica Wnt. Los niveles citoplasmáticos de β -catenina son finamente regulados por un complejo multiproteico, que la fosforila y marca para su posterior degradación vía proteosoma. La unión de las proteínas Wnt a Frizzled activa la vía con lo que es bloqueada la fosforilación de la β -catenina, con lo que se acumula en el citoplasma y posteriormente se transloca al núcleo para interactuar con la familia de factores transcripcionales TCF/LEF para activar sus genes blancos¹⁵.

específicos¹⁷⁻¹⁸. Los blancos transcripcionales pueden variar entre el tipo celular, pero en algunos casos pueden incluir oncogenes como *c-myc*¹⁹ y la ciclina D1²⁰.

Algunos de estos genes son conocidos como blancos transcripcionales directos de la vía Wnt, por su efector β -catenina/TCF, pero otros pueden estar regulados por mecanismos menos directos.

Recientemente se ha observado que la familia de factores transcripcionales TCF pueden inhibir sus blancos transcripcionales como activarlos, y con ello llevar a cabo instrucciones de cambios en las características celulares.

Los mecanismos por los cuales la familia TCF inhiben o activan a sus genes blancos no son solo importantes para comprender el patrón de formación durante el desarrollo, sino también en los procesos tumorales²¹.

En la actualidad, un oncogen bien conocido c-myc es un gen blanco que es activado en cáncer de colon humano. El gen c-myc tiene sitios de unión a la familia de factores transcripcionales TCF en su promotor, probablemente este gen está sujeto a la regulación de la vía canónica Wnt¹⁹.

Aunado a la regulación positiva de la vía canónica Wnt sobre genes que confieren características de las células tumorales, muchos de los componentes de esta vía de señalización han sido identificados como oncogenes o supresores de tumores. Esto es más evidente en cáncer de colon, en el que el 85% de los tumores han perdido la función de APC, un componente esencial de la maquinaria de desestabilización de β -catenina⁹. Y con una continua estimulación por las proteínas Wnt, las mutaciones en APC resultan en altos niveles de β -catenina y su subsecuente actividad transcripcional. Se observa un comportamiento similar a éste, en cáncer hepatocelular que pierde la función de la axina²². Mutaciones en β -catenina, que afectan los sitios de fosforilación, han sido detectados en una amplia gama de cánceres humanos, tales como tumores colorectales, meduloblastomas, hepatoblastomas, carcinoma hepatocelular, pilomatrixomas, carcinomas endometriales, prostáticos y de tiroides. Estos datos colectivamente implican que la activación de la vía Wnt, es la anomalía más común en las señalizaciones conocidas en cáncer humano⁹.

1.3.2 Relación de la vía canónica Wnt y procesos tumorales.

Después de un amplio estudio²³ del proceso tumoral, en los recientes años se ha descubierto que la desregulación de las vías de señalización es una de las principales causas de la transformación de las células, debido a que éstas regulan cada una de las características celulares que se ven afectadas en las células tumorales, dentro de estas vías de señalización se encuentra la vía canónica Wnt que es una de las más frecuentes anomalías conocidas en cánceres humanos.

Esto se debe a que muchos de los genes involucrados en esta vía de señalización son genes supresores de tumores (GSK-3 β , Axinal, APC) u oncogenes (β -catenina, TCF, Frizzled), además, esta vía de señalización regula a nivel transcripcional varios genes que están relacionados con cada una de las características que adquiere una célula tumoral, tales como: capacidad replicativa ilimitada, invasión a tejidos y metástasis, angiogénesis sostenida, autosuficiencia de señales de crecimiento, evasión de la apoptosis y falta de respuesta a señales inhibitorias de crecimiento²³; que se explican a continuación.

En cuanto a la capacidad replicativa ilimitada, esta vía regula positivamente la expresión de la ciclina D1²⁴; y es bien conocido que las ciclinas son necesarias para pasar a través del ciclo celular.

Para la invasión a tejidos y metástasis, la degradación de la matriz extracelular es importante para este proceso, una proteína encargada de esta función; la matrilisina; es un blanco conocido de la vía canónica Wnt²⁵.

La sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) provee a las células tumorales una angiogénesis sostenida, esta sobreexpresión puede ser ocasionada por la activación no regulada de la vía canónica Wnt²⁶.

Otra de las características importantes de las células tumorales son la evasión de la apoptosis y la falta de respuesta a señales inhibitorias de crecimiento, la relación entre la vía canónica Wnt y estas características es que un blanco transcripcional de esta vía es el oncogen c-myc²⁷, que al estar sobreexpresado hace que el ciclo celular continúe por todas sus etapas, sin responder a señales inhibitorias y en cuanto a la apoptosis, esta misma sobreexpresión hace que se insensibilice la célula a la muerte celular programada ocasionada por el factor de necrosis tumoral²⁸.

Modificaciones en la estabilidad del RNAm y/o la eficiencia de traducción se han incrementado en los reportes de investigación dentro del cáncer. Estos procesos son controlados por una compleja red de interacciones de RNA/proteínas involucrando el reconocimiento de secuencias específicas en los RNAm blancos de proteínas de unión a RNA. Es importante conocer las alteraciones de estas secuencias reguladoras, en las proteínas de unión a RNA, o que vías de señalización afectan la estabilidad o eficiencia de traducción de genes que codifican para proto-oncogenes, citocinas, reguladores del ciclo celular y otras proteínas que promueven la tumorigénesis y la progresión del cáncer³.

Otra de las características importantes que adquiere una célula tumoral es la resistencia al tratamiento con antineoplásicos, que se comenta más adelante.

1.3.3 Resistencia a antineoplásicos de células tumorales.

La quimioterapia es una importante modalidad para el tratamiento de los tumores malignos. Sin embargo, para la mayoría de los pacientes con estos padecimientos, el tratamiento con un agente anticancerígeno produce efectos adversos a largo plazo y una respuesta farmacológica variada ²⁹, esto es debido a que ciertos genes que afectan la quimiosensibilidad están involucrados en diversos procesos como: el transporte del antineoplásico, su metabolismo, en la reparación y síntesis de DNA y en apoptosis³⁰⁻³².

En líneas celulares tumorales, la resistencia a antineoplásicos está asociada con un decremento del fármaco en la célula de manera dependiente de ATP, lo cual es atribuido a la sobreexpresión de ciertas proteínas transportadoras ABC (ATP binding cassette). Estas proteínas incluyen a la glicoproteína P (MDR1), la proteína de resistencia a multidrogas 1 (MRP1), y la proteína de resistencia en cáncer de mama (BCRP) ³³.

Sin embargo, no todos los tumores resistentes a antineoplásicos sobreexpresan alguno o algunos de los transportadores ABC, por lo que es importante estudiar que otras proteínas están involucradas en dicha capacidad de las células tumorales, así como los mecanismos involucrados en la resistencia a antineoplásicos conferidos por estas proteínas.

La resistencia a antineoplásicos es el mayor impedimento de un tratamiento satisfactorio de muchos de los procesos tumorales²⁹⁻³³.

1.3.4 Gen de la anexinal.

La anexinal es una proteína de 37 kDa miembro de una superfamilia de proteínas estructuralmente relacionadas, que unen fosfolípidos ácidos de manera dependiente de calcio.

La anexinal fue primero identificada como un mediador de la acción de los antiinflamatorios glucocorticoides. Subsecuentes trabajos revelaron que esta proteína tiene otras funciones y en la actualidad es reconocida como un importante intermediario de señalización en una variedad de otros sistemas³⁴.

Estas proteínas tienen un extremo carboxilo terminal muy conservado, que contiene cuatro repeticiones de 70 aminoácidos. La secuencia del extremo amino terminal de cada anexina es única y es lo que les confiere la especificidad biológica a cada una de estas proteínas³⁵.

Las anexinas están descritas en múltiples organismos desde eucariotes inferiores hasta el hombre, se han reportado un gran número de genes de

anexinas y éstas son expresadas en todos los tejidos excepto en los eritrocitos.

Estas proteínas están implicadas en múltiples aspectos de la biología celular[®]

incluyendo la regulación del tráfico de proteínas, actividad de canal transmembranal, inhibición de la fosfolipasa A₂, inhibición de la coagulación y transducción de señales mitógenas³⁶

1.4 ANTECEDENTES DIRECTOS.

1.4.1 Anexinal y resistencia a antineoplásicos.

Wang et al³⁷. demostraron que en líneas celulares tumorales la sobreexpresión de la anexinal aumenta de 2 a 5 veces la resistencia a adriamicina, melphalan y etopósido (Fig.2) y en líneas celulares resistentes a antineoplásicos, al transfectar con la secuencia antisentido de la anexinal, observaron una disminución de 2.5 a 8 veces en la resistencia a estos mismos fármacos, sin niveles detectables de las proteínas de resistencia a multidrogas (MDR1,MRP1 y BCRP)³⁷. En este estudio, ellos proponen que la resistencia conferida a estos antineoplásicos por la anexinal, es mediada por exocitosis, ya que esta resistencia es menor a las observadas en líneas celulares que sobreexpresan MDR1 o MRP1, sin embargo este mecanismo no está comprobado³⁷.

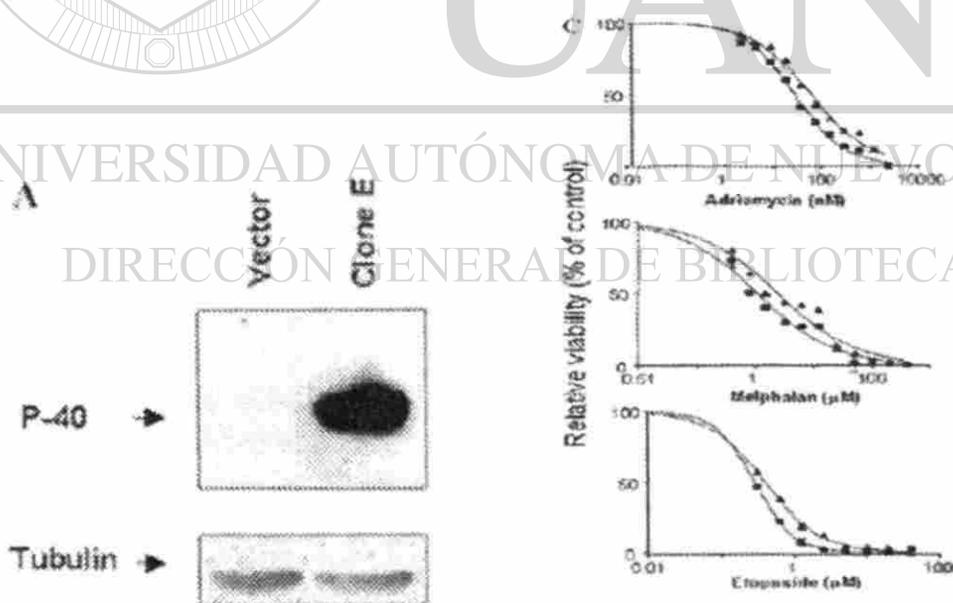
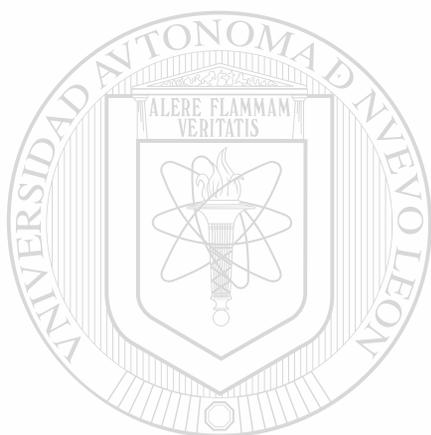


Figura 2. Análisis de células MCF-7 transfectadas con anexinal. A) análisis de Western blot de lisado total de células transfectadas con vector solo y clona E transfectadas con anexinal (p40) C) viabilidad relativa de las células MCF-7 transfectadas con vector solo o con el cDNA de en presencia de concentraciones crecientes de adriamicina, melphalan y etopósido³⁷.

1.4.2 Relación entre anexinal y el Oncogen Wnt.

En datos no publicados de Velázquez et al, observó que los niveles de RNAm de la anexinal es regulada positivamente por el oncogen Wnt1, por medio de microarreglos, Estos resultados fueron corroborados por RT-PCR semicuantitativa y northern blot en líneas celulares de feocromocitoma de rata que expresan el oncogen Wnt1.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.5 JUSTIFICACIÓN.

En este trabajo destacan tres aspectos interesantes:

- La vía canónica Wnt contribuye al desarrollo de distintos tipos de tumores. Por ejemplo, cáncer de mama, colon y melanoma, entre otros.
- La necesidad de dilucidar la relación funcional entre la vía canónica wnt y la expresión de la anexinal, contribuirá al conocimiento de los mecanismos por los cuales esta vía de señalización activa la transcripción de genes que favorecen el desarrollo de una gran variedad de tumores.
- La importancia del estudio de la regulación de la anexinal dada la relevancia de la expresión de genes que confieren resistencia a antineoplásicos, en el tratamiento de pacientes con cáncer.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO II.

OBJETIVOS.

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar la participación de la región promotora y 3' UTR del gen de la anexinal en la regulación positiva por el oncogen Wnt1.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1.- Confirmar que Wnt1 modula positivamente los niveles del RNAm y proteína de la anexinal en células PC12: RT- PCR y western-blot.

2.- Aislar, clonar río arriba del gen reportero luciferasa, secuenciar y caracterizar funcionalmente un fragmento de 1.5 Kpb del promotor de la anexinal, que se extiende 1.5 Kpb a partir del sitio de iniciación de la transcripción, por ensayos de transfección transitoria en las líneas celulares del sistema experimental propuesto.

3.- Aislar, clonar río abajo del gen reportero luciferasa, secuenciar y caracterizar funcionalmente la región 3' UTR del RNAm de la anexinal, por ensayos de transfección transitoria en las líneas celulares del sistema experimental propuesto.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

3.1 Área de trabajo

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

3.2 Reactivos y material diverso

a) Active Motif (Carlsbad, CA, EUA)

Vivid Violet DNA/RNA Co-Precipitate

b) Ambion (Austin, TX, EUA)

Kit PARIS

c) BD Bioscience Clontech (Palo Alto, CA, EUA)

Advantage RT for PCR kit

Titanium taq PCR kit

d) Becton Dickinson- Difco (Sparks, MD, EUA)

Bacto-agar, extracto de levadura, bacto-triptona.

e) Corning (NY, EUA)

Criotubos 2 ml, botella para cultivo celular de 25 cm², 50 cm² y 100 cm²

f) Costar (NY, EUA)

Pipetas serológicas Stripette 5, 10 y 25 ml, plato de cultivo de 24 pozos.

g) Hyclone (Logan, UT, EUA)

Tripsina 0.25%, suero fetal bovino, suero de ternera.

h) Invitrogen (California, EUA)

Oligonucleótidos específicos

Escherichia coli STAB Top 10 F' chemically competent cells.

Agarosa

i) LI-COR Biosciences (Lincoln, NB, EUA)

IRDye 800v2 Terminator Mixes.

j) New England Biolabs (Beverly, CA, EUA)

Enzimas de restricción (*KpnI*, *HindIII*, *SacI*, *MspI*), DNA Polimerasa de T4,

DNA ligasa de T4

k) Promega (Madison, WI, EUA)

Ligasa T4

Kit Wizard SV gel and PCR clean-up system

Kit PGEM-T Easy vector System

Kit Dual-luciferase reporter assay system

Transfast Transfection reagent

DNA del bacteriófago Lambda digerido con *PstI*

pGL3-Basic

pRL-CMV

l) QIAGEN (Valencia, CA, EUA)

Kit plasmid midi kit

m) Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA)

DMEM

Glucosa

Acetato de potasio

Acetato de sodio

Alcohol etílico

Hidróxido de amonio

Hidróxido de sodio

Fosfato dibásico de sodio

Fosfato monobásico de potasio

Cloruro de sodio

Cloruro de potasio

Cloruro de calcio

Sulfato de magnesio

Dodecil sulfato de sodio

Fenol

Trizma base

EDTA

Ácido bórico

Azul de bromofenol

Xilencianol

Bromuro de etidio

Tubos Eppendorf de 0.5, 1.5 y 2.0 ml y puntillas para micropipetas

n) USB (Cleveland, OH, EUA)

Kit Termo sequenase cycle sequencing

o) Gibco-BRL-life technologies (Gaithersburg, MD, EUA)

Enzimas de restricción (*XbaI* y *BamHI*)

100 pb leader

p) Falcon (Houston, EUA)

Tubos cónicos de 15 y 50 ml

q) Merck (Gibson, NJ, EUA)

Cloroformo, etanol, isopropanol

r) Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA)

Anticuerpos monoclonales contra β -actina y anexinal.

