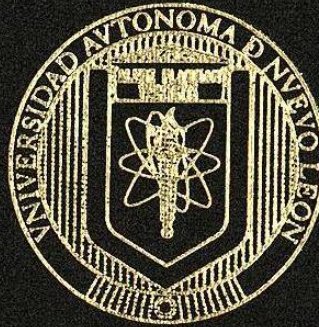


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



EFEECTO DEL ONCOGEN W_{nt1} SOBRE LA EXPRESION
DE LAS ISOFORMAS DE AUF1

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

PRESENTA:

Q.F.B. IVAN ALBERTO MARINO MARTINEZ

MONTERREY, NUEVO LEON

AGOSTO DE 2006

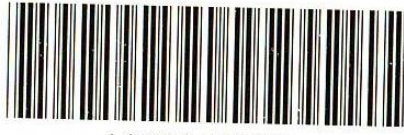
TM

26658

FM

2006

.M354



1020154710

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTO DEL ONCOGÉN Wnt1 SOBRE LA EXPRESIÓN
DE LAS ISOFORMAS DE AUF1.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA.**

PRESENTA:

Q.F.B. IVAN ALBERTO MARINO MARTÍNEZ

Monterrey, Nuevo León

Agosto de 2006

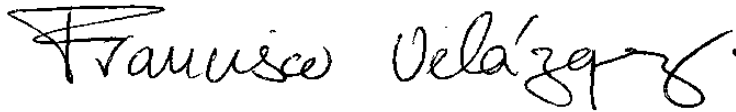


FONDO
TESIS

TM
Z6658
FM
2006
.M354

**EFFECTO DEL ONCOGÉN Wnt1 SOBRE LA EXPRESIÓN
DE LAS ISOFORMAS DE AUF1.**

Aprobación de la Tesis:



DR. JUAN FRANCISCO VELÁZQUEZ VADILLO
Director de Tesis



DR. GERARDO PADILLA RIVAS
Co-Director de Tesis



DRA. HERMINIA MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Co-Director de Tesis



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

DEDICADO A:

MIS PADRES:

María Victoria Martínez Rodríguez y Alberto Marino Castañón

Gracias por su ejemplo, apoyo, confianza y su eterno cariño.

MIS HERMANOS:
(Paulo, Gilberto y Jacob)

Sigan adelante que cuando me hayan dejado atrás, ustedes serán mi guía.

MI NOVIA LAURA:

Mi lado izquierdo, te amo.

Mil gracias por tu apoyo incondicional, tu paciencia y tu amor.

GRACIAS A:

MIS AMIGOS:

Manuel, Oscar, Antonio, Ernesto, Miguel, Héctor.
Porque cada uno de ustedes, es para mí un hermano.

Sandra, Sofía, Berenice, Cecilia y Michell.
Por toda su ayuda durante la maestría.

MIS MAESTROS:

Dr. Juan Francisco Velázquez Vadillo.

Por darme la oportunidad de seguir aprendiendo de su experiencia.

Dr. Gerardo Padilla Rivas.

Por enseñarme que lo importante es saber donde buscar.

Dra. Herminia Martínez Rodríguez.

Por toda su ayuda durante mi formación en el posgrado.

ÍNDICE

Índice	i
Lista de figuras	iii
Tabla de nomenclatura	iv
Resumen	v
	Página
Capítulo I. Introducción	1
1.1 Introducción general	1
1.2 La vía canónica Wnt	1
1.3 Cáncer y estabilidad del ARNm	2
1.4 Degradación del ARNm que contiene codones de terminación de la traducción prematuros	3
Capítulo II. Objetivos	4
2.1 Objetivo general	4
2.1.1 Objetivo particular I	4
2.1.2 Objetivo particular II	4
Capítulo III. Materiales y métodos	5
3.1 Área de trabajo.	5
3.2 Reactivos.	5
3.3 Equipo.	7
3.4 Ácidos nucleicos.	8
3.4.1 Oligonucleótidos.	8
3.4.2 Vectores.	9
3.5 Modelo celular.	10
3.6 Metodología.	11
3.6.1 Aislamiento de ARN total de las líneas celulares.	11
3.6.2 Síntesis del cDNA a partir de ARN total.	11
3.6.3 Aislamiento y caracterización del marco de lectura de las isoformas de la proteína AUF1.	12
3.6.4 Análisis de los niveles de ARNm de proteínas involucradas en el recambio del ARNm.	14
3.6.4.1 Análisis de expresión a nivel de ARNm de AUF1.	14
3.6.4.2 Análisis de la expresión a nivel ARNm de la proteína KSRP.	15
3.6.4.3 Análisis de la expresión a nivel ARNm de la proteína TTP.	15
3.6.4.4 Análisis de la expresión a nivel ARNm de la proteína HuR.	16

	Página
Capítulo IV. Resultados	17
4.1 Aislamiento de los marcos de lectura abiertos derivados de ARNm “aberrantes” de AUF1.	17
4.2 p26AUF1: probable nueva isoforma AUF1.	25
4.3 Wnt1 regula positivamente los niveles de los ARNm funcionales de las isoformas AUF1.	26
4.4 Wnt1 regula diferencialmente los niveles de los ARNm de las proteínas que unen ARN (RBPs) HuR, KSRP y TTP.	30
Capítulo V. Discusión y conclusiones	32
5.1 ARNm aberrantes de AUF1.	32
5.2 ¿Influyen los ARNm “aberrantes” en la expresión de las isoformas funcionales de AUF1?	34
5.3 p26AUF1: probable nueva isoforma AUF1	34
5.4 Wnt1 regula positivamente los niveles de los ARNm de las isoformas p45, p42, p40 y p37.	34
5.5 Wnt1 regula diferencialmente los niveles de los ARNm de las proteínas HuR, KSRP y TTP.	35
Referencias bibliográficas	

LISTA DE FIGURAS.

FIGURA	Pag.
Figura 1. Mapa circular y sitios de referencia de la secuencia del vector pGEM-T Easy.	9
Figura 2. Imagen de las líneas celulares PC12, PC12 WNT1, HB+ y HB- en cultivo.	11
Figura 3. Estrategia para aislar el marco de lectura de las cuatro isoformas de la proteína AUF1.	17
Figura 4. Alineamiento de los residuos de aminoácidos de la isoforma p40AUF1 y de la proteína p26AUF1.	26
Figura 5. Estrategia para analizar por RT-PCR semicuantitativa los niveles del ARNm de las isoformas de AUF1.	26
Figura 6. Resultado inicial del análisis de los niveles de ARNm de AUF1 por RT-PCR semicuantitativa.	27
Figura 7. Estrategia para amplificar, por RT-PCR, los ARNm funcionales de las isoformas de AUF1.	28
Figura 8. Efecto de wnt1 sobre los niveles del ARNm de las isoformas funcionales de AUF1.	29
Figura 9. Análisis densitométrico de las bandas de ADN amplificadas al analizar por RT-PCR los niveles de los ARNm funcionales de las isoformas p45AUF1, p42AUF1 y b-actina, en las líneas celulares PC12, PC12-WNT1, HB+ y HB-	29
Figura 10. Análisis densitométrico de las bandas de ADN amplificadas al analizar por RT-PCR los niveles de los ARNm funcionales de las isoformas p40AUF1, p37AUF1 y b- actina , en las líneas celulares PC12, PC12-WNT1, HB+ y HB-.	30
Figura 11. Análisis, por RT-PCR semicuantitativa, de los niveles del ARNm de las proteínas TTP, KSRP y HuR, en las líneas celulares PC12, PC12-WNT1, HB+ y HB-.	31
Figura 12. Análisis densitométrico de las bandas de ADN amplificadas al analizar por RT-PCR semicuantitativa (Figura 11) los niveles del ARNm de las proteínas HuR, TTP, KSRP y beta-actina en las líneas celulares PC12, PC12-WNT1, HB+ y HB-.	31
Figura 13. Localización de los codones de terminación de la traducción prematuros.	33

TABLA DE NOMENCLATURA

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
H ₂ O NF	Agua Nuclease Free (libre de nucleasas)
RT-PCR (siglas en ingles)	Retro transcripción – Reacción en cadena de la polimerasa.
NMD (siglas en ingles)	Non-sense Mediated mRNA Decay
CPT	Codón prematuro de terminación de la traducción.
Pb	Pares de bases

RESUMEN

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.

Numero de páginas: 35

Título del estudio: “Efecto del Oncogén Wnt1 sobre la expresión de las isoformas de AUF1”.

Introducción: Este trabajo se enfoca al estudio de la relación entre la denominada vía canónica Wnt1 y la expresión, a nivel del ARNm, de las isoformas de la proteína AUF1. Estas isoformas están involucradas en la desestabilización de los ARNm que contienen, en la región 3'utr, secuencias ricas en adenina y uracilo (AU-rich elements, AREs, por sus siglas en inglés). La unión de las proteínas AUF1 a los ARE dispara la degradación del ARNm. Los elementos ARE han sido identificados en la región 3'utr del ARNm de varios protooncogenes, como c-myc, fos, c-jun. La regulación de la estabilidad del ARNm contribuye, de manera importante, a la regulación fina de la expresión de estos genes.

Objetivo: Determinar el efecto de la expresión del oncogén Wnt1 sobre los niveles del ARNm de las proteínas AUF1, en las líneas celulares PC12, PC12-Wnt1, HB+ y HB-.

Materiales y Métodos: Se utilizaron las líneas celulares PC12 (no expresa el oncogén Wnt1), PC12-Wnt1 (expresa el oncogén Wnt1 de manera constitutiva), HB+ (expresa el oncogén Wnt1 de manera constitutiva) y HB- (no expresa el oncogén Wnt1), derivadas de un tumor de células adrenales de rata (feocromocitoma). A partir de las 4 líneas celulares se aisló ARN total, se sintetizó el ADNc y se analizó por RT-PCR y RT-PCR semicuantitativa los niveles del ARNm de las proteínas b-actina (como control interno), TTP, HuR, KSRP y de las isoformas p45, p42, p40 y p37 de AUF1, utilizando iniciadores específicos (Invitrogene). Los fragmentos de ADN amplificados fueron clonados en el vector pGEM-T-Easy (Promega) y secuenciados.

Resultados: 1) el oncogén wnt1 regula positivamente los niveles del ARNm de las 4 isoformas reportadas de AUF1; la expresión constitutiva de wnt1 no es necesaria para mantener elevados los niveles de los ARN mensajeros de las isoformas de AUF1; 2) aislamos y secuenciamos el marco de lectura contenido en lo que denominamos ARNm “aberrantes” de AUF1. Estos mensajeros carecen de una región, de extensión variable, localizada río abajo del codón de inicio de la traducción, lo cual cambia el marco de lectura resultando en la aparición de codones de terminación de la traducción prematuros; 3) aislamos el marco de lectura de una probable nueva isoforma de AUF1, la cual denominamos p26AUF1, basados en el peso molecular estimado. 4) Encontramos que la expresión del oncogén resulta en un ligero incremento en los niveles del ARNm de HuR; la expresión constitutiva de wnt1 no es necesaria para mantener elevados los niveles de este ARNm; 5) la expresión de Wnt1 no afecta los niveles de los ARNm de las proteínas KSRP y TTP.

Conclusiones: Wnt1 regula de manera positiva, en células PC12, los niveles de los ARNm de las isoformas p45, p42, p40 y p37 de AUF1; no es necesaria la expresión constitutiva de Wnt1 para mantener elevados los niveles de estos ARNm. La expresión constitutiva de Wnt1 regula diferencialmente, en células PC12, los niveles del ARNm de proteínas involucradas en el metabolismo del ARNm: contribuye a elevar los niveles de los ARNm de las isoformas AUF1 y de la proteína HuR, pero no modifica los niveles de los ARNm de las proteínas TTP y KSRP. Las células PC12 y líneas derivadas, expresan ARN mensajeros de AUF1 “aberrantes”, los cuales carecen de una región de extensión variable localizada río abajo del codón de inicio de la traducción. Estas deleciones cambian el marco de lectura, resultando en la aparición en fase de codones de terminación de la traducción prematuros. Será interesante conocer el mecanismo por el cual se generan estas deleciones, y determinar si estos ARNm “aberrantes” influyen sobre la expresión de las proteínas AUF1.

DR. JUAN FRANCISCO VELÁZQUEZ VADILLO (Director de Tesis)

DR. GERARDO PADILLA RIVAS (Co-Director de Tesis)

DRA. HERMINIA MARTÍNEZ RODRÍGUEZ (Co-Director de Tesis)

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN.

1.1 Introducción general.

Distintos mecanismos moleculares determinan el grado de expresión genética. Estos mecanismos actúan, de manera general, a dos niveles: transcripcional y postranscripcional. El primero se refiere a todos aquellos eventos que regulan la actividad de la región promotora; es decir, estos mecanismos controlan la iniciación de la síntesis del pre-ARNm. Los mecanismos de regulación postranscripcional actúan a diferentes niveles: maduración del ARNm, transporte al citoplasma, estabilidad y eficiencia de la traducción del ARNm, estabilidad del producto proteico, modificaciones de la proteína (fosforilación, glicosilación, etc). Estos mecanismos de regulación están, a su vez, influenciados por las condiciones del entorno celular. Por ejemplo, la presencia de factores de crecimiento que inciden sobre la expresión diferencial de genes para responder a las demandas del entorno, como son la proliferación, la diferenciación celular y la muerte celular programada.

Nuestro trabajo experimental se enfoca en el estudio de la relación entre la denominada vía canónica wnt, una vía de transducción de señales, y los mecanismos que regulan la estabilidad del ARNm. Específicamente, analizamos la relación entre la expresión del oncogén *wnt1* y las isoformas de la proteína AUF1. Estas isoformas están involucradas en la desestabilización del ARNm que contiene, en la región 3'utr, secuencias ricas en adenina y uracilo (AU-rich elements, AREs, por sus siglas en inglés). De manera interesante, encontramos evidencias de que el pre-ARNm de AUF1 está sujeto a eventos de splicing que generan codones prematuros de terminación de la traducción.

1.2 La vía canónica Wnt.

Los “Wnts” son una familia de glicoproteínas, secretadas al medio, que participan en una gran variedad de procesos celulares. Algunos de estos Wnts activan una vía de señalización conocida como “vía canónica Wnt”. Esta vía está muy conservada en la evolución, presentándose desde *C. elegans* hasta mamíferos. La “vía canónica Wnt” tiene un papel relevante en varios procesos del desarrollo animal. La activación no regulada de esta vía resulta en el desarrollo de numerosos tipos de tumores. Por ejemplo, cáncer de mama, colon, melanoma, próstata, entre otros.

