

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



"PAPEL DE LA REGION 3'UTR EN LA ACUMULACION
DEL RNA MENSAJERO DE VEGF-D EN CELULAS PC12
QUE EXPRESAN CONSTITUTIVAMENTE
EL ONCOGEN WNT-1"

Por

Q.F.B. MARGARITA DE LA LUZ MARTINEZ FIERRO

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

Octubre, 2005

2005

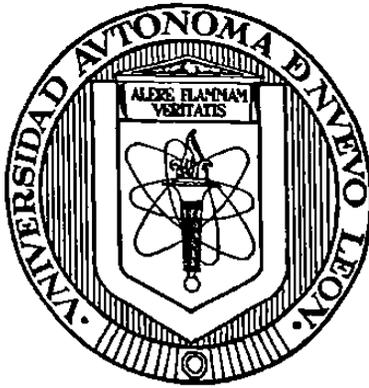
TM
RC267
.M3
2005
c.1

O.F.B. MARCABRITA DE LA LUZ MARTINEZ FIERRO



1080128034

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**“PAPEL DE LA REGIÓN 3’UTR
EN LA ACUMULACIÓN DEL RNA MENSAJERO DE VEGF-D
EN CÉLULAS PC12 QUE EXPRESAN CONSTITUTIVAMENTE
EL ONCOGEN WNT-1”**

Por

Q.F.B. MARGARITA DE LA LUZ MARTÍNEZ FIERRO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Octubre, 2005

TM
RC27
.M3
005

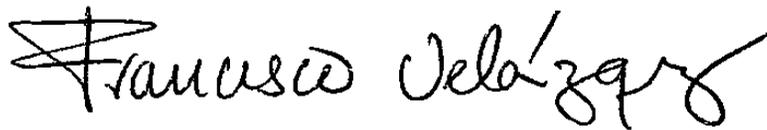


*“Si has construido un castillo en el aire, no has perdido el tiempo, es allí donde debería estar....
Ahora debes construir los cimientos debajo de él.”*

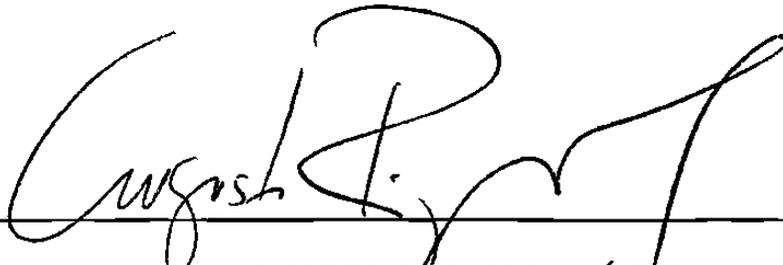
George Bernard Shaw

**“PAPEL DE LA REGIÓN 3’UTR EN LA ACUMULACIÓN DEL RNA MENSAJERO
DE VEGF-D EN CÉLULAS PC12 QUE EXPRESAN CONSTITUTIVAMENTE EL
ONCOGEN WNT-1”**

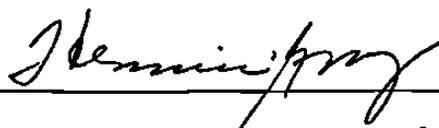
Aprobación de la tesis:



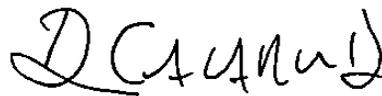
DR. JUAN FRANCISCO VELÁZQUEZ VADILLO.
Director de Tesis.



DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ.
Co-Director de Tesis.

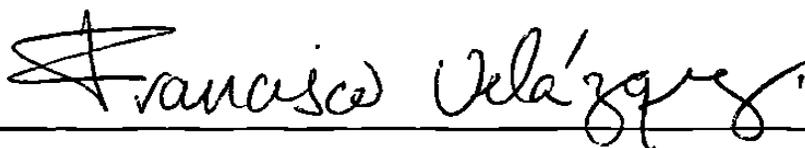


DRA. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ.
Co-Director de Tesis.



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

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección del Dr. Juan Francisco Velázquez Vadillo y la Co-Dirección del Dr. Augusto Rojas Martínez y la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez.

A handwritten signature in black ink, reading "Francisco Velázquez", written over a horizontal line.

DR. JUAN FRANCISCO VELÁZQUEZ VADILLO
Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

*A*l ser opcional, es difícil tomar la decisión de escribir esta página; sin embargo, por ser una ocasión especial, es bueno de vez en cuando ser agradecido con la vida y reconocer que hay alguien que mueve de manera perfecta las situaciones, las personas y los tiempos para que cada quien esté donde tenga que estar... *Gracias Dios.*

Familia.. ¿Qué más les puedo decir? Gracias por seguir impulsando mis locuras.

A los ejemplos de vida; los encargados del diseño del menú principal, que les ha tocado la divertida tarea de poner en bandeja de plata, de mostrar y dejarme elegir, lo que se debe hacer y de una manera indirecta todo aquello lo que no quiero ser... A mis profesores Gracias.

A los idealistas renegados que aún creen en la existencia de un sistema en el que se pueda hacer Ciencia a Conciencia y no por Sobrevivencia Personal... Edith, Iram, Cristian, Mary... Gracias.

A la gran familia de la ULIÆG (2003-2005), por la muy peculiar y amplia gamma de personalidades que hacen de este lugar el mejor modelo experimental para estudios de evasión de la apoptosis y respuesta a estrés ambiental.... Gracias a todos.

Por último gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico recibido.

CONTENIDO

	PÁGINA
CONTENIDO	i
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	iv
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	
1.1	1
1.2	2
1.2.1	4
1.2.2	3
1.2.3	3
1.2.4	5
1.2.5	6
1.2.6	8
1.2.6.1.	10
1.2.7	10
1.3	12
1.4	13
1.5	14
1.6	14
CAPÍTULO II. OBJETIVOS	
2.1	15
2.2	15

CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1	Esquema General de Trabajo	16
3.1.1	Estrategia Experimental por Objetivo	17
3.2	Material y Reactivos	18
3.3	Equipo	21
3.4	Microorganismos utilizados	22
3.5	Ácidos Nucleicos	22
3.5.1	Oligonucleótidos.	22
3.5.2	Marcadores de Peso Molecular.	24
3.5.3	Vectores plasmídicos Comerciales.	24
3.5.4	Vectores de expresión contruidos en el curso del trabajo experimental.	26
3.6	Métodos.	31
3.6.1	Reacción en Cadena de la Polimerasa.	31
3.6.1.1.	Retrotranscripción.	32
3.6.1.2.	PCR Clásica.	33
3.6.1.3.	PCR Largo.	34
3.6.1.4.	PCR Semicuantitativa.	36
3.6.1.5.	PCR RACE.	37
3.6.2	Aislamiento de DNA plasmídico por el método de Lisis Alcalina.	41
3.6.3	Purificación de DNA a partir de Geles de Agarosa.	43
3.6.4	Purificación de productos de PCR.	45
3.6.5	Digestión de DNA con endonucleasas de restricción.	45
3.6.6	Reacción de Ligación con T4 DNA ligasa.	46
3.6.7	Preparación y Transformación de competentes: Método del CaCl ₂ .	46
3.6.8	Secuenciación de Ácidos Nucleicos.	48
3.6.9	Transfección.	51
3.6.10	Ensayo de Actividad de Luciferasa.	52

CAPÍTULO IV. RESULTADOS	
4.1	Comprobación del sistema celular como un modelo de estudio para investigar la relación de <i>wnt1</i> en la acumulación del RNAm de VEGF-D 57
4.2	Aislamiento y secuenciación de la región 3'UTR de VEGF-D expresado en células PC12- <i>wnt1</i> 57
4.3	Identificación de secuencias relacionadas con estabilidad del RNAm. 65
4.4	Caracterización funcional de la región 3'UTR del RNAm de VEGF-D. 65
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN 84	
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES 87	
CAPÍTULO VII. PERSPECTIVAS 88	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 89	
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO 99	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Factores involucrados en la angiogénesis.	7
Tabla 2.	Oligonucleótidos específicos utilizados durante la investigación.	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema general de la proteína wnt.	2
Figura 2.	Vía de señalización wnt.	4
Figura 3.	Representación esquemática de las interacciones entre la familia VEGF/VEGFR.	9
Figura 4.	Esquema general de trabajo.	16
Figura 5.	Mapas de los plásmidos pGEMT-easy y pUSEamp(+)-wnt1	25
Figura 6.	Mapas de los plásmidos pGL3-Basic y pRL-CMV	26
Figura 7.	Representación esquemática de la construcción del vector pMF-CMV	26
Figura 8.	Mapas de los vectores de expresión pMF1-Drc, pMF2-Dm y pMF3-Dh	28
Figura 9.	Mapas de los vectores pMF4-rmyc y pMF5-r β	29
Figura 10.	Mapas de los vectores pMF6-3UTRDrl y pMF7-3UTRDro	29
Figura 11.	Construcción de los vectores pMF1, pMF6 y pMF7- Δ .	30
Figura 12.	Diagrama de flujo para la amplificación de la región 3'UTR por SMART RACE	38
Figura 13.	Amplificación de wnt1	54
Figura 14.	PCRs semicuantitativas	56
Figura 15.	Amplificación de las regiones 5' y 3'UTR del receptor de la transferrina	57
Figura 16.	Producto 3'RACE de VEGF-D	58
Figura 17.	Caracterización del fragmento obtenido por PCR-RACE	58
Figura 18.	PCR anidada	59
Figura 19.	Purificación del fragmento obtenido por PCR anidada	60
Figura 20.	Secuencia completa de la región 3'UTR de VEGF-D.	60
Figura 21.	Alineamiento de la secuencia parcial reportada para la región 3'UTR de VEGF-D con la secuencia obtenida.	61
Figura 22.	Amplificación de la región 3'UTR de VEGF-D a partir de DNAp de la	62

clona CK473815.

Figura 23.	Secuencia completa de la región 3'UTR de VEGF-D obtenida partir de DNAp de la clona CK473815.	62
Figura 24.	Alineamiento de la secuencia parcial reportada para la región 3'UTR de VEGF-D con la secuencia obtenida.	63
Figura 25.	Amplificación de la región 3'UTR larga de VEGF-D en el sistema celular PC12.	65
Figura 26.	Construcción de vector de expresión eucariótico.	66
Figura 27.	Caracterización de clonas candidatas (1-6) para el plásmido pMF-CMV.	66
Figura 28.	Amplificación de las diferentes regiones 3'UTRs.	69
Figura 29.	Caracterización de clonas candidatas por digestión enzimática	69
Figura 30.	PCR Largo para deletar las repeticiones CT's de las regiones 3UTR de VEGF-D.	70
Figura 31.	Caracterización de Candidatos de pMF1-Δ, pMF6-Δ, pMF7-Δ por digestión enzimática.	71
Figura 32.	Secuencia completa de la región 3UTR de VEGF-D de ratón obtenida a partir de DNAp de la clona comercial NM_010216	72
Figura 33.	Alineamiento 3'UTR de VEGF-D de ratón y la región 3'UTR de VEGF-D de la clona NM_010216.	72
Figura 34.	Secuencia completa de la región 3UTR de VEGF-D de humano obtenida a partir de DNAp de la clona comercial BC027948.	73
Figura 35.	Alineamiento 3'UTR de VEGF-D de humano y la región 3'UTR de VEGF-D de la clona BC027948.	74
Figura 36.	Secuencia completa de la región 3'UTR de c-myc de rata.	75
Figura 37.	Alineamiento de la región 3'UTR de c-myc de rata obtenida y la región 3'UTR de c-myc con número de acceso NM_012603.	75
Figura 38.	Secuencia completa de la región 3UTR β actina de rata.	76
Figura 39.	Alineamiento de las regiones 3UTR β-actina de rata (obtenida y reportada).	76
Figura 40.	Efecto de la región 3'UTR corta de VEGF-D de rata sobre la expresión de Luciferasa.	79
Figura 41.	Efecto de de la región 3'UTR de VEGF-D de ratón sobre la expresión de Luciferasa.	80
Figura 42.	Efecto de de la región 3'UTR de VEGF-D de humano sobre la expresión de Luciferasa.	81
Figura 43.	Efecto de la región 3'UTR larga de VEGF-D de rata sobre la expresión de Luciferasa.	82
Figura 44.	Comparación de los niveles de actividad de <i>Luciferasa</i> de las regiones 3'UTR de VEGF-D de rata (región larga), ratón y humano en el sistema celular PC12.	83

LISTA DE ABREVIATURAS

CMV	Citomegalovirus.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DNAc	DNA complementario.
DNAp	DNA plasmidico.
dNTP's	Desoxinucleotidos trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético.
Et/Br	Bromuro de etidio.
g	gramos.
h	Horas.
kb	Kilobases.
M	Molaridad.
mg	Miligramos.
min	minutos.
ml	Mililitros.
mM	Milimolar.
mQ	Agua ultrapura (NANO pore).
µg	Microgramos.
µl	Microlitros.
µM	Micromolar.
NaCl	Cloruro de sodio.
ng	Nanogramos.