Anticuerpos anti-raton conjugado con peroxidasa

3.3 Equipo utilizado

- Microcentrifugas Eppendorf (Hamburg-Eppendorf, Alemania)
 - Cámaras de electroforesis horizontal marca Biorad (Hercules, CA, EUA).
 - Fuente de poder Biorad (Hercules, CA, EUA)
 - Horno de microondas LG (Seoul, Korea)
 - Campana de flujo laminar Labconco Corporation (Kansas City, MO, EUA)
 - Incubadora con CO₂ NAPCO (Winchester, VA, EUA)
 - Balanza digital Sartorius modelo 1206 MP, (Camibh Gottingen, Alemania)
 - Microscopio invertido marca Karl Zeiss (Jena, Alemania)
 - Vortex (Thermolyne, IO, USA)
 - Termociclador Gene Amp PCR system 2400 (Foster, CA, EUA)
 - Maxi Mix II type 37600 Mixer (Debuque, IA, EUA)
 - Centrifugas Allegra 21R y J2-MI (Palo Alto, CA, EUA)
-
- Thermomixer Eppendorf (Hamburg-Eppendorf, Alemania)
 - Secuenciador DNA sequencer LONG READIR 4200 (Lincoln, NB, EUA)
 - Baño de agua orbital (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA)
 - Ultracongelador SO-LOW (Cincinnati, OH, EUA)
 - Transiluminador con cámara oscura UVP (Upland, CA, EUA)
 - Luminómetro Veritas (Turner Biosystem, Sunnyvale, CA, EUA)

3.4 Estrategia General.

En este proyecto se propuso la siguiente estrategia general experimental que se muestra en la figura 3.

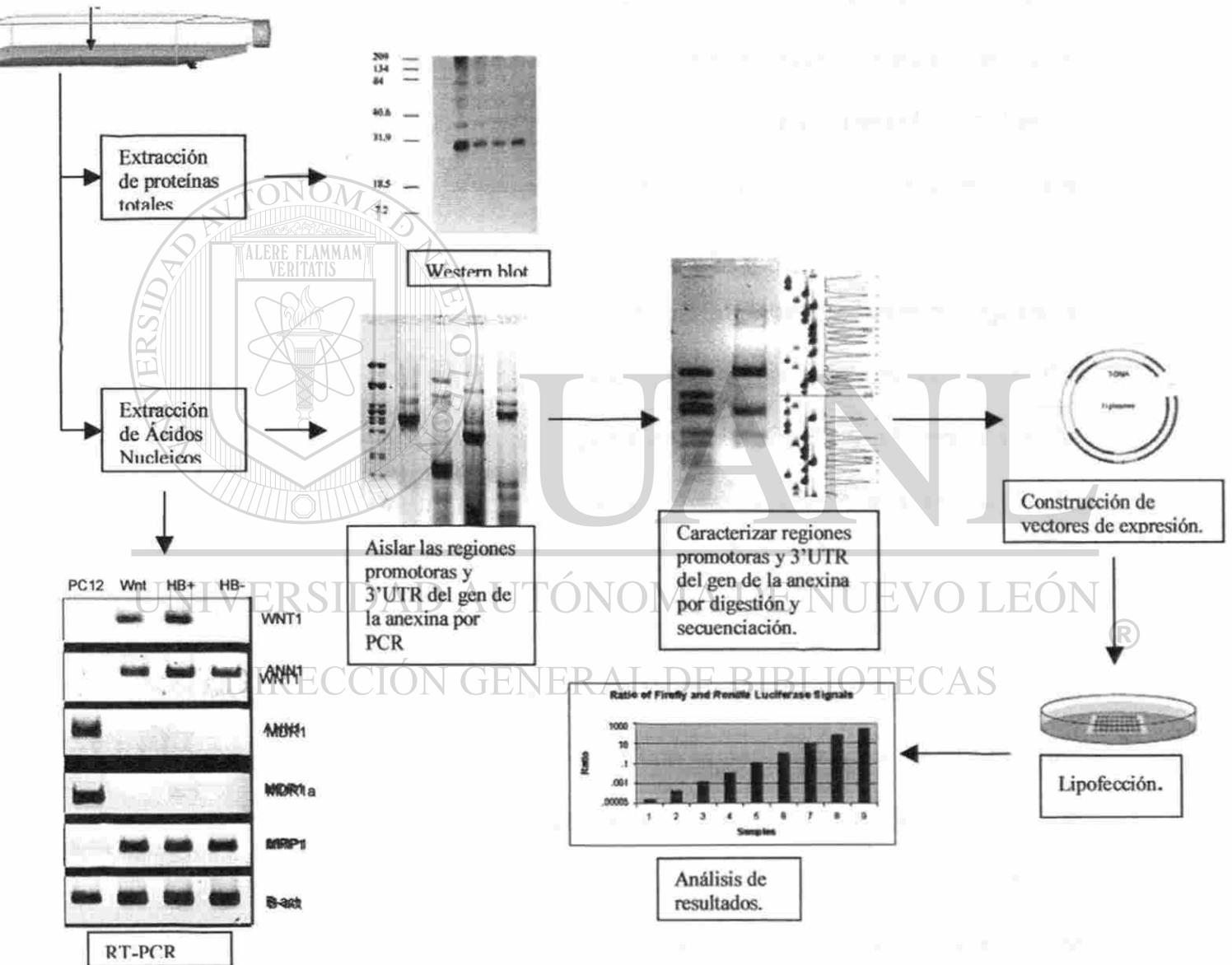


Figura 3. Estrategia General. Se muestran las etapas involucradas en el trabajo experimental, en orden cronológico, indicado por las flechas.

3.5 Descripción del sistema experimental.

Línea parental PC12: es una línea celular que se estableció a partir de un tumor adrenal de rata denominado feocromocitoma y responde reversiblemente al factor de crecimiento neuronal (NGF). Son células pequeñas redondeadas con poca adherencia al frasco de cultivo. Esta línea tiene un número homogéneo de 40 cromosomas. La exposición a NGF a corto plazo, comienza una diferenciación hacia neuronas simpatomiméticas. Las células tratadas con NGF también contienen pequeñas vesículas, estas vesículas sintetizan y almacenan los neurotransmisores dopamina y norepinefrina³⁸.

Esta línea celular es un modelo útil para estudios neurobiológicos y neuroquímicos, entre los que se incluyen los mecanismos de acción del NGF y el papel que éste desempeña en el desarrollo y diferenciación de células madres neuronales y el metabolismo, almacenamiento y liberación de catecolaminas³⁸.

Línea PC12-Wnt1: Derivadas de PC12 transformadas por transfección estable con el plásmido Wnt1 DNAc con el gen marcador de neomicina y utilizando G418. Es una línea celular que no responde al factor de crecimiento neuronal, es decir, no se diferencia a neuronas simpatomiméticas, sin embargo si responden al factor de crecimiento de fibroblastos³⁹. La expresión constitutiva del oncogen Wnt1 produce un

gran cambio en su morfología de células pequeñas redondeadas a células alargadas que se adhieren fácilmente al frasco de cultivo³⁹.

La línea celular PC12 Wnt1 no expresa muchos genes específicos de neuronas, con lo que se asume que esta línea celular tiene un nuevo fenotipo³⁹.

Esta línea celular es un modelo útil para estudios funcionales de Wnt1 y de la familia de proteínas Wnts, además de la respuesta diferente a factores de crecimiento, es también útil para estudiar las vías de señalización de estos factores³⁹.

Línea PC12-HB+: Derivadas de la línea celular PC12 transformadas por transducción retroviral con el vector basado en el virus de sarcoma murino que contiene el DNAC de Wnt1 de ratón junto con un gen de resistencia bacteriana *neo*. (Neomicina fosfotransferasa). Esta línea celular

presenta una morfología alargada, se adhiere fácilmente al frasco de cultivo, además de presentar un gran número de interacciones célula-célula y tener una morfología parecida a células epiteliales⁴⁰.

Línea PC12-HB-: Derivada de HB+, y en algún momento dejó de expresar el oncogen Wnt1.

3.6 Confirmar que Wnt1 modula positivamente los niveles del RNAm y proteína de la anexina en células PC12: RT-PCR y western-blot.

La extracción de RNA total y proteínas totales de las 4 líneas celulares utilizadas se realizó con el kit comercial PARIS (Ambion), el cual consiste en la lisis de las células con lo que se obtiene el extracto proteico total y a partir de este se realiza la extracción del RNA total por medio de columnas (Fig. 4)

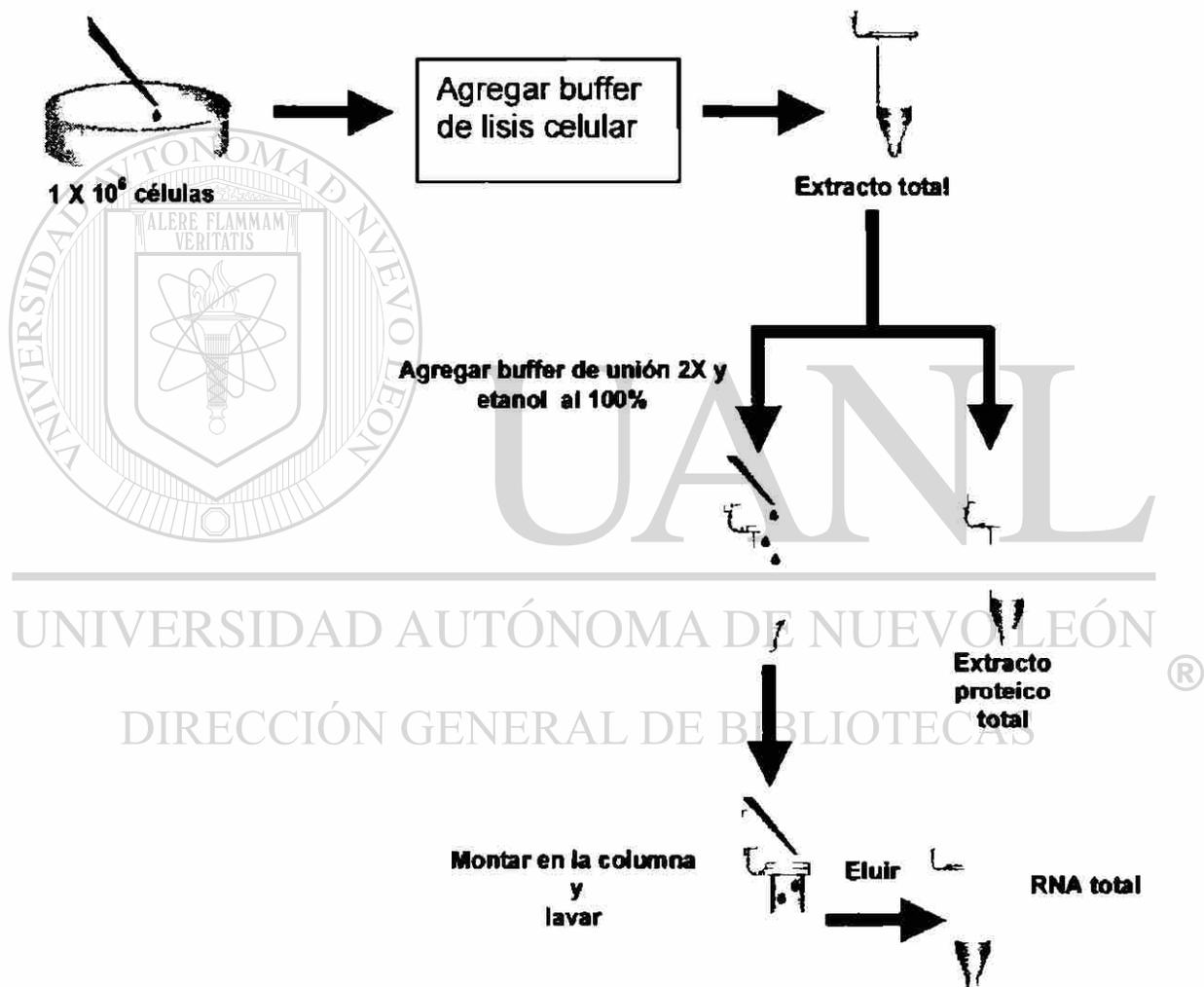


Figura 4. Protocolo esquematizado del Kit PARIS (Ambion.)

Para medir el nivel de expresión a nivel de RNAm de la anexinal en las 4 líneas celulares se realizó la extracción de RNA total mediante el kit PARIS (Ambion). Posteriormente se realizó la retrotranscripción de 1 µg de RNA total utilizando el kit Advantage RT-PCR (BD Biosciences) de cada una de las líneas celulares siguiendo el protocolo del proveedor. Después de la retrotranscripción se realizó una PCR semicuantitativa con iniciadores específicos para los genes Wnt1, anexinal y β-actina. (Tabla 1).

Gen	Secuencia del iniciador	Tamaño del fragmento	Tm
β-actina	5' CTTGTCTCTAGAGCGGACTGTTACTGAGCTGCGTTTTAC 3' GATCTTGGATCCTAAGGTGTGCACTTTTATTAACGG	628 pb	68°C
Anexinal	5' GGAGACTTTCGTAATGCCTTGC 3' GAGACCATAATCCTGATCAATGTC	385 pb	68°C
Wnt 1	5' GAAACAGCGTTCATCTTCGCAATCAC 3' CTCGTTGTTGTGAAGGTTTCATGAGG	245 pb	68°C

Tabla1. Iniciadores utilizados para determinar el efecto de Wnt1 sobre la anexinal diseñados en el laboratorio de Biología Molecular.

La PCR semicuantitativa fue empleada para la determinación y comparación de los niveles de expresión del gen de la anexinal en las diferentes líneas celulares, para comprobar los resultados de Vealquez-Vadillo, donde observó que el oncogen Wnt1 regula positivamente los niveles del RNAm del gen de la anexinal, utilizando el gen de la β-actina para normalizar los valores.

La reacción de PCR se realizó utilizando 0.2 µl del cDNA obtenido de la retrotranscripción mediante el kit Titanium Taq PCR (BD Bioscience), con las condiciones de amplificación que se muestran a continuación:

Reactivo	Volumen (µl)
H ₂ O	8.45
Buffer 10X TITANIUM	1.0
Mezcla de dNTP's (10mM c/u)	0.1
Iniciadores (20 pM/µl)	0.2
Taq DNA polimerasa TITANIUM	0.05
Volumen total	10.0

Una vez preparadas las reacciones se amplificaron en un termociclador (PCR system 2400), Utilizando el programa de amplificación siguiente:

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
94 °C	5 minutos	
94 °C	30 segundos	
68 °C	30 segundos	20-35 ciclos
68 °C	3 minutos	

Una vez obtenidos los productos amplificados se corrieron los productos amplificados en geles de agarosa al 2%, y se visualizaron con bromuro de etidio en el fotodocumentador (UVP)

Para medir el nivel de expresión a nivel de proteínas de la anexinal en las 4 líneas celulares se realizó la extracción de proteínas totales mediante el kit PARIS (Ambion). Una vez obtenidas las proteínas se cuantificaron por el Quick Start Bradford Protein Assay (BIO-RAD) por microensayo (ver anexos). Posteriormente se corrió un gel SDS-PAGE al 10% por 2 horas a 100V en una cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN 3 (BIO-RAD) para comprobar que la cuantificación realizada fue correcta y observar la integridad de las proteínas, observándose las proteínas con la tinción de Coomassie. Para realizar el ensayo de western-blot para la β -actina se utilizaron 20 μ g de extracto proteico total de cada una de las líneas celulares, se corrió un gel SDS-PAGE al 10 % por 2 horas a 100V. Posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por 2 horas a 80V. Se realizo una tinción con rojo de Ponceau para observar si la transferencia fue correcta. Finalmente se realizó la inmunodetección con anticuerpos monoclonales contra β -actina 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora a temperatura ambiente, seguida de la incubación con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa 1:1000 (Santacruz Biotechnology) por 1 hora a temperatura ambiente y se realizó la detección de quimioluminiscencia utilizando el kit western blotting luminol reagent (Santacruz Biotechnology) en el fotodocumentador (UVP). Para la detección de la anexinal se utilizaron 60 μ g de extracto proteico total, y para la inmunodeteccion una dilución del anticuerpo contra anexinal de 1:125 (Santacruz Biotechnology) siguiendo el protocolo mencionado para la β -actina antes mencionado.