Wnt1 fue descrito como un proto-oncogene cuya expresión no regulada, ocasionada por la inserción del virus MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus), resulta en tumores mamarios en el ratón. El papel de la activación de la vía clásica wnt en la proliferación y desarrollo tumorales ha sido exhaustivamente estudiado y caracterizado (1-5). Los sistemas experimentales incluyen el uso de líneas celulares, animales transgénicos y muestras tumorales; el mecanismo de regulación de la vía canónica wnt ha sido estudiado por un gran número de grupos de investigación (6-14).

La interacción de Wnt1 con su receptor, denominado Frizzled y localizado en la membrana plasmática, activa la vía clásica wnt. Esta activación se logra a través de inhibir la degradación de la beta-catenina, una proteína de adhesión celular. En estas condiciones, la β -catenina se acumula en el citoplasma y finalmente es translocada al núcleo de la célula (15,24) en donde interacciona con miembros de una familia de factores de transcripción denominados TCF/Lef (T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor) (25-29). El complejo bipartita β -catenina-TCF/Lef activa de manera específica la expresión de genes blanco (30-34). Los promotores de los genes blancos de la vía canónica wnt contienen secuencias responsivas que interaccionan directamente con el complejo β -catenina-TCF/Lef (30,35). Entre los genes blanco de la vía clásica wnt se encuentran genes relacionados con proliferación celular: c-myc, ciclina D1, c-jun, fra-1 (36-39).

1.3 Cáncer y estabilidad del ARNm.

Durante el proceso tumoral se altera la regulación de la estabilidad y/o traducibilidad del ARNm de distintos genes relacionados con la proliferación celular y el desarrollo tumoral (40). Los mecanismos que determinan la estabilidad y la traducibilidad del ARNm están controlados por una compleja red de interacciones proteína-RNA. En este trabajo centramos nuestra atención en las isoformas de la proteína AUF1.

El gene *auf1* codifica para un pre-ARNm que, por splicing alternativo, genera 4 isoformas de la proteína AUF1 (41). Estas isoformas interaccionan con secuencias ricas en adenina y uracilo, presentes en la región 3'utr del ARNm, disparando la degradación rápida del ARNm. La modulación de la estabilidad de los ARNm blancos de las isoformas de la proteína AUF1 parece depender tanto de los niveles relativos de las distintas isoformas (42) como de la localización subcelular de las mismas (distribución nuclear vs. distribución citoplásmica) (43) y de modificaciones postraduccionales, como fosforilación (44). Sarkar y cols. reportan que la isoforma p37AUF1, y en menor grado la isoforma p40AUF1, son los factores limitantes que facilitan la degradación rápida de ARNm que contienen secuencias AU (45). Las proteínas AUF1 pueden estar relacionadas con el desarrollo de procesos tumorales. Por ejemplo, Shchors y colaboradores (46) sugieren que la inhibición de la actividad de AUF1 confiere resistencia a la muerte celular programada o apoptosis (47). En ratones transgénicos, la sobreexpresión de la isoforma p37AUF1 resulta en altos niveles de la ciclina D1 y el desarrollo de sarcomas, sugiriendo que la desregulación de la expresión/actividad de p37AUF1 resulta en un proceso tumoral (48). Hasta donde sabemos, no se ha reportado la relación entre la vía canónica wnt y la expresión y/o actividad de las isoformas AUF1.

Las proteínas HuR, KSRP y TTP unen ARN (RNA Binding Proteins, RBPs, por sus siglas en inglés) y tienen afinidad por regiones ARE (49). HuR estabiliza, mientras que KSRP y TTP desestabilizan, al ARNm. La activación de la vía canónica wnt, en células α -T3, induce la estabilización de ARNm que contienen regiones ARE. Este efecto resulta de la combinación de una reducción en la afinidad de KSRP y TTP por el ARNm y el incremento en la afinidad por AREs de la proteína estabilizadora HuR (49).

1.4 Degradación del ARNm que contiene codones de terminación de la traducción prematuros.

Las células eucarióticas han desarrollado un sofisticado mecanismo de control de la calidad del ARNm. Este “mecanismo de vigilancia” garantiza que sólo ARN mensajeros libres de errores sean traducidos. Estos errores son cambios (originados por mutaciones, inserciones, deleciones, eventos de recombinación o translocación) que generan ARNm aberrantes conteniendo codones de traducción prematuros. Estos ARNm podrían ser traducidos a proteínas aberrantes, ya sea proteínas truncadas o proteínas que contengan aminoácidos extra. Estas proteínas aberrantes podrían tener un efecto tóxico sobre la célula (50-53). Este mecanismo se conoce como Degradación del ARNm mediada por codones sin sentido (Non sense mediated mRNA, NMD).

Como se mencionó, los codones prematuros de terminación podrían generarse por mutaciones o por errores durante la síntesis del ARNm o el procesamiento alternativo (splicing). Sin embargo, este mecanismo también se utiliza para regular la expresión de transcritos normales (51).

El mecanismo de NMD ha sido estudiado extensivamente en organismos modelo como *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *Drosophila* y en distintas líneas celulares humanas. Se han identificado distintas proteínas que participan en la conexión entre los ribosomas que encuentran el codón prematuro de terminación (CPT) y los componentes que degradan al ARNm. La terminación prematura de la traducción conlleva a la formación del complejo SURF, el cual contiene proteínas como SMG1, UPF1, eRF1 y eRF3. Este complejo es capaz de interactuar con el complejo de la unión exónica (Exon Junction Complex, EJC), formándose el complejo DECID (Decay-inducing complex), el cual es un complejo de transición para la liberación de ribosomas y la formación de un complejo localizado sobre la unión exónica capaz de atraer la maquinaria encargada de la degradación del ARNm (50,52,53).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

Determinar el efecto de la expresión del oncogén Wnt1 sobre los niveles del ARNm de las proteínas AUF1, en las líneas celulares PC12, PC12-Wnt1, HB+ y HB- .

2.1.1 Objetivo particular I:

Analizar, por RT-PCR, la expresión de los marcos de lectura de las isoformas de la proteína AUF1 expresadas en las líneas celulares PC12, PC12-Wnt1, HB+ y HB-.

2.1.2 Objetivo particular II:

Determinar, por RT-PCR semi-cuantitativa el efecto de la expresión constitutiva de wnt1 sobre los niveles del ARNm de las isoformas de la proteína AUF1, HuR, KSRP y TTP.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

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, cuyo responsable es el Dr. Juan Francisco Velázquez Vadillo.

3.2. Reactivos.

Se indican los reactivos utilizados durante el trabajo experimental, estos reactivos han sido agrupados de acuerdo a la compañía que los produce.

- **Promega Corporation (Madison, WI, USA)**

Enzimas de restricción.
Go Taq Gen Master Mix.
T4 ADN ligasa.
Dual Luciferase Reporter Assay System.
TransFast Transfection Reagent.
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System.
PGEM-T Easy vector System
Agarosa

- **LI-COR (Lincoln, NB, USA)**

IRDye 800v2 Terminator mixes

- **QIAGEN (Valencia, CA, USA)**

QIAGEN Plasmid Midi Kit

- **New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, USA).**

Enzimas de restricción.

- **BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA,USA)**

Advantage RT for PCR Kit

- **Invitrogen (California, USA)**

Iniciadores específicos

- **SIGMA-ALDRICH (Steinheim, Alemania; St. Louis MO, USA)**

Glucosa (C₆H₁₂O₆)

Acetato de potasio (CH₃COOK)

Acetato de sodio (CH₃COONa)

Alcohol etílico (C₂H₅OH)

Hidróxido de amonio (NH₄OH)

Hidróxido de sodio (NaOH)

Cloruro de sodio (NaCl)

Cloruro de potasio (KCl)

Cloruro de Calcio (CaCl₂)

SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)

EDTA (Acido Etileno Diamino Tetracético)

Cloroformo (CHCl₃)

- **Becton Dickinson- Disco (Sparks, MD, USA)**

Bacto agar

Extracto de levadura

Bacto triptona.

- **USB Corporation (Cleveland, OH, USA)**

Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit.

- **Ambion (Austin, TX, USA)**

PARIS Kit

- **Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)**

Anticuerpos comerciales.

- **GIBCO BRL Life Technologies (California USA).**

Marcador de peso molecular, escalera de DNA de 100 pb.

3.3 Equipo.

Termociclador Gene Amp PCR System 2400 de la marca Applied Biosystems (Foster CA, USA).

Mezclador tipo vortex Maxi Mix II Type 37600 de Barnstead/ Thermoline (Debuque, IA, USA).

Centrifuga J2-MI marca Beckman (Palo Alto, CA, USA).

Microcentrifuga Eppendorf 5415C y 5415D distribuido por Brinkmann Instruments (Westbury, NY, USA).

Thermomixer marca Eppendorf de Brinkmann Instruments (Westbury, NY, USA).

Fuente de poder para electroforesis modelo 250 de GIBCO BRL Life Technologies (California USA).

Cámara de electroforesis de International Biotechnologies Inc.

Campana de flujo laminar marca Labconco Corporation (Kansas City, MO, EUA).

Incubadora para cultivo celular con suplemento de CO₂ de NAPCO Scientific Company (USA).

Balanza digital Sartorius modelo 1206 MP, (Camibh Gottingen, Alemania).

Microscopio invertido marca Karl Zeiss.

Incubadora de convección mecánica Precision Cientific INC (Chicago, IL, USA).

Ultracongelador SO-LOW de Enviromental Equipment (Cincinnati, OH, USA).

Fotodocumentador de imágenes (Transiluminador UV con cámara oscura) UVP (Upland, USA).

Secuenciador DNA sequencer Long Readir 4200 de LI-COR Biosciences (Lincoln, NB, USA).

3.4. Ácidos nucleicos.

3.4.1. Oligonucleótidos.

CLAVE	NOMBRE	SECUENCIA	UTILIDAD
001	5' ORF rAUF1 (Eco RI)	5' TAA CTT GGA ATT CGA TGT CGG AGG AGC AGT TCG GAG G 3'	Clonación del marco de lectura abierto de las isoformas rAUF1.
002	3' ORF rAUF1 (Not I)	5' TAA CTT GCG GCC GCT TAG TAT GGT TTG TAG CTA TTT TGA TG 3'	Clonación del marco de lectura abierto de las isoformas rAUF1.
003	5' funcional	5' CGA GCA GGA GGG AGC CAT GGT 3'	Análisis de isoformas funcionales.
004	AUF1 Exon2	5' GAG GAG GAT GAA GGC CAT TCA AAC 3'	Identificación de las isoformas p45 y p40 rAUF1.
005	AUF1 Delta2	5' GAG GAT GAA GGG AAA ATG TTT ATA GG 3'	Identificación de las isoformas p42 y p37 rAUF1.
006	AUF1 Exon7	5' CCA CTC TGC TGA TTG CTA TAG TC 3'	Identificación de las isoformas p45 y p42 rAUF1.
007	AUF1 Delta7	5' CCA CTC TGC TGA TCA CCG CCT C 3'	Identificación de las isoformas p40 y p37 rAUF1.
008	M13 forward	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'	Secuenciación en el vector pGEM-T-Easy
009	M13 reverse	5' AAC AGC TAT GAC CAT G 3'	Secuenciación en el vector pGEM-T-Easy
010	5'RTIS11 (Eco RI)	5' GTG TCT GAA TTC GAT GGA TCT CTC TGC CAT CTA CGA G 3'	Análisis de expresión y clonación del ORF de TTP.
011	RTIS11 3' (Not I)	5' CAT CTT GCG GCC GCT CAC TCA GAG ACA GAG ATG CGA TTG 3'	Análisis de expresión y clonación del ORF de TTP.
012	KHSRP3' (Not I)	5' CAT CTT GCG GCC GCT CAC AGA TGA AGT TCA TAT CCA TTT G3'	Análisis de expresión y clonación del ORF de KSRP.
013	5' clalKHSRP	5' GAC ACA TCC TGC GAG AAC GTG ACC 3'	Análisis de expresión de KSRP.
014	HuR 5'ORF (EcoRI)	5' TAA CTT GAA TTC GAT GTC TAA TGG TTA TGA AGA CCA CAT GG 3'	Análisis de expresión y clonación del ORF de HuR.
015	HuR ORF 3' (Not I)	5' TAA CTT GCG GCC GCT TAT TTG TGG GAC TTG TTG GTT TTG AAGG 3'	Análisis de expresión y clonación del ORF de HuR.
016	5'β-actina (XbaI)	5'CTT GTC TCT AGA GCG GAC TGT TAC TGA GCT GCG TTT TAC 3'	PCR para β-actina
018	3'β-actina (BamHI)	5' GAT CTT GGA ICC TAA GGT GTG CAC TTT TAT TAA AAC GG 3'	PCR para β-actina
019	5' Wnt1	5' GAA ACA GCG TTC ATC TTC GCA ATC AC3'	PCR para Wnt 1
020	Wnt1 3'	5' CTC GTT GTT GTG AAG GTT CAT GAG G 3'	PCR para Wnt1

3.4.2. Vectores.

3.4.2.1. Vector pGEM –T Easy (Promega).

El vector utilizado para la clonación y posterior secuenciación de productos de PCR. El vector posee una timidina 3' terminal en ambos extremos haciéndolo compatible con productos de PCR generados por ciertas ADN polimerasas que adicionan residuos de deoxiadenosina a los extremos 3' de los fragmentos amplificados (Figura 1).

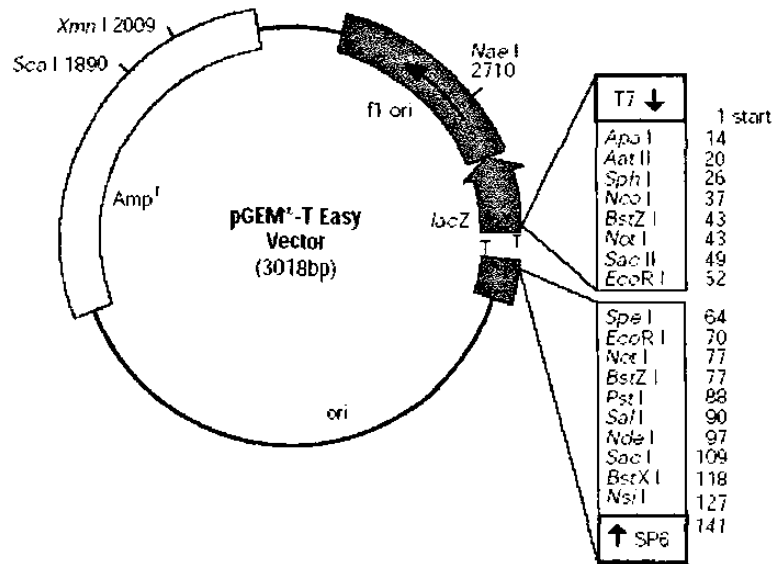


Figura 1. Mapa circular y sitios de referencia de la secuencia del vector pGEM-T Easy (PROMEGA).