ORF	Marco de lectura abierto (siglas en inglés).
pb	Pares de bases nucleotídicas.
PCBP's	Proteínas de unión a poli citosinas (siglas en inglés).
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos (siglas en inglés).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés).
pH	Potencial de hidrógeno.
pMF1-3UTRDrc	Plásmido que contiene la región 3'UTR corta de VEGF-D de rata obtenida a partir de DNAC de células PC12HB*.
pMF2-3UTRDm	Plásmido que contiene la región 3'UTR VEGF-D de ratón obtenida a partir de DNAp de clona comercial.
pMF3-3UTRDh	Plásmido que contiene la región 3'UTR VEGF-D de humano obtenida a partir de DNAp de clona comercial.
pMF4-3UTRrmyc	Plásmido que contiene la región 3'UTR c-myc de rata obtenida a partir de DNAC de células PC12HB*.
pMF5-3UTRr β	Plásmido que contiene la región 3'UTR β -actina de rata obtenida a partir de DNAC de células PC12HB*.
pMF6-3UTRDrl	Plásmido que contiene la región 3'UTR VEGF-D de rata secuencia larga obtenida a partir de clona comercial.
pMF7-3UTRDro	Plásmido que contiene la región 3'UTR VEGF-D de rata secuencia larga, obtenida a partir de DNAC de células PC12HB*.
pMF1- Δ	Plásmido que contiene la secuencia corta de la región 3'UTR de VEGF-D de rata con las repeticiones CU's deletadas.

pMF6-Δ	Plásmido que contiene la secuencia larga de la región 3'UTR de VEGF-D de rata con las repeticiones CU's deletadas. Obtenido a partir del plásmido pMF6-3UTRDrl.
pMF7-Δ	Plásmido que contiene la secuencia larga de la región 3'UTR de VEGF-D de rata con las repeticiones CU's deletadas. Obtenido a partir del plásmido pMF7-3UTRDro.
poli-A	Poliadenilación.
RNA	Ácido ribonucleico.
rpm	Revoluciones por minuto.
RT	Retrotranscripción.
s	Segundos.
SNC	Sistema Nervioso Central.
TBE	Tris-borato-EDTA.
TRF	Receptor de transferrina.
TSH	Hormona estimuladora de la tiroides.
U	Unidades internacionales.
3'UTR	Región 3' no traducida (siglas en inglés).
UV	Ultravioleta.
V	Voltios.
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (siglas en inglés).

RESUMEN

Q.F.B. Margarita de la Luz Martínez Fierro

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina.

Fecha de graduación: Octubre de 2005.

Área de Estudios: Biología Molecular.

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

Número de páginas: 99

Título del estudio: "Papel de la región 3'UTR en la acumulación del RNA mensajero de VEGF-D en células PC12 que expresan constitutivamente el oncogen *wnt-1*".

Introducción. La vía Wnt tiene un papel clave en el desarrollo normal al favorecer el crecimiento y la diferenciación celular y en condiciones de desregulación, participa en la oncogénesis. Estudios en fibroblastos de ratón indican que la β -catenina regula negativamente el RNAm de VEGF-D, al favorecer su degradación mediante un elemento desestabilizador tipo ARE, localizado en su región 3'UTR. Resultados en nuestro laboratorio en células PC12, que expresan constitutivamente *wnt1*, contrastan con este reporte, observándose una acumulación del RNAm de VEGF-D cuando la vía Wnt está activa. Una explicación a este suceso puede ser la presencia de repeticiones de CT's, en la región 3'UTR de VEGF-D de rata y ausentes en las regiones 3'UTR de VEGF-D de ratón y de humano,

Objetivo. Determinar si la región 3'UTR del RNAm de VEGF-D de rata participa en la acumulación del transcrito correspondiente en células PC12 que expresan constitutivamente el oncogen *Wnt1*.

Material y Métodos: A partir de clonas comerciales de DNAc, se secuenció la región 3'UTR del RNAm de VEGF-D. Esta región se amplificó por RT-PCR a partir de RNA total de proveniente de células PC12-HB⁺ utilizando oligos específicos y se subclonó río abajo del gen reportero *Luciferasa*, en el vector pMF-CMV. Se realizaron ensayos de transfección, usando el vector resultante (pMF6Dr), en las células PC12HB⁺ (expresa constitutivamente el oncogen) y PC12HB⁻ (no expresa *Wnt1*). Para contrastar los resultados obtenidos se construyeron vectores de expresión que contienen las regiones 3'UTR de VEGF-D de ratón y de humano.

Resultados: Se identificaron 6 elementos desestabilizadores tipo ARE en la secuencia obtenida para la región 3'UTR de VEGF-D de rata, así como una región con 17 repeticiones de CT's. Ensayos de transfección con el plásmido pMF6Dr indican una mayor actividad de *Luciferasa* en células PC12 *Wnt1* que en la línea celular PC12HB⁻. Como se esperaba, un efecto contrario fue observado para los ensayos de transfección con los plásmidos que contienen las regiones 3'UTR de ratón y humano respectivamente.

Conclusiones: En células PC12 la vía canónica Wnt regula positivamente la actividad de la región 3'UTR de VEGF-D de rata y negativamente la actividad de la región 3'UTR de VEGF-D de ratón y humano. La mayor actividad de *Luciferasa* en la línea celular PC12HB⁺ sugiere una relación funcional entre *Wnt1* y la región 3'UTR de VEGF-D de rata.

DR. FRANCISCO VELÁZQUEZ.

Director de tesis.

DR. AUGUSTO ROJAS MTZ.

Co-Director de tesis.

DRA. HERMINIA G. MTZ.

Co-Director de tesis.



CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Los *wnt*'s, son glicoproteínas que son secretadas al ambiente extracelular. En condiciones estrictamente reguladas, la vía de señalización *wnt* es un proceso clave en las diferentes etapas del crecimiento y desarrollo del organismo; sin embargo, la activación no regulada de la vía desencadena un crecimiento celular incontrolado, que promueve el desarrollo de procesos tumorales de distinto origen, tales como cáncer de mama, colon y pulmón, entre otros.

Se han identificado un gran número de blancos transcripcionales de la vía *wnt* entre los que destacan reguladores de la progresión del ciclo celular como la ciclina D1, factores de crecimiento como c-myc y VEGF-A y algunas metaloproteasas tales como la MMP7, que contribuyen a la degradación de la matriz extracelular. La activación no regulada de estos genes ha sido reportada en diversos procesos tumorales. Uno de los mecanismos de regulación de la expresión génica está dado a nivel de estabilidad del RNA mensajero, proceso mediante el cual, se controla el recambio y por lo tanto la disponibilidad de los mensajeros a ser traducidos. La región 3' no traducida (3'UTR) del RNAm eucariótico está relacionada con la regulación de su estabilidad, gracias a la interacción de elementos de acción en *cis* con proteínas específicas.

En la presente investigación, nos hemos enfocado al estudio de la región 3'UTR del RNA mensajero de VEGF-D de rata en el sistema celular PC12 (derivado de feocromocitoma de rata) que expresa constitutivamente el oncogen *wnt1*, debido a que recientemente se ha reportado que en fibroblastos de ratón, la β -catenina (efector de la vía *wnt*) regula negativamente la expresión de VEGF-D y que dicha regulación se lleva a cabo a nivel de estabilidad, a través de su región 3'UTR. En esta región, fue descrita la presencia de un elemento desestabilizador ARE tipo I, que promueve la degradación del mensajero de VEGF-



D. En el caso del sistema PC12, el RNAm de VEGF-D de rata se acumula en aquellas líneas celulares que expresan constitutivamente el oncogen *wnt1* (Velázquez, datos no publicados), la presencia de repetidos CU's (elementos estabilizadores) en la región 3'UTR de VEGF-D de rata y ausentes en la región 3'UTR de VEGF-D de ratón y humano nos brindan la posibilidad de explicar la diferencia en estos resultados.

1.2 ANTECEDENTES GENERALES.

1.2.1. Descripción de la familia *wnt*.

La familia génica *wnt* comprende al menos 19 miembros^{1,2}. Las proteínas *wnt* cuyos tamaños oscilan entre los 39-46 kDa son definidas más por su secuencia que por sus propiedades funcionales, contienen una secuencia señal seguida por una región de 23-24 residuos de cisteínas altamente conservada^{1,3}.

Las proteínas *wnt's* son secretadas de las células en una forma lipídica y altamente hidrofóbica que solo puede ser solubilizada por detergentes. La modificación lipídica consiste en la unión covalente de un palmitato a una cisteína conservada cerca del amino terminal de la proteína *wnt*⁴ figura 1.

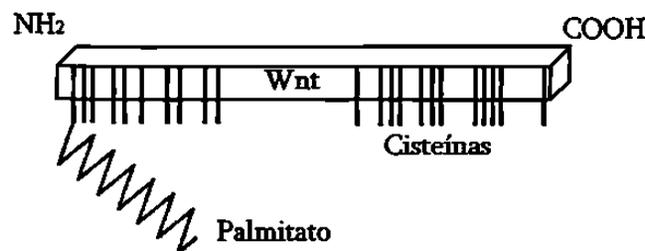


Figura 1. Esquema general de la proteína *wnt*. En la figura se ejemplifica la estructura de la proteína *wnt*, mostrando la modificación lipídica y con líneas verticales las posiciones aproximadas de las cisteínas. (Modificada de Nusse R, 2003).

La remoción enzimática del palmitato, así como el análisis mutacional de la cisteína modificada, resulta en la pérdida de actividad, indicando con ello que la adición de lípidos es



importante para la señalización⁵. La familia *wnt* ha sido bien conservada a través de la evolución con genes homólogos presentes tanto en vertebrados como en invertebrados. Estudios en ratones indican que todos los miembros de la familia *wnt* se expresan durante el desarrollo del sistema nervioso, otros siguen expresándose en el cerebro adulto, mientras que cinco de ellos se expresan de manera diferencial en la glándula mamaria del ratón durante el embarazo y la lactancia⁶.

1.2.2. Mecanismos de activación de la vía *wnt*.

La sobreexpresión de diferentes *wnt*'s produce diferentes fenotipos en *Xenopus laevis* y en pez cebra lo que sugiere que los *wnt*'s actúan por mecanismos diferentes⁷. Se han descrito tres mecanismos de activación de la vía *wnt*⁸:

1. El mecanismo de la polaridad planar celular, que involucra a RhoA y a la cinasa Jun (JNK), regula la polaridad de las células a través de la reorganización del citoesqueleto;
2. La vía de activación *wnt*/Ca⁺² es estimulada por *wnt* 5a y *wnt*11, involucra un incremento en la concentración de calcio intracelular y la activación de componentes de señalización sensibles a calcio, por ejemplo la cinasa dependiente de calmodulina, la calcineurina fosfatasa, entre otras.
3. La vía clásica o canónica, involucra la estabilización de la β -catenina en el citoplasma y su posterior traslocación al núcleo, donde interacciona con miembros de la familia TCF/Lef (T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor)^{9,10 11,12, 13}activando la transcripción de genes blanco.

1.2.3. Vía Clásica o Canónica *wnt*.

El principal efector de la vía canónica *wnt*, la β -catenina, es producida constitutivamente¹. Una porción de esta proteína, tiene un rol estructural al servir como una molécula



adaptadora entre las cadherinas y el citoesqueleto de actina en la adhesión célula a célula²; el resto de la proteína se distribuye en el citoplasma como una proteína monomérica¹⁴. En ausencia de señalización por *wnt*, los niveles citoplásmicos de la β -catenina son mantenidos bajos, gracias a la fosforilación de la β -catenina por un complejo multienzimático, dentro del que se encuentran la cinasas CKI y GSK-3 β ; dicha fosforilación permite que la β -catenina sea blanco de ubiquitinación y de degradación vía proteasoma^{15,16}.

La activación de la vía de señalización *wnt* conlleva a la inhibición de la actividad de la cinasa GSK3- β previniendo la fosforilación de la β -catenina. En estas condiciones, la β -catenina se acumula en el citoplasma y finalmente se trasloca al núcleo de la célula^{2,4,6,8} por un mecanismo poco conocido¹. Una vez en el núcleo, la β -catenina interacciona con miembros de la familia de activadores/represores Tcf/Lef.