3.7 Caracterizar funcionalmente el promotor de la anexinal en las células del sistema experimental.

Para caracterizar funcionalmente el promotor de la anexinal en las células PC12 y PC12-Wnt1, se realizó una búsqueda de la secuencia del promotor de este gen en la base de datos GenBank. Una vez obtenida se realizó un análisis bioinformático de posibles sitios de interacción con factores transcripcionales (MatInspector, GENOMATIX) dentro de esta secuencia, para observar si contaba con sitios de unión a la familia de factores transcripcionales TCF/LEF, una vez determinado el número y posición de probables sitios de unión TCF/LEF, se diseñaron iniciadores específicos para el promotor de la anexinal (tabla 3) (GenBank Accession U25159) de la posición 989-1014 para el extremo 5' y de la posición 2568-2593 para el extremo 3'.

Fragmento amplificado	Tm	Iniciador 5'	Iniciador 3'	Clave de la secuencia (GenBank)
Promotor anexinal	68 °C	cttctaGGTACCgtcagg ttggtttttgagacagagtc	cttgatCTCGAGcctttg tattgccttgtcttccaggg	U25159

Tabla 2. Iniciadores específicos del promotor del gen de la anexinal. En mayúsculas se observan los sitios de restricción agregados a los iniciadores. (GGTACC= *KpnI*, CTCGAG= *XhoI*)

La reacción de PCR se realizó utilizando 400 ng de DNAg de la línea celular Wnt y mediante el kit Titanium Taq PCR (BD Bioscience), las condiciones de amplificación se muestran a continuación:

Reactivo	Volumen (μl)
H ₂ O	38.025
Buffer 10X TITANIUM	4.5
Mezcla de dNTP's (10mM c/u)	0.45
Iniciadores (20 pM/μl)	0.9
Taq DNA polimerasa TITANIUM	0.225
Volumen total	45.0

Una vez preparadas las reacciones se amplificaron en un termociclador (PCR system 2400), Utilizando el programa de amplificación siguiente:

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
94 °C	5 minutos	
94 °C	30 segundos	
68 °C	2 minutos	35 ciclos
68 °C	3 minutos	

Una vez amplificada la región promotora del gen de la anexinal se reamplificó nuevamente con las mismas condiciones antes descritas, para obtener mas producto amplificado.

Posterior a la reamplificación de la región promotora del gen de la anexinal, se precipitó el producto amplificado con 1 volumen de isopropanol, se visualizo en un gel de agarosa al 1% y se purificó del gel de agarosa por medio del kit Wizard SV-gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las indicaciones de la casa comercial(Fig.5).

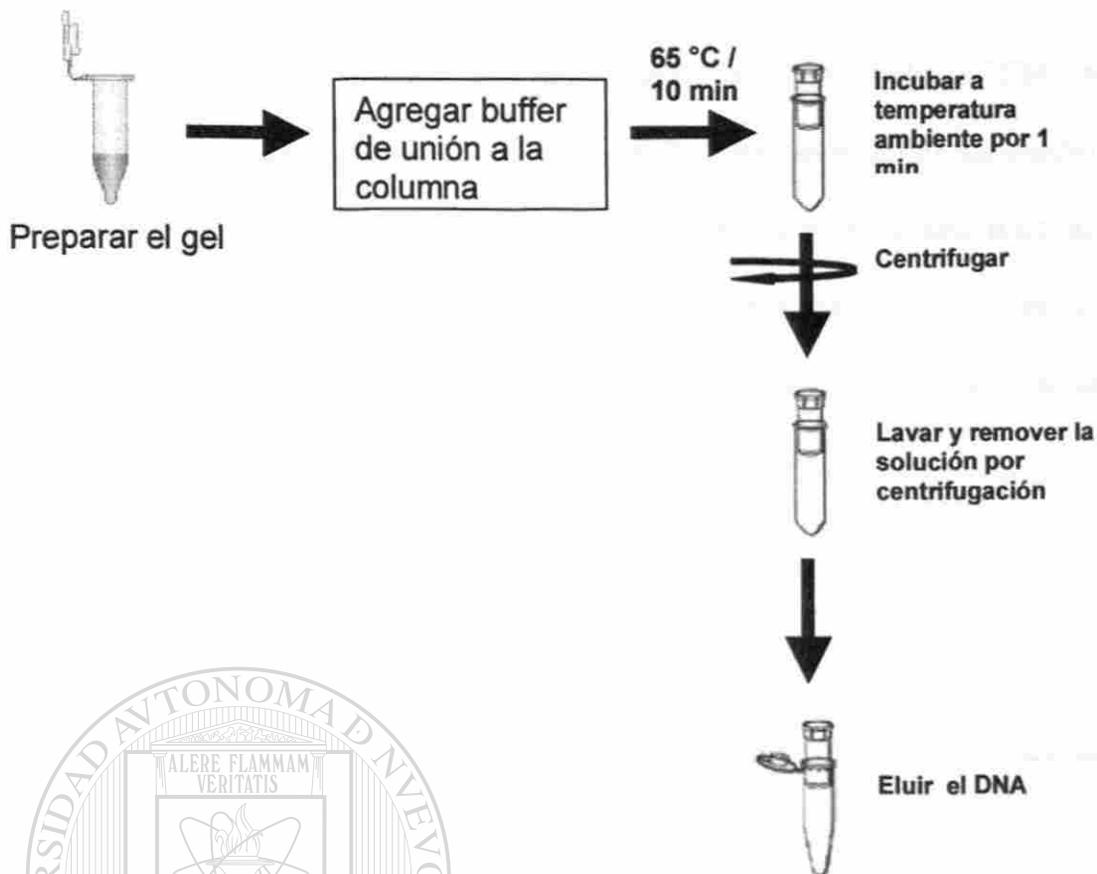


Figura 5. Purificación de productos amplificados a partir del gel de agarosa.

Una vez purificado el promotor de la anexinal se caracterizó con la enzima de restricción *MspI* (NEB) con 10 unidades de la enzima en un volumen final de 20 μ l. Se incubó a 37 °C por 3 horas y posteriormente se corrió en gel de agarosa al 2 %, esperando el patrón de restricción siguiente: 152 pb, 183pb, 211pb, 356pb y 692pb. Una vez caracterizado enzimáticamente el fragmento correspondiente al promotor de la anexinal, éste se clonó en el vector pGEM-T easy (Promega) siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Fig.6).

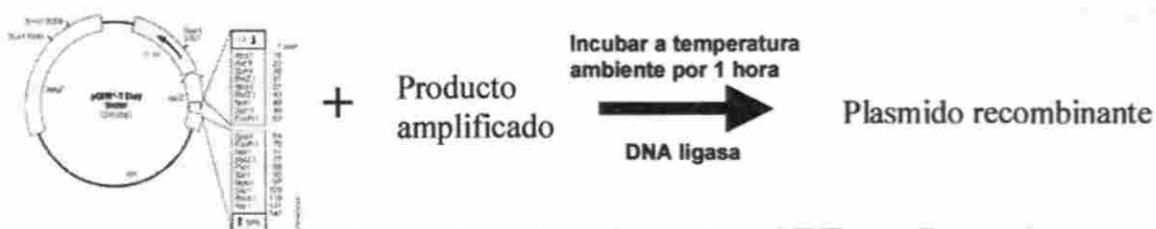


Figura 6. Protocolo de clonación en pGEMT-easy (Promega)

Una vez clonado el promotor del gen de la anexinal en el vector pGEMT-easy utilizando los primers universales M13, se realizó la secuenciación por medio del kit IRDye 800v2 Terminator mixes de LI-COR siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial. Posteriormente se precipitó por medio del reactivo Vivid Violet siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial (Fig.7) y se analizaron en el secuenciador semi-automático Long read 4200 (LI-COR)

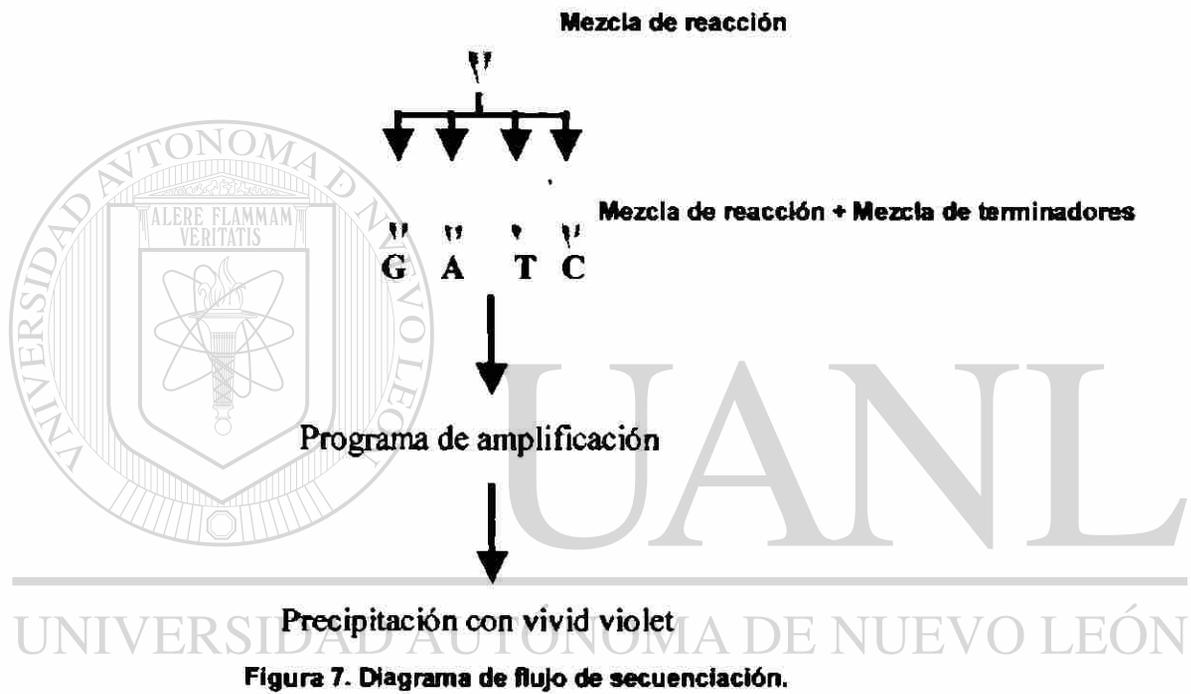


Figura 7. Diagrama de flujo de secuenciación.

Una vez obtenida la secuencia se comparó utilizando el programa computacional BLAST, para corroborar si la secuencia correspondía a la esperada.

Una vez corroborado que el fragmento amplificado pertenecía al promotor de la anexinal, y utilizando los sitios de restricción *Xho* I y *Kpn* I introducidos en los iniciadores, se liberó el fragmento correspondiente al promotor por medio de las enzimas de restricción antes mencionadas del vector pGEM-Prom ANX1. Una vez liberado el promotor de la anexinal se insertó en el vector de expresión pGL3-basic (Promega) previamente linealizado con los mismos sitios de

restricción del vector, con lo que se logró que el promotor de anexinal dirigiera la expresión del gen reportero de luciferasa. Una vez obtenido el vector PGL3-PromANX1 se caracterizó mediante enzimas de restricción y secuenciación. Ya obtenido el vector PGL3-promANXI se utilizó el reactivo Trasfast (Promega) y la transfección se llevó a cabo siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Fig.8), se realizaron co-transfecciones con el vector pCMV-Renilla para normalizar los valores de transfección.

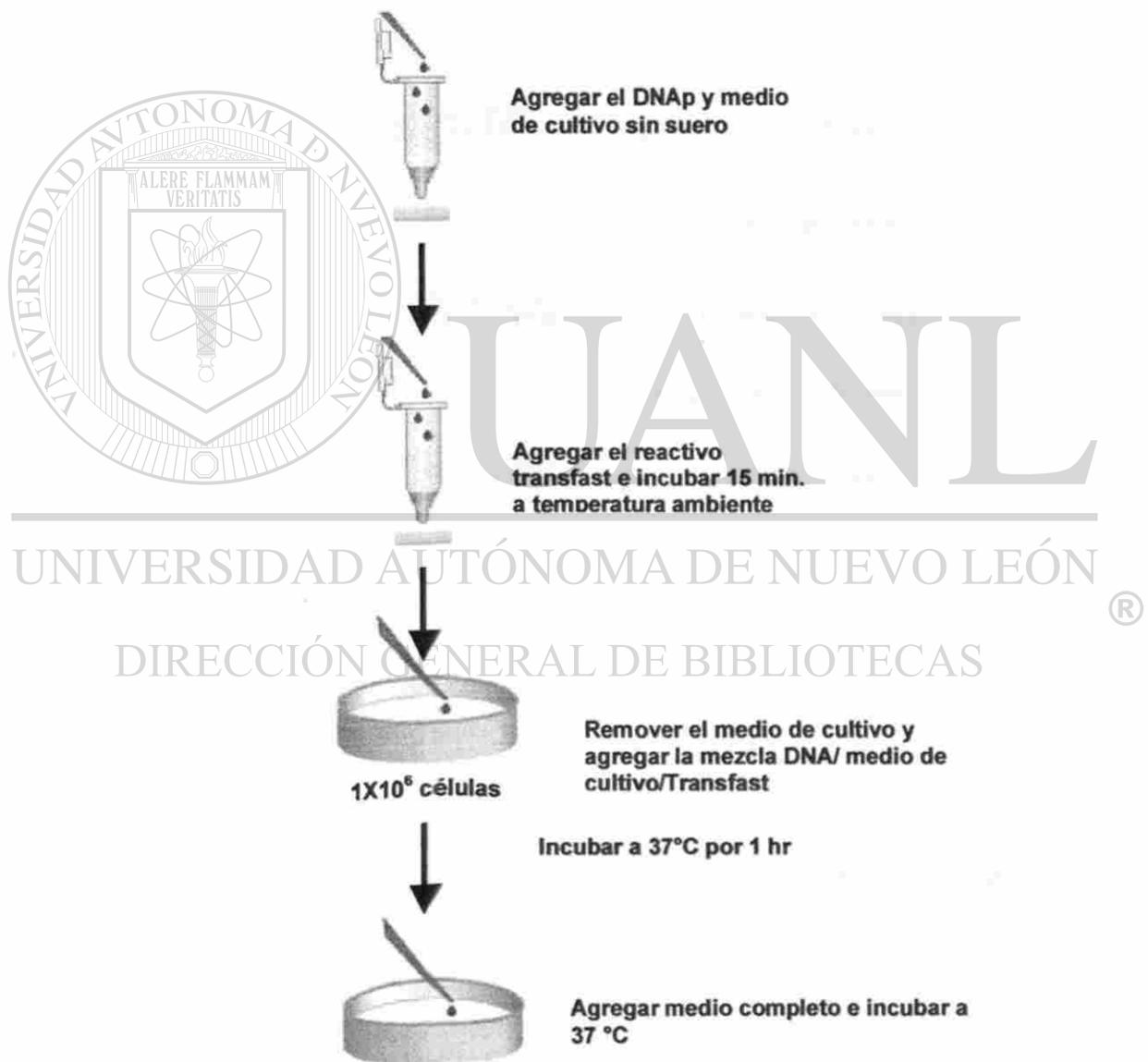


Figura 8. Diagrama de flujo de transfección mediante el reactivo Trasfast.

Las células transfectadas Se incubaron por 48 horas y se realizó la medición del gen reportero de luciferasa por medio del kit Dual-luciferase reporter assay system (Promega), siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial (Fig.9).