Sitios de referencia de la secuencia del vector pGEM-T Easy.

- Sitio de inicio de la transcripción de la ARN polimerasa T7 1
- Región de clonación múltiple 10-128
- Promotor de la ARN polimerasa SP6 (-17 a +3) 139-158
- Sitio de inicio de la transcripción de la ARN polimerasa SP6 141
- Sitio de unión del primer de secuenciación pUC/M13 Reverse 176-197
- Codón de inicio de *lacZ* 180
- Operador *lac* 200-216
- Región codificante para B-lactamasa 1337-2197
- Región del fago fl 2380-2835
- Secuencias del operon *lac* 2836-2996, 166-395
- Sitio de unión del primer de secuenciación pUC/M13 Forward 2949- 2972
- Promotor de la ARN polimerasa T7 2999-3

3.5 Modelo celular.

El modelo celular que utilizamos en este trabajo es la línea celular PC12 de rata, proveniente de un tumor de glándulas adrenales (feocromocitoma) de rata. Son derivadas de la cresta neural y a su vez provienen del tubo neural, estructura en la que Wnt1 se expresa durante el desarrollo embrionario. Son utilizadas ampliamente como modelo en estudios de diferenciación neuronal. En el laboratorio contamos con 4 líneas celulares PC12 con características diferentes (Figura 2):

- Línea parental PC12:
 - Esta es la línea parental aislada del feocromocitoma.
 - No expresa el oncogén Wnt1.
 - No tiene activada la vía canónica Wnt/ β -catenina.
 - Crece en suspensión, no se adhiere al sustrato.
 - Su morfología es esférica.

- Línea PC12-Wnt1:
 - Es derivada de la línea parental PC12.
 - Expresa constitutivamente el oncogén Wnt1.
 - Tiene activada la vía canónica Wnt/ β -catenina.
 - Crece adherida al sustrato.
 - Presenta una morfología estrellada.

- Línea PC12-HB+:
 - Es derivada de la línea parental PC12.
 - Expresa constitutivamente el oncogén Wnt1.
 - Tiene activada la vía canónica Wnt/ β -catenina.
 - Crece adherida al sustrato.
 - Su morfología es estrellada.

- Línea PC12-HB-:
 - Se derivó de la línea PC12-HB+.
 - No expresa el oncogén Wnt1.
 - No tiene activada la vía canónica Wnt/ β -catenina.
 - Crece adherida al sustrato.
 - Su morfología es estrellada.

Las líneas celulares PC12 y PC12 -WNT1 fueron donadas por el Dr. A.M. Brown de la Cornell University. Las líneas celulares HB+ y HB- fueron donadas por el Dr. Bruce Howard de la UCLA.

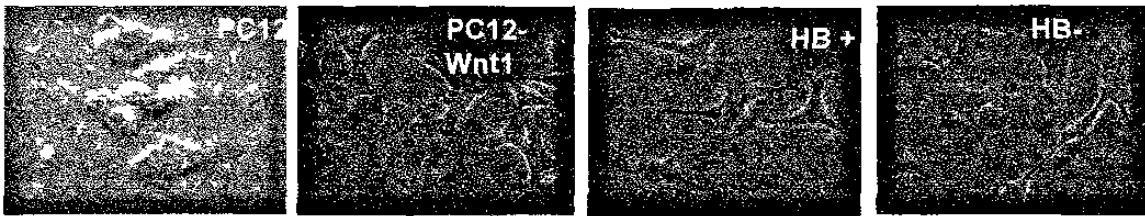


Figura 2. Imagen de las líneas celulares PC12, PC12 WNT1, HB+ y HB- en cultivo. Las líneas celulares PC12 / PC12 -WNT1 fueron donadas por el Dr. A.M. Brown de la Cornell University. Las líneas celulares HB+ / HB- fueron donadas por el Dr. Bruce Howard de la UCLA.

3.6 Metodología.

3.6.1. Aislamiento de ARN total de las líneas celulares.

El aislamiento de ARN total se realizó a partir de un cultivo celular de las líneas celulares PC12, PC12-Wnt, HB+ y HB-, utilizando el estuche RNAqueous-4PCR de AMBION siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.6.2. Síntesis del ADNc a partir de ARN total.

La síntesis del ADNc se realizó a partir del ARN total obtenido de las 4 líneas celulares PC12, mediante retro-transcripción utilizando el estuche comercial Advantage RT for PCR Kit y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los ADNc fueron normalizados utilizando como control el ARNm de β -actina. El modelo de estudio se validó mediante una RT-PCR específica para el ARNm del oncogén Wnt1.

Condiciones de la RT-PCR.

β - actina	RT-PCR	Wnt1
2.6 μ l	H ₂ O NF	2.6 μ l
3.0 μ l	Go Taq Green MM 2 X	3.0 μ l
0.2 μ l	Mezcla de Primers 20p μ /p μ l	0.2 μ l
0.2 μ l	ADNc	0.2 μ l

Programa de la PCR:

B - actina	PROGRAMA PCR	Wnt1
94 °C - 5 minutos	Desnaturalización	94 °C - 5 minutos
94 °C - 30 segundos	Desnaturalización	94 °C - 30 segundos
68 °C - 1 minuto	Alineamiento / Extensión	68 °C - 1 minuto
27 ciclos	Ciclos	35 ciclos
4° C - α	Terminación	4° C - α

3.6.3. Aislamiento y caracterización del marco de lectura de las isoformas de la proteína AUF1.

El aislamiento de las isoformas de AUF1 de rata, se realizó a partir del ADNc obtenido para cada una de las cuatro líneas celulares (PC12, PC12-Wnt, PC12-HB+ y PC12-HB-) utilizando el juego de primers *5' ORF rAUF1 (001) – 3' ORF rAUF1 (002)*.

Condiciones de la PCR

PCR	5' ORF r AUF 1 (001) - 3' ORF rAUF1 (002)
H ₂ O NF	23 µl
Go Taq Green MM 2 X	25 µl
Mezcla de Primers 20ppµl	1.0 µl
ADNc	1.0 µl

Programa de la PCR:

PROGRAMA PCR	5' ORF r AUF 1 (001) - 3' ORF rAUF1 (002)
Desnaturalización	94 °C – 5 minutos
Desnaturalización	94 °C – 30 segundos
Alineamiento / Extensión	68 °C – 1:30 minutos
Ciclos	37 ciclos
Terminación	4° C – α

Una vez amplificado el marco codificante de las isoformas de AUF1, se corrió el producto amplificado en un gel de agarosa al 2.0 %, se purificaron las bandas y se clonaron en el vector pGEM –T- Easy de Promega (ver sección 3.4.2.1.), siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Se seleccionaron candidatos, se crecieron en medio LB-AMP, para una mini preparación de ADN plasmídico. El ADN plasmídico se purificó por la técnica de Fenol-Cloroformo (54) para su posterior caracterización por enzimas de restricción y por secuenciación.

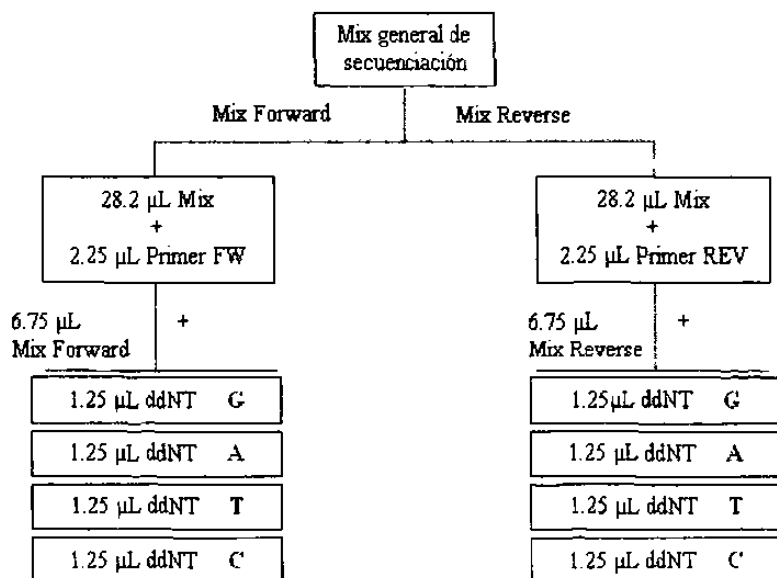
La caracterización por enzimas de restricción se hizo usando la enzima EcoRI que flanquea el sitio de inserción del producto amplificado en el vector pGEM-T-Easy de Promega. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 2% para discriminarlos por tamaño, los candidatos que presentaban insertos de tamaños entre 800 y 1000 pb fueron seleccionados para su secuenciación.

Mezcla general para la reacción de secuenciación:

REACTIVOS	2.25 X
H ₂ O NF	45 µL
Buffer 2X	3.375 µL
Primer	-
ADN	6.75 µL
Taq Sequenase	1.125 µL
TOTAL MIX	56.25 µL

Para algunos candidatos la secuenciación se realizó en ambos sentidos para obtener secuencias completas (primers Forward y Reverse) y para otros candidatos solo se obtuvieron secuencias parciales.

Secuenciación completa:



Programa de secuenciación:

PROGRAMA PCR SECUENCIACIÓN	Primers: M13 Forward y M13 Reverse
Desnaturalización	94 °C – 5 minutos
Desnaturalización	94 °C – 30 segundos
Alineamiento	62 °C – 30 segundos
Extensión	72 °C – 1 minuto
Ciclos	35 ciclos
Terminación	4° C – α

3.6.4. Análisis de los niveles de ARNm de proteínas involucradas en el recambio del ARNm.

El análisis de expresión a nivel de ARNm de las isoformas de la proteína AUF1, HuR, TTP y KSRP en líneas celulares PC12, se realizó mediante RT-PCR y RT-PCR semicuantitativa.

3.6.4.1. Análisis de expresión a nivel de ARNm de AUF1.

Para el análisis de las isoformas p45 rAUF1 y p42 rAUF1 se utilizó el juego de primers 5'funcional (003) /AUF1 Exon7 (006), que amplifican un fragmento de 936pb para p45 rAUF1 y de 879pb para p42 rAUF1. Para las isoformas p40 rAUF1 y p37 rAUF1 se utilizó el juego de primers 5'funcional (003) /AUF1 Delta7 (007) que amplifican un fragmento de 789pb de p40 rAUF1 y otro de 732pb de p37 rAUF1

Condiciones de la PCR:

5'funcional (003) - AUF1 Exon7 (006) (p45 y p42 rAUF1)	RT-PCR	5'funcional (003) - AUF1 Delta7 (007) (p40 y p37 rAUF1)
2.6 µl	H ₂ O NF	2.6 µl
3.0 µl	Go Taq Green MM 2 X	3.0 µl
0.2 µl	Mezcla de Primers 20pµ/µl	0.2 µl
0.2 µl	ADNc	0.2 µl

Programa de la PCR:

5'funcional (003) - AUF1 Exon7 (006) (p45 y p42 rAUF1)	PROGRAMA PCR	5'funcional (003) - AUF1 Delta7 (007) (p40 y p37 rAUF1)
94 °C – 5 minutos	Desnaturalización	94 °C – 5 minutos
94 °C – 30 segundos	Desnaturalización	94 °C – 30 segundos
68 °C – 1 minuto	Alineamiento / Extensión	68 °C – 1 minuto
35 ciclos	Ciclos	37 ciclos
4° C – α	Terminación	4° C – α

3.6.4.2. Análisis de la expresión a nivel ARNm de la proteína KSRP.

El análisis de la expresión de KSRP en las líneas celulares PC12 se realizó por RT-PCR semicuantitativa a tres ciclos (24, 26 y 28 ciclos). Los primers utilizados para el ensayo fueron *5'clalKHSRP (013) /KHSRP3' (012)*, los cuales amplifican una región de 1057pb que se extiende hasta el codón de paro de la traducción del marco de lectura de KSRP.

Condiciones de la PCR:

RT-PCR	KSRP
H ₂ O NF	3.75 µl
Go Taq Green MM 2 X	5.0 µl
Mezcla de Primers 20pµ/µl	1 µl
ADNc	0.25 µl

Programa de la PCR:

PROGRAMA PCR	KSRP
Desnaturalización	94 °C – 5 minutos
Desnaturalización	94 °C – 30 segundos
Alineamiento / Extensión	68 °C – 90 segundos
Ciclos	24, 26 y 28 ciclos
Terminación	4° C – α

3.6.4.3. Análisis de la expresión a nivel ARNm de la proteína TTP.

En el análisis de expresión de la tristetraprolina (TTP) se utilizaron los primers *5'RTIS11 (010) / RTIS113' (011)*, que amplifican una región de 980 pb. El ensayo se realizó por RT-PCR semicuantitativa a los ciclos 28, 30 y 32.

Condiciones de la PCR:

RT-PCR	TTP
H ₂ O NF	3.75 µl
Go Taq Green MM 2 X	5.0 µl
Mezcla de Primers 20pµ/µl	1 µl
ADNc	0.25 µl

154710

Programa de la PCR:

PROGRAMA PCR	TTP
Desnaturalización	94 °C – 5 minutos
Desnaturalización	94 °C – 30 segundos
Alineamiento / Extensión	68 °C – 90 segundos
Ciclos	28, 30 y 32 ciclos
Terminación	4° C – α

3.6.4.4. Análisis de la expresión a nivel ARNm de la proteína HuR.

Utilizando el juego de primers que flanquean el marco de lectura de HuR, se realizó el análisis de expresión en células PC12 por RT-PCR semicuantitativa a cuatro ciclos (29,31, 33 y 35 ciclos). Los primers *HuR 5' ORF (014) / HuR ORF 3' (015)* amplifican un fragmento de 981 pb.

Condiciones de la PCR:

RT-PCR	HuR
H₂O NF	4.6 μ l
Go Taq Green MM 2 X	5.0 μ l
Mezcla de Primers 20pμ/pμl	0.2 μ l
ADNc	0.2 μ l

Programa de la PCR:

PROGRAMA PCR	HuR
Desnaturalización	94 °C – 5 minutos
Desnaturalización	94 °C – 30 segundos
Alineamiento / Extensión	68 °C – 90 segundos
Ciclos	29, 31, 33 y 35 ciclos
Terminación	4° C – α

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Aislamiento de los marcos de lectura abiertos derivados de ARNm “aberrantes” de AUF1.