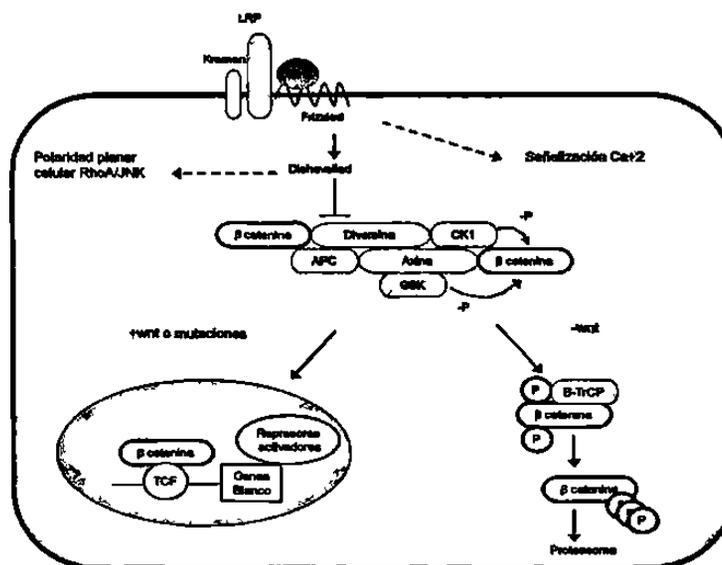


Figura 2. Vía de señalización *wnt*. Los niveles citoplásmicos de la β -catenina se mantiene bajos en ausencia de señalización por *wnt*, ya que la fosforilación de la β -catenina por las protein quinasas CK1 y GSK la hace blanco de la proteína β -TrCP con la subsiguiente ubiquitinación y degradación vía el proteosoma. La unión de *wnt* a frizzled y al correceptor LRP6 activa la vía provocando que dishevelled bloquee la función de GSK permitiendo que la β -catenina se estabilice, se trasloque al núcleo, interaccione con proteínas de la familia TCF/LEF y active los genes blanco. Proteínas como la diversina, el APC y la axina proporcionan un andamio que ayuda a la incorporación de las proteínas GSK y CK1 favoreciendo la fosforilación de la β -catenina. Kremen induce endocitosis y remoción de LRP6 de la membrana cuando se encuentra unido a la proteína Dkk que es un inhibidor de la vía.



Las proteínas Tcf poseen un dominio de unión al DNA⁹ pero a pesar de que por sí mismas no pueden activar o reprimir la transcripción, son capaces de mediar la represión transcripcional cuando se unen a represores de la familia Groucho, o en su lugar llegan a ser potentes transactivadores cuando interactúan con la β -catenina¹⁷ (quien les proporciona el dominio de transactivación). Cuando la vía *wnt* está activa, los niveles de β -catenina traslocada al núcleo se incrementan y como consecuencia la β -catenina puede competir con Groucho por los sitios de unión a Lef/Tcf y de esta manera activar la transcripción de los genes blanco.

1.2.4. Blancos transcripcionales de *wnt* y cáncer.

Se han descrito diversos genes regulados por la vía *wnt*¹⁸. Los promotores de estos genes contienen secuencias en *cis* que interactúan con el complejo β -catenina-TCF/Lef^{19,20}. Estos elementos son variaciones de la secuencia 5'(A/T)(A/T)CM(A/T)GG, que al ser reconocidos por el complejo β -catenina-TCF/Lef activan la transcripción de genes blanco.

Análisis de mutantes de los genes *wnt*, han permitido identificar a estos genes como los responsables del control de múltiples procesos biológicos como los que se describen a continuación: Wingless en *Drosophila* está involucrado en múltiples eventos del desarrollo embrionario y larvario, que incluyen interesantemente la diferenciación sináptica. En el desarrollo de vertebrados la pérdida de un *wnt* puede producir fenotipos dramáticos que incluyen letalidad embrionaria, anomalías en el SNC, el riñón y defectos en las extremidades. Una función general de la señalización *wnt* durante el desarrollo, es que puede regular la proliferación celular por inducción de reguladores del ciclo celular tales como c-myc, ciclina D1, c-jun, fra-1^{4,21,22,23}, etc. Los genes activados por la vía *wnt* involucrados en la diferenciación celular incluyen a siamois, engrailed-2, twin, nacre, y brachyury^{24,25,26,27,28}.



El efecto de la señalización *wnt* sobre los diferentes procesos biológicos es ejemplificado por los genes de las metaloproteasas (MMPs), de las cuales cuatro genes: MMP-1, MMP-7, MMP-14 y MMP-26^{29,30,31} han mostrado ser blancos directos de la β -catenina; estudios en ratones muestran que varios genes MMPs son expresados en adenomas. Las MMPs tienen la capacidad de actuar sobre la osteopontina (un blanco secundario de la vía *wnt*) y junto con VEGF (un blanco directo de *wnt*) contribuyen a la angiogénesis sostenida y metástasis en los procesos tumorales⁴. Por otro lado, el desarrollo de la respuesta inmune citotóxica depende de la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I, mismas que son reguladas negativamente en cánceres humanos y en respuesta a una señalización *wnt* aberrante; esto puede contribuir a la habilidad de los tumores de escapar a la respuesta inmune del organismo⁴.

Se han reportado además como blancos transcripcionales de la vía *wnt* a ITF-2, que promueve la transformación neoplásica en tumores humanos³², la interleucina IL-8, que ha sido implicada en la progresión tumoral por sus funciones mitogénicas y angiogénicas³³, el gen Nr-CAM que promueve el crecimiento y la motilidad celular³⁴, entre otros (véase referencia 18). En su conjunto todos estos reportes dejan clara la relación de la activación no regulada de la vía *wnt* y los procesos tumorales.

1.2.5. Angiogénesis y Cáncer.

La angiogénesis, definida como la formación de nuevos capilares a partir de vasos pre-existentes, ocurre durante el desarrollo embrionario, placentario, los ciclos endometrial y ovárico, la adaptación a la hipoxia tisular, la inflamación y la cicatrización de las heridas³⁵. Además de estar implicada en procesos normales, la angiogénesis junto con la linfangiogénesis son requerimientos necesarios para la propagación y progresión tumoral, debido a que los tumores, al igual que cualquier tejido normal, requieren de concentraciones adecuadas de oxígeno y metabolitos, así como un mecanismo efectivo para eliminar productos de deshecho³⁶.



A diferencia de un proceso tumoral, los procesos angiogénicos normales son altamente regulados y los nuevos vasos sanguíneos maduran rápidamente³⁷, mientras que los tumores son definidos como "heridas que nunca sanan". La forma tortuosa, dilatada y la organización irregular son características distintivas de los vasos sanguíneos producidos por un proceso de angiogénesis anormal³⁸.

Un factor importante que determina si un nuevo vaso sanguíneo se forma, es el balance entre las señales pro y anti-angiogénicas^{35,36} durante el desarrollo del proceso tumoral. Este "switch angiogénico" es promovido desde etapas tempranas de la tumorigénesis. En la tabla 1 se muestran algunos de los factores involucrados en la regulación del proceso angiogénico.

Tabla 1. Factores involucrados en la angiogénesis.

Estimuladores de angiogénesis	Inhibidores de angiogénesis
Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) 1, 2, 4, 5.	-Inhibidores específicos de células endoteliales: Angiostatina Endostatina Serpín antitrombina
Factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E).	-Inhibidores avasculares derivados de tejido: Troponina
Factor de crecimiento placentario (PGF)	Factor pigmentario derivado del epitelio (PEDF)
Factor de crecimiento de hepatocitos/Factor scatter (HGF/SF)	-Citocinas antiangiogénicas: Quimocina gro- β
Angiogenina	Interferón α
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Interleucina-12 (IL-12)
Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)	Interferón γ
Pleiotrofina (PTN)	Quimocina IP-10
Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)	Interleucina-18 (IL-18)
Factor de crecimiento transformante α y β (TGF- α , TGF- β)	-Factores antagonistas angiogénicos: Receptor-1 soluble del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR-1).
Interleucina 8 (IL-8)	-Otros inhibidores: Trombospondina-1 (TSP-1)
Interleucina 1b (IL-1b)	Inhibidores tisulares de metaloproteasas 1,2 y 3 (TIMPs 1-3).
Factor inducido por hipoxia 1 α (HIF-1 α)	Prolactina 16 kD. Prolactina RP

Modificada de Janavel (2001)^{39,40,41}.



Dentro de los activadores del proceso angiogénesis se encuentran el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PDGF), la angiopoyetina 2 (Ang-2), el factor de crecimiento de hepatocitos y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)^{35,38}, entre otros.

1.2.6. Familia de los Factores de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGFs).

La familia de los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGFs), incluyen al VEGF-A, el factor de crecimiento placentario (PlGF), el VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, y VEGF-E. El VEGF-A, el más ubicuo, es inducido por hipoxia y regulado positivamente por el factor de crecimiento transformante β y la interleucina 6 en varios tipos celulares.

El VEGF-C es inducido por suero y varios factores como la interleucina-1 y el factor de necrosis tumoral- α . El VEGF-D se expresa en grandes proporciones en fibroblastos en crecimiento y es inducido por contacto directo célula-célula por la cadherina-1⁴². A pesar de que VEGF-C y VEGF-D no son inducidos por hipoxia se sabe que activan muchos de los mecanismos de VEGF-A⁴³. Las secuencias de VEGF-E son codificadas por el virus orf (OV); Ensayos *in vitro* demuestran que VEGF-E, al igual que VEGF-A estimula la liberación del factor tisular, la proliferación, quimiotaxis y el "brote" de las células endoteliales, mientras que *in vivo* estimula el proceso de angiogénesis⁴⁴.

Existen tres receptores VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3^{41,43,45}. El VEGFR1 se expresa principalmente en células progenitoras hematopoyéticas, macrófagos, monocitos, así como en el endotelio vascular. El VEGFR-2 es más característico del endotelio vascular y linfático, mientras que el VEGFR-3 es expresando predominantemente en el endotelio linfático⁴¹.

Los miembros de la familia VEGF exhiben distintas especificidades hacia los receptores (figura 3); dicha especificidad influye en sus funciones biológicas. VEGFR-1 y VEGFR-2, son

expresados en el endotelio de vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario y subregulados en tejidos adultos; el VEGFR-3 es expresado en el endotelio linfático pero es sobre regulado en el endotelio de los vasos sanguíneos en las heridas y en los tumores; VEGFR-3 se expresa también en el endotelio de vasos sanguíneos fenestrados.

Una forma mutante de VEGF-C con un cambio aminoacídico de una cisteína por una serina en la posición 156 (VEGF-C 156S), se une a VEGFR-3 pero no a VEGFR-2. En el ratón VEGF-D (mVEGF-D) interacciona específicamente con VEGFR-3⁴³ (figura 3).

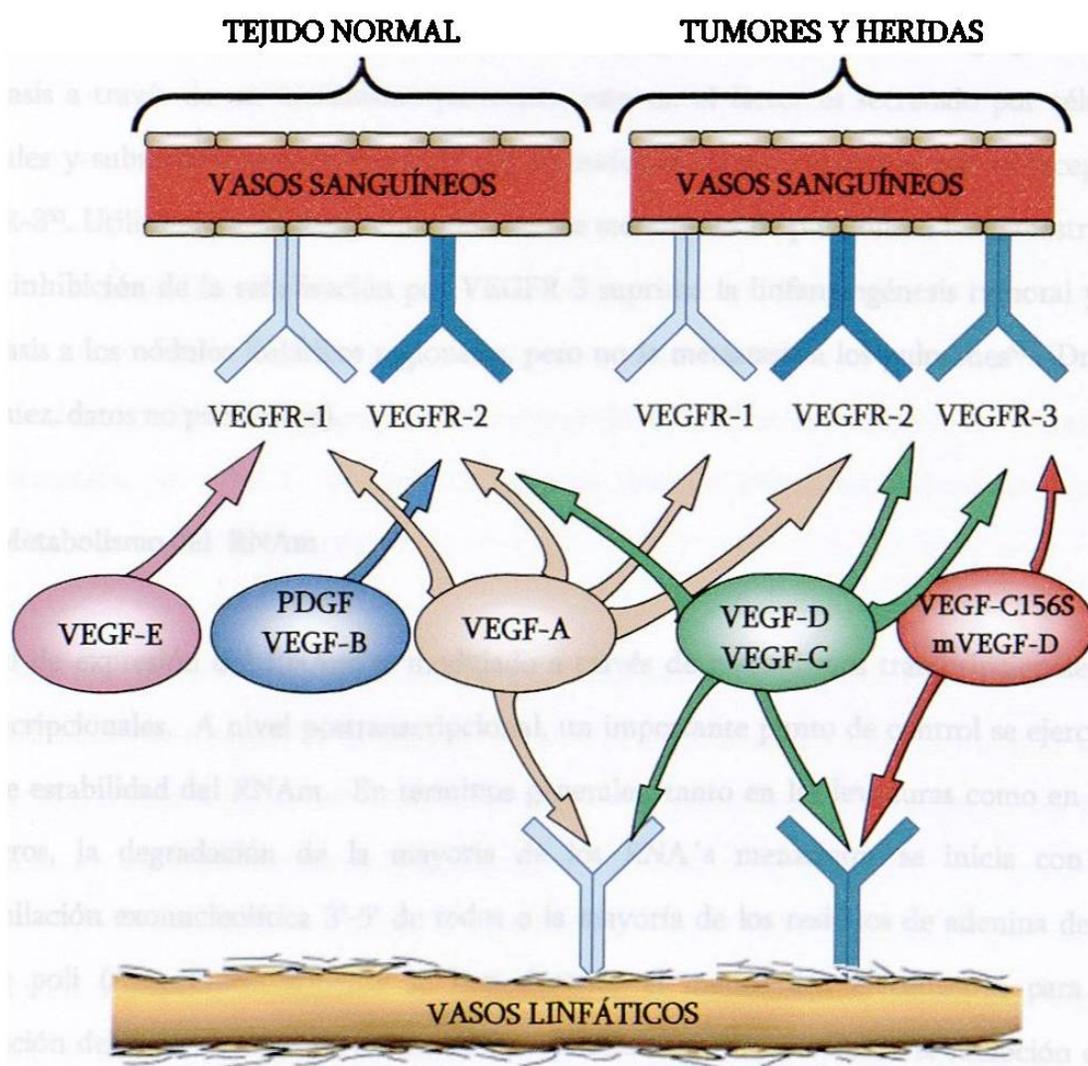


Figura 3. Representación esquemática de las interacciones entre la familia VEGF/VEGFR. (Modificado de Baldwin y cols (2002).