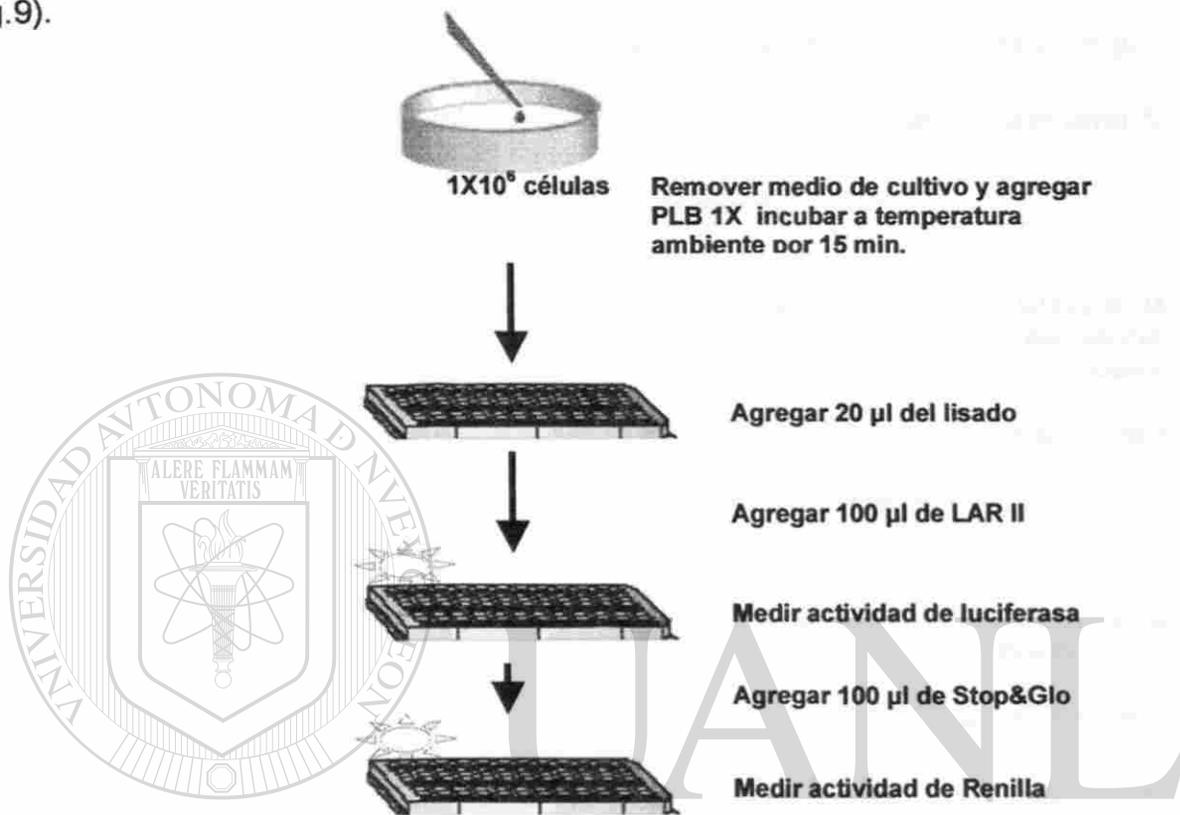


Figura 9. Diagrama de flujo para la determinación de luciferasa por DLR.

Con los resultados obtenidos se realizó una prueba t de student para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los mismos, utilizando el programa computacional SPSS 12.0.

Para los ensayos de transfección se incluyeron los siguientes vectores: PGL3-Basic como control negativo, pCMV-LUC como control positivo, pCMV-REN para normalizar los valores de transfección, pTOPFLASH y pFOPFLASH⁴¹ como controles de la activación de la vía clásica Wnt y el vector PGL3-PromANXI para establecer el efecto del oncogen Wnt1 sobre la actividad del reportero y por lo tanto sobre la región promotora de la anexinal contenida en este vector.

3.8 Caracterizar funcionalmente la región 3'UTR de la anexinal en las células del sistema experimental.

Para caracterizar funcionalmente la región 3' UTR del gen de la anexinal en el sistema experimental se diseñaron iniciadores específicos para esta región (Gen bank Accession **NM_012904**) de la posición 1104-1128 para el extremo 5' y de la posición 1352-1387 para el extremo 3' (Tabla 4)

Fragmento amplificado	Tm	Iniciador 5'	Iniciador 3'	Clave de la secuencia (GenBank)
Región 3'UTR del gen de la anexinal	68 °C	cttgctCTAGAcatt cccaactgctctgta agattccg	gatcttGGATCCgtc ttataaaattgtttt atattattctatgta aac	NM_012904

Tabla 3. Iniciadores específicos para la región 3'UTR del gen de la anexinal. En mayúsculas se observan los sitios de restricción agregados a los iniciadores. (TCTAGA=XbaI, GGATCC=BamHI)

La reacción de PCR se realizó utilizando 0.9µl del cDNA de la línea celular HB+ mediante el kit Titanium Taq PCR (BD Bioscience), las condiciones de amplificación se muestran a continuación:

Reactivo	Volumen (µl)
H ₂ O	38.025
Buffer 10X TITANIUM	4.5
Mezcla de dNTP's (10mM c/u)	0.45
Iniciadores (20 pM/µl)	0.9
Taq DNA polimerasa TITANIUM	0.225
Volumen total	45.0

Una vez preparadas las reacciones se amplificaron en un termociclador (PCR system 2400), Utilizando el programa de amplificación siguiente:

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
94 °C	5 minutos	
94 °C	30 segundos	
68 °C	30 segundos	35 ciclos
68 °C	3 minutos	

El producto amplificado de la región 3' UTR del gen de la anexinal se purificó del gel de agarosa por medio del kit Wizard SV-gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Una vez purificado el fragmento correspondiente a la región 3' UTR del gen de la anexinal fue clonado en el vector pGEM-T easy (Promega) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Una vez clonado la región 3'UTR del gen de la anexinal en el vector pGEMT-easy (Promega) utilizando los primers universales M13, se realizó la secuenciación por medio del kit IRDye 800v2 Terminator mixes (LI-COR) siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial. Posteriormente se precipitó por medio del reactivo Vivid Violet siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial y se analizaron en el secuenciador semi-automático Long read 4200 (LI-COR)

Una vez obtenida la secuencia se comparó utilizando el programa computacional BLAST, para corroborar si la secuencia correspondía a la esperada.

Una vez corroborado que el fragmento amplificado pertenecía a la región 3' UTR del gen de la anexinal, y utilizando los sitios de restricción *Bam*HI y *Xba*I (Gibco) introducidos en los iniciadores, se liberó el fragmento correspondiente a la región

3' UTR por medio de las enzimas de restricción antes mencionadas del vector pGEM-3 UTR ANX1. Una vez liberado, se insertó en el vector de expresión pGL3-basic (Promega), linearizado con los mismos sitios de restricción del vector con lo que se logró donar la región 3' UTR del gen de la anexina 1 abajo del gen reportero de luciferasa, para identificar si esta región está encargada de la regulación positiva. Una vez obtenido se caracterizó mediante enzimas de restricción y secuenciación. Para realizar la transfección del vector reportero se utilizó el reactivo Trasfast (Promega) siguiendo las indicaciones de la casa comercial, se realizaron co-transfecciones con el vector pCMV-Renilla para normalizar los valores de transfección. Las células transfectadas se incubaron por 48 horas y se realizó la medición del gen reportero de luciferasa por medio del kit Dual-Luciferase reporter assay system (Promega), siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial, con los resultados obtenidos se realizó una prueba t de student para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los mismos, utilizando el programa computacional SPSS 12.0.

Para los ensayos de transfección se incluyeron los siguientes vectores: pCMV-LUC-3'UTRSV40 como control positivo, pCMV-REN para normalizar los valores de transfección, el vector PGL3-3'UTRANX1 para establecer el efecto del oncogen Wnt1 sobre la actividad del reportero y por lo tanto sobre la región 3'UTR del gen de la anexina 1 contenida en este vector.

CAPITULO IV

RESULTADOS.

4.1 Wnt1 modula positivamente los niveles del RNAm de la anexinal en células PC12: RT- PCR semicuantitativa y western-blot

Se comprobó por RT-PCR semicuantitativa que la expresión constitutiva del oncogen *wnt1* resulta en un incremento en los niveles del RNAm de anexinal, y se observa que los niveles de expresión del oncogen *Wnt1* en las líneas celulares PC12 y HB- es considerablemente menor que en las líneas celulares *Wnt1* y HB+ que expresan constitutivamente dicho oncogen, y los niveles de RNAm son similares, debido a que la expresión de β -actina en las cuatro líneas celulares es equiparable (Fig.10). La identidad de estos productos amplificados fue comprobada por secuenciación de los mismos y por la búsqueda y alineamiento, por medio de bioinformática, de las secuencias obtenidas, utilizando el programa computacional BLAST del NCBI.

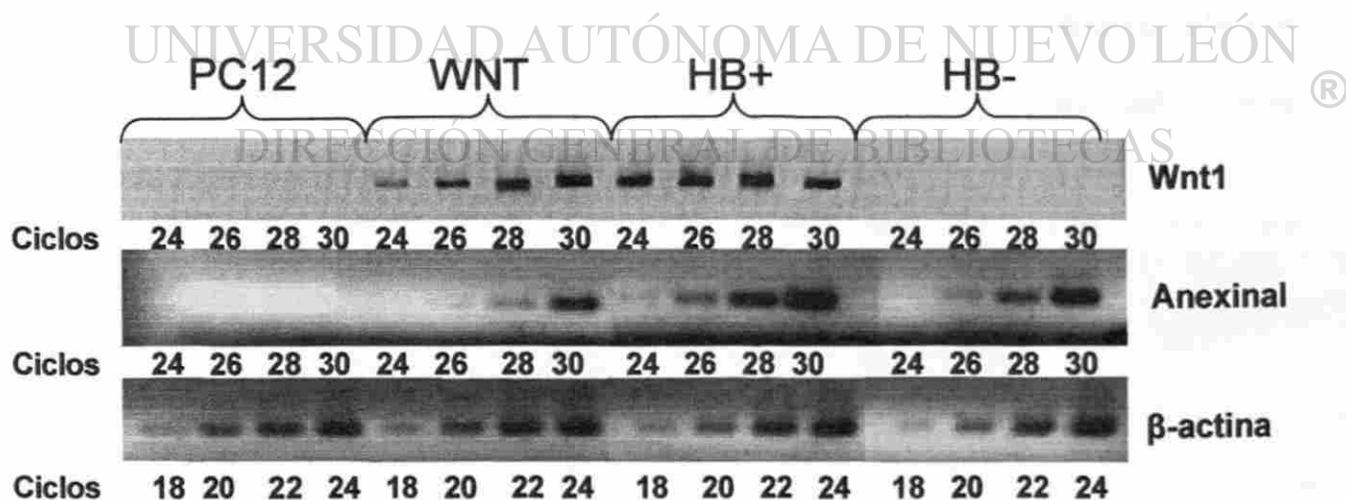


Figura 10. *Wnt1* regula positivamente la expresión de la anexinal en el modelo de estudio. El RNA Total fue aislado de las diferentes líneas celulares y se realizó RT-PCR semicuantitativa para determinar los niveles de *wnt1* y *anx1*, normalizando los valores con β -actina (PC12 parental y HB- líneas celulares que no expresan *wnt1*; *Wnt1* y HB+ líneas celulares que expresan constitutivamente *wnt1*).

A nivel proteico, se extrajeron las proteínas totales de las líneas celulares del modelo en estudio, con las siguientes concentraciones:

Línea celular	Concentración
PC12	0.45 µg/µl
Wnt	1.0 µg/µl
HB+	0.85 µg/µl
HB-	0.90 µg/µl

Posteriormente a la cuantificación se corrió un gel SDS-PAGE con 15 µg de los extractos proteicos totales donde se observa que la cuantificación fue correcta y se observa que la integridad de las proteínas es aceptable (Fig.11A.)

Para determinar si la regulación positiva del oncogen Wnt1 sobre la anexinal también es a nivel de proteínas, el ensayo de western blot demostró un incremento en los niveles de la proteína en las líneas celulares que expresan o expresaron el oncogen Wnt1, con un nivel similar de proteínas totales debido a que la concentración de la proteína β-actina es similar en las cuatro líneas celulares del modelo de estudio (Fig.11).

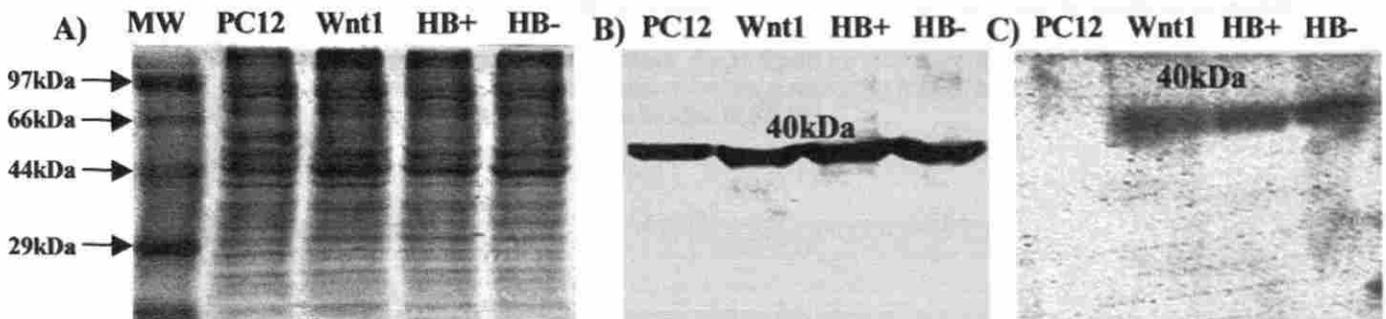


Figura 11. Gel SDS-PAGE y Western-blot. A) Gel de acrilamida al 10 % de 15 µg de extractos totales donde se observa la cuantificación de las proteínas totales. B) Western blot para analizar los niveles de β-actina donde se observa que los niveles de proteínas es similar en el modelo de estudio. C) Western-blot para analizar los niveles de anexinal donde se observa la regulación positiva de la anexinal por la expresión del oncogen Wnt1 (PC12 parental y HB- líneas celulares que no expresan wnt1; Wnt1 y HB+ líneas celulares que expresan constitutivamente wnt1).

4.2 Aislamiento de la región promotora de la anexinal por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Por medio de análisis bioinformático se lograron identificar tres posibles sitios de interacción con miembros de la familia TCF/LEF en la región promotora y uno más en la región 5'UTR (Fig.12)

1	GTCAGGTTGG	TTTTTGAGAC	AGAGTCTTTC	ACTTAGCTCG	GAATTCACCA	ATTAGACTGA
61	ACCAGTGATC	AATAAGCCTC	AGTGGTCCAT	CTGTCTCTGT	CTCTCCTAAT	TGGTGACACA
121	TGCCTTCAGG	ACAGGCTTGT	AAATTTAGCT	TCCGGATCAA	ACTCAGGTCA	TTATGCTCAC
181	ATGAAAAGCA	GCTTCTGAG	AAACTACTAT	CCAATCATTT	GTGGATTTTT	ATCAACATGA
241	AATATATAAT	TGCTGAAAAG	CCAGGGGAAG	TAAAGAGGGG	ACAAAGGGAC	GAAGTATGAA
301	AATGGCTCAG	CAGGTAAGAG	CACTGGCTGC	TTTTCCGGAT	GGACTCAGTT	TTAATTCCCA
361	GCACCCACAT	GGCAGCTCAC	AACTGTAACT	CTGTTTCCAG	GGGATCCAAC	ACCCTCACAC
421	AGACATGTGT	GTAGACAAAA	CACCAATGCA	CATAAAATAA	AACAATAGTT	ACTTTTTAAA
481	AGTACAATGC	AAGCAACATC	AGAGAAAAGA	GCTACAACATA	TTTTTTGTTT	TAAAGATTTT
541	ATTAAGAATG	AAGTGAATCA	CACTGACGTT	CCCTTCTTTA	CATTAGCTGG	GACATTTCTG
601	ATGGCACCTG	TTGTGTGGTA	GGTGCCATCC	CACTAATCCT	TACAGCTCAG	AGGTCCAGGC
661	CATGGCTTAT	TGTTCCACTC	TTCTACCACA	CCGGGGCTCG	ATTCATACTC	TGCCCTCTGTG
721	GTTTGAGTCT	ATTCAAAAAT	TAAGAAAAGA	GGCTCCTCTT	TAGTGCCAAT	GTTTTCATTA
781	AATGTCATTA	CACTTGCATT	TTTAGCATTG	ATTATTGAAA	ATGTTGAAGA	AAACTGGAGC
841	TTCATGTGTT	TCCTGTTTCT	TAGTTACCTC	AGTTCCAAAG	GCTTGATTGA	AAGGCAGGGG
901	CATAGCTGGT	GAATCGTAAG	AAAAGTACTC	ATTACAGCAT	CATTTCAAAA	CCTACAAATA
961	AGTTCTATTT	CAATTGTCTA	TACTTTCCTG	GAAATAAGTA	GAGCCTTTGT	GATATAGCTT
1021	CGCCATATAA	AATGATACCG	AATCCAGAGT	AATTAATTA	TCCCTCTAAG	TCTTGAAGTA
1081	GTAAGCATT	GGGCTGAAAT	CAATCCCTCC	CCTCCCCTCC	CCTCTCCCTT	TCTTTGTTA
1141	GTTTTGTGGT	TAATGTGCTT	TTTATTTTAT	TTTTTGCATT	TAATGTGCCT	AATTTTATTC
1201	TCTTTTGGGG	GTTAATGTGC	TTACTTTTAA	AGGAGGTCCA	ATAAATTCCT	TAAGATAGGG
1261	CAGGGAGCTC	AACATAGCTG	AAACTCAATT	GCACTGTACC	ATTCCTGGGA	GGAATAAAC
1321	CTCAAAAGGA	AAGGCAGGGG	GAAAATCCAT	GATTCCTTTT	TCTTTCTGTA	GCTGAGTTGT
1381	TTCCGGGAGT	AGTTTTCGAA	GACTTGTTTC	TCCTTGGTTP	TGACCAGGCC	CGAGCCAGTT
1441	CTTCAAACAA	AGACAGCCAG	TTACTAACTT	TGGTTGCTAG	GTGTGGCTTC	AGTTCATATC
1501	CTATAAAATC	AGGAGTCCAG	CCCTCCACTT	CCAGTCCGAA	AGCATCTCAG	CAAAGCTTCT
1561	CTTCAGTTCC	CTGGAAGACA	AGGCAATCA	AAGG		

Figura 12. Secuencia del promotor de la anexinal. En la figura se muestran en negritas se observa la caja TATA, en el círculo el inicio de la transcripción y en los cuadros se muestran los 4 posibles sitios de interacción con los factores transcripcionales de la familia TCF/LEF.