Empleamos iniciadores específicos, ver **Figura 3**, para amplificar, a partir del ADNc de las líneas celulares PC12, HB+ y HB-, fragmentos de ADN conteniendo una región delimitada por los codones de inicio y terminación de la traducción de las isoformas AUF1. Estos fragmentos de ADN se clonaron en el vector pGEMTEasy. 17 fragmentos fueron secuenciados en toda su extensión, mientras que otros 6 fragmentos fueron secuenciados sólo a partir del extremo 5' que contiene el codón de inicio de la traducción de AUF1.

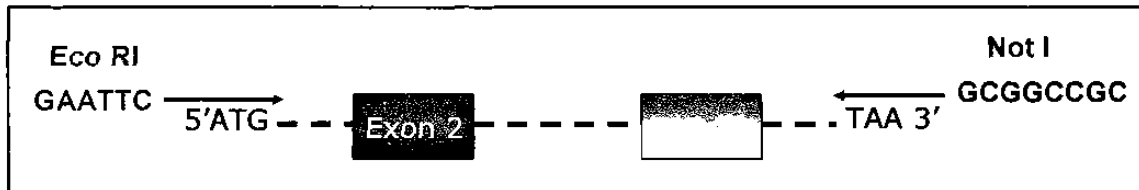


Figura 3. Estrategia para aislar el marco de lectura de las cuatro isoformas de la proteína AUF1. En verde se indica el iniciador que amplifica a partir del extremo 5' y que introduce en el producto amplificado el sitio de restricción para la enzima Eco RI (5' *ORF AUF1 (001)*). En rojo se indica el primer que amplifica a partir del codón de paro de la traducción y que introduce el sitio de restricción para la enzima NotI (3' *ORF AUF1 (002)*). También se indican en la figura la presencia del exón 2 (azul) y el exón 7 (gris).

Abajo mostramos las secuencias nucleotídicas del marco de lectura de las cuatro isoformas AUF1 junto con las secuencias nucleotídicas de los candidatos aislados. El análisis de estas secuencias genera dos observaciones importantes: 1) Ninguno de los candidatos analizados corresponde al marco de lectura de alguna de las isoformas de AUF1 (p45, p42, p40, p37; a las cuales nos referiremos, de aquí en adelante, como *isoformas “funcionales”*); 2) Todos los candidatos aislados, carecen de una región, de extensión variable, localizada río abajo del codón de inicio de la traducción. Esto resulta, excepto para el candidato 5, en la presencia, en fase, de codones de terminación de la traducción, a los cuales nos referiremos como codones de terminación de la traducción “prematuros”. El candidato 5 posee un marco de lectura sin interrupción desde el codón ATG hasta el codón TAA presentes en los iniciadores utilizados.

En el alineamiento de las secuencias nucleotídicas del marco de lectura de las isoformas AUF1 de rata p45, p42, p40 y p37 (ver abajo), se puede apreciar la presencia o ausencia (líneas punteadas) de los exones 2 (letras azules) y 7 (letras rojas). Subrayamos las secuencias, a partir del codón de iniciación de la traducción ATG y del codón de terminación de la traducción TAA, de los iniciadores usados para amplificar el marco de lectura de las isoformas AUF1 (ver sección 3.4.1).

p40rat ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGCGGGCGGCAACGGCGGGCGGTAGGC 60
 p37rat ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGCGGGCGGCAACGGCGGGCGGTAGGC 60
 p45rat ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGCGGGCGGCAACGGCGGGCGGTAGGC 60
 p42rat ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGCGGGCGGCAACGGCGGGCGGTAGGC 60

p40rat GGCTCGGCGGGCGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGGCGGCGAGGGGGCAGCGGCGGGCG 120
 p37rat GGCTCGGCGGGCGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGGCGGCGAGGGGGCAGCGGCGGGCG 120
 p45rat GGCTCGGCGGGCGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGGCGGCGAGGGGGCAGCGGCGGGCG 120
 p42rat GGCTCGGCGGGCGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGGCGGCGAGGGGGCAGCGGCGGGCG 120

p40rat GCGGGAAGCGGGAGCGGGCGGGCGGCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAG 180
 p37rat GCGGGAAGCGGGAGCGGGCGGGCGGCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAG 180
 p45rat GCGGGAAGCGGGAGCGGGCGGGCGGCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAG 180
 p42rat GCGGGAAGCGGGAGCGGGCGGGCGGCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAG 180

p40rat GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAAGAATGAGGAGGATGAAGGCCATTCAAACCTCC 240
 p37rat GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAAGAATGAGGAGGATGAAGG----- 227
 p45rat GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAAGAATGAGGAGGATGAAGGCCATTCAAACCTCC 240
 p42rat GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAAGAATGAGGAGGATGAAGG----- 227

p40rat TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGA 300
 p37rat -----GAAAATGTTTATAGGA 243
 p45rat TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGA 300
 p42rat -----GAAAATGTTTATAGGA 243

p40rat GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGAC 360
 p37rat GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGAT 303
 p45rat GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGAC 360
 p42rat GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGAT 303

p40rat GTTGTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTT 420
 p37rat GTTGTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTT 363
 p45rat GTTGTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTT 420
 p42rat GTTGTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTT 363

p40rat GTGCTATTTAAAGAGTCCGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTG 480
 p37rat GTGCTATTTAAAGAGTCCGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTG 423
 p45rat GTGCTATTTAAAGAGTCCGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTG 480
 p42rat GTGCTATTTAAAGAGTCCGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTG 423

p40rat AATGGGAAAGTCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAA 540
 p37rat AATGGGAAAGTCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAA 483
 p45rat AATGGGAAAGTCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAA 540
 p42rat AATGGGAAAGTCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAA 483

p40rat AAAATTTTGTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTT 600
 p37rat AAAATTTTGTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTT 543
 p45rat AAAATTTTGTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTT 600
 p42rat AAAATTTTGTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTT 543

p40rat GGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGG 660
p37rat GGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGG 603
p45rat GGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGG 660
p42rat GGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGG 603

p40rat CGTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAG 720
p37rat CGTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAG 663
p45rat CGTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAG 720
p42rat CGTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAG 663

p40rat AAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTGGAAGGAGCAG 780
p37rat AAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTGGAAGGAGCAG 723
p45rat AAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTGGAAGGAGCAG 780
p42rat AAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTGGAAGGAGCAG 723

p40rat TATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA 840
p37rat TATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA 783
p45rat TATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA 840
p42rat TATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA 783

p40rat GGCGGTG----- 847
p37rat GGCGGTG----- 790
p45rat GGCGGTGGCCCCAGTCAAACTGGAACCAGGGATATAGTAACTATTGGAACCAAGGCTAT 900
p42rat GGCGGTGGCCCCAGTCAAACTGGAACCAGGGATATAGTAACTATTGGAACCAAGGCTAT 843

p40rat -----
p37rat -----
p45rat GGCAGCTATGGATATAACAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAGGATATGACTACACTGGT 960
p42rat GGCAGCTATGGATATAACAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAGGATATGACTACACTGGT 903

p40rat -----ATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTA 882
p37rat -----ATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTA 825
p45rat TACAACAGCTACTATGGATATGGTACTATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTA 1020
p42rat TACAACAGCTACTATGGATATGGTACTATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTA 963

p40rat TCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA 915
p37rat TCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA 858
p45rat TCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA 1062
p42rat TCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA 1005

A continuación presentamos la secuencia nucleotídica de los marcos de lectura de las isoformas funcionales AUF1, así como la secuencia de algunos de los candidatos aislados. Se indica la posición del codón de inicio de la traducción (ATG), codón de terminación de la traducción (TAA), exon2 (letras azules), exon 7 (letras rojas), unión exon1-exon3 (AGGGAA), unión exon 6-exon8 (GTGATC) y los codones de terminación de la traducción prematuros (TAA, TGA, TAG).

p45AUF1

ATGTCGGAGGAGCAGTTTCGGAGGGGACGGGGCGGGCGGGCGGCAACGGCGGGCGGTAGGCGGGCTCGGCGG
 GCGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGGCGGCAGGGGGCAGCGGGCGGGCGGGAAAGCGGGAGCGGGCGG
 CGGCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAGGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAG
 AATGAGGAGGATGAAGGCCATTCAACTCCTCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAG
 AATGGAAAATGTTTATAGGAGGCCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAA
 ATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTT
 GTGCTATTTAAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAAGAACAATAAAATGAAATGGGAAAG
 TCATTTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCT
 TTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAG
 CTGGCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGGGCTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCCAG
 TGAAGAAGATAAATGGAGAAGAAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTC
 GAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGATCTAGAGGAGGTTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA
 GGCGGTGGCCCCAGTCAAAACTGGAACCCAGGGATATAGTAACTATTGGAACCAAGGCTATGGCAGCTATGG
 ATATAACAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAGGATATGACTACACTGGTTACAACAGCTACTATGGATATG
 GTGACTATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTATCCAGACGAGGTGGTTCATCAAAATAGCTAC
 AAACCATACTAA

p42AUF1

ATGTCGGAGGAGCAGTTTCGGAGGGGACGGGGCGGGCGGGCGGCAACGGCGGGCGGTAGGCGGGCTCGGCGGG
 CGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGGCGGCAGGGGGCAGCGGGCGGGCGGGAAAGCGGGAGCGGGCGGG
 GCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAGGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAAT
 GAGGAGGATGAAGGGAAAATGTTTATAGGAGGCCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTA
 CTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTT
 TTGGCTTTGTGCTATTTAAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAAGAACAATAAAATGAAAT
 GGGAAAAGTCAATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAAAAAAATTTTTGTTGG
 TGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCA
 TAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCGTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAA
 CCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCAT
 GTCGAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGATCTAGAGGAGGTTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAA
 GAGCGGTGGCCCCAGTCAAAACTGGAACCCAGGGATATAGTAACTATTGGAACCAAGGCTATGGCAGCTAT
 GGATATAACAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAGGATATGACTACACTGGTTACAACAGCTACTATGGATA
 TGGTACTATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTATCCAGACGAGGTGGTTCATCAAAATAGCTACA
 AACCATACTAA

p40AUF1

ATGTCGGAGGAGCAGTTTCGGAGGGGACGGGGCGGGCGGGCGGCAACGGCGGGCGGTAGGCGGGCTCGGCGGG
 CGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGGCGGCAGGGGGCAGCGGGCGGGCGGGAAAGCGGGAGCGGGCGGG
 GCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAGGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAAT
 GAGGAGGATGAAGGCCATTCAACTCCTCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAAG
 AATGGAAAATGTTTATAGGAGGCCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAA
 TTTGGGGACGTTGTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTTGT
 GCTATTTAAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAAGAACAATAAAATGAAATGGGAAAGTCA
 TTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCTTTCT
 CCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCC
 TATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCGTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCCAGTGAAGA
 AGATAATGGAGAAGAAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTCGAAGGAG
 CAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGATCTAGAGGAGGTTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGTGA
TCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTATCCAGACGAGGTGGTTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA

p37AUF1

ATGTCCGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGGCGGGCGGCAACGGCGGGCGGTAGGGCGGCTCGGCGGG
CGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGGCGGCAGGGGGCAGCGGGCGGGCGGGGAAGCGGGAGCGGGCGGG
GCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAGGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAAT
GAGGAGGATGAAGGGAAAATGTTTATAGGAGGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTA
CTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACCTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTT
TTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAAATTTGAAT
GGGAAAGTCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCCTCAAAAAATTTTTGTGG
TGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAATAAGAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCA
TAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCGTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAA
CCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCAT
GTCGAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAA
GAGCGCGTGATCAGCAGAGTGGTTATGGAAAGTATCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCA
TACTAA

Candidato #27

ATGTCCGAGGAGCAGTTCGGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGGCCATTCAA
ACTCCTCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGAGGCC
TTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACCT
CTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGT
AGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAAATTTGAATGGGAAAGTCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCA
TGAAAACAAAAGAGCCCCTCAAAAAATTTTTGTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAATA
AGAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAG
GCGTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACCACA
ATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTCGAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGG
GGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGTGGCCCCAGTCAAAACTGGAACCAGGG
ATATAGTAACTATTTGGAACCAAGGCTATGGCAGCTATGGATATAACAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAG
GATATGACTACACTGGTTACAACAGCTACTATGGATATGGTGACTATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGG
AAAGTATCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA

Candidato #6

ATGTCCGAGGAGCAGTTCGGAGGCACCGAAGAGGCAGCACCGAGGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGT
AAGAATGAGGAGGATGAAGGCCATTCAAACCTCTCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGA
AGAATGGAAAATGTTTATAGGAGGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCA
AATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACCTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTT
GTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAAATTTGAATGGGAAAGT
CATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCCTCAAAAAATTTTTGTGGTGGCCTTT
CTCCAGACACACCTGAAGAAAAATAAGAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTG
CCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCGTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAA
GAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTCGAAGG
AGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGT
GGCCCCAGTCAAAACTGGAACCAGGGATATAGTAACTATTTGGAACCAAGGCTATGGCAGCTATGGATATAA
CAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAGGATATGACTACACCGGTTACAACAGCTACTATGGATATGGTGACT
ATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTATCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACT
TAA

Candidato #3

ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGGCGGGCGGCAACGGCGGCCATTCAAACCTCTCCC
CACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGAGGCCCTTAGCTGGGAC
ACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACCTCGGAAGTTAGA
TCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCCGGAGAGTGTAGATAAGGTCA
TGGATCAGAAAGAACATAAAATTTGAATGGGAAAGTCATCGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAA
GAGCCCGTCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAATAAGAGAGTACTTT
TGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCATATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCCGTGGGTCT
GTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAAATACCACAATGTTGGTCTT
AGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTcGAAGGAGcAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGG
AGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGTGATCAGCAGAGCGGTTATGGGAAAGTATCCAGACGAG
GTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA

Candidato #7

ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGAGGATGAAGCGGAAAATGTTTATAGGAGGCCCTTAGCTGGGACACCACAA
AGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACCTCGAAGTTAGATCCTATC
ACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCCGGAGAGTGTAGATAAGGTCAATGGATCA
GAAAGAACATAAAATTTGAATGGGAAAGTCATTTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCG
TCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAATAAGAGAGTACTTTGGTGG
TTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCATATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCCGTGGGTCTCTGTTTCA
TTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAA
TGTGAAATAAAAGTAGCCATGTcGAAGGAGcAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGCAGCAGCAGTGGGGAT
CTAGAGGAGGGTTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGTGATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTA'ICC
AGACGAGGTGGTTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA

Candidato #2

ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGGCGGGCGGCTCTGCGGCCGGAGACCGAAGAGGCAGC
ACCGAGGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAAATGAGGAGGATGAAGGCCATTCAAACCTCTCCCC
ACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGAGGCCCTTAGCTGGGACA
CCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCGAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACCTCGGAAGTTAGAT
CCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCCGGAGAGTGTAGATAAGGTCA
GGATCAGAAAGAACATAAAATTTGAATGGGAAAGTCATTTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAG
AGCCCGTCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAATAAGAGAGTACTTT
GGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCATATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCCGTGGGTCTG
TTTCAATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAAATACCACAATGTTGGTCTTA
GTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTcGAAGGAGcAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGA
GGGTTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGTGATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTATCCAGACGAG
TGGTTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA

Candidato #16Hb-

ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGAGGCCCTTAGCT
GGGATACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACCTCTGAAG
TTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCCGGAGAGTGTAGATAA
GGTCATGGATCAGAAAGAACATAAAATTTGAATGGGAAAGTCATTTGACCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAGA
CAAAAGAGCCCGTCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAATAAGAGAG
TACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCATATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCCGTGG
GTCTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAAATACCACAATGTTG
GTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTcGAAGGAGcAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCT
AGAGGAGGGTTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGTTGGCCCCAGTCAAACCTGGAAACCAGGGATATAG
TAACTATTGGACCAAGGCTATGGCAGCTATGGATATAACAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAGGATATGA
CTACACTGGTTACAACAGCTACTATGGATATGGTGACTATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTAT
CCAGCGGGTGGTTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA

Candidato #15Hb-

ATGTCCGAGGAGCAGTTCGGAGGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAG**TAA**GAATGAGGAGGATGAAGGCC
ATTCAAACTCCTCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGA
GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTG
CACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGGTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCGGGGA
GTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAAATTTGAATGGGAAAGTCATTGATCCTAAAGGGCCAAAG
CCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAAAAAAATTTTGTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAA
ATAAGAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCATATGGACAACAAGACCAATAA
GAGGCGTGGTTCCGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACC
ACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTCGAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAG
TGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGG**TGAT**CAGCAGAGTGGTTGTGGGAA
AGTATCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACT**TAA**

Candidato #6Hb-

ATGTCCGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGAGGCC**TAG**CT
GGGATACCCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCAC**CT**GAAG
TTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAA
GGTCATGGATCAGAAAGAACATAAAATTTGAATGGGAAAGTCATTGACCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAGA
CAAAGAGCCCGTCAAAAAAATTTTGTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAA
GAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCATATGGACAACAAGACCAATAAGAGG
CGTGGGTTCTGTTTTCA**TT**CCTTTAAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAA
TGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTCGAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGG
GATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGTGGCCCCAGTCAA**AA**CTGGAACCAGGGA
TATAGTAACTATTTGGAACCAAGGCTATGGCAGCTATGGATATAACAGCCAAGGGTACGGTGGTTAT
GGAGGATATGACTACACTGGTTACAACAGCTACTATGGATATGGTGACTATAGCAATCAGCAGAGTGGTTA
TGGGAAAGTATCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACT**TAA**

Candidato #4Hb-

ATGTCCGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGAGGCC**TAG**CT
GGGATACCCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCAC**CT**GAAG
TTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGYCGGAGAGTGTAGATAA
GGTCATGGATCAGAAAGAACATAAAATTTGAATGGGAAAGYCATTTGACCCTAAAAGGGCCAAAGCCCATGAA
GACCAAAGAGCCCGTCCAAAAAATTTTGTGGTGGCCTTTCTCCAGCACACCTGAAGAAAAAATAAG
AGAGTCTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCATATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCG
TGGGTTCTGTTTTCA**TT**ACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAATG
TTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTCGAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGTGGGGATCT
AGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGTGGCCCCAGTCAA**AA**CTGGAACCAGGGATATAG
TAACTATTTGGAACCAAGGCTATGGCAGCTATGGATATAACAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAGGATATG
ACTACACTGGTTACAACAGCTACTATGGATATGGTGACTATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTA
TCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACT**TAA**

Candidato #3Hb+

ATGTCCGAGGAGCAGTTCGGAGGCACCGAAGAGGCAGCACCGAGGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGT
AAGAATGAGGAGGATGAAGGCCATTC**AA**ACTCCTCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGA
AGAATGGAAAATGTTT**TAG**GAGGCCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCA
AATTTGGGGACGTTGTAGACTGCAC**CT**CTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGCTTGGCTTT
GTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAAATTTGAATGGGAAAGT
CATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAAAAAAATTTTGTGGTGGCCTTT
CTCCAGGCACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTG
CCTATGGACAACAAGCAAATAAGAGGCGTGGGTTCTGTTTCA**TT**ACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGA
AAGATAATGGAGAAGAAAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTCGAAGG
AGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGT
GGCCCCAGTCAA**AA**CTGGAACCAGGGATATAGTAACTATTTGGAGCCAAGGCTATGGCAGCTATGGATATAA
CAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAGGATATGACTACCCGGTTACAACAGCTACTATGGATAT**GTGATC**
ATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTATCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACT
TAA

Candidato #5 (No presenta codón de terminación de la traducción prematuro)

**ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGCGGCGGCGGCAACGGCGGCGGTAGGAGGCAGCACCGA
 GGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGGCCATTCAAACCTCCTCCCCACGAC
 ACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAAGAAATGGAAAAATGTTTATAGGAGGCCCTTAGCTGGGACACCACA
 AAGAAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTAT
 CACAGGGCGATCAAGGGGTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCCGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATC
 AGAAAGAACATAAAATGAATGGGAAAGTCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCC
 GTCAAAAAAATTTTGTGGTGGCCTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAATAAGAGAGTACTTTGGTGG
 TTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCGTGGGTTCTGTTTCA
 TTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAA
 TGTGAAATAAAAAGTAGCCATGTCGAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTT
 TGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGG**GTGATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTATCCAGACGAGGTGGTC**
 ATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA**

Como mencionamos arriba, el alineamiento de las secuencias de p45 (primeras 300b, a partir de, e incluyendo, el codón ATG) y de los distintos candidatos (ver abajo), revela que todos los candidatos aislados carecen de una región, de extensión variable, cerca del codón de iniciación de la traducción. Esto es evidente en el alineamiento de secuencias nucleotídicas que presentamos a continuación.

CLUSTAL W (1.83) Alineamiento múltiple de secuencias

```

p45rat      ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGCGGCGGCGGCAACGGCGGCGGTAGGC 60
C27         ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGG----- 23
C26         ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGG----- 23
C3          ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGCGGCGGCGGCAACGGCGGCG----- 54
C2          ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGCGGCGGCGGCGGCG----- 44
C7          ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGG----- 23
C16hb-     ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGG----- 24
C15hb-     ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGG----- 23
C6hb-      ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGG----- 24
C4hb-      ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGG----- 24
C3hb+      ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGG----- 23
C5         ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGCGGCGGCGGCGGCAACGGCGGCGGTAGG- 59
          *****

p45rat      GGCTCGGCGGGCGGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGCGGCGCAGGGGGCAGCGGCGGCG 120
C27         -----
C26         -----
C3          -----
C2          -----
C7          -----
C16hb-     -----
C15hb-     -----
C6hb-      -----
C4hb-      -----
C3hb+      -----
C5         -----
  
```

```

p45rat      GCGGGAAGCGGGAGCGGGCGGCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAG 180
C27        -----
C26        -----CACCGAAGGAGGCAGCACCGAG 55
C3         -----
C2         -----TCTGCGGCCGGAG--ACCGAAG-AGGCAGCACCGAG 56
C7         -----
C16hb-    -----
C15hb-    -----
C6hb-     -----
C4hb-     -----
C3hb+     -----CACCGAAG-AGGCAGCACCGAG 44
C5         -----AGGCAGCACCGAG 72

p45rat      GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGGCCATTCAAACCTCC 240
C27        -----GAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGGCCATTCAAACCTCC 76
C26        GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGGCCATTCAAACCTCC 115
C3         -----CCATTCAAACCTCC 67
C2         GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGGCCATTCAAACCTCC 116
C7         -----AGGATGAAGG----- 33
C16hb-    -----
C15hb-    -----CAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGGCCATTCAAACCTCC 82
C6hb-     -----
C4hb-     -----
C3hb+     GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGGCCATTCAAACCTCC 104
C5         GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGGCCATTCAAACCTCC 132

p45rat      TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGA 300
C27        TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGA 136
C26        TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGA 175
C3         TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGA 127
C2         TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGA 176
C7         -----GAAAATGTTTATAGGA 49
C16hb-    -----GACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGA 61
C15hb-    TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGA 142
C6hb-     -----GACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGA 61
C4hb-     -----GACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGA 60
C3hb+     TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGA 164
C5         TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGA 192
          *****

```

El que ningún candidato corresponda a alguna isoforma funcional de la proteína AUF1 nos permite sugerir que los ARNm “aberrantes” son más abundantes que los ARNm de las isoformas funcionales. Esta posibilidad afecta, de manera importante, nuestra estrategia inicial dirigida a evaluar el efecto de la expresión de wnt1 sobre los niveles del ARNm de las isoformas funcionales AUF1, como se explica en la sección 4.3.

4.2 p26AUF1: probable nueva isoforma AUF1.

Líneas arriba presentamos la secuencia nucleotídica del candidato #5. Esta secuencia representa un marco de lectura continuo, desde el codón de inicio de la traducción ATG hasta el codón de término de la traducción TAA, presentes en los extremos de dicha secuencia. Este marco de lectura tiene el potencial de generar una proteína de 268 aminoácidos. La estructura de esta proteína es similar a la isoforma p40, ya que contiene al exón 2 pero carece del exón 7, como puede verse en la **Figura 4**, en la que se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de p40 y del candidato #5, a la que hemos denominado tentativamente como p26AUF1.

p40AUF1	MSEEQFGGDGAAAAATAAVGSSAGEQEGAMVAAAQGA AAAAGSGSGGSAAGGT EGGSTE	60
p26AUF1	MSEEQFGGDGAAAAATAAVG-----GSTE	24
	*****	****
p40AUF1	AEGAKI DASKNEE DEGHSSNS PRHTEAATAQREEWKMF IGGLSWDTTKKDLKDYFSKFGD	120
p26AUF1	AEGAKI DASKNEE DEGHSSNS PRHTEAATAQREEWKMF IGGLSWDTTKKDLKDYFSKFGD	84
	*****	*****
p40AUF1	VVDCTLKLDPITGRSRGFGFVLFKESESVDKVM DQKEHKLNGKVIDPKRAKAMKTKEPVK	180
p26AUF1	VVDCTLKLDPITGRSRGFGFVLFKESESVDKVM DQKEHKLNGKVIDPKRAKAMKTKEPVK	144
	*****	*****
p40AUF1	KIFVGGLSPDTPEEKIREYFGGFGEVESIELPMDNKTKRRGFCFITFKEEEPVKKIMEK	240
p26AUF1	KIFVGGLSPDTPEEKIREYFGGFGEVESIELPMDNKTKRRGFCFITFKEEEPVKKIMEK	204
	*****	*****
p40AUF1	KYHNVGLSKCEIKVAMSKEQYQQQQWGSRGGFAGRARGRGGDQQSGYGKVSRRGGHONS	300
p26AUF1	KYHNVGLSKCEIKVAMSKEQYQQQQWGSRGGFAGRARGRGGDQQSGYGKVSRRGGHONS	264
	*****	*****
p40AUF1	YKPY	304
p26AUF1	YKPY	268

Figura 4. Alineamiento de los residuos de aminoácidos de la isoforma p40AUF1 y de la proteína p26AUF1. Se muestra el alineamiento de los residuos de aminoácidos de la proteína p40AUF1 y de la proteína p26AUF1. Las letras azules corresponden al exón 2, y la letra D, en color magenta, indica el aminoácido que se genera por la ausencia del exón 7, y la unión de los exones 6 y 8.

4.3 Wnt1 regula positivamente los niveles de los ARNm funcionales de las isoformas AUF1.

Inicialmente planteamos determinar el efecto de *wnt1* sobre los niveles de los ARNm de las isoformas de AUF1, de acuerdo a la estrategia mostrada en la **Figura 5**. Diseñamos 4 iniciadores para, de manera específica, amplificar y determinar por RT-PCR semicuantitativa los niveles del ARNm de cada una de las isoformas de AUF1. Empleando esta estrategia, encontramos que *wnt1* no altera los niveles de los ARNm de AUF1 (Figura 6).

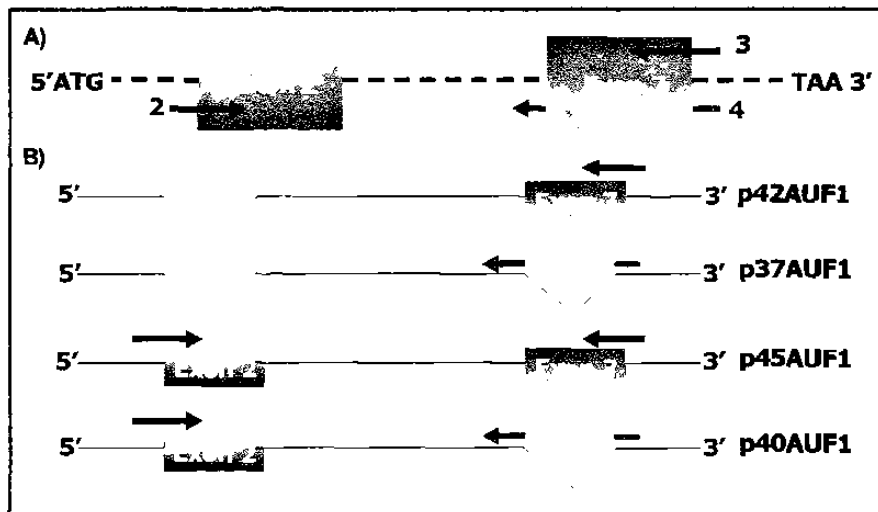


Figura 5. A) Estrategia para analizar por RT-PCR semicuantitativa los niveles del ARNm de las isoformas de AUF1. Se diseñaron iniciadores que amplifican de manera específica las isoformas p45 (iniciadores 2-3; presencia de exón 2 y de exón 7), p42 (iniciadores 1-3; ausencia de exón 2 y presencia de exón 7), p40 (iniciadores 2-4; presencia de exón 2 y ausencia de exón 7) y p37 (iniciadores 1-4; ausencia de exones 2 y 7). Los nombres de los iniciadores mostrados en esta figura como 1, 2, 3 y 4 son: *AUF1 Delta2 (005)*, *AUF1 Exon 2 (004)*, *AUF1 Exon 7 (006)* y *AUF1 Delta7 (007)* respectivamente.