1.2.6.1. VEGF-D y Cáncer

“Durante el desarrollo del ratón, VEGF-D es importante para la vascularización del tejido pulmonar⁴⁶. VEGF-D promueve angiogénesis y vascularización linfática in vivo, además de ser un mitógeno de células endoteliales^{47,48,49}. Este factor promueve la angiogénesis dentro del tumor y contribuye a la metástasis de los ganglios linfáticos; la inactivación de VEGF-D conduce a la inhibición del proceso de metástasis⁵⁰. La expresión de VEGF-D en cáncer de mama y melanoma es importante para el desarrollo del tumor y para la metástasis a los ganglios linfáticos, ya que las células tumorales secretan VEGF-D, promoviendo angiogénesis dentro del tumor^{51,52}. VEGF-D promueve la angiogénesis tumoral, linfangiogénesis y metástasis a través de un mecanismo paracrino; esto es, el factor es secretado por células tumorales y subsecuentemente se asocia con el endotelio al ser capturado por el receptor VEGFR-3⁵³. Utilizando una línea celular altamente metastásica de pulmón, se ha demostrado que la inhibición de la señalización por VEGFR-3 suprime la linfangiogénesis tumoral y la metástasis a los nódulos linfáticos regionales, pero no la metástasis a los pulmones⁵⁴. (Dr. F. Velázquez, datos no publicados).

1.2.7. Metabolismo del RNAm

El nivel de expresión del RNAm es modulado a través de mecanismos transcripcionales y postranscripcionales. A nivel postranscripcional, un importante punto de control se ejerce a nivel de estabilidad del RNAm. En términos generales, tanto en las levaduras como en los mamíferos, la degradación de la mayoría de los RNA's mensajeros se inicia con la desadenilación exonucleolítica 3'-5' de todos o la mayoría de los residuos de adenina de la cola de poli (A). Posteriormente se han descrito al menos dos mecanismos para la degradación del resto del cuerpo del RNAm; el primero de ellos involucra la remoción del CAP 5' seguido por la degradación exonucleolítica 5'-3' del cuerpo del RNAm. En el segundo mecanismo el CAP 5' es retenido después de la desadenilación; sin embargo, ésta es seguida de la degradación exonucleolítica 3'-5' del resto del cuerpo del RNAm⁵⁵.



Recientemente se han empezado a dilucidar los mecanismos involucrados en el recambio del RNAm. Algunos proto-oncogenes⁵⁶ como c-Fos y c-Jun y la mayoría de los genes de las citocinas y quimocinas producen transcritos que son inestables en células no estimuladas, pero su estabilidad se incrementa considerablemente en respuesta a la estimulación celular. Dentro de los estímulos que pueden modificar la estabilidad de los RNA's mensajeros, se encuentran factores de crecimiento, estímulos hormonales, nutricionales, farmacológicos, alteraciones ambientales tales como cambios en la temperatura o la hipoxia.

Los mecanismos de estabilidad del RNAm se basan en la interacción entre secuencias en el RNAm de acción en *cis*, y factores proteicos que actúan en *trans*. Los elementos de acción en *cis* pueden encontrarse dentro de la región codificante y/o (más frecuentemente) en la región 3' no traducida (3'UTR) del RNAm y varían tanto en secuencia como en longitud. Los elementos de acción en *cis* más frecuentes en los mamíferos son los elementos ricos en A-U (ARE) y son definidos por su habilidad de promover la degradación dependiente de deadenilación del RNAm. Dentro de las funciones de los ARE se encuentra la estimulación de la remoción del CAP 5', el reclutamiento de diversas exonucleasas (exosoma) y el acortamiento de la cola de poli (A).

La longitud de los ARE varía entre los 50-150 nucleótidos de longitud. Algunos de ellos contienen numerosas copias de la secuencia AUUUA o del nonámero AUAUUUAUU a lo largo de una o más regiones estrechas ricas en U. El número de estas repeticiones son importantes en la determinación de la estabilidad del RNAm.

De la misma manera que los ARE, se ha descrito a las regiones ricas en citosina como elementos de acción en *cis* que contribuyen al recambio del RNAm; sin embargo, a diferencia de los ARE, las regiones ricas en C's han sido descritas como elementos estabilizadores⁵⁷ y han sido extensivamente caracterizadas como determinantes de la



estabilidad del RNAm de la $\alpha 2$ -globina humana⁵⁸. Las secuencias presentes en las regiones ricas en C's pueden ser típicamente CCUCC, CCCUCCC o U(U/C)CCCU.

Se han identificado al menos 15 proteínas que se unen a regiones ricas en AU, U, dentro de las cuales se incluyen AUF1 y TTP quienes contribuyen al recambio rápido del RNAm, mientras que otras como HuR contribuyen a la estabilización del transcrito⁵⁶. Las proteínas que se unen a regiones ricas en C's incluyen a las proteínas de unión a poli (C) (PCBP's) y generalmente tienen un efecto estabilizador⁵⁵.

Debido a la importante función de estas proteínas en el recambio del RNAm, la expresión no regulada de alguna de ellas podría afectar los procesos de proliferación y diferenciación celular normales.

Algunos tumores desarrollan la capacidad de estabilizar los RNAs mensajeros de oncogenes resultando en la sobreproducción y una predisposición sostenida al crecimiento. Por ejemplo el RNAm de *c-myc* contiene un elemento en su región 3'UTR que es fundamental para su recambio rápido; en procesos tumorales tales como mieloma y leucemia de células T, una mutación en *c-myc* resulta en un mensajero siete veces más estable que RNAm silvestre.

1.3. ANTECEDENTES DIRECTOS.

Estudios relacionados con estabilidad de RNAs mensajeros han puesto de manifiesto mecanismos que pueden participar en el recambio del RNAm. Dichos mecanismos se llevan a cabo a lo largo del RNAm en regiones bien definidas dentro de las que se incluyen: la región 5'UTR, la región codificante, la región 3'UTR y en algunos casos, la longitud de la cola de poli (A). Como se mencionó anteriormente, los mecanismos de regulación incluyen la presencia de elementos en *cis*, así como su interacción con elementos de acción en *trans*^{59,60,61}.



Reportes recientes indican que en fibroblastos de ratón la β -catenina regula de manera inversa el RNAm de VEGF-D⁴². En la regulación está involucrado un elemento desestabilizador que se encuentra en la región 3'UTR del RNAm de VEGF-D, que induce su desestabilización y como consecuencia, los niveles del RNAm de VEGF-D se ven disminuidos cuando la vía *wnt* está activa⁴². Por otro lado en células PC12 derivadas de feocromocitoma de rata^{62,63}, que expresan constitutivamente *wnt1*, se ha observado un efecto inverso. La expresión constitutiva del oncogene *wnt1*, en células PC12 de rata, da como resultado la acumulación del RNAm de VEGF-D aproximadamente 15 veces más que en la línea celular parental (F. Velázquez, datos no publicados). Este resultado contrasta con los datos publicados por Orlandini *y cols* (2003). Para responder a esta discrepancia existen al menos dos explicaciones: una de ellas es que en estos trabajos, se utilizaron líneas celulares de distinto origen y además provenientes de distintos organismos (fibroblastos de ratón y células de rata PC12 derivadas de feocromocitoma); por otro lado la diferencia puede ser explicada por las diferencias en secuencia de la región 3'UTR de VEGF-D y por lo tanto a nivel de estabilidad del mensajero.

1.4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se detectó una diferencia en la secuencia de las regiones 3'UTR de VEGF-D proveniente de ratón (GeneBank NM_010216) y de rata (clona EST_21273525). Esta diferencia podría explicar el efecto diferencial de *wnt1* sobre la expresión de VEGF-D en fibroblastos de ratón y en células de rata PC12. La región 3'UTR de VEGF-D de rata contiene una región rica en residuos de citosina, no presente en la secuencia de ratón. Esta secuencia rica en C's podría funcionar como un elemento que contribuye a la estabilidad del RNAm. De hecho, está bien documentado el papel de secuencias ricas en C's localizadas en regiones 3'UTR que funcionan como elementos que estabilizan al RNAm.

Proponemos que en células PC12 que expresan constitutivamente el oncogen *wnt1*, el aumento en la cantidad del RNAm del factor VEGF-D se debe, al menos en parte, al



incremento en la estabilidad del transcrito. De ser cierta esta hipótesis, esto implicaría que el oncogen *wnt1* regula, de alguna manera, los mecanismos que controlan el recambio del RNA mensajero y, al mismo tiempo, sugiere que estos mecanismos regulatorios podrían tener un papel relevante en la proliferación celular y en el desarrollo tumoral.

1.5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

“La región 3'UTR del RNAm del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular D, contribuye a la estabilidad del transcrito correspondiente en células PC12 que expresan constitutivamente el oncogen *wnt1*”.

1.6 JUSTIFICACIÓN

La expresión no regulada de *wnt1* ocasiona el desarrollo de tumores mamarios y metástasis a los pulmones y a los ganglios linfáticos proximales. Lo anterior pone de relieve la importancia del estudio de los mecanismos que regulan la expresión de VEGF-D y sugiere como una posibilidad que el efecto de *wnt1* sobre el desarrollo, vascularización y metástasis de tumores esté mediado por VEGF-D. Por otro lado la sobre expresión, en tejido tumoral, de proteínas que regulan la estabilidad del RNAm por ejemplo AUF-1, HuR, TTP⁶⁴, sugiere que los mecanismos que regulan el recambio del RNAm juegan un papel importante en el proceso tumoral. Un ejemplo es *c-myc*, cuyo RNAm contiene elementos desestabilizadores en la región 3'UTR.

Estas consideraciones han puesto de manifiesto la importancia de estudiar los mecanismos que controlan el metabolismo del RNAm. De esta manera, las proteínas reguladoras que determinan su estabilidad, pueden ser atractivos blancos terapéuticos para el control del desarrollo tumoral⁵⁶.



CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar si la región 3'UTR del RNAm de VEGF-D participa en la acumulación del transcrito correspondiente en células PC12 que expresan constitutivamente el oncogen *wnt1*.

2.2. Objetivos Específicos.

1. Comprobar el sistema celular como un modelo de estudio para investigar la relación de *wnt1* en la acumulación del RNAm de VEGF-D.
2. Aislar y secuenciar la región 3'UTR del RNAm del factor de crecimiento endotelial vascular D (VEGF-D) expresado en células PC12-*wnt1*.
3. Identificar secuencias relacionadas con estabilidad del RNAm.
4. Caracterizar funcionalmente la región 3'UTR del RNAm de VEGF-D.

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Esquema general de trabajo

En la figura 4 se muestran de manera general, las principales etapas y técnicas empleadas, para el cumplimiento de los objetivos propuestos al inicio del proyecto de tesis.