Se aisló el promotor de la anexinal mediante PCR, obteniéndose un fragmento de aproximadamente 1594 pb, la cual se encontraba con bandas inespecíficas (Fig.13A), posteriormente a la reamplificación el producto amplificado se purificó a partir del gel (Fig.13B) y se caracterizó enzimáticamente mediante la enzima de restricción *MspI*, dando el patrón de restricción esperado (Fig.13C).

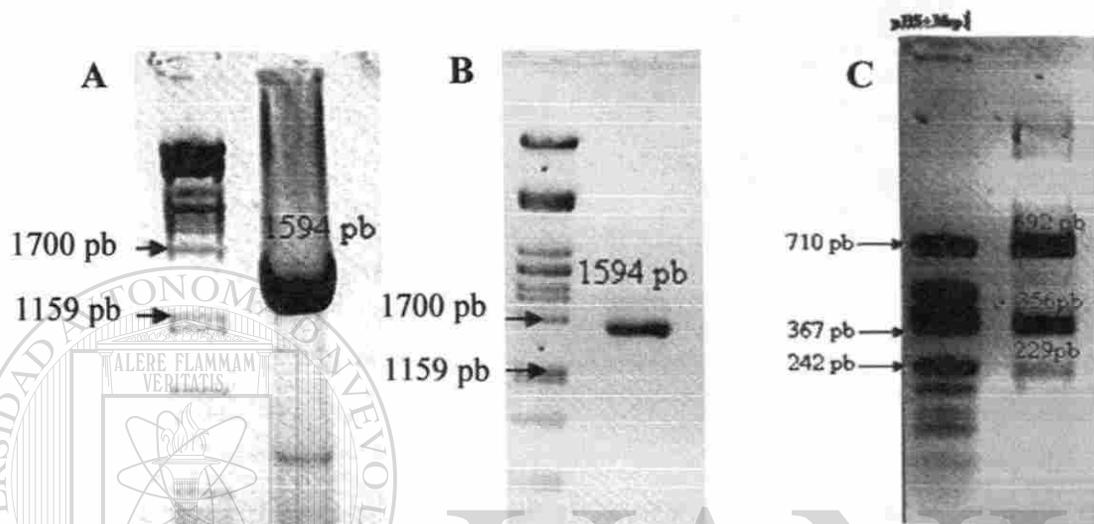


Figura 13. Aislamiento y caracterización del promotor de la anexinal. A) Aislamiento del promotor de la anexinal mediante PCR, a partir de DNA genómico de la línea celular Wnt1. **B)** purificación de la región promotora del gen de la anexinal a partir del gel. **C)** Caracterización de la región promotora de la anexinal mediante la enzima de restricción *MspI*.

Una vez caracterizada la región promotora del gen de la anexinal se clonó en el vector PGEM-T easy (Promega), con lo que se obtuvo el vector pGEM[®]-PromANXI, el cual fue caracterizado por enzimas de restricción y secuenciación (fig.14). A partir de la secuencia obtenida se realizó una búsqueda con el programa computacional BLAST del NCBI, para comprobar la identidad de la secuencia obtenida, identificando esta secuencia como el promotor de la anexinal (Fig.15).

4.3 Construcción del vector de expresión eucariótico que contiene el gen reportero de luciferasa dirigido por una región de 1.6Kb del promotor de la anexinal.

A partir del vector PGEM-PromANXI se aisló la región promotora de la anexinal mediante digestión, utilizando los sitios de restricción incorporados a los iniciadores, con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI* (Fig.16A). Posterior a la purificación de la región promotora (Fig.16B) se llevó a cabo la ligación de este fragmento con el vector PGL3-Basic previamente tratado con las mismas enzimas, y defosforilado (Fig.16C).

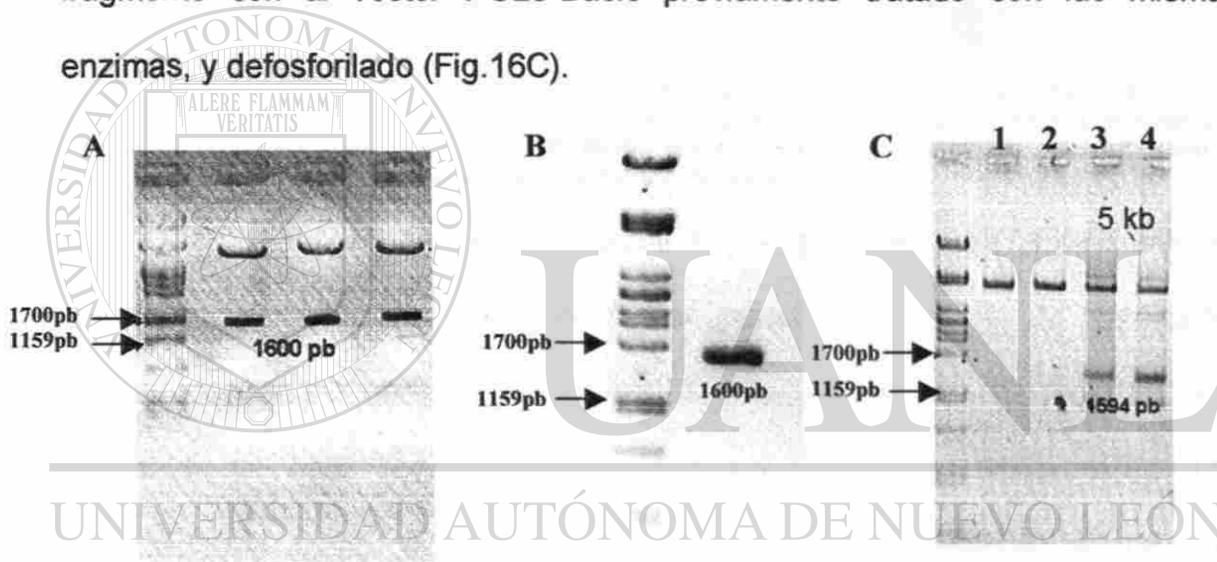


Figura 16. Construcción del vector de expresión eucariótico PGL-PromANXI. A) Reacciones de digestión del vector PGEM-PromANXI: la digestión de este vector con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI* libera un fragmento de 1600pb correspondiente al promotor de la anexinal. B) Purificación del promotor de la anexinal a partir del gel de agarosa. C) Reacción de ligación del promotor de la anexinal en PGL3-Basic: Carril 1 y 2 vector sin y con ligasa respectivamente, carriles 3 y 4 reacción de ligación completa vector-promotor-T4 DNA ligasa, con diferentes concentraciones del inserto.

Posteriormente a la transformación de las reacciones de ligación, se llevó a cabo la caracterización de clonas candidatas con la enzima de restricción *SacI* y por secuenciación (Fig.17). Una vez obtenida la secuencia del promotor se realizó la búsqueda de los posibles sitios de interacción con la familia de factores transcripcionales TCF/LEF para comprobar que se encontraran los 4 sitios

4.4 Ensayos de transfección para la región promotora de la anexinal.

A) pCMV-LUC.

En los ensayos de co-transfección de las líneas celulares PC12, Wnt1, HB+ y HB- con los vectores pCMV-LUC/ pCMV-REN (200ng/ 40ng) se encontraron altos niveles relativos de luciferasa (normalizando con los niveles del gen reportero Renilla) y que estos resultados son similares en las cuatro líneas celulares del modelo de estudio, y no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las líneas celulares (Fig.18).

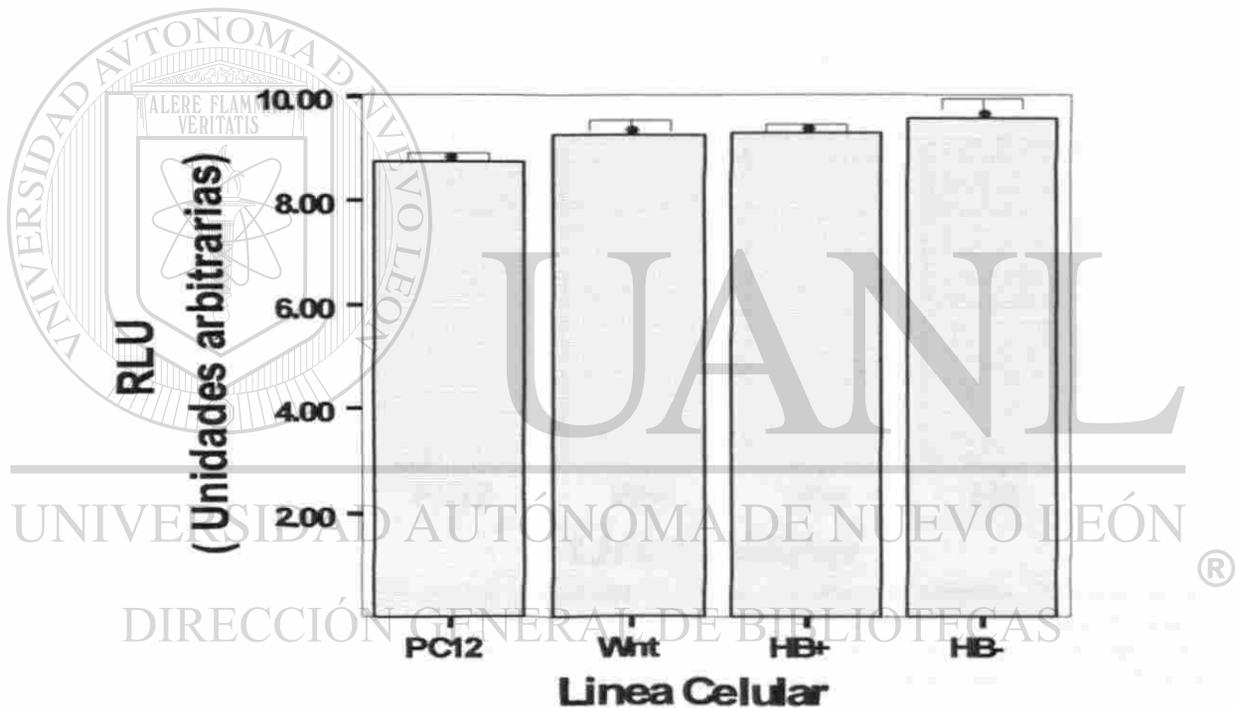


Figura 18. Transfecciones del vector pCMV-LUC en el modelo de estudio. A) Representación esquemática de los resultados de transfección con el vector pCMV-LUC, donde se observa que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) en la expresión del gen reportero de la luciferasa entre las líneas celulares. Resultados de dos ensayos independientes realizados por triplicado (RLU Unidades relativas de luciferasa, estas unidades se obtienen de la relación de los valores de la luciferasa entre los valores de la renilla; NA, no aplica)

B) pGL3-Basic.

En los ensayos de co-transfección de las líneas celulares PC12, Wnt1, HB+ y HB- con los vectores pGL3-Basic / pCMV-REN (200ng / 40ng) se encontraron bajos niveles relativos de luciferasa (normalizando con los niveles del gen reportero Renilla) y estos mismos son similares en las cuatro líneas celulares del modelo de estudio, y no existe una diferencia significativa entre las líneas celulares (Fig.19).

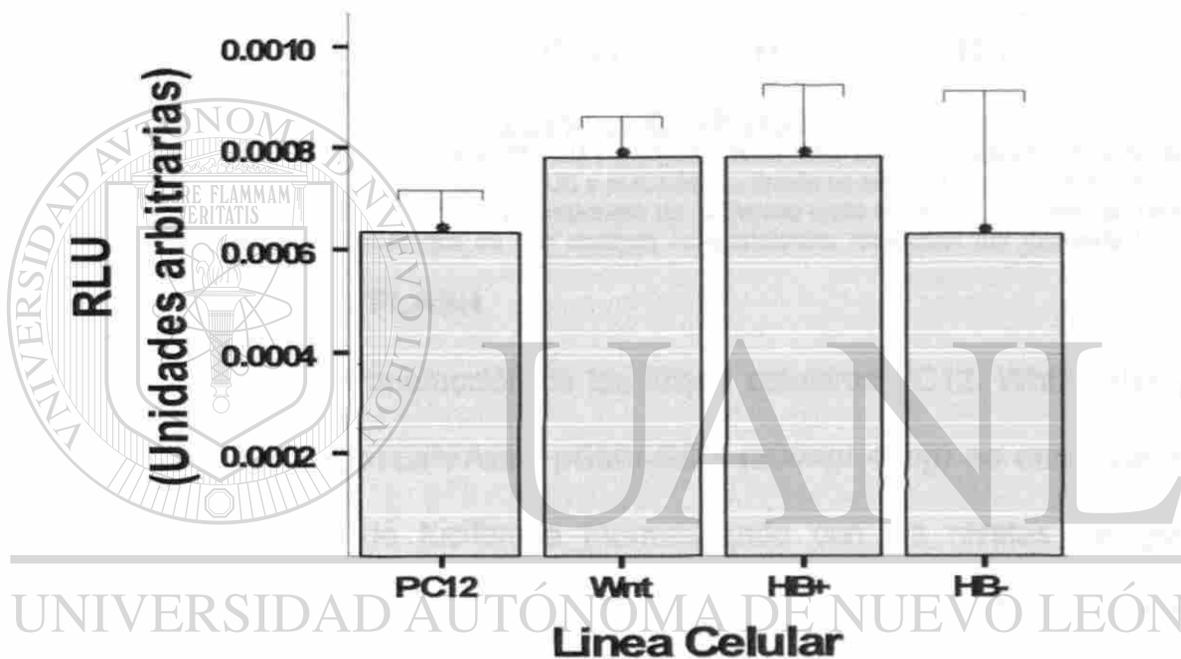


Figura 19. Transfecciones del vector pGL3-Basic en el modelo de estudio. Representación esquemática de los resultados de transfección con el vector pGL3-Basic, donde se observa que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) en la expresión del gen reportero de la luciferasa entre las líneas celulares. Resultados de dos ensayos independientes realizados por triplicado (RLU Unidades relativas de luciferasa; NA, no aplica)

Al integrar los resultados obtenidos entre los vectores pCMV-LUC y PGL3 Basic se encuentra una diferencia estadísticamente significativa, entre estos vectores en las 4 líneas celulares del modelo de experimentación (Fig.20).