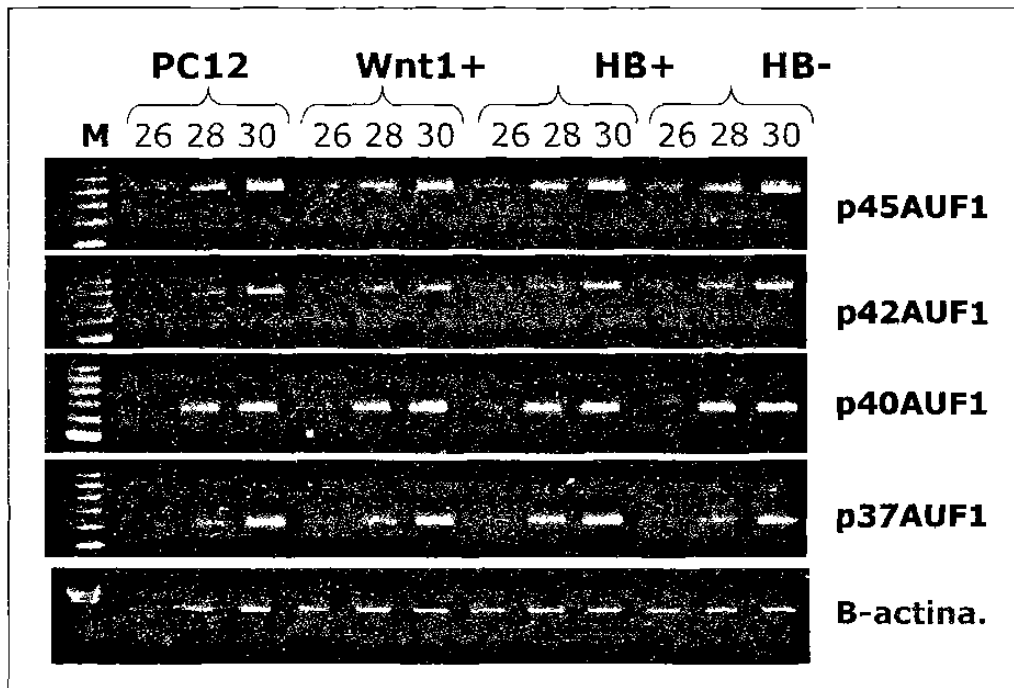


Figura 6. Resultado inicial del análisis de los niveles de ARNm de AUF1 por RT-PCR semicuantitativa. A partir de cDNA de las líneas celulares PC12 (PC12), PC12-Wnt1 (Wnt1), HB+ (HB+), HB- (HB-), y con los iniciadores *AUF1 Exon2 (004) / AUF1 Exon7 (006)* para p45AUF1, *AUF1 Delta2 (005) / AUF1 Exon7 (006)* para p42AUF1, *AUF1 Exon2 (004) / AUF1 Delta7 (007)* para p40AUF1 y *AUF1 Delta2 (005) / AUF1 Delta7 (007)* para p37AUF1.

Sin embargo, este resultado podría estar sesgado dada la posible abundancia de los ARNm aberrantes descritos en la sección anterior. Por ello, diseñamos una estrategia para analizar exclusivamente los ARNm funcionales de AUF1, es decir aquellos ARNm que contienen la región que invariablemente está ausente en los ARNm “aberrantes”. En la **Figura 7** se esquematiza el alineamiento de las secuencias nucleotídicas a partir del codón de iniciación de la traducción de la isoformas funcionales de AUF1 y de los candidatos “aberrantes” aislados. El rectángulo vertical señala la región que invariablemente está ausente en los fragmentos de ADN de los candidatos “aberrantes”. Diseñamos, dentro de esta región, un iniciador específico (flecha amarilla), denominado iniciador “funcional”. Este iniciador “funcional” es complementario sólo a secuencias nucleotídicas presentes en los ARNm funcionales de AUF1. La combinación del iniciador “funcional” con el iniciador AUF1exon7 (flechas rojas) permite amplificar las isoformas funcionales p45 y p42, mientras que la combinación del iniciador “funcional” y del iniciador AUF1Delta7 (flechas verdes) amplifica fragmentos de las isoformas funcionales p40 y p37.

El resultado de los ensayos de RT-PCR semicuantitativa para determinar el efecto de la expresión de Wnt1 sobre los niveles de los ARNm funcionales de las isoformas AUF1 se muestra en la **Figura 8**. Encontramos que, en relación a la línea celular PC12, los niveles de los ARNm funcionales de las 4 isoformas AUF1 están incrementados en las líneas celulares PC12-Wnt1, HB+ y HB-. El análisis densitométrico de los ensayos de RT-PCR semicuantitativa (**Figura 9** y **Figura 10**) revela los siguientes incrementos: para la isoforma p45, de alrededor de 1.8 veces; para la isoforma p42, de alrededor de 1.7 veces; para la isoforma p40, de alrededor de 14 veces; para la isoforma p37, de alrededor de 6 veces. Estos resultados indican que Wnt1 regula positivamente, y en diferente grado, los niveles de los ARNm funcionales de las isoformas AUF1. Asimismo, estos resultados, revelan que la expresión constitutiva de Wnt1 no es necesaria para mantener elevados los niveles de los ARNm funcionales de AUF1 (resultados utilizando el cDNA de la línea celular HB-).

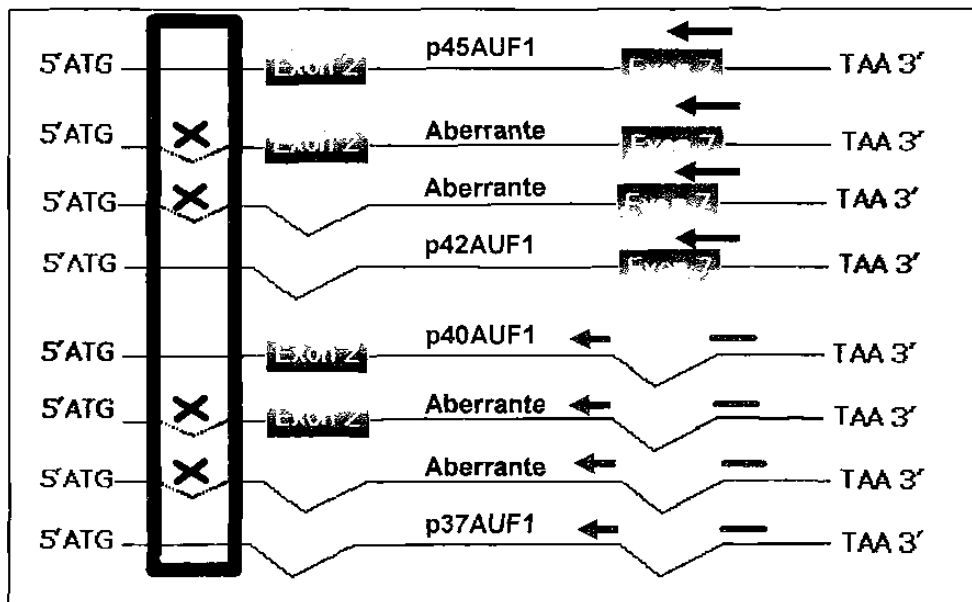


Figura 7. Estrategia para amplificar, por RT-PCR, los ARNm funcionales de las isoformas de AUF1. Se representan los marcos de lectura, desde el codon ATG de inicio de la traducción hasta el codon TAA de término de la traducción, de los ARNm funcionales de las isoformas p45AUF1, p42AUF1, p40AUF1 y p37AUF1. Los ARNm aberrantes se identifican por la palabra Aberrante, localizada inmediatamente arriba de la línea sólida que representa al marco de lectura correspondiente. El iniciador 5' funcional se representa con una flecha amarilla. Las flechas rojas indican los iniciadores que permiten amplificar las isoformas conteniendo el exón 7. Las flechas verdes indican los iniciadores que permiten amplificar las isoformas que carecen del exón 7. La cruz roja indica que el iniciador 5' funcional no puede hibridar con, y por lo tanto no amplificará, los ARNm "aberrantes".

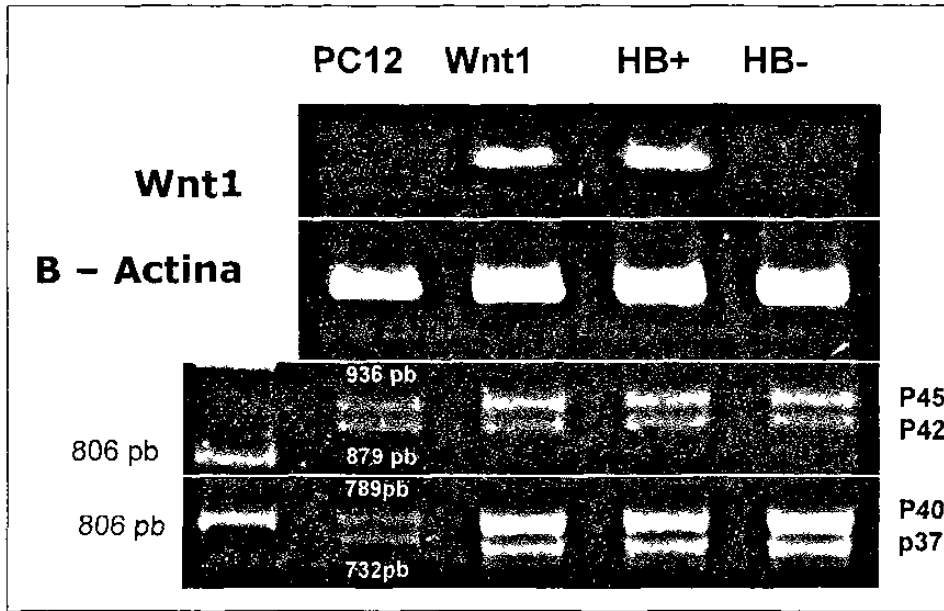


Figura 8. Efecto de *wnt1* sobre los niveles del ARNm de las isoformas funcionales de AUF1. Las bandas de ADN amplificadas corresponden al ARNm del oncogene *Wnt1* (*Wnt1*), β -actina (*B-actina*) y de las isoformas funcionales de AUF1 (P45, P42, P40 y P37). Los cDNAs utilizados provienen de las líneas celulares PC12 (PC12), PC12-WNT1 (*Wnt1*), HB+ (HB+) y HB- (HB-). 806 pb indica la posición de la banda de este tamaño presente en los marcadores de tamaño de ADN utilizados (λ /PstI). 936pb, 879pb, 789pb y 732pb indican los tamaños de los fragmentos amplificados por RT-PCR de las isoformas p45, p42, p40 y p37, respectivamente.

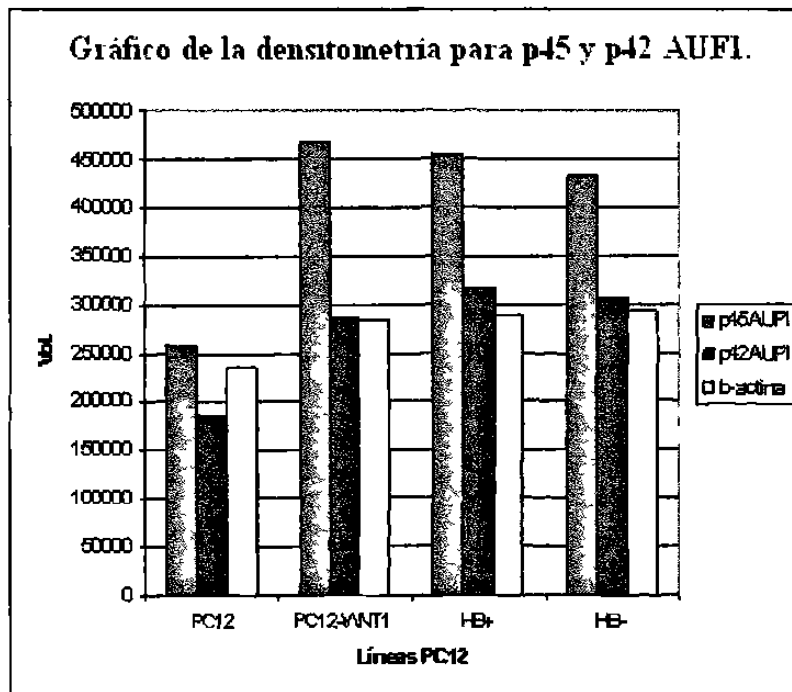


Figura 9. Análisis densitométrico de las bandas de ADN amplificadas al analizar por RT-PCR (Figura 8) los niveles de los ARNm funcionales de las isoformas p45AUF1 (barras azules), p42AUF1 (barras magenta) y b-actina (barras amarillas), en las líneas celulares PC12, PC12-WNT1, HB+ y HB-. Se grafica, en unidades arbitrarias asignadas por el programa PHORETIX 1D, el volumen (Vol) de cada una de las bandas de ADN amplificadas de p45 y p42 AUF1, en las distintas líneas celulares.

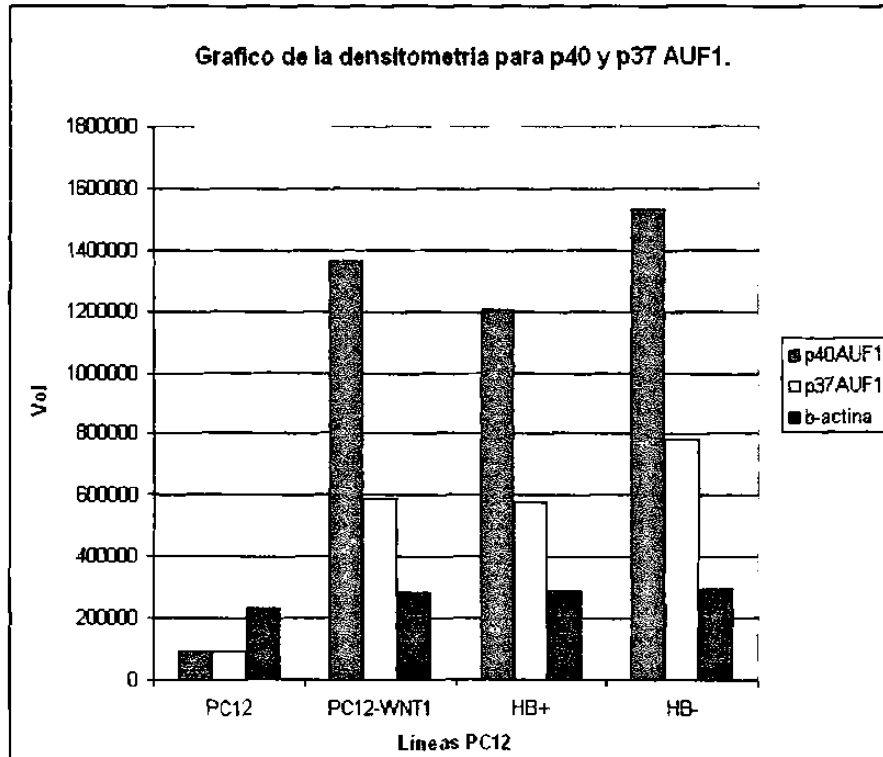


Figura 10. Análisis densitométrico de las bandas de ADN amplificadas al analizar por RT-PCR (Figura 8) los niveles de los ARNm funcionales de las isoformas p40AUF1 (barras azules), p37AUF1 (barras amarillas) y b- actina (barras magenta), en las líneas celulares PC12, PC12-WNT1, HB+ y HB-. Se grafica, en unidades arbitrarias asignadas por el programa PHORETIX 1D, el volumen (Vol) de cada una de las bandas de ADN amplificadas de p40 y p37 AUF1, en las distintas líneas celulares.