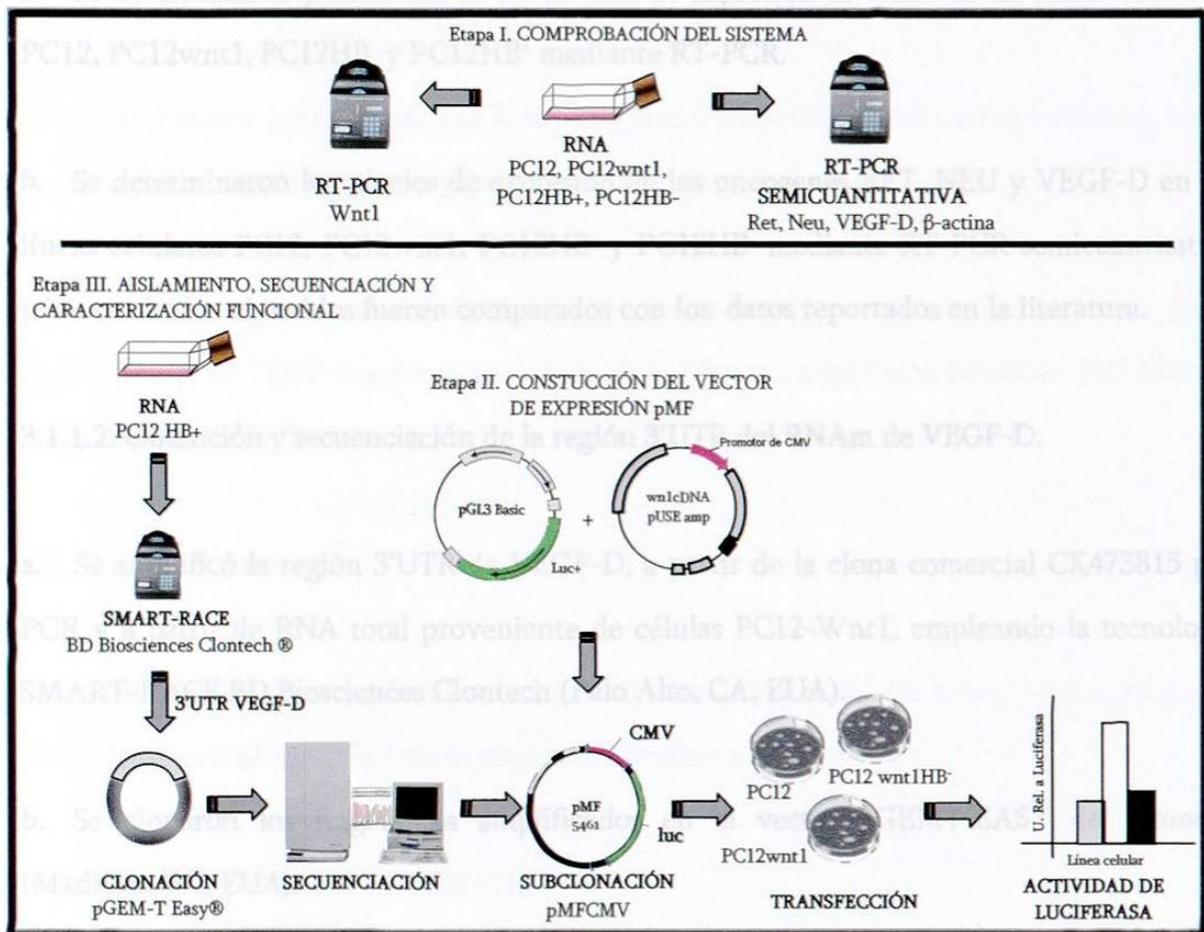


Figura 4. Esquema general de Trabajo. El estrategia experimental se dividió en tres etapas: durante la etapa I, se comprobó el sistema celular PC12 como un modelo para el estudio de relación de *wnt1* con la acumulación del RNAm de VEGF-D; en la etapa II, se construyó un vector de expresión eucariótico con el gen reportero de luciferasa dirigido por el promotor de CMV; en la etapa III se llevó a cabo la obtención, secuenciación y caracterización funcional de la región 3'UTR de VEGF-D.



3.1.1. Estrategia experimental por objetivo.

A continuación se abordan de manera general los pasos que se siguieron para el cumplimiento de cada uno de los objetivos:

3.1.1.1. Comprobación del sistema celular como un modelo de estudio para investigar la relación de *wnt1* en la acumulación del RNAm de VEGF-D.

- a. Se determinaron y compararon los niveles de expresión de *wnt1* de las líneas celulares PC12, PC12wnt1, PC12HB⁻ y PC12HB⁺ mediante RT-PCR.
- b. Se determinaron los niveles de expresión de los oncogenes RET, NEU y VEGF-D en las líneas celulares PC12, PC12wnt1, PC12HB⁻ y PC12HB⁺ mediante RT-PCR semicuantitativa y los resultados obtenidos fueron comparados con los datos reportados en la literatura.

3.1.1.2. Obtención y secuenciación de la región 3'UTR del RNAm de VEGF-D.

- a. Se amplificó la región 3'UTR de VEGF-D, a partir de la clona comercial CK473815 por PCR y a partir de RNA total proveniente de células PC12-Wnt1, empleando la tecnología SMART-RACE BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, EUA).
- b. Se clonaron los fragmentos amplificados en el vector pGEMT-EASY de Promega (Madison, WI, EUA).
- c. Se secuenciaron los fragmentos clonados en pGEMT-EASY empleando el kit de secuenciación Thermo Sequenase de USB (Cleveland, OH, EUA).



3.1.1.3. Identificación de secuencias relacionadas con estabilidad del RNAm.

Se identificaron de manera visual regiones desestabilizadoras (regiones ricas en A-U, U) y regiones estabilizadoras (regiones ricas en C y C-U).

3.1.1.4. Caracterización funcional de la región 3'UTR de VEGF-D.

- a. Se construyó un vector de expresión eucariótico que contiene el gen reportero luciferasa dirigido por el promotor de CMV (pMFCMV).
- b. Se subclonaron las regiones 3'UTR de interés, río abajo del gen reportero luciferasa, en el vector pMF, reemplazando la región 3'UTR de SV40.
- c. Mediante ensayos de co-transfección y de luminometría, se determinó el efecto de la región 3'UTR de VEGF-D sobre la expresión de luciferasa en las líneas celulares, PC12-wnt1, PC12-HB⁺ y PC12 HB⁻.

3.2. Material y reactivos.

Los principales reactivos utilizados durante la realización del trabajo experimental, así como las casas comerciales donde fueron adquiridos se citan a continuación:

- a. **Active Motif** (Carlsbad, CA, EUA).
Vivid Violet DNA/RNA Co-Precipitate
- b. **Ambion** (Austin, TX, EUA)
RNA4-PCR



- c. Applied Biosystems (Foster, CA, EUA).
Six Paq, rTth DNA Polymerase, XL and XL Buffer II Pack.

- d. BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, EUA)
Advantage RT for PCR Kit
BD SMART RACE cDNA Amplification Kit
TITANIUM Taq PCR kit

- e. Becton Dickinson – Difco (Sparks, MD, EUA)
Bacto agar, extracto de levadura, bacto triptona.

- f. Corning (NY, EUA)
Criotubos 2ml, botella para cultivo celular de 25 cm², botella para cultivo celular de 75 cm², botella para cultivo celular de 150 cm².

- g. Costar (NY, EUA)
Pipeta serológica Stripette 5, 10 y 25 ml, plato de cultivo celular de 24 y 96 pozos.

- h. Hyclone (Logan UT, EUA).
Trypsina 0.25%, suero fetal bovino, suero de ternera.

- i. Invitrogen (California, EUA).
Oligonucleótidos. Específicos.
Escherichia coli TOP 10.

- j. LI-COR Biosciences (Lincoln, NB, EUA).
IRDye 800v2 Terminator Mixes.



k. New England BioLabs (Beverly, MA, EUA).

Enzimas de restricción, DNA polimerasa de T4, DNA ligasa de T4.

l. Promega (Madison, WI, EUA).

Dual-Luciferase Reporter Assay System.

TransFast Transfection Reagent

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System.

Wizard PureFection Plasmid DNA purification System.

m. QIAGEN (Valencia, CA, EUA; Alemania).

QIAEX II Gel extraction kit, QIAGEN plasmid midi kit.

n. SIGMA-ALDRICH (Steinheim, Alemania; St. Louis MO, EUA).

DMEM.

Glucosa ($C_6H_{12}O_6$).

Acetato de potasio (CH_3COOK).

Acetato de sodio (CH_3COONa).

Alcohol etílico (C_2H_5OH).

Hidróxido de amonio (NH_4OH).

Hidróxido de sodio ($NaOH$).

Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4).

Fosfato monobásico de potasio (NaH_2PO_4).

Cloruro de sodio ($NaCl$).

Cloruro de potasio (KCl).

Cloruro de calcio ($CaCl_2$).

Sulfato de magnesio ($Mg SO_4$).

Dodecil sulfato de sodio (SDS).



m. Usb (Cleveland, OH, EUA).

Thermosequenase Cycle Sequencing Kit

3.3. Equipo.

a. Applied Biosystems (Foster, CA, EUA).

Termociclador Gene Amp PCR System 2400.

b. Barnstead/Thermoline (Debuque IA, EUA).

Maxi Mix II type 37600 Mixer.

c. Beckman (Palo Alto, CA, EUA).

Centrífuga Allegra 21R.

Centrífuga J2-MI.

d. Brinkmann Instruments (Westbury, NY, EUA).

Centrífuga Eppendorf 5415C.

Centrífuga Eppendorf 5415D.

Thermomixer Eppendorf.

e. GIBCO BRL Life Technologies (California, EUA).

Fuente de poder para electroforesis.

f. LI-COR Biosciences (Lincoln, NB, EUA).

Secuenciador DNA sequencer LONG READIR 4200.

g. New Brunswick Scientific Co. Inc. (Edison, NJ, EUA).

Baño de agua orbital (rotatorio).



- h. OHAUS (Florham Park, NJ, EUA).
Balanza Semianalítica, Precision Standar.
- i. Precision Cientific Inc. (Chicago, IL, EUA).
Incubadora de convección mecánica.
- j. SO-LOW Enviromental Equipment (Cincinnati, OH, EUA).
Ultracongelador.
- k. UVP (Upland, CA, EUA).
Transiluminador U.V. con cámara oscura.

3.4. Microorganismos utilizados.

Escherichia coli TOP 10 (Invitrogen, CA, EUA): Cepa utilizada normalmente en experimentos de transformación para la propagación de plásmidos, debido a su alta eficiencia de transformación (1×10^9 UFC/ μ g de DNA).

GENOTIPO: *F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str®) endA1 nupG.*

3.5. Ácidos Nucleicos.

3.5.1. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados tanto para los análisis de secuencias, así como aquellos utilizados para la amplificación de las distintas regiones 3'UTR, fueron diseñados por el Dr. Francisco Velázquez y fueron sintetizados por Invitrogen (CA, EUA); su secuencia, así como el nombre y tamaño del fragmento que amplifican se resume en la tabla 2.



Fragmento amplificado	Oligo 5’	Oligo 3’	Posición de los oligos (secuencia reportada en el GenBank)	Tamaño del Fragmento que amplifican	Clave de la Secuencia utilizada para el diseño.
ORF Wnt1 ratón.	GAAACAGCGTT CATGTTCCGAA TCAC	CTCGTTGTTGT GAAGGTTTCATG AGG	Oligo 5’ 688-713 Oligo 3’ 933-909.	245 pb	NM_021279.3
ORF VEGFD rata.	CATTTCAGATCC CAGAAGAAGAT C	CATCTTGTGCT TTTGGCAACAG C	Oligo 5’ 902-925 Oligo 3’ 1202-1180.	300 pb	NM_031761
3’UTR VEGFD sin CTs (Δ) rata.	CTCACTGAATT CGCCAAACCTC TCTTAACCCCTG TTG	GTGTCTGAATT CTGTAGGCAAG ACATTTAAAGA TGAC		5189 pb (para la reg. corta) 6465 pb (para la reg. larga)	Para el 5’ NM_031761 Para el 3’ sec. no reportada
3’UTR VEGFD rata (Corta).	CATGATTCTAG ATTTGGTTTAC TGGTGACATTT AAAGGAC	GTTTCATGGATC CCTCAGTGGTT AGTTTGGGTAG ATTTTG	Oligo 5’ 1251-1278 Oligo 3’ (secuencia no reportada).	427 pb	NM_031761
3’UTR VEGFD humano.	CITGTCTCTAG AGTTCCAAAGT CCCCATCCCTG TC	GATCITGGATC CGGCTTGAATA ATGGTGTTTAT TTTCTT	Oligo 5’ 1581-1603 Oligo 3’ 2110-2092.	553 pb	NM_004469
3’UTR VEGFD ratón.	CITGTCTCTAG ACAACCTCCCT TCAAGTCCCC CATC	GATCITGGATC OGTGGGCTGCA TAACAGTGTT ATTCC	Oligo 5’ 1362-1446 Oligo 3’ 1875-1848.	537 pb	NM_010216
3’UTR β-actina rata.	CITGTCTCTAG AGCGGACTGTT ACTGAGCTGCG TTTTAC	GATCITGGATC CTAAGGTGTGC ACTTTTATTAA AACGG	Oligo 5’ Oligo 3’	628 pb	V01217
3’UTR c-myc rata.	CITGTCTCTAG ACTGACCGGAA GTGAGGAGGA GC	GATCITGGATC CAAGAGTTGGC TCAATTATATT TTTTCC	Oligo 5’ 1898-1921 Oligo 3’ 2338-2313	463 pb	NM_012603
ORF RET rata.	CTGTGGTAGCC ACTCTGCAGTG	GACAGGCAGCA CAGACACGTTG	Oligo 5’ 891-910 Oligo 3’ 1219-1198.	330 pb	NM_012643.1
ORF NEU rata.	GAAGAATGGG GTTGTCAAAG CG	CTGCACACGTC TCATACAGGTA C	Oligo 5’ 3559-3581 Oligo 3’ 3810-3788.	251 pb	NM_017003.1
3’UTR VEGFD rata (Larga)	CATGATTCTAG ATTTGGTTTAC TGGTGACATTT AAAGGAC	GGTCGACGGAT CCGGGTTGCGT AACaGtGTTTAT TTCC	Oligo 5’ 1251-1278 Oligo 3’ (secuencia no reportada).	1693 pb	NM_031761

Tabla 2. Oligonucleótidos específicos utilizados durante la investigación. En la tabla se muestran las principales características de los oligonucleótidos empleados durante la investigación. En color azul se muestra el sitio de corte para *Eco* RI, en color rojo el sitio de corte para *Xba* I y en color rosa el sitio de corte para *Bam* HI. En el caso de los oligonucleótidos 3’UTR VEGFD sin CTs (Δ) rata, fueron diseñados a partir de la secuencia obtenida durante el trabajo experimental.