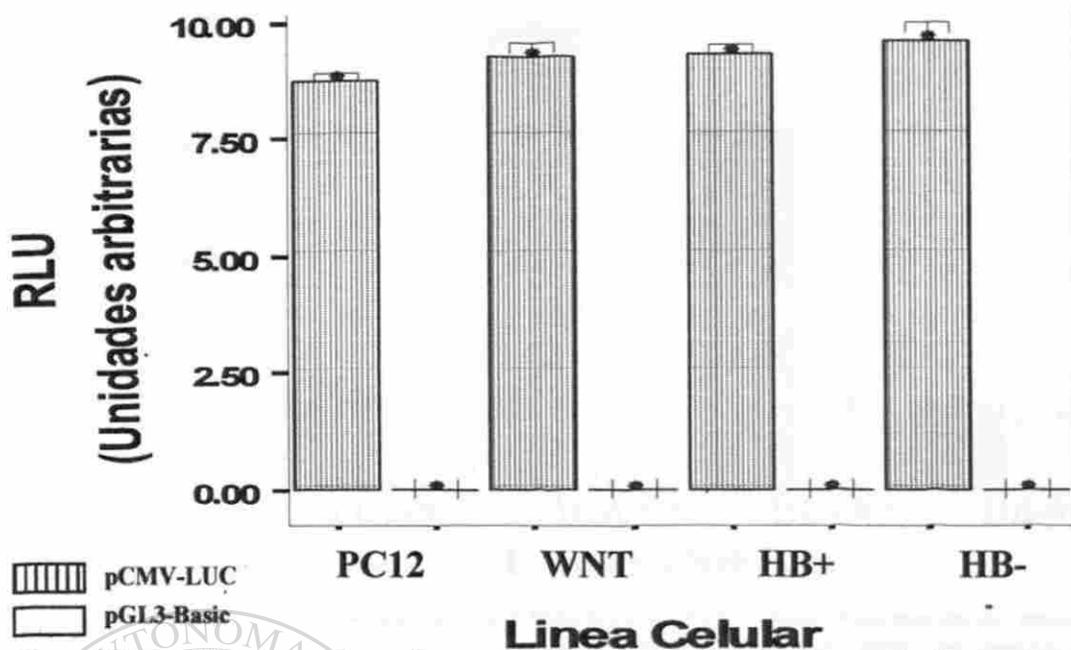


Figura 20. Transfecciones de vectores pCMV-LUC y pGL3-Basic. Representación esquemática de los resultados de transfección con el vector pCMV-LUC y pGL3-Basic, donde se observa que existe diferencia significativa ($p < 0.0001$) en la expresión del gen reportero de luciferasa entre estos dos vectores, en cada una de las líneas celulares. Resultados de dos ensayos independientes realizados por triplicado (RLU Unidades relativas de luciferasa)

C) pTOPFLASH y pFOPFLASH

En los ensayos de co-transfección de las líneas celulares PC12, Wnt1, HB+ y HB- con los vectores pTOPFLASH/ pCMV-REN (200ng/ 40ng) se encontraron altos niveles relativos de luciferasa (normalizando con los niveles del gen

reportero Renilla) en las líneas celulares que expresan el oncogen Wnt1 y niveles bajos relativos de luciferasa en aquellas líneas celulares que no expresan el oncogen Wnt1 y existe diferencia significativa ($p < 0.001$) entre las mismas

(Fig.15). En los ensayos de co-transfección de las líneas celulares PC12, Wnt1, HB+ y HB- con los vectores pFOPFLASH/ pCMV-REN (200ng/ 40ng) se encontraron niveles similares del gen reportero de la luciferasa (Fig.21). Por lo que con estos resultados comprobamos que las líneas celulares que expresan el oncogen Wnt1 tienen los efectores necesarios para activar los genes blancos de la vía de señalización Wnt/ β -catenina.

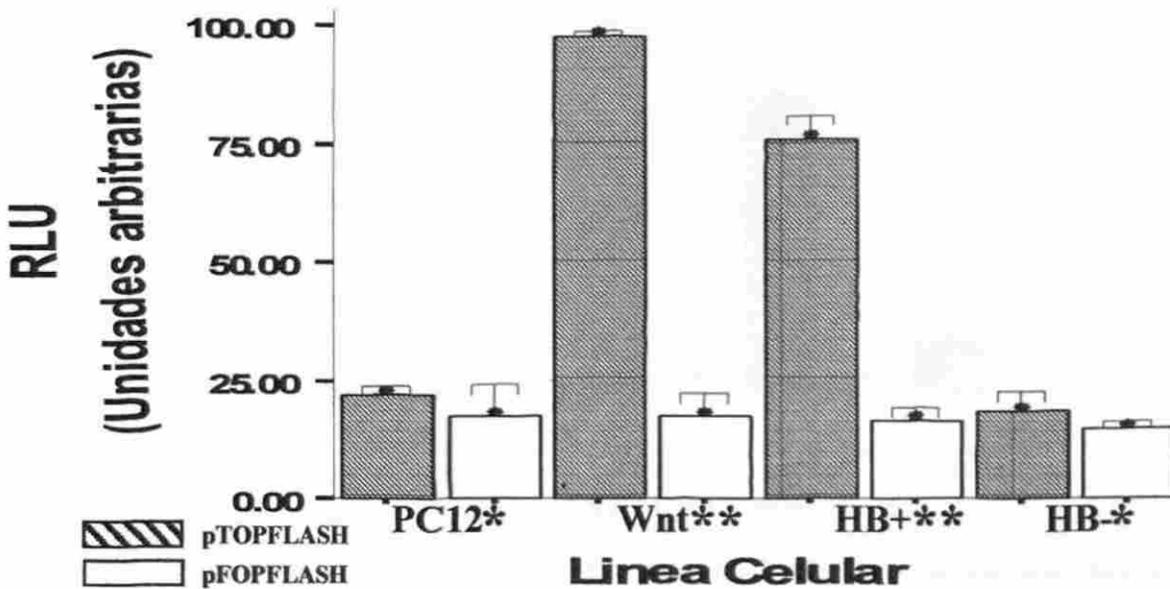


Figura 21. Transfecciones de vectores pTOPFLASH y pFOPFLASH. Representación esquemática de los resultados de transfección con el vector pTOPFLASH y pFOPFLASH, donde se observa que existe diferencia significativa ($p < 0.001$) en la expresión del gen reportero de luciferasa del vector pTOPFLASH entre las líneas celulares que expresan el oncogen (**) y las líneas celulares que no lo expresan (*). En el vector pFOPFLASH no hay diferencia significativa en las líneas celulares del modelo de estudio ($p > 0.05$). Resultados de dos ensayos independientes realizados por triplicado (RLU Unidades relativas de luciferasa)

D) pGL3-PromANXI

En los ensayos de co-transfección de las líneas celulares PC12, Wnt1, HB+ y HB- con los vectores pGL3-PromANXI/ pCMV-REN (200ng/ 40ng) se

encontraron altos niveles relativos de luciferasa en las líneas celulares que expresan el oncogen Wnt1 (normalizando con los niveles del gen reportero

Renilla) y bajos niveles relativos de luciferasa en las líneas celulares que no

expresan el oncogen Wnt1, los resultados en la línea celular Wnt1 demuestran

un aumento de 22 veces comparando con el vector pGL3-Basic; en la línea

celular HB+ se observa un aumento de 20 veces con respecto al vector pGL3-

Basic, y solo un aumento de 2 veces en la línea celular HB-, con lo que se

demuestra una activación del gen reportero de luciferasa de esta construcción

en función de la activación de la vía canónica Wnt1, por lo que este gen podría

ser un blanco potencial de esta vía (Fig.22).

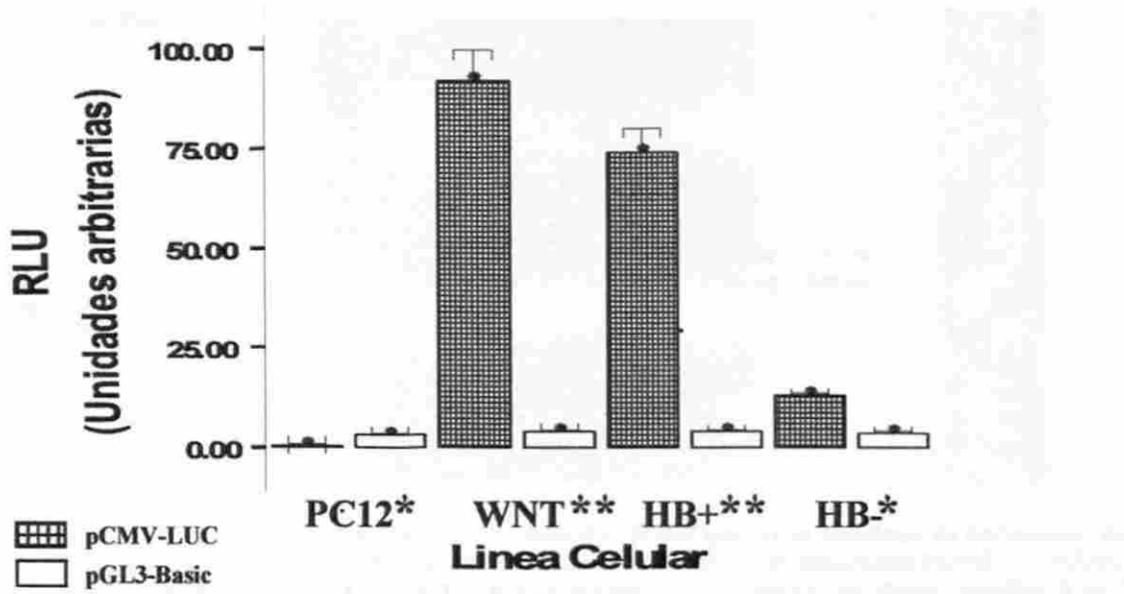


Figura 22. Transfecciones de vectores pGL3-PromANXI y pGL3-Basic. Representación esquemática de los resultados de transfección con el vector pGL3-PromANXI y pGL3-Basic, donde se observa que existe diferencia significativa en la expresión del gen reportero de luciferasa del vector pGL3-PromANXI entre las líneas celulares que expresan el oncogeno (**) y las líneas celulares que no lo expresan (*). En el vector pGL3-Basic no existe diferencia significativa entre las líneas celulares ($p > 0.05$). Resultados de dos ensayos independientes realizados por triplicado (RLU Unidades relativas de luciferasa)

4.5 Aislamiento de la región 3' UTR del gen de la anexinal por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Se logró aislar la región 3'UTR del gen de la anexinal mediante PCR, obteniéndose un fragmento de aproximadamente de 284 pb (Fig.23A), Una vez

aislada la región 3'UTR del gen de la anexinal se clonó en el vector PGEM-T easy (Promega), con lo que se obtuvo el vector pGEM-3'UTRANXI, el cual fue caracterizado por enzimas de restricción y secuenciación (Fig.23). A partir de la secuencia obtenida se realizó una búsqueda con el programa computacional BLAST del NCBI, para comprobar la identidad de la secuencia obtenida, identificando esta secuencia como la región 3'UTR del gen de la anexinal (Fig.24)

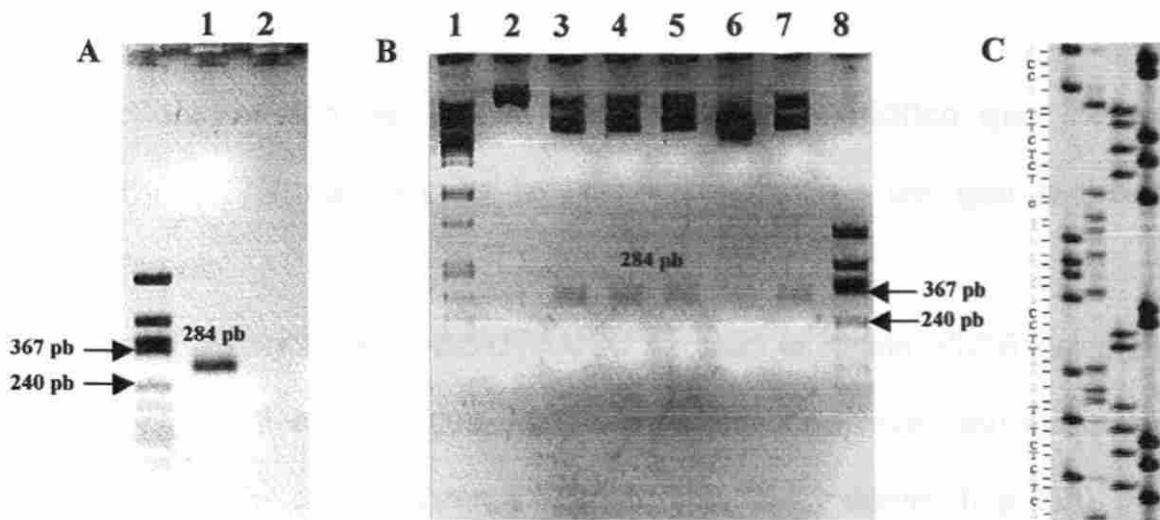


Figura 23. Aislamiento y caracterización de la región 3'UTR del gen de la anexinal. A) Aislamiento de la región 3'UTR del gen de la anexinal mediante PCR. B) Caracterización de candidatos PGEM-3'UTRANXI con la enzima de restricción *EcoRI* (Carril 1 y 8 marcadores, carril 2 vector sin digerir, carriles 3 al 7 vectores con inserto. C) imagen del gel de secuenciación de la región 3' UTR del gen de la anexinal.

Una vez obtenida la secuencia se buscaron visualmente secuencias relacionadas con interacción con proteínas que intervienen en el metabolismo del RNAm, se identificó un posible sitio de interacción con las proteínas AUF o HUR, pero sin embargo es una región muy rica en uracilos y adeninas, que pudieran estar regulando la estabilidad de este gen.



Figura 24. Alineamiento de la secuencia obtenida utilizando el programa BLAST. Se comprobó que la secuencia clonada es la perteneciente a la región 3'UTR del gen de la anexinal, en el círculo se muestra la posible secuencia de interacción con proteínas relacionadas con el metabolismo del RNAm.

4.6 Construcción del vector de expresión eucariótico que contiene la región 3'UTR del gen de la anexina r10 abajo del gen reportero de luciferasa

A partir del vector PGEM-3'UTRANXI se aisló la región 3'UTR del gen de la anexina mediante digestión, utilizando los sitios de restricción incorporados a los iniciadores, con las enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI* (Fig.25A). Posterior a la purificación de esta región se llevó a cabo la ligación de este fragmento con el vector PGL3-Basic previamente tratado con las mismas enzimas, y defosforilado (Fig.25B), posteriormente se caracterizó mediante PCR y secuenciación (Fig. 25C)

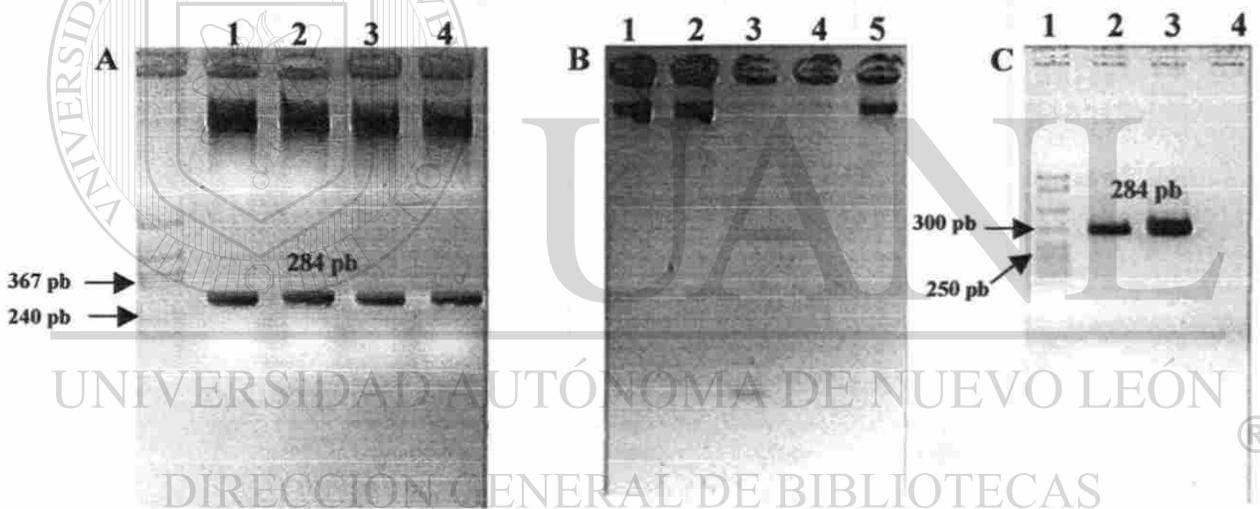


Figura 25. Construcción del vector de expresión eucariótico PGL3-3'UTRANXI. A) Reacciones de digestión del vector PGEM-3'UTRANXI: la digestión de este vector con las enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI* libera un fragmento de 284pb correspondiente a la región 3'UTR de la anexina. B) Reacción de ligación de la región 3'UTR de la anexina en PGL3-Basic: Carril 1 y 2 vector sin y con ligasa respectivamente, carriles 3 y 4 región 3'UTR de la anexina sin y con ligasa respectivamente, carril 5 reacción de ligación completa vector-región 3'UTR-T4 DNA ligasa. C) Caracterización del vector construido mediante PCR donde se observan dos clonas candidatas.