4.4 Wnt1 regula diferencialmente los niveles de los ARNm de las proteínas que unen ARN (RBPs) HuR, KSRP y TTP.

Analizamos, por RT-PCR semicuantitativa, los niveles de los ARNm de las proteínas TTP, KSRP y HuR (Figura 11). El análisis densitométrico de las bandas de ADN (Figura 12), indica que los niveles del ARNm de las proteínas TTP y KSRP no son afectados por la expresión constitutiva del oncogén Wnt1, (comparar PC12 contra PC12-Wnt1, HB+ y HB-). Por otro lado, de acuerdo con el análisis densitométrico, encontramos que la expresión de Wnt1 resulta en un ligero incremento, de aproximadamente 80%, en los niveles del ARNm de HuR (comparar PC12 contra PC12-Wnt1, y HB+). La expresión constitutiva de Wnt1 no es necesaria para mantener elevados estos niveles (comparar PC12-Wnt1 y HB+ contra PC12). Estos resultados coinciden con lo reportado por Briata y colaboradores (49), quienes encontraron que la activación de la vía clásica wnt, en la línea celular α T3, no modifica los niveles de los ARNm de TTP y KSRP, pero sí resulta en un incremento en los niveles del ARNm de HuR.

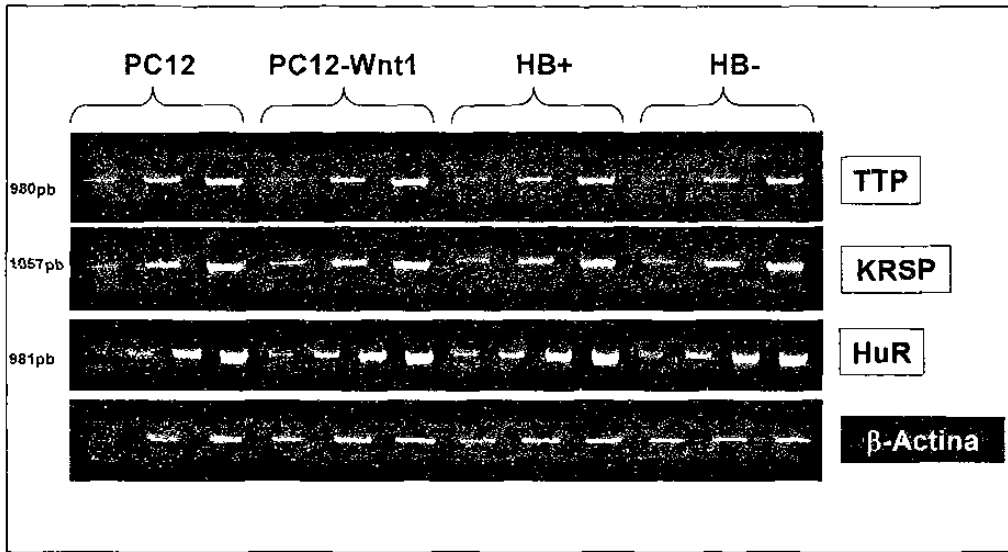


Figura 11. Análisis, por RT-PCR semicuantitativa, de los niveles del ARNm de las proteínas TTP, KRSP y HuR, en las líneas celulares PC12 (PC12), PC12-WNT1 (PC12-Wnt1), HB+ (HB+) y HB- (HB-). Se muestra, como control interno, el análisis por RT-PCR semicuantitativa, de los niveles del ARNm de b-actina (β-actina). Los ciclos utilizados para la RT-PCR semicuantitativa fueron: 26, 28 y 30 para b-actina, 28, 30 y 32 para TTP, 24, 26 y 28 para KRSP y 29, 31, 33 y 35 para HuR.

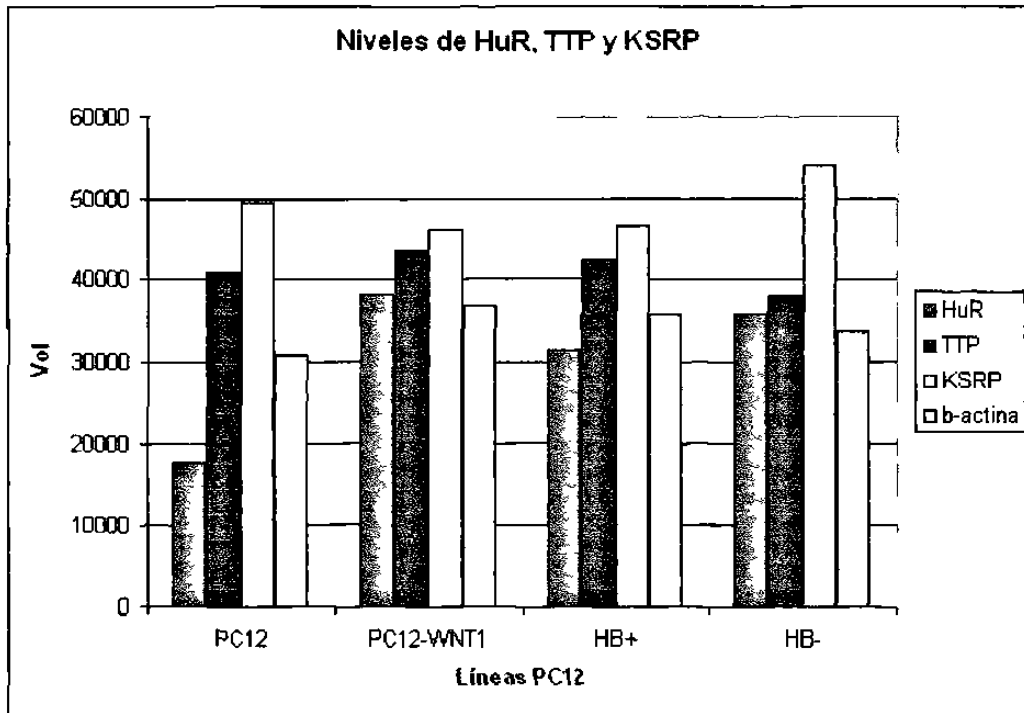


Figura 12. Análisis densitométrico de las bandas de ADN amplificadas al analizar por RT-PCR semicuantitativa (Figura 11) los niveles del ARNm de las proteínas HuR (barras azules), TTP (barras magenta), KSRP (Barras amarillas) y beta-actina (Barras grises) en las líneas celulares PC12, PC12-WNT1, HB+ y HB-. Se grafica, en unidades arbitrarias asignadas por el programa PHORETIX 1D, el volumen (Vol) de cada una de las bandas de ADN amplificadas de HuR, TTP y KSRP en las distintas líneas celulares.

CAPITULO V

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

El nivel de expresión de un gene dado está determinado por la acción concertada de varios mecanismos de regulación. Estos mecanismos de regulación están, a su vez, influenciados por las condiciones del entorno celular. Por ejemplo, por la presencia de factores de crecimiento que inciden sobre la expresión diferencial de genes para responder a las demandas del medio, como son la proliferación, la diferenciación celular y la muerte celular programada.

Este trabajo experimental de tesis se enfoca al estudio de la relación entre la denominada vía canónica Wnt, una vía de transducción de señales, y la expresión, a nivel del ARNm, de las isoformas de la proteína AUF1. Estas isoformas están involucradas en la desestabilización de los ARNm que contienen, en la región 3'utr, secuencias ricas en adenina y uracilo (AU-rich elements, AREs, por sus siglas en inglés). La unión de las proteínas AUF1 a los ARE dispara la degradación del ARNm. Los elementos ARE han sido identificados en la región 3'utr del ARNm de varios protooncogenes, como c-myc, fos, c-jun. La regulación de la estabilidad del ARNm contribuye, de manera importante, a la regulación fina de la expresión de estos genes.

Nuestro trabajo generó tres observaciones originales: 1) el oncogén wnt1 regula positivamente los niveles del ARNm de las 4 isoformas reportadas de AUF1. Además, encontramos que la expresión constitutiva de wnt1 no es necesaria para mantener elevados los niveles de los ARN mensajeros de las isoformas p45, p42, p40 y p37; 2) aislamos y secuenciamos el marco de lectura contenido en ARN mensajeros que denominamos ARNm “aberrantes” de AUF1. Estos marcos de lectura carecen de una región, de extensión variable, localizada río abajo del codón de inicio de la traducción, lo cual cambia el marco de lectura, resultando en la aparición de codones de terminación prematuros; 3) detectamos el marco de lectura de una probable nueva isoforma de AUF1, a la cual hemos denominado p26AUF1, en base a su peso molecular estimado.

5.1 ARNm aberrantes de AUF1.

Nuestro objetivo inicial fue determinar el efecto de la expresión del oncogén wnt1 sobre los niveles del ARNm de las isoformas de la proteína AUF1. Diseñamos iniciadores específicos para, por RT-PCR, aislar los marcos de lectura de las isoformas AUF1. Los fragmentos de ADN amplificados fueron clonados y secuenciados. De manera inesperada, todos los candidatos carecen de una región, de extensión variable, cerca del codón de inicio de la traducción. Esto tiene como consecuencia, a excepción del candidato #5, cambios en el marco de lectura y la aparición de codones de terminación de la traducción prematuros.

La presencia de codones de terminación prematuros normalmente está asociada con la degradación rápida del ARNm, a través del mecanismo conocido como Degradación de ARNm mediada por codones sin sentido (Non sense Mediated mRNA Decay, NMD, por sus siglas en inglés). Este mecanismo de vigilancia (“surveillance”) tiene como función eliminar todo los ARNm aberrantes que codifican para proteínas truncadas o aberrantes, las cuales pueden ser tóxicas para la célula. Los ARNm conteniendo codones de terminación prematuros pueden escapar a este mecanismo de vigilancia si los codones sin sentido se encuentran a una distancia menor de 55 pb río abajo del codón ATG, o bien si los codones sin sentido se encuentran a una distancia menor de 55b de una unión exón-exón.

Todos los candidatos analizados parecen escapar al mecanismo NMD. Por ejemplo, tres candidatos presentan codones sin sentido a 48b, 42b y 28b río abajo del codón AUG; dos candidatos presentan codones sin sentido a 27b y 18b río abajo, y tres candidatos presentan codones sin sentido a 10b, 11, y 21b, río arriba de una unión exón-exón (Figura 13).

Dado que de los 17 candidatos analizados ninguno corresponde a alguna de la isoformas reportadas (que denominamos isoformas “funcionales”) de AUF1, proponemos que los ARNm “aberrantes” de los candidatos identificados son más abundantes que los ARNm de las isoformas funcionales. De manera interesante, estos ARNm “aberrantes” también están sujetos a splicing alternativo como lo demuestra la presencia y/o ausencia de los exones 2 y 8 en los candidatos aislados.

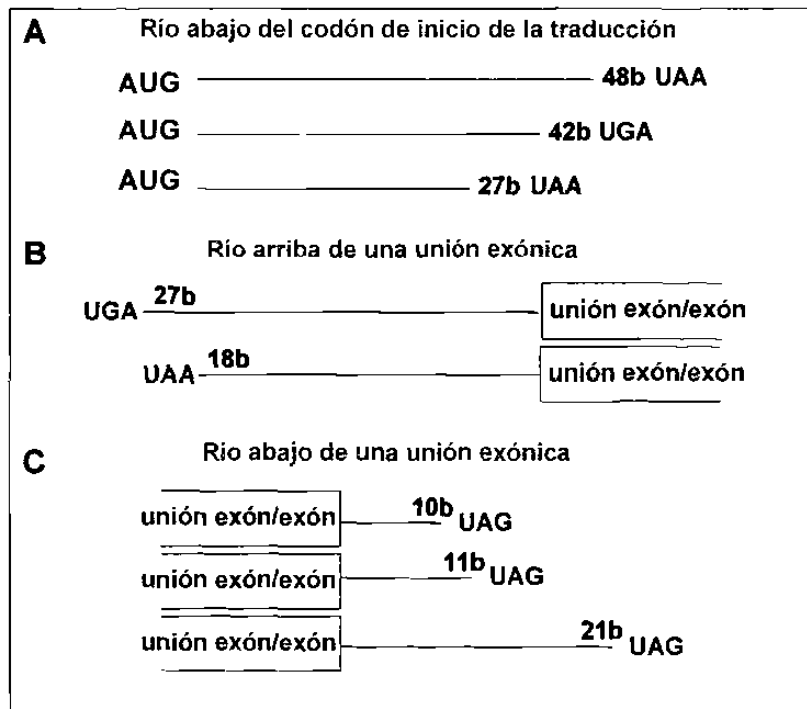


Figura 13 . Localización de los codones de terminación de la traducción prematuros. Se muestra la localización de codones de terminación de la traducción prematuros, presentes en los fragmentos de ADN amplificados a partir de ARNm “aberrantes” de AUF1, en relación al codón de inicio de la traducción (A), una unión exónica 3’ próxima (B) y a una unión exónica 5’ próxima (C). Se indican los números de bases que separan a los codones sin sentido del codón ATG y de las uniones exónicas 3’ y 5’.

5.2 ¿Influyen los ARNm “aberrantes” en la expresión de las isoformas funcionales de AUF1?

Esto podría ser posible. Se ha reportado que las AUF1 regulan la estabilidad de sus propios ARNm al unirse a secuencias ARE localizadas en la región 3'utr. Asumiendo que la única diferencia entre los ARNm “funcionales” y los ARNm “aberrantes” sea la presencia/ausencia de la región cercana al codón ATG, los ARNm “aberrantes” podrían influir sobre la cantidad de los ARNm funcionales, por ejemplo, al secuestrar proteínas, como las mismas AUF1, que se unen a la región 3'utr, previniendo, por tanto, la degradación rápida del ARNm.