3.5.2. Marcadores de peso molecular.

a. Promega (Madison, WI, EUA).

Escalera de 50pb.

Escalera de 100pb.

Escalera de 1.0kb

DNA del bacteriófago lambda digerido con *Pst*I.

b. Fermentas (Hanover, MD, EUA)

Escalera de 100pb.

3.5.3. Vectores plasmídicos comerciales.

a. pGEM-T easy. Promega (Madison, WI, EUA).

Vector utilizado para la clonación de productos de PCR. Posee una timina 3' terminal en ambos extremos; esta proyección es compatible con los productos de PCR generados por ciertas polimerasas que adicionan residuos de deoxiadenosina a los extremos 3' de los fragmentos amplificados. Este vector confiere resistencia a ampicilina, y contiene sitios promotores para las RNA polimerasas de los fagos T7 y SP6 flanqueando la región múltiple de clonación (figura 5). Todos estos elementos se encuentran dentro de la región codificante del péptido α . La inactivación insercional del péptido α permite identificar las clonas recombinantes por su color blanco en un medio que contiene IPTG y X-gal.

b. Wnt1 cDNA. Upstate biotechnology (Lake Placid, NY, EUA).

Es un vector de expresión eucariótico que contiene el promotor de CMV dirigiendo la expresión del DNAc del oncogen wnt1 de ratón etiquetado con hemaglutinina (H.A) en su región 3'. Río abajo del DNAc de wnt1, posee una señal de poliadenilación de la hormona de



tardía de SV40 río abajo del gen reportero *Rluc* y un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección (figura 6).

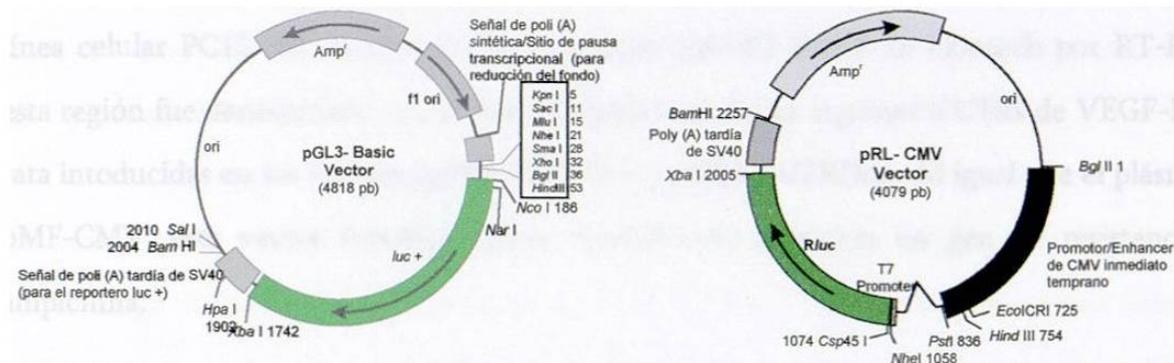


Figura 6. Mapas de los vectores pGL3-Basic y pRL-CMV.

3.5.4. Vectores de expresión construidos en el curso del trabajo experimental.

a. **pMF-CMV.** Contiene el gen reportero de luciferasa dirigido por el promotor de CMV. Río abajo del gen de la luciferasa contiene una señal de poliadenilación de SV40. Como marcador de selección posee un gen de resistencia a ampicilina. Este vector fue utilizado como esqueleto para la construcción de los vectores de expresión pMF1-7. pMF1-Δ, pMF6-Δ y pMF-7Δ. Para la construcción de este vector, se aisló el promotor de CMV (677pb) del vector comercial Wnt1 DNac de Upstate biotechnology mediante digestión con las enzimas de restricción *Hinc II/Hind III*; posteriormente el promotor fue introducido río arriba del gen reportero de luciferasa del vector pGL3 basic de promega (previamente digerido con *Sma I/Hin dII*), figura 7.

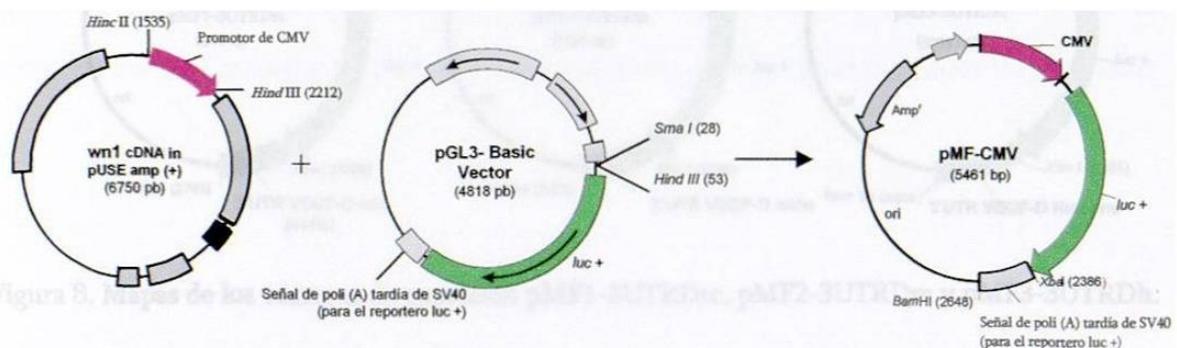


Figura 7. Representación esquemática de la construcción del vector pMF.



b. pMF1-3UTRDrc. Fue generado reemplazando la señal de poliadenilación de SV40 localizada río abajo del gen de la luciferasa, por la región 3'UTR de VEGF-D de rata en el vector pMF (figura 8). La región 3'UTR de VEGF-D fué obtenida a partir de RNA total de la línea celular PC12-HB⁺ empleando la tecnología SMART-RACE de clontech por RT-PCR, esta región fue denominada "corta" para diferenciarla de las regiones 3'UTRs de VEGF-D de rata introducidas en los vectores pMF6-3UTRDrl y pMF7-3UTRDrlc. Al igual que el plásmido pMF-CMV, este vector contiene como marcador de selección un gen de resistencia a ampicilina.

c. pMF2-3UTRDm y pMF3-3UTRDh. Vectores de expresión eucarióticos generados reemplazando en el vector pMF la señal de poliadenilación de SV40 localizada río abajo del gen de la luciferasa, por la región 3'UTR de VEGF-D de ratón (pMF2-3UTRDm) y la región 3'UTR de VEGF-D de humano (pMF3-3UTRDh) respectivamente (figura 8). Fueron utilizados durante los ensayos de transfección con la finalidad de contrastar los resultados reflejados en los niveles de actividad del gen reportero ligado a la región 3'UTR de VEGF-D de rata. La regiones 3'UTR de VEGF-D de ratón y de humano, fueron obtenidas por PCR empleando oligonucleótidos específicos con sitios de restricción *Xba*I/*Bam*HI, a partir de DNA plasmídico de clonas comerciales (número de acceso en el banco de genes NM_010216 y BC027948 respectivamente).

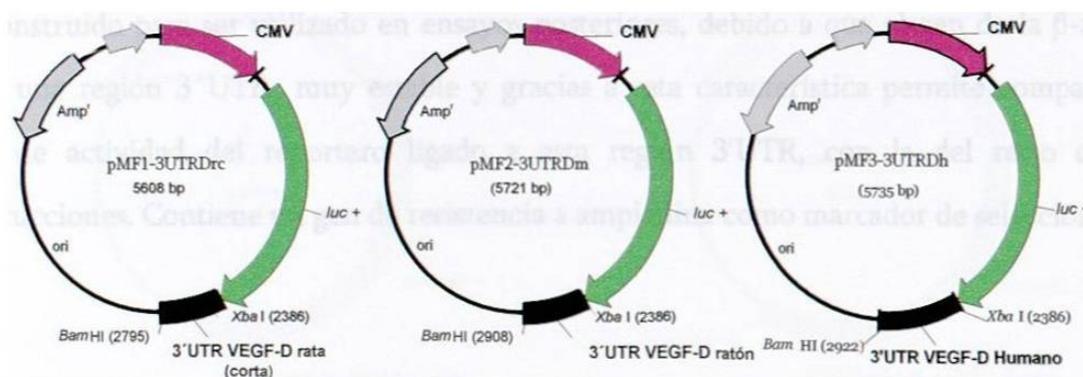


Figura 8. Mapas de los vectores de expresión pMF1-3UTRDrc, pMF2-3UTRDm y pMF3-3UTRDh.



d. pMF4-3UTRmyc. Contiene la región 3'UTR de c-myc de rata río abajo del gen reportero de luciferasa (figura 9). La región 3'UTR de c-myc se obtuvo a partir de RNA total de la línea celular PC12HB⁺, mediante RT-PCR empleando oligonucleótidos específicos que incluyen sitios de restricción *Xba I/Bam HI*; posteriormente la región fue introducida reemplazando la región de poliadenilación de SV40 en el plásmido pMF-CMV.

La construcción y la utilización de este vector no fué planteada como objetivo de esta tesis, sin embargo dicho vector fue construido para ser utilizado en ensayos posteriores, debido a que c-myc es un blanco transcripcional de la vía wnt y es un modelo para el estudio del recambio del RNAm en condiciones normales; sin embargo en procesos tumorales dicho recambio ha sido poco estudiado. Al igual que los vectores derivados de pMF-CMV, contiene un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección.

e. pMF5-3UTR β . Contiene la región 3'UTR de β -actina de rata río abajo del gen reportero de luciferasa (figura 9). La región 3'UTR de β -actina fue obtenida a partir de RNA total de la línea celular PC12 HB⁺, mediante RT-PCR empleando oligos específicos que incluyen sitios de restricción *Xba I/Bam HI*; posteriormente dicha región fue introducida reemplazando la región de poliadenilación de SV40 en el plásmido pMF-CMV.

Al igual que pMF4-3UTRmyc, este vector no fue planteado como objetivo de esta tesis, pero fue construido para ser utilizado en ensayos posteriores, debido a que el gen de la β -actina posee una región 3'UTR muy estable y gracias a esta característica permite comparar el nivel de actividad del reportero ligado a esta región 3'UTR, con la del resto de las construcciones. Contiene un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección.

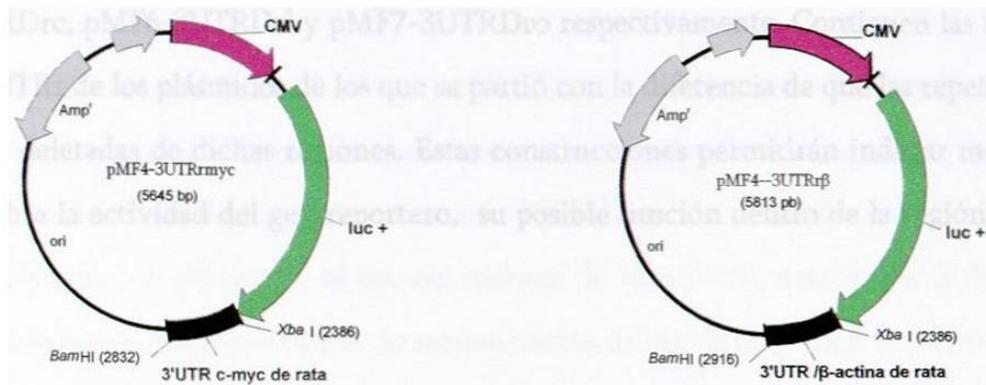


Figura 9. Mapas de los vectores de expresión pMF4-3UTRmyc y pMF5--3UTRβ.

f. pMF6-3UTRDrl y pMF7-3UTRDro. Contienen la región 3'UTR "Larga" de VEGF-D de rata obtenida a partir de RNA total de células PC12 HB⁺ por RT-PCR (pMF6-3UTRDrl) y de DNAP de la clona con número de acceso en el banco de genes CK473815 (pMF7-3UTRDro) respectivamente (figura 10). Para la obtención de ambas regiones la clona CK473815 fue secuenciada a partir de su extremo 3'; a partir de esta secuencia parcial, se diseñó un oligonucleótido con sitio de restricción *Bam* HI, posteriormente y con la ayuda del oligo 5' de la región 3'UTR de VEGF-D de rata "Corta" se amplificó la región 3'UTR de VEGF-D "Larga" completa, partiendo por un lado de RNA total de células HB⁺ y por otro de la clona comercial CK473815. Ambas regiones fueron introducidas reemplazando la señal de poliadenilación de SV40 en el vector pMF-CMV.