4.7 Ensayos de transfección para la región 3'UTR del gen de la anexinal.

A) pCMV-LUC.

En los ensayos de co-transfección de las líneas celulares PC12, Wnt1, HB+ y HB- con los vectores pCMV-LUC-3'UTRSV40/ pCMV-REN (200ng/ 40ng) se encontraron altos niveles relativos de luciferasa (normalizando con los niveles del gen reportero Renilla) y que estos resultados son similares en las cuatro líneas celulares del modelo de estudio, y no existe una diferencia significativa entre las líneas celulares (Fig.26).

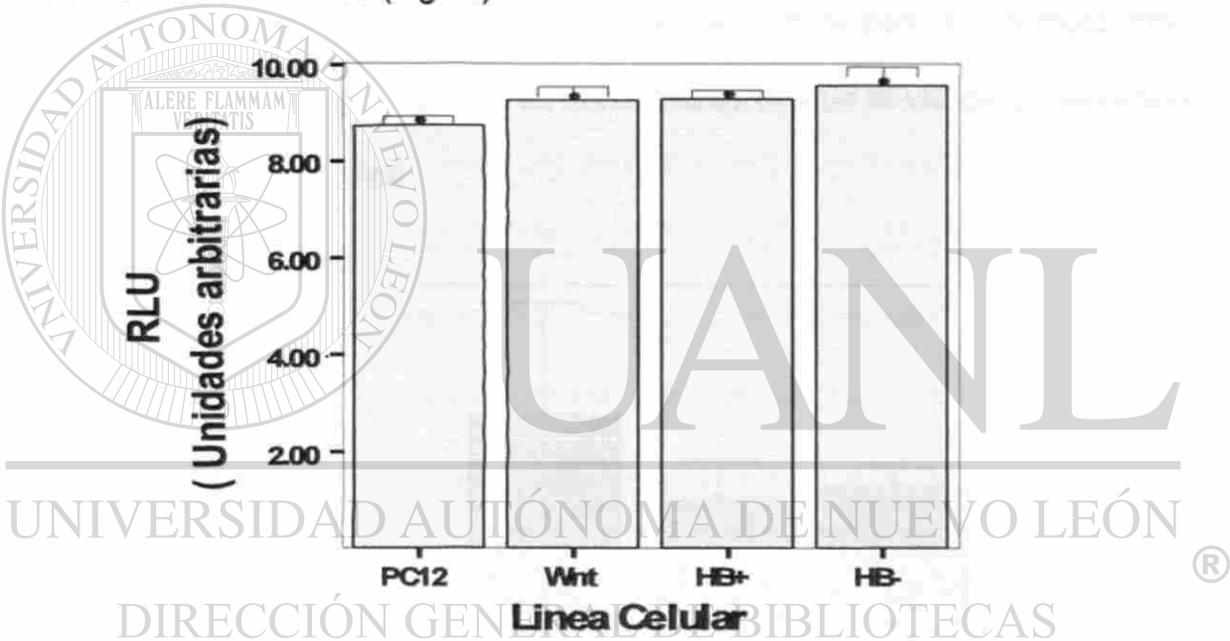


Figura 26. Transfecciones del vector pCMV-LUC-3'UTRSV40 en el modelo de estudio. Representación esquemática de los resultados de transfección con el vector pCMV-LUC, donde se observa que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) en la expresión del gen reportero de la luciferasa entre las líneas celulares. Resultados de dos ensayos independientes realizados por triplicado (RLU Unidades relativas de luciferasa; NA, no aplica)

B) pGL3-3'UTRANXI

En los ensayos de co-transfección de las líneas celulares PC12, Wnt1, HB+ y HB- con los vectores pGL3-3'UTRANXI/ pCMV-REN se encontraron altos niveles relativos de luciferasa en las líneas celulares que expresan o expresaron el oncogen Wnt1 (normalizando con los niveles del gen reportero Renilla) y bajos niveles relativos de luciferasa en la línea celular parental que no expresa el oncogen Wnt1 (Fig.27), los resultados demuestran un aumento de 3 o 4 veces en la expresión del gen reportero de la luciferasa entre las líneas celulares que expresan o expresaron el oncogen Wnt1 y la línea celular parental, demostrando que a este nivel, la regulación no es dependiente de que la vía de señalización Wnt/ β -catenina esté activa.

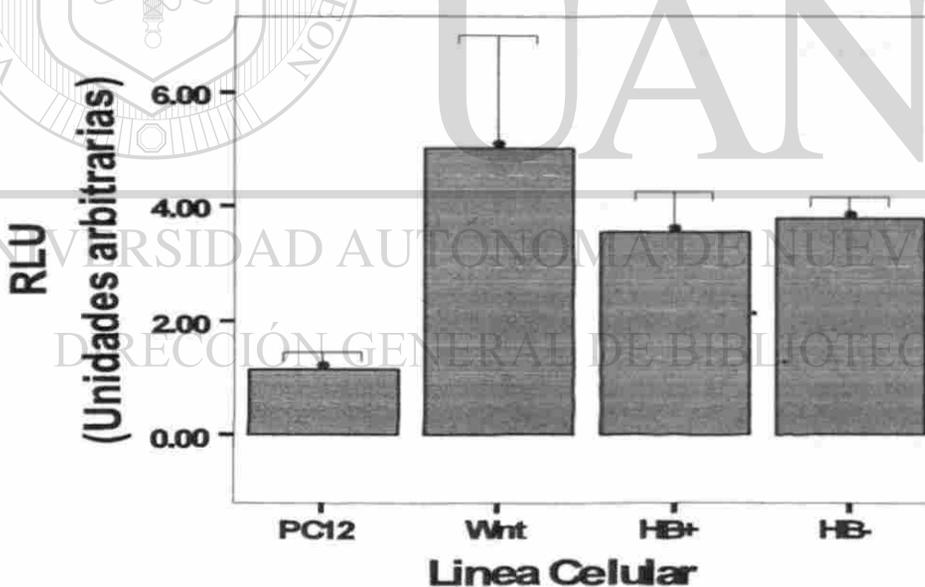


Figura 27. Transfecciones de vectores pGL3-3'UTRANXI. Representación esquemática de los resultados de transfección con el vector pGL3-3'UTRANXI, donde se observa que existe diferencia significativa ($p < 0.01$) en la expresión del gen reportero de luciferasa entre las líneas celulares que expresan o expresaron el oncogen (***) y la línea celular parental (*). Resultados de dos ensayos independientes realizados por triplicado (RLU Unidades relativas de luciferasa)

CAPITULO V

DISCUSIÓN.

En este estudio se pudo corroborar que la expresión de Wnt1 en la línea celular PC12 incrementa los niveles del RNAm del gen de la anexinal y dichos niveles permanecen sin cambio una vez que Wnt1 deja de ser expresado (HB-). Este resultado concuerda con los resultados obtenidos por Velázquez-Vadillo, mediante microarreglos, RT-PCR semicuantitativa y northern blot (datos no publicados). Al igual que para el gen de la anexinal, los resultados coinciden con el comportamiento del gen NEU ya que los niveles del RNAm de este gen no son dependientes de que la vía de señalización Wnt/ β -catenina este activa⁴².

A nivel de proteína los niveles de anexinal se encuentran elevados en las líneas celulares que expresan o expresaron el oncogen Wnt1 comparando con la línea celular parental. Estos resultados coinciden con lo que sucede con la proteína β -

TrCP donde la activación de la vía de señalización Wnt produce un aumento de los niveles del RNAm y de la proteína⁴³ entre muchos otros.

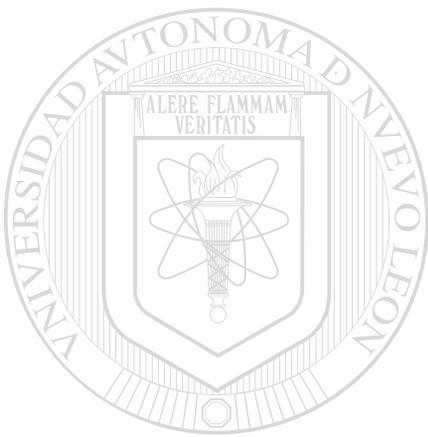
Los resultados demuestran una correlación en la expresión de Wnt1 y anexinal, indicando que este gen es un blanco potencial de esta vía de señalización, además de encontrar, mediante análisis bioinformático, 3 posibles sitios de interacción con la familia de factores transcripcionales TCF/LEF dentro de la secuencia del promotor de este gen, y uno más en el exon 1.

La hipótesis de que este gen es un blanco potencial de la vía Wnt, también es apoyada por los ensayos de transfección transitoria de la construcción del promotor de la anexinal dirigiendo la expresión del gen reportero de luciferasa,

en los cuales se encontró un aumento de 7 u 8 veces en la expresión del gen reportero en las líneas celulares que expresan constitutivamente el oncogen Wnt1 con respecto a aquellas que no expresan dicho oncogen. Sin embargo no solo por el aumento en la expresión del gen reportero en las líneas celulares que expresan el oncogen Wnt1 es suficiente para demostrar que es un blanco de esta vía de señalización, debido que recientemente se demostró que la regulación positiva de la ciclina D1 por la activación de la vía clásica Wnt, no se debe directamente a la interacción de los factores transcripcionales TCF/LEF, esto lo demostraron por la sobreexpresión de un miembro de esta familia de factores transcripcionales carente del dominio de unión a β -catenina, con lo que no puede ser transactivado, y no se observó una disminución en la expresión del gen reportero de luciferasa en estas condiciones, por lo que los autores concluyen que dicho gen no es un blanco directo de la vía clásica Wnt, y que el efecto es indirecto⁴⁴.

En cuanto a la participación de la región 3'UTR del gen de la anexinal sobre la regulación positiva por el oncogen Wnt1, se observó que también a este nivel es llevada a cabo, debido a que los ensayos de transfección transitoria con la construcción que contenía esta región se observó un aumento en la expresión del gen reportero en las líneas celulares que expresan o alguna vez expresaron el oncogen Wnt1 comparando con la línea celular parental. Al no encontrar más que una secuencia relacionada con la interacción con proteínas relacionadas con el metabolismo del RNAm, el estudio de esta región podría ser interesante para observar que otras proteínas están regulando la estabilidad del RNAm del

gen de la anexinal, debido a que esta zona es muy rica en uracilos y adeninas, y estas regiones están involucradas en la regulación de la localización, traducción y degradación de genes como citocinas y reguladores del ciclo celular⁴⁵, sin embargo ha sido reportado que la proteína HuR se puede unir a estas mismas secuencias y ocasiona la acumulación del RNAm de sus genes blanco⁴⁶.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

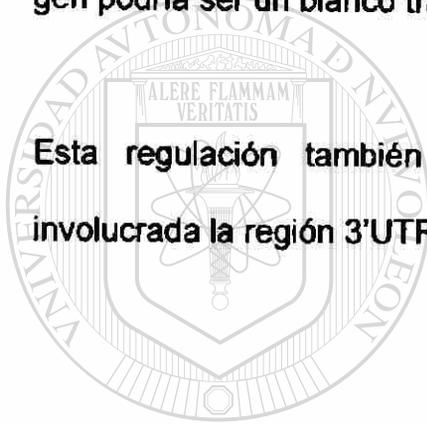
CAPITULO VI

CONCLUSIONES.

Los niveles de RNAm y Proteína de la anexinal son regulados positivamente por el oncogen Wnt1 en nuestro modelo de estudio.

La regulación positiva es llevada a cabo a nivel transcripcional, por lo que este gen podría ser un blanco transcripcional de la vía de señalización Wnt.

Esta regulación también es llevada a nivel post-transcripcional, y esta involucrada la región 3'UTR del gen de la anexinal.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO VII

PERSPECTIVAS.

Los resultados de esta tesis sugieren que la anexinal podría ser un blanco de la vía de señalización Wnt, para comprobar esto, es necesario realizar co-transfecciones del vector reportero con activadores de esta vía en aquellas líneas celulares que no expresan el oncogen Wnt1 y represores de la misma en aquellas líneas que expresan el oncogen Wnt1.

Aunado a esto se tendría que realizar mutaciones en cada uno de los posibles sitios de interacción con los factores de transcripción TCF/LEF para evitar la unión de los mismos y la activación de este promotor, además de deleciones del promotor.

Para observar si en vivo se lleva a cabo la interacción entre los factores transcripcionales TCF/LEF y las secuencias contenidas en este promotor se tendría que realizar una inmunoprecipitación de cromatina, utilizando anticuerpos contra TCF o β -catenina.

En cuanto a la región 3'UTR del gen de la anexinal se tendría que realizar ensayos de estabilidad del RNAm con actinomicinaD para observar si la regulación positiva se está realizando a este nivel. Si la regulación se llevara a cabo a este nivel, se tendría que realizar un escaneo por mutación para situar que secuencias están relacionadas con la estabilidad del RNAm.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1.- Benjamin, L. (2005) Genes VIII. Oxford University Press. N.Y.
2. - Tijan R. (1995) Molecular machines that control genes. Sci. Am. February 38-45.
- 3.- Audic Y, Hartley RS. (2004) Post-transcriptional regulation in cancer. Biol Cell. 96(7):479-98.
- 4.- Duret, L., Dorkeld, F., Gautier, C. (1993) Strong conservation of non-coding sequences during vertebrates evolution: potential involvement in posttranscriptional regulation of gene expression. Nucleic Acids Res 21, 2315–2322.
- 5.- Poyry, T.A., Kaminski, A., Jackson, R.J. (2004) What determines whether mammalian ribosomes resume scanning after translation of a short upstream open reading frame? Genes Dev 18, 62–75.
6. - Brown A. (2001) Wnt signaling in breast cancer: have we come full circle? Breast Cancer Res. 3: 351-355.
7. - Brennan K. and Brown A. (2004) Wnt proteins in mammary development and cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia. Apr;9(2):119-31.
- 8.- Polakis P.(1999) The oncogenic activation of beta-catenin. Curr. Opin. Genet. Dev. 9: 15-21
- 9.- Polakis P.(2000) Wnt signaling and Cancer. Genes Dev. 14: 1837-1851.
- 10.- Logan C., Nusse R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. Anu. Rev. Cell Dev. Biol. 20: 781-810.

11 - Kikuchi a., Kishida S., Yamamoto H. (2006) Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Exp Mol Med.* Feb 28;38(1):1-10.

12.- Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW.(1997) Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem.* Oct 3;272(40):24735-8.

13.- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R.(1997) Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 1997 Jul 1;16(13):3797-804.

14.- Nelson WJ, Nusse R. (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science.* Mar 5;303(5663):1483-7.

15.- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R.(2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature.* May 22;423(6938):448-52.

16.- Lustig B, Behrens J. (2003) The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol.* Apr;129(4):199-221

17.- Waterman ML. (2004) Lymphoid enhancer factor/T cell factor expression in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* Jan-Jun;23(1-2):41-52.

18.- Roose J, Clevers H (1999) TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Oct 29;1424(2-3):M23-37

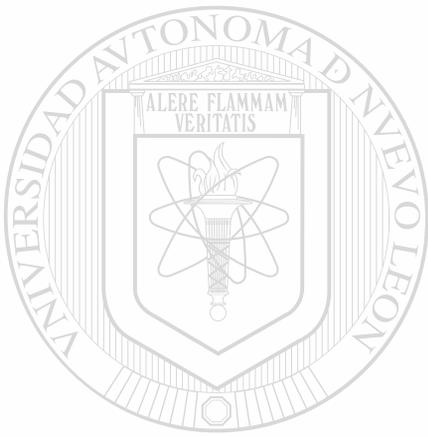
19.- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* Sep 4;281(5382):1509-12.

- 20.- Tetsu O, McCormick F. (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999 Apr 1;398(6726):422-6.
- 21.- Nusse R. (1999) Wnt targets. Repression and activation. *Trends Genet*. 1999 Jan;15(1):1-3.
- 22.- Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, Ishiguro H, Fujita M, Tokino T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Yamaoka Y, Nakamura Y.(2000) AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet*. Mar;24(3):245-50.
- 23.- Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*. Jan 7;100(1):57-70.
- 24.- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(10):5522-7.
-
- 25.- Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM. (1999) The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*. 18(18):2883-91.
- 26.- Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. (2001) Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res*. 61(16):6050-4.
- 27.- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 281(5382):1509-12.