La variación en la extensión de la delección cercana al codón ATG en los distintos candidatos, además de introducir codones de terminación prematuros, resulta en la presencia de un marco de lectura alternativo (ver Alineamiento extremo 5', pagina 24 - 25). En caso de ser traducidos, estos marcos de lectura podrían generar una serie de proteínas AUF1 que carecen de una secuencia variable de aminoácidos en el extremo amino, lo que afecta al dominio de oligomerización de las AUF1. Sin embargo, estas proteínas serían capaces de unir ARN, dada la presencia de los dos dominios de unión a ARN presentes en el marco de lectura. Por lo tanto, esta serie de proteínas podría regular negativamente la actividad de las proteínas AUF1 funcionales, ya que competiría por unión al ARNm pero no contribuirían a la degradación de éste ya que no podrían formar hexámeros, prerequisite para que las AUF1 disparen la degradación del ARNm.

5.3 p26AUF1: probable nueva isoforma AUF1.

El candidato número 5 presenta una delección río abajo del codón ATG (Figura 4). A diferencia de los otros candidatos “aberrantes”, la presencia de esta delección no resulta en la aparición de codones prematuros de terminación. El marco de lectura abierto codifica para una proteína de 268 aminoácidos que carece del dominio de oligomerización, pero contiene los dos dominios de unión a ARN propios de las proteínas AUF1. Por lo tanto, esta proteína podría actuar como un regulador negativo de la actividad de las isoformas funcionales AUF1, ya que puede unirse a ARN pero no formar un hexámero funcional capaz de disparar la degradación del ARNm.

5.4 Wnt1 regula positivamente los niveles de los ARNm de las isoformas p45, p42, p40 y p37.

Como estrategia inicial, para determinar el efecto de la expresión de wnt1 sobre los niveles de los ARNm de las isoformas AUF1, planteamos realizar ensayos de RT-PCR semicuantitativa utilizando juegos de iniciadores que amplifican, de manera independiente, cada uno de los cuatro ARNm de AUF1 (Figura 5). En estas condiciones, encontramos que wnt1 no altera los niveles de los ARNm funcionales de las isoformas AUF1. Sin embargo, como mencionamos arriba, la abundancia de los ARNm “aberrantes”, identificados en este trabajo, podría enmascarar el efecto de wnt1 sobre los niveles de los ARNm funcionales de AUF1.

La nueva estrategia se basó en el hecho de que los ARNm “aberrantes” carecen de una región, río abajo del codón de inicio de la traducción, que está presente en los ARNm “funcionales” de las isoformas AUF1. Diseñamos un iniciador, denominado iniciador “5’ funcional”, complementario a esta región y que por tanto es capaz de amplificar únicamente fragmentos correspondientes a los ARNm “funcionales”.

Empleando el oligo 5’ funcional, determinamos que *wnt1* regula positivamente los niveles de los ARNm “funcionales” de las isoformas AUF1 y que la expresión constitutiva de este oncogén no es necesaria para mantener niveles elevados de estos ARN mensajeros (Figura 8). De manera interesante, la expresión de *wnt1* afecta diferencialmente los niveles de los ARNm de las isoformas AUF1. En relación a la línea celular PC12, en el resto de las líneas celulares los niveles de los ARNm de las isoformas p45, p42, p40 y p37 se incrementan en 1.8, 1.7, 14 y 6 veces, respectivamente (Figura 9). Esto puede deberse a la combinación de la estabilidad intrínseca de cada ARNm y/o de la frecuencia de generación de cada ARNm por splicing alternativo.

5.5 Wnt1 afecta diferencialmente los niveles de los ARNm de las proteínas HuR, KSRP y TTP.

Al analizar, por RT-PCR semicuantitativa, el efecto de *wnt1* sobre los niveles de los ARNm de las proteínas HuR, KSRP y TTP, encontramos que la expresión del oncogén resulta en un ligero incremento (0.8 veces) en los niveles del ARNm de HuR (Figura 12). Asimismo, la expresión constitutiva de *wnt1* no es necesaria para mantener elevados los niveles de este ARNm. Por otro lado, encontramos, por ensayos de RT-PCR semicuantitativa, que la expresión de *wnt1* no afecta los niveles de los ARNm de las proteínas KSRP y TTP (Figura 12).

Estos resultados son idénticos a los reportados por Briata y colaboradores (49), quienes encontraron que, en células de ratón α T3, la expresión de *wnt1* resulta en un ligero incremento en los niveles del ARNm de HuR pero no afecta los niveles de los ARNm de las proteínas KSRP y TTP.

En conjunto, estos resultados indican que *wnt1* regula de manera diferencial los niveles de los ARNm de las proteínas que unen ARN (RNA Binding Proteins) AUF1, HuR, KSRP y TTP. Esto puede deberse a un efecto de *wnt1* a nivel de promotor y/o estabilidad de los ARNm correspondientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1.- You L, He B, Xu Z, Uematsu K, Mazieres J, Fujii N, Mikami I, Reguart N, McIntosh JK, Kashani-Sabet M, McCormick F, Jablons DM. An anti-Wnt-2 monoclonal antibody induces apoptosis in malignant melanoma cells and inhibits tumor growth. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5385-9. PMID: 15289346
- 2.-Goodall J, Martinozzi S, Dexter TJ, Champeval D, Carreira S, Larue L, Goding CR. Brn-2 expression controls melanoma proliferation and is directly regulated by beta-catenin. *Mol Cell Biol.* 2004 Apr;24(7):2915-22. PMID: 15024079
- 3.- Chen D, Xu W, Bales E, Colmenares C, Conacci-Sorrell M, Ishii S, Stavnezer E, Campisi J, Fisher DE, Ben-Ze'ev A, Medrano EE. SKI activates Wnt/beta-catenin signaling in human melanoma. *Cancer Res.* 2003 Oct 15;63(20):6626-34. PMID: 14583455
- 4.- Verras M, Brown J, Li X, Nusse R, Sun Z. Wnt3a growth factor induces androgen receptor-mediated transcription and enhances cell growth in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2004 Dec 15;64(24):8860-6. PMID: 15604245
- 5.- Chen G, Shukeir N, Potti A, Sircar K, Aprikian A, Goltzman D, Rabbani SA. Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer.* 2004 Sep 15;101(6):1345-56. PMID: 15316903
- 6.-Bejsovec A..*Cell.* 2005 Jan 14;120(1):11-4.
- 7.- Staal FJ, Clevers HC. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nat Rev Immunol.* 2005 Jan;5(1):21-30. PMID: 15630426
- 8.- Prunier C, Hocevar BA, Howe PH. Wnt signaling: physiology and pathology. *Growth Factors.* 2004 Sep;22(3):141-50. PMID: 15518237
- 9.-Clapper ML, Coudry J, Chang WC. beta-catenin-mediated signaling: a molecular target for early chemopreventive intervention. *Mutat Res.* 2004 Nov 2;555(1-2):97-105. PMID: 15476853
- 10.- Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science.* 2002 May 31;296(5573):1644-6. PMID: 12040179
- 11.- van de Wetering M, de Lau W, Clevers H. WNT signaling and lymphocyte development. *Cell.* 2002 Apr;109 Suppl:S13-9. PMID: 11983149

- 12.- van Noort M, Clevers H. TCF transcription factors, mediators of Wnt-signaling in development and cancer. *Dev Biol.* 2002 Apr 1;244(1):1-8. PMID: 11900454
- 13.- Heisenberg CP, Tada M. Wnt signalling: a moving picture emerges from van gogh. *Curr Biol.* 2002 Feb 19;12(4):R126-8. PMID: 11864583
- 14.- Huelsken J, Birchmeier W. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 2001 Oct;11(5):547-53. PMID: 11532397
- 15.- Luo W, Lin SC. Axin: a master scaffold for multiple signaling pathways. *Neurosignals.* 2004 May-Jun;13(3):99-113. PMID: 15067197
- 16.- Kishida S, Yamamoto H, Ikeda S, Kishida M, Sakamoto I, Koyama S, Kikuchi A. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem.* 1998 May 1;273(18):10823-6. PMID: 9556553
- 17.- Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J.* 1998 Mar 2;17(5):1371-84. PMID: 9482734
- 18.- Hsu W, Zeng L, Costantini F. Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. *J Biol Chem.* 1999 Feb 5;274(6):3439-45. PMID: 9920888
- 19.- Woodgett JR. Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Sci STKE.* 2001 Sep 18;2001(100):RE12. PMID: 11579232
- 20.- Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem.* 1997 Oct 3;272(40):24735-8. PMID: 9312064
- 21.- Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW. The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro. *Genes Dev.* 1999 Feb 1;13(3):270-83. PMID: 9990852
- 22.- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 1997 Jul 1;16(13):3797-804. PMID: 9233789
- 23.- Orsulic S, Peifer M. An in vivo structure-function study of armadillo, the beta-catenin homologue, reveals both separate and overlapping regions of the protein required for cell adhesion and for wingless signaling. *J Cell Biol.* 1996 Sep;134(5):1283-300. PMID: 8794868

- 24.- Schneider S, Steinbeisser H, Warga RM, Hausen P. Beta-catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. *Mech Dev.* 1996 Jul;57(2):191-8. PMID: 8843396
- 25.- Waterman ML. Lymphoid enhancer factor/T cell factor expression in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004 Jan-Jun;23(1-2):41-52. PMID: 15000148
- 26.- Atcha FA, Munguia JE, Li TW, Hovanes K, Waterman ML. A new beta-catenin-dependent activation domain in T cell factor. *J Biol Chem.* 2003 May 2;278(18):16169-75. PMID: 12582159
- 27.- Van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, Ypma A, Hursh D, Jones T, Bejsovec A, Peifer M, Mortin M, Clevers H. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell.* 1997 Mar 21;88(6):789-99. PMID: 9118222
- 28.- Omer CA, Miller PJ, Diehl RE, Kral AM. Identification of Tcf4 residues involved in high-affinity beta-catenin binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Mar 24;256(3):584-90. PMID: 10080941
- 29.- Brantjes H, Barker N, van Es J, Clevers H. TCF: Lady Justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling. *Biol Chem.* 2002 Feb;383(2):255-61. PMID: 11934263
- 30.- Giese K, Amsterdam A, Grosschedl R. DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1. *Genes Dev.* 1991 Dec;5(12B):2567-78. PMID: 1752444
- 31.- Clevers H, van de Wetering M. TCF/LEF factor earn their wings. *Trends Genet.* 1997 Dec;13(12):485-9. PMID: 9433138
- 32.- Riese J, Yu X, Munneryn A, Eresh S, Hsu SC, Grosschedl R, Bienz M. LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic. *Cell.* 1997 Mar 21;88(6):777-87. PMID: 9118221
- 33.- Ashihara K, Saito T, Mizumoto H, Nishimura M, Tanaka R, Kudo R. Mutation of beta-catenin gene in endometrial cancer but not in associated hyperplasia. *Med Electron Microsc.* 2002 Mar;35(1):9-15. PMID: 12111402
- 34.- Machin P, Catusus L, Pons C, Munoz J, Matias-Guiu X, Prat J. CTNNB1 mutations and beta-catenin expression in endometrial carcinomas. *Hum Pathol.* 2002 Feb;33(2):206-12. PMID: 11957146
- 35.- Waltzer L, Bienz M. The control of beta-catenin and TCF during embryonic development and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(2):231-46. PMID: 10728986

- 36.- Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science*. 1997 Mar 21;275(5307):1784-7. PMID: 9065401
- 37.- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998 Sep 4;281(5382):1509-12. PMID: 9727977
- 38.- Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999 Apr 1;398(6726):422-6. PMID: 10201372
- 39.- Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Feb 16;96(4):1603-8. PMID: 9990071
- 40.- Audic Y, Hartley RS. Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol Cell*. 2004 Sep;96(7):479-98. PMID: 15380615
- 41.- Wagner BJ, DeMaria CT, Sun Y, Wilson GM, Brewer G. Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics*. 1998 Mar 1;48(2):195-202. PMID: 9521873
- 42.- : Raineri I, Wegmueller D, Gross B, Certa U, Moroni C. Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucleic Acids Res*. 2004 Feb 19;32(4):1279-88. PMID: 14976220
- 43.- Arao Y, Kikuchi A, Kishida M, Yonekura M, Inoue A, Yasuda S, Wada S, Ikeda K, Kayama F. Stability of A+U-rich element binding factor 1 (AUF1)-binding messenger ribonucleic acid correlates with the subcellular relocalization of AUF1 in the rat uterus upon estrogen treatment. *Mol Endocrinol*. 2004 Sep;18(9):2255-67. PMID: 15192077
- 44.- Wilson GM, Lu J, Sutphen K, Sun Y, Huynh Y, Brewer G. Regulation of A + U-rich element-directed mRNA turnover involving reversible phosphorylation of AUF1. *J Biol Chem*. 2003 Aug 29;278(35):33029-38. PMID: 12819195
- 45.- Sarkar B, Xi Q, He C, Schneider RJ. Selective degradation of AU-rich mRNAs promoted by the p37 AUF1 protein isoform. *Mol Cell Biol*. 2003 Sep;23(18):6685-93. PMID: 12944492
- 46.- Shchors K, Yehiely F, Kular RK, Kotlo KU, Brewer G, Deiss LP. Cell death inhibiting RNA (CDIR) derived from a 3'-untranslated region binds AUF1 and heat shock protein 27. *J Biol Chem*. 2002 Dec 6;277(49):47061-72. PMID: 12356764

- 47.- Lapucci A, Donnini M, Papucci L, Witort E, Tempestini A, Bevilacqua A, Nicolin A, Brewer G, Schiavone N, Capaccioli S. AUF1 Is a bcl-2 A + U-rich element-binding protein involved in bcl-2 mRNA destabilization during apoptosis. *J Biol Chem.* 2002 May 3;277(18):16139-46. PMID: 11856759
- 48.- Gouble A, Grazide S, Meggetto F, Mercier P, Delsol G, Morello D. A new player in oncogenesis: AUF1/hnRNPd overexpression leads to tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer Res.* 2002 Mar 1;62(5):1489-95. PMID: 11888925
- 49.- Briata P, Ilengo C, Corte G, Moroni C, Rosenfeld MG, Chen CY, Gherzi R. The Wnt/beta-catenin-->Pitx2 pathway controls the turnover of Pitx2 and other unstable mRNAs. *Mol Cell.* 2003 Nov;12(5):1201-11. PMID: 14636578
- 50.- Behm-Ansmant I, Izaurralde E. Quality control of gene expression: a stepwise assembly pathway for the surveillance complex that triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 2006 Feb 15;20(4):391-8. PMID: 16481468
- 51.- Conti E, Izaurralde E. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr Opin Cell Biol.* 2005 Jun;17(3):316-25. PMID: 15901503
- 52.- Lejeune F, Maquat LE. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2005 Jun;17(3):309-15. PMID: 15901502
- 53.- Weischenfeldt J, Lykke-Andersen J, Porse B. Messenger RNA surveillance: neutralizing natural nonsense. *Curr Biol.* 2005 Jul 26;15(14):R559-62. PMID: 16051166
- 54.- Sambrook J and Russell DW. *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor Press (2001).