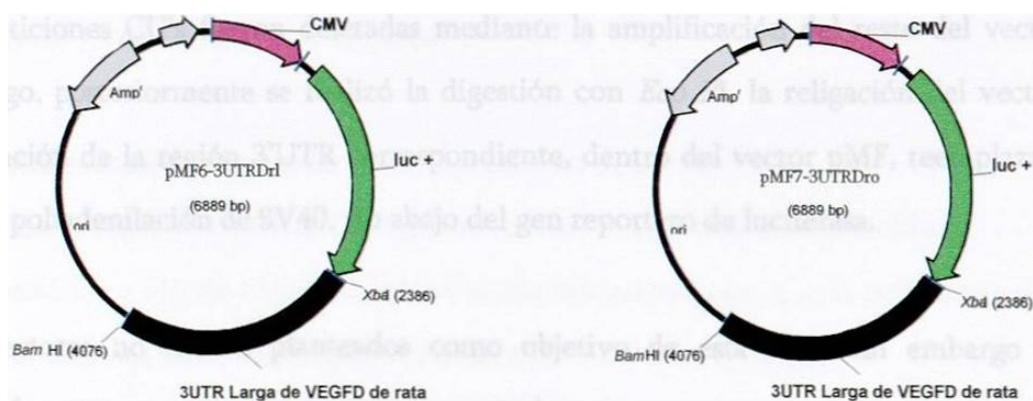


Figura 10. Mapas de los vectores de expresión pMF6-3UTRDrl y pMF7-3UTRDro.

g. pMF1- Δ , pMF6- Δ , pMF7- Δ . Vectores de expresión construidos a partir de los plásmidos pMF1-3UTRDrc, pMF6-3UTRDrl y pMF7-3UTRDro respectivamente. Contienen las mismas regiones 3'UTRs de los plásmidos de los que se partió con la diferencia de que las repeticiones CU's fueron deletadas de dichas regiones. Estas construcciones permitirán indagar mediante su efecto sobre la actividad del gen reportero, su posible función dentro de la región 3'UTR de VEGF-D.

Para la construcción de estos vectores se diseñaron oligonucleótidos específicos con sitio de corte *Eco RI* (oligos 3'UTR VEGF-D Δ rata) flanqueando la región rica en CU's como se muestra en la figura 11.

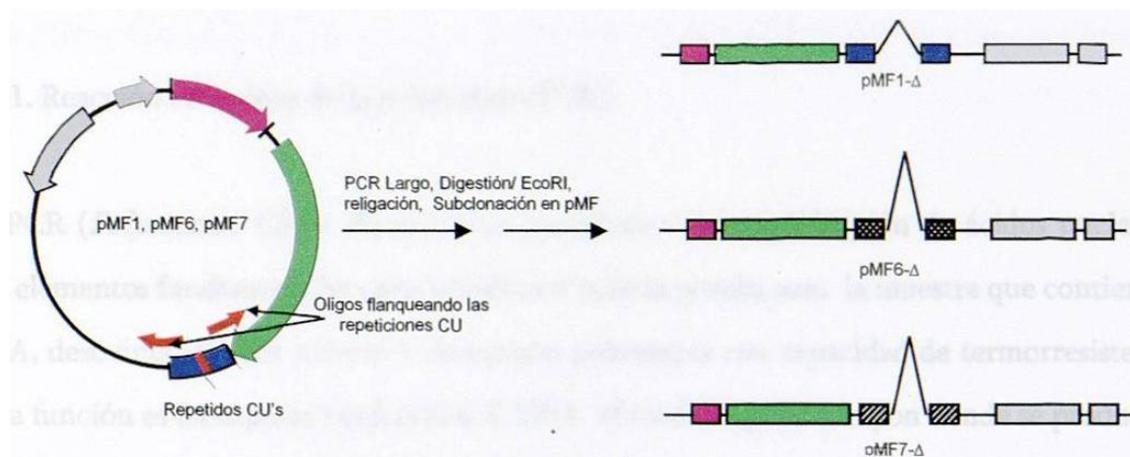


Figura 11. Representación esquemática de la estrategia empleada para la construcción de los vectores pMF1- Δ , pMF6- Δ , pMF7- Δ .

Las repeticiones CU's fueron deletadas mediante la amplificación del resto del vector por PCR largo, posteriormente se realizó la digestión con *Eco RI*, la religación del vector y la subclonación de la región 3'UTR correspondiente, dentro del vector pMF, reemplazando la señal de poliadenilación de SV40, río abajo del gen reportero de luciferasa.

Estos vectores no fueron planteados como objetivo de esta tesis, sin embargo fueron construidos para ser utilizados en ensayos posteriores.



3.6. MÉTODOS.

Para la realización del trabajo experimental, se utilizaron herramientas básicas de biología molecular, dentro de las que se encuentran: ensayos de transcripción reversa (RT), reacciones de PCR clásicas, así como algunas de sus variantes (PCR largo, semicuantitativa y de SMART RACE), purificación de plásmidos, el uso de enzimas de restricción, reacciones de ligación, transformación bacteriana y reacciones de secuenciación de ácidos nucleicos. Por otro lado se emplearon técnicas de cultivo celular, ensayos de transfección y de determinación de actividad de *Luciferasa* y *Renilla* mediante fluorometría. Dichos protocolos se describen brevemente a continuación.

3.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) es una técnica de amplificación de ácidos nucleicos. Los elementos fundamentales para la realización de la prueba son: la muestra que contiene el DNA, desoxinucleótidos trifosfato, la enzima polimerasa con capacidad de termorresistencia cuya función es incorporar nucleótidos al DNA, el medio líquido tampon donde se produce la reacción y que posee la concentración de sales y pH necesarios para la actividad óptima de la enzima, y oligonucleótidos que se diseñan con base a secuencias específicas de DNA; una vez combinados estos elementos, el tubo de reacción se incuba durante varios ciclos de temperaturas y cada ciclo tiene tres pasos:

- ✓ **Desnaturalización:** separación de las dos cadenas de DNA,
- ✓ **Alineación:** apareamiento de lo oligonucleótidos con su secuencia específica y
- ✓ **Extensión:** los oligonucleótidos actúan como iniciadores para que la polimerasa sintetice dos nuevas cadenas de DNA complementarias a las cadenas originales.

Este ciclo de síntesis se repite de 30 a 40 ciclos por lo que la cantidad de estos productos se duplica con cada ciclo, de tal manera que se van acumulando de forma exponencial.



Durante el desarrollo de este trabajo además de la reacción de PCR clásica se emplearon algunas de sus variantes con fines de clonación, secuenciación y mutagénesis; dentro de dichas variantes se encuentran la RT-PCR, PCR largo, PCR semicuantitativa y la PCR SMART-RACE. A continuación se describen brevemente las consideraciones generales para el montaje de dichas técnicas.

3.6.1.1. Retrotranscripción (RT).

Fue utilizada para la obtención del DNA complementario de muestras de RNA total (proporcionados por el Dr. Francisco Velázquez) de las líneas celulares PC12, PC12wnt1, PC12 HB⁺ y PC12HB⁻, mediante el kit Advantage RT-for-PCR de BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, EUA).

Brevemente: A 12.5µl de RNA total (1.0 µg) se adicionó 1.0 µl de oligo (dT), se calentó a 70°C por 2 minutos, se puso en hielo y se adicionó la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen (µl)
Tampon de reacción (5X)	4.0
Mezcla de dNTPs (10mM c/u)	1.0
Inhibidor de RNAsa (1U/µl)	0.5
Transcriptasa Reversa (MMLV)	1.0
Volumen Total	6.5

Se mezcló por pipeteo suave y se incubó a 42°C por 1 hora en el termociclador. Posteriormente se calentó a 95°C por 5 minutos para detener la reacción y eliminar cualquier actividad DNAsa. Se adicionaron 80 µl de H₂O DEPC. Los DNA's complementarios así preparados fueron almacenados a -20°C hasta su utilización. La caracterización de éstos DNAs complementarios fue realizada inicialmente por el Dr. Francisco Velázquez y reproducida a manera de confirmación en este trabajo de tesis.



3.6.1.2. PCR clásica.

Utilizadas para la amplificación de fragmentos específicos con fines de detección, clonación y caracterización, las reacciones de PCR clásicas fueron montadas utilizando el kit TITANIUM Taq PCR de BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, EUA), que ofrece la ventaja del denominado "Inicio en Caliente", gracias a que incluye el anticuerpo TaqStart que permite que la polimerasa inicie la síntesis de DNA hasta que este anticuerpo es desnaturalizado durante el primer ciclo de calentamiento, de esta manera se evita la síntesis inespecífica de DNA a temperaturas inferiores (por ejemplo durante el tiempo de preparación de la reacción). El criterio general del que se partió para la preparación de este tipo de reacciones fue el siguiente:

Reactivo	Volumen (µl)
H ₂ O	8.3
Tampon de reacción (10X)	1.0
Mezcla de dNTPs (10mM c/u)	0.1
Primers (20 µM)	0.5
Taq DNA polimerasa TITANIUM	0.1
Volumen Total	10.0

Durante cada ciclo de síntesis se emplearon las siguientes temperaturas y tiempos:

Temperatura	Tiempo	Numero de Ciclos
94°C	1 minuto	
94°C	30 segundos	
68°C	*	30-40 ciclos
72°C	1 minuto	

* Por cada 800 bases se dio 1 minuto de extensión



3.6.1.3. PCR largo.

El procedimiento de PCR largo fue utilizado en las estrategias de delección de las repeticiones CU's de los plásmidos pMF1, pMF6 y pMF7 (que poseen las regiones 3'UTRs VEGF-D corta y largas respectivamente), para dar origen a los vectores de expresión pMF1- Δ , pMF6- Δ y pMF7- Δ . El experimento fue realizado empleando el kit Six Paq, *rTth* DNA Polymerase, XL and XL Buffer II Pack, de Applied Biosystems (Foster, CA, EUA). La polimerasa *rTth* XL (Extra Long) es una enzima diseñada para amplificar fragmentos de DNA de gran tamaño (de 5 a más de 40 kb), la polimerasa Ventra es un componente de esta enzima lo que proporciona cantidades optimizadas de actividades correctoras tanto de 5' a 3' como de 3' a 5'.

Para la amplificación de fragmentos largos es recomendado utilizar la técnica de "inicio en caliente" (Hot Start), por lo que se preparan dos mezclas por separado para evitar el contacto de la polimerasa con los oligonucleótidos; de esta manera, se evita que la actividad exonucleasa de 3' a 5' de la enzima pueda digerir y/o modificar los extremos 3' de los oligos cuando la enzima, los oligonucleótidos y el acetato de magnesio se agregan al mismo tiempo. Por otro lado se disminuyen las reacciones de oligomerización colaterales. Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

✓ En un tubo de 0.2 ml se preparó una "mezcla inferior" como se indica en la siguiente tabla.

Mezcla Inferior

Reactivo	Volumen (μ l)
H ₂ O	6.0
Tampon de reacción II (3.3X)	6.0
Mezcla de dNTPs (10mM c/u)	1.0
Primers (20 μ M)	4.0
Acetato de Magnesio (25mM)	3.0
Volumen Total	20.0



- ✓ Se adicionó media perla Ampliwax PCR Gem 50 al tubo, se incubó 5 minutos a 80°C y se dejó a temperatura ambiente por 3 minutos. Cuidadosamente evitando tocar la superficie de la perla, se adicionó la siguiente “mezcla superior”

Mezcla Superior

Reactivo	Volumen (μ l)
H ₂ O	19.5
Tampon de reacción II (3.3X)	9.0
DNA polimerasa rTth (2U/ μ l)	0.5
DNA plasmídico (0.3 μ g/ μ l)	1.0
Volumen Total	30.0

NOTA: Estos pasos tienen como objetivo por un lado, incrementar la temperatura para permitir que la perla se funda; y por otro disminuir dicha temperatura para permitir que la perla solidifique de nuevo sobre la mezcla de reacción inferior, permitiendo la formación de una capa de separación. Sobre esta superficie sólida, se adiciona la mezcla superior, evitando así el contacto entre ambas mezclas de reacción hasta que se inicie un nuevo ciclo de calentamiento (Hot Start).

- ✓ Una vez adicionada la mezcla superior, el tubo se regresó al termociclador bajo el siguiente programa de temperaturas:

Temperatura	Tiempo	Numero de Ciclos
94°C	1 minuto	
94°C	15 segundos	
68°C	7 minutos	16 ciclos
94°C	15 segundos	12 ciclos (Incremento de 15
68°C	7 minutos	segundos por ciclo)
72°C	10 minutos	



Los productos obtenidos fueron verificados en geles de agarosa/EtBr al 1.0% y almacenados a -20°C hasta su utilización.

3.6.1.4. PCR Semicuantitativa.

La PCR semicuantitativa es una variante de la PCR clásica en la cual se compara el nivel de expresión del gen de interés en dos diferentes condiciones; estos niveles son normalizados en base a un gen "constitutivo" (β -actina en nuestro caso) cuya expresión no varía en tales condiciones.