- 28.- Yang F, Zeng Q, Yu G, Li S, Wang CY. (2006) Wnt/beta-catenin signaling inhibits death receptor-mediated apoptosis and promotes invasive growth of HNSCC. *Cell Signal*. 18(5):679-87.
- 29.- Marie JP. (2001) Drug resistance in hematologic malignancies. *Curr Opin Oncol* 13:463-469.
- 30.- Pommier Y, Sordet O, Antony S, Hayward RL, Kohn KW (2004) Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene* 23: 2934-2949.
- 31.- Rickardson L, Fryknas M, Dhar S, Lovborg H, Gullbo J, Rydaker M, Nygren P, Gustafsson MG, Larsson R, Isaksson A. (2005) Identification of molecular mechanisms for cellular drug resistance by combining drug activity and gene expression profiles. *Br J Cancer*. Aug 22; 93(4):483-92
- 32.- Nygren P. (2001) What is cancer chemotherapy? *Ada Oncol* 40: 166-174
- 33.- Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 May 1;204(3):216-37.
34. - Parente L, Solito E. (2004) Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *InflammRes*. Apr;53(4):125-32.
35. - Raynal P, Pollard HB. (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. Apr 5;1197(1):63-93.
- 36.- Gerke V, Moss SE. (2002) Annexins: from structure to function *Physiol Rev*. Apr;82(2):331-71.

- 37.- Wang Y, Serfass L, Roy MO, Wong J, Bonneau AM, Georges E. (2004) Annexin-I expression modulates drug resistance in tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Feb 6;314(2):565-70.
- 38.- Greene LA, Tischler AS. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*73(7):2424-8.
- 39.- Shackleford GM, Willert K, Wang J, Varmus HE.(1993) The Wnt-1 proto-oncogene induces changes in morphology, gene expression, and growth factor responsiveness in PC12 cells. *Neuron.*11(5):865-75
- 40.- Bradley RS, Cowin P, Brown AM (1993) Expression of Wnt-1 in PC12 cells results in modulation of plakoglobin and E-cadherin and increased cellular adhesion. *J Cell Biol.*123(6 Pt 2):1857-65
- 41.- V. Korinek, N. Barker, P.J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K.W. Kinzler, B. Vogelstein and H. Clevers (1997) Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 275 1784-1787
- 42.- Zheng S, Ramachandran B, Haigh JR, Palos TP, Steger K, Howard BD. The induction of ret by Wnt-1 in PC12 cells is atypically dependent on continual Wnt-1 expression. *Oncogene* 12(3): 555-562.
- 43.- Spiegelman VS, Slaga TJ, Pagano M, Minamoto T, Ronai Z, Fuchs SY. (2000) Wnt/beta-catenin signaling induces the expression and activity of betaTrCP ubiquitin ligase receptor. *Mol Cell.* 5(5):877-82

- 44.- Sansom OJ, Reed KR, van de Wetering M, Muncan V, Winton DJ, Clevers H, Clarke AR.(2005) Cyclin D1 is not an immediate target of beta-catenin following Apc loss in the intestine. J Biol Chem. 280(31):28463-7.
- 45.- Audic Y, Hartley RS.(2004) Post-transcriptional regulation in cancer. Biol Cell. 96(7):479-98
- 46.- Shim J, Karin M (2002) The control of mRNA stability in response to extracellular stimuli. Mol Cells. 14(3):323-31



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANEXOS.

PROCOLO PARIS.

- 1.- Colectar 10^6 células y lavarlas con PBS 1X frio.
- 2.- Lisar las células en 500 μ l de Cell Disruption Buffer
- 3.- Dividir el lisado para la extracción de RNA total y proteínas totales
- 4.- Para la extracción de proteínas totales :
 - a) Incubar en hielo por 10 min.
 - b) Centrifugar a 10,000 g a 4°C para clarificar la muestra.
- 5.- para la extracción del RNA total:
 - a) Mezcla el lisado con un volumen de 2X Lysis/Binding Solution
 - b) Agrega un volumen de etanol al 100%
 - c) Aplicar la mezcla en la columna ensamblada en el tubo colector
 - d) Centrifugar a 14,000 rpm por 2 minutos
 - e) Descartar la solución contenida en el tubo colector
 - f) Lavar una vez con 700 μ l de Wash Solution 1
 - g) Realizar 2 lavados con 500 μ l de Wash Solution 2/3
 - h) Eluir el RNA con 50 μ l a 95°C de Elution Solution
 - i) Almacenar el RNA a -80°C

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PROCOLO DE RETROTRANSCRIPCIÓN.

1.- Agregar 1 μ l de oligo (dT) a 1 μ g de RNA total y calentar a 70°C

2.- Incubar en hielo y adicionar la siguiente mezcla:

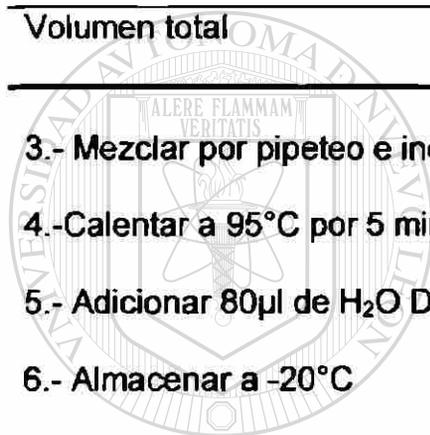
Reactivo	Volumen (μl)
Buffer 5X	4.0
Mezcla de dNTPs (10mM c/u)	1.0
Inhibidor de RNAsa (1U/ μ l)	0.5
Transcriptasa Reversa (MMLV)	1.0
Volumen total	6.5

3.- Mezclar por pipeteo e incubar a 42°C por 1 hora

4.- Calentar a 95°C por 5 minutos

5.- Adicionar 80 μ l de H₂O DEPC.

6.- Almacenar a -20°C



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS MÉTODO DE BRADFORD MICROENSAYO (1 ml)

PROTOCOLO

1. Preparar en agua estéril una solución stock de Albúmina Sérica Bovina (BSA) a una concentración de 100 mg/ml.
2. Hacer una dilución de 1:50 del stock de 100 mg/ml, para que quede a una concentración final de 2 mg/ml ó 2 µg/µl.
3. Preparar directamente en las celdas de plástico los siguientes estándares empleando el stock diluido de BSA:

Estándar	µl del estándar de 2 mg/ ml	µl del agua	Concentración µg/µl
1	0	800	0
2	1	799	2
3	2.5	797.5	5
4	5	795	10
5	7.5	792.5	15

4. Adicionar 200 µl del reactivo de Bradford concentrado a cada celda y mezclar.
5. Incubar las celdas a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las absorbancias aumentan con el tiempo de incubación, por lo que **no** se recomienda incubar las muestras por más de una hora.
6. Medir absorbancia a 595 nm en el biofotómetro (Eppendorf).

ELECTROFORÉISIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

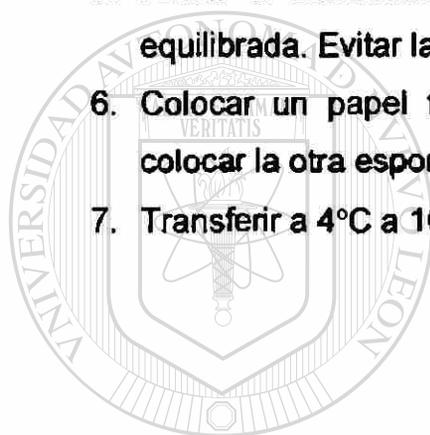
PROTOCOLO

1. Ensamblar el cassette del gel conforme a las especificaciones de la compañía BIO-RAD (Mini-Protean 3 Cell).
 2. Preparar la solución del gel separador a una concentración del 12% de acrilamida.
 3. Aplicar con una pipeta serológica 4.5 ml de la solución del gel separador al vidrio que contiene el separador de 1 mm,
 4. Preparar la solución del gel concentrador al 4 %, vaciarlo hasta el límite del vidrio e inmediatamente colocar el peine.
 5. Colocar el gel en la cámara de corrimiento y ensamblarlo para después añadir el buffer de corrida 1X.
 6. Retirar el peine y lavar los pocillos con buffer para eliminar la acrilamida que no haya polimerizado.
-
7. Cargar las muestras que previamente deben ser mezcladas con buffer de desnaturalización en una relación 1:1, y calentarlas a 95°C por 4 minutos.®
 8. Correr el gel a 100V por 2 horas.
 9. Realizar la tinción del gel separador con azul de coomassie

TRANSFERENCIA DEL GEL A LA MEMBRANA

PROTOCOLO

1. Recortar la membrana de nitrocelulosa con las dimensiones del gel
2. Equilibrar la membrana con buffer de transferencia 1X durante 5 minutos.
Colocar también en el buffer de transferencia dos piezas de papel filtro.
3. Remover y descartar el gel concentrador (stacking gel).
4. Colocar sobre el gel un papel filtro húmedo y despegar el gel del vidrio.
Colocarlo sobre la esponja del set de transferencia.
5. Armar el sándwich colocando sobre el gel la membrana previamente equilibrada. Evitar la formación de burbujas.
6. Colocar un papel filtro humedecido sobre la membrana, y enseguida colocar la otra esponja.
7. Transferir a 4°C a 100V durante 1.5 horas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

WESTERN BLOT

PROTOCOLO

1. Después de la transferencia teñir la membrana con el reactivo rojo de Ponceau durante 5 minutos
2. Enjuagar la membrana teñida 3 veces con buffer PBS-T 1X,
3. Sumergir la membrana en el buffer de bloqueo (Santa Cruz Biotech) a 4°C toda la noche con agitación.
4. Posteriormente, lavar la membrana 2 veces con PBST 1X por 10 minutos cada uno de los lavados a temperatura ambiente.
5. Incubar la membrana con el anticuerpo primario en una dilución de 1:125 para la anexina y 1:1000 para la β -actina, por una hora a temperatura ambiente.
6. Lavar la membrana 5 veces con el buffer PBS-T 1X por 10 minutos cada una y a temperatura ambiente.
7. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario (1:1000) por 1h a temperatura ambiente.
8. Lavar la membrana 5 veces con el buffer PBS-T 1X por 10 minutos cada una y a temperatura ambiente.
- ~~9. Al terminar los lavados preparar el material necesario para efectuar el desarrollo de Quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotech).~~

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PROTOCOLO DEL KIT WIZARD SV-GEL AND PCR CLEAN-UP SYSTEM.

- 1.- Cortar la banda de interés procurando exponer el menor tiempo posible el DNA a la luz UV
- 2.- Pesar exactamente el fragmento de agarosa que se corto del gel
- 3.- Agregar 1 µl de Membrane Binding Solution por cada mg de agarosa
- 4.- mezclar vigorosamente e incubar a 65°C por 10 minutos
- 5.- Transferir la mezcla a una columna ensamblada a su tubo colector
- 6.- Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente
- 7- Centrifugar a 14,000 rpm por 1 minuto
- 8.- Descartar el liquido colectado y agregar 700µl de Membrane Wash Solution
- 9.- Centrifugar a 14,000 rpm por 1 minuto
- 10.- Descartar el liquido colectado y agregar 500µl de Membrane Wash Solution
- 11.- Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos
- 12.- Transferir la columna a un tubo limpio
- 13.-Eluir con 50 µl de H₂O libre de nucleasas, incubar 1 minuto a temperatura ambiente
- 14.- Centrifugar a 14,000 rpm por 1 minuto
- 15.- Almacenar el DNA a 4°C

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CLONACIÓN EN PGEMT-EASY.

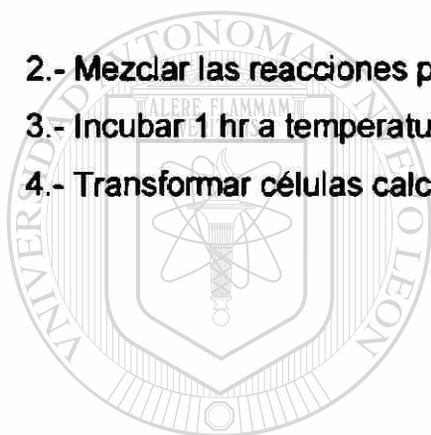
1.- Realizar la mezcla siguiente:

Reactivo	Reacción	Control positivo	Control de fondo
2x Rapid Ligation Buffer	5 μ l	5 μ l	5 μ l
pGEMT-Easy Vector	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Producto de PCR	X μ l	---	---
Inserto de DNA control	---	2 μ l	---
T4 DNA ligasa	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Volumen total	10 μ l	10 μ l	10 μ l

2.- Mezclar las reacciones por pipeteo.

3.- Incubar 1 hr a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche.

4.- Transformar células calciocompetentes



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN.

1.- Preparar la siguiente mezcla de reacción por cada muestra:

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen (μl)</i>
H ₂ O	21.0
Buffer de reacción	1.5
Iniciador 5' 0 3' (20μM)	2.0
Thermo-sequenase (4U/μl)	0.5
DNAP (0.5μg/μl)	2.0
Volumen Total	27.0

2.- Etiquetar 4 tubos con las letras G, A, T y C. A cada tubo adicionar 6.75μl de la mezcla de reacción.

3.- Agregar a cada tubo 1.2μl de la mezcla de terminadores correspondiente.

4.- Realizar el siguiente programa de amplificación:

<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Número de ciclos</i>
94°C	5 minutos	
94°C	30 segundos	
62°C	30 segundos	30 ciclos
72°C	1 minuto	
72°C	5 minutos	

5.- Agregar a cada tubo de reacción 1.0μl de acetato de sodio 3M pH5.2 y 1.0μl de Vivid Violet y 20μl de etanol al 100%.

6.- Mezclar e incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.

7.- Centrifugar a 14,000 rpm por 15 minutos

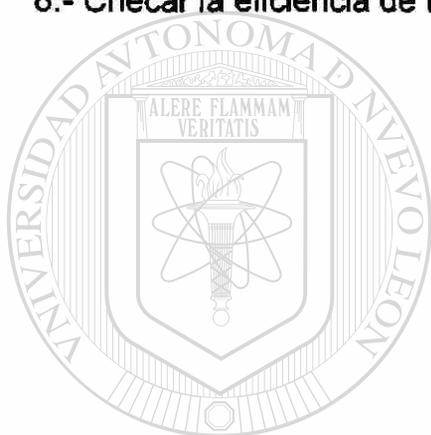
8.- Retirar el sobrenadante y lavar la pastilla 2 veces con 100μl de etanol al 70%

9.- Retirar el exceso de etanol al 70% y secar por calentamiento a 80°C por 5 minutos

10.- Resuspender la pastilla con 3μl de solución STOP.

PROCOLO DE TRANSFECCIÓN (TRANSFAST)

- 1.- Agregar 200µl de medio de cultivo a 37°C por cada muestra a transfectar a un tubo estéril.
- 2.- Agregar 240 ng de DNAp al medio de cultivo.
- 3.- Agregar 2µl del reactivo Transfast a la mezcla anterior e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- 4.- Remover el medio de cultivo de las células.
- 5.- Agregar 200µl de la mezcla a cada pozo con 10⁶ células.
- 6.- Incubar a 37°C por 1 hora.
- 7.- Agregar 1 ml de medio de cultivo completo e incubar por 48 horas.
- 8.- Checar la eficiencia de transfección.



UANL

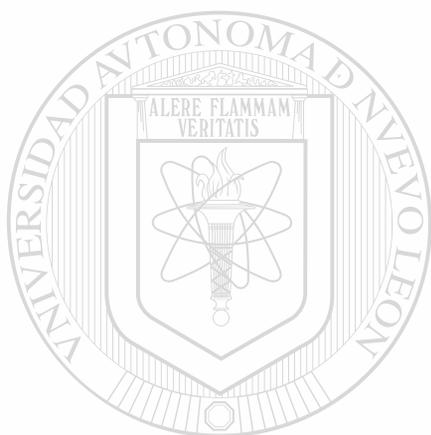
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PROCOLO DEL KIT DUAL LUCIFERASE REPORTER ASSAY.

- 1.- Retirar el medio de cultivo y lavar 2 veces con PBS 1X
- 2.- Agregar 200µl de PLB 1X (Buffer de Lisis) e incubar con agitación por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Agregar a cada pozo de una placa de 96 pozos 100µl de LARII (substrato de la enzima luciferasa) y 20µl del lisado obtenido, mezclar por pipeteo
- 4.- Medir la actividad de luciferasa en el luminómetro
- 5.- Agregar 100µl del reactivo Stop & Glo (para detener actividad de la luciferasa y substrato de la enzima renilla) y mezclar por pipeteo
- 6.- Medir la actividad de Renilla en el luminómetro



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