La PCR semicuantitativa fue empleada para la determinación y comparación de niveles de expresión de genes RET, NEU, VEGF-D y c-myc en las diferentes líneas celulares (PC12, PC12wnt1, PC12HB⁺ y PC12 HB⁻). La elección de los genes RET y NEU como criterio de evaluación del sistema celular, se debió a que ya se contaba con resultados preliminares (Velázquez, datos no publicados) del comportamiento de estos genes en las líneas celulares PC12, por lo que se incluyeron con fines comparativos. Por otro lado con fines de corroborar los datos obtenidos por Velázquez para VEGF-D, (principal gen de estudio de esta tesis), los niveles de expresión de este gen también fueron analizados. El caso de c-myc adquiere interés debido a que este oncogen es un blanco transcripcional de la vía wnt y su comportamiento en el sistema celular PC12 no está reportado.

Previo a la determinación, se realizó un procedimiento de estandarización, durante el cual se verificó que ninguna de las muestras analizadas llegara a la fase de meseta al final de la reacción de amplificación, es decir se realizó cuando la amplificación se encontraba en su fase exponencial. Por otro lado se verificó que los oligonucleótidos utilizados durante la reacción se encontraran en la cantidad suficiente para evitar que este fuera un punto limitante durante el proceso. Una vez estandarizada la cantidad de muestra, los tiempos de extensión, la concentración de oligos y el número de ciclos se procedió a la realización de la prueba. Los



criterios de reacción para el montaje de estos ensayos fueron los mismos que los mencionados en el apartado 3.5.6.2 (PCR clásica), con las siguientes consideraciones:

1. Se prepararon 4 mezclas de reacción, una por cada muestra de DNAc (PC12, PC12wnt1, PC12 HB⁺, PC12 HB⁻), cada mezcla se dividió en 4 tubos etiquetados del 1 al 4 (4 juegos de tubos, un juego para cada muestra de DNAc).
2. Las muestras fueron transferidas al termociclador. Se inició la reacción de PCR con las condiciones de temperatura, tiempo y número de ciclos estandarizados para cada procedimiento.
3. Una vez que la amplificación llegó a la fase exponencial (de no saturación) se detuvo momentáneamente la ciclación y los tubos numero 1 fueron retirados del termociclador e introducidos inmediatamente en un baño con hielo. Se procedió con la reacción de amplificación de las muestras restantes; dos ciclos después se retiraron los tubos etiquetados con el número 2, y así sucesivamente cada 2 ciclos hasta retirar todos los tubos.
4. Una vez concluida la reacción se centrifugaron brevemente las muestras para coleccionar todo el contenido en el fondo del tubo. Se verificó que no hubiera pérdidas por evaporación reflejadas en el volumen de reacción que pudieran influir en la determinación. Se cargaron 6.0 µl de cada tubo de reacción en un gel de agarosa/EtBr al 2.0%. Las imágenes obtenidas fueron analizadas por densitometría utilizando el programa LabWorks v 4.5.00.0 de UVP (Upland, CA).

3.6.1.5. PCR RACE.

Denominada por sus siglas en inglés Rapid Amplification of cDNA Ends, la PCR RACE fue empleada para la amplificación de la región 3'UTR de VEGF-D a partir de RNA total proveniente de la línea celular PC12-Wnt1, mediante la tecnología SMART-RACE de BD



Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, EUA). Dicha tecnología es utilizada para la obtención de la longitud completa de los extremos 5' y 3' del RNA mensajero de interés. Para el caso de la obtención de la región 3'UTR se lleva a cabo la generación de la primera cadena de DNAc por transcripción reversa utilizando un oligo dT modificado y la enzima BD PowerScript RT. En la reacción de amplificación se utiliza un oligonucleótido gen específico y un juego de oligos adicionales provistos por el kit, con secuencias que se superponen unas con otras, para lograr la amplificación específica y completa de la región 3'UTR de interés (figura 12).

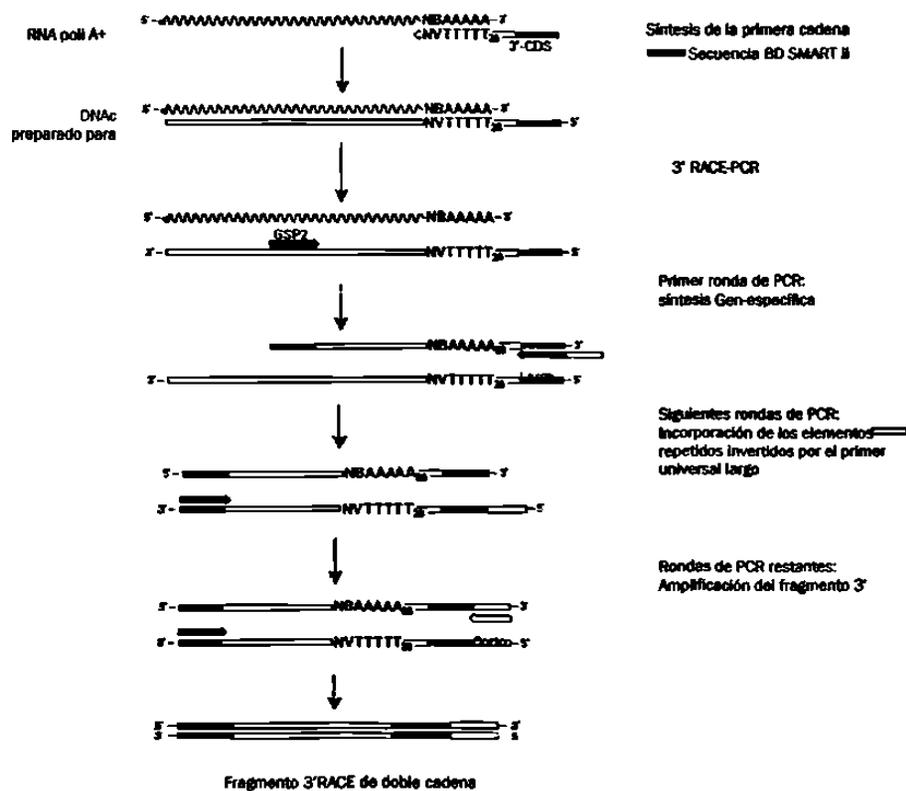


figura 12. Diagrama de flujo para la amplificación de la región 3'UTR utilizando la tecnología SMART-RACE. En la síntesis del DNAc se utiliza oligo dT (3'CDS) cuya secuencia (a excepción de las T) esta contenida en el "oligonucleótido largo" utilizado en la etapa de PCR. Durante la etapa de amplificación se utiliza un oligo gen-específico (GSP2) además del oligo universal largo. Un oligo adicional (corto) diseñado a partir del oligonucleotido universal largo es utilizado para la amplificación completa del extremo 3'UTR.

El procedimiento que se siguió se describe brevemente a continuación.



Síntesis de la primera cadena de DNAc: Previo a la amplificación de la región 3UTR de VEGF-D, partiendo de RNA incluido en el kit, se corrió un control positivo sugerido por el proveedor tanto para la síntesis de DNAc, como para la amplificación de las regiones 3' y 5'UTR del receptor de la Transferrina (TFR); este control se incluyó con la finalidad de verificar que los reactivos provistos por el kit estuvieran en buen estado y que las condiciones de ciclación sugeridas por el proveedor fueran óptimas y aplicables para este fin (el DNAc obtenido se utilizó como control positivo en reacciones posteriores). En un tubo de microcentrífuga de 0.5ml se preparó lo siguiente:

Reactivo	Volumen (μ l)
RNA total (1.0 μ g/ μ l)	1.0
3'-CDS primer A	1.0
H ₂ O libre de nucleasas	3.0
Volumen Total	5.0

2. Se mezcló por pipeteo suave y se centrifugó brevemente para colectar todo el contenido en el fondo del tubo. Se incubó a 70°C por 2 minutos; el tubo de reacción se incubó en hielo por 2 minutos y se le adicionó la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen (μ l)
5X First-Strand Buffer	2.0
DTT (20.0 mM)	1.0
Mezcla de dNTP's (10.0 mM)	1.0
Transcriptasa Reversa BD PowerScript	1.0
Volumen Total	10.0

4. Se mezcló el contenido del tubo por pipeteo suave y se incubó a 42°C por 1.5 horas en un termociclador de tapa caliente. Se adicionaron 100 μ l de buffer de tricina-EDTA para diluir el producto de reacción.



5. Se calentó el tubo a 72°C por 7 minutos para detener la reacción y las muestras fueron almacenadas a -20°C. Hasta este punto se tienen la muestra de DNAc de 3'RACE.

PCR. Las reacciones se optimizaron para ser realizadas con la BD Advantage 2 polimerase mix. Para cada 10.0 µl de reacción de PCR, se mezclaron los siguientes reactivos:

Mezcla maestra para 1 reacción

Reactivo	Volumen (µl)
H ₂ O	6.9
Tampon BD Advantage 2 (10X)	1.0
Mezcla de dNTP's (10 mM)	0.2
Mezcla de polimerasas BD Advantage 2 (50X)	0.2
Volumen Total	8.3

Para cada ensayo RACE se preparó la reacción de PCR como se muestra a continuación; cada uno de los componentes fue adicionado a tubos de 0.2 ml en el orden mostrado.

Reactivo	M1 3'RACE (Muestra)	M2 Oligo 3'+5' (Control +)	M3 UPM (Control -)	M4 Oligo 3' (Control -)
3'RACE DNAc	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
UPM (10X)	1.0 µl	-	1.0 µl	-
Oligo 3' (10 µM)	0.2 µl	0.2 µl	-	0.2 µl
Oligo 5' (10 µM)	-	0.2 µl	-	-
H ₂ O	-	0.8 µl	0.2	1.0
Mezcla maestra	8.3 µl	8.3 µl	8.3 µl	8.3 µl
Volumen Total	10.0 µl	10.0 µl	10.0 µl	10.0 µl



Se mezcló por pipeteo suave, se centrifugó brevemente para colectar el contenido en el fondo del tubo y las muestras se colocaron en el termociclador bajo las siguientes condiciones.

Temperatura	Tiempo	Numero de Ciclos
94°C	30 segundos	5 ciclos
72°C	3 minutos	
94°C	30 segundos	5 ciclos
70°C	30 segundos	
72°C	3 minutos	29 ciclos
94°C	30 segundos	
68°C	30 segundos	29 ciclos
72°C	3 minutos	

Los productos obtenidos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa/EtBr al 2.0%.

3.6.2. Aislamiento de DNA plasmídico por el método de Lisis Alcalina.

La técnica utilizada para la obtención de DNA plasmídico fue una modificación del método de Lisis Alcalina descrito por Sambrook y *cols* (2001). El método se describe a continuación y fue utilizado cuando se requirió la caracterización de candidatos.

1. Se inocularon 25 ml de medio LB¹ con una colonia de células de *E. coli* portadoras del plásmido de interés y se cultivaron las células bacterianas durante 12-16 horas a 37°C, con agitación orbital (300 r.p.m.). El medio se suplementó con el antibiótico adecuado (la concentración final de este antibiótico fue 100 µg/ml para el caso de la ampicilina).

¹ LB: 10g de Bactotripton, 10g de NaCl, 5.0g de Extracto de levadura, se ajustó el volumen a 1L. Se esterilizó por autoclave durante 20 min a 120°C.



2. Se centrifugó por 5 min. a 5000 r.p.m., se descartó el sobrenadante y el botón bacteriano fue resuspendido en 250µl de solución I². Esta mezcla se pasó a un tubo eppendorf de 2.0ml. Se adicionaron 500µl de la solución II³, se agitó por inversión de 5 a 7 veces y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Se agregaron 375 µl de la solución III⁴, se agitó por inversión de 5 a 7 veces y se incubó en hielo por 5 min. Se centrifugó 5 min a 14 000 r.p.m.
4. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo de 1.5 ml. El DNA fue precipitado con 0.7 volúmenes de isopropanol. Se mezcló por inversión y se centrifugó 5 minutos a 14000 r.p.m.
5. Se eliminó el sobrenadante, y la pastilla fue resuspendida en 300 µl de H₂O milliQ (mQ), se adicionaron 300 µl de Acetato de amonio 7.5M⁵ y 600 µl de isopropanol. Se mezcló por inversión y se centrifugó 5 minutos a 14 000 r.p.m.
6. Se retiró el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con 500 µl de etanol al 80%. Se retiró el exceso de líquido y se dejó secar la pastilla para posteriormente resuspenderla en 100 µl H₂O mQ (2.0 µl son suficientes para verificar la integridad del DNA plasmídico por electroforesis en gel de agarosa/EtBr al 1.0%).

Se realizaron los siguientes pasos de purificación cuando se requería obtener un DNA de buena calidad libre de proteínas (por ejemplo con fines de secuenciación o después de una caracterización para continuar con transformaciones bacterianas, etc).

² Solución I: EDTA 10mM pH 8.0 (Ajustado a pH 8.0 con NaOH sólido), Glucosa 50mM y Tris-HCl 25mM pH 8.0. Preparar la solución de estándares de 100 mL estériles mantenidos a 4°C.

³ Solución II: NaOH 0.2N y SDS al 1% (p/v).

⁴ Acetato potásico para lisis alcalina: Se mezclan 60 mL de acetato potásico 5M, 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5 mL de agua destilada. La solución resultante tiene un valor de pH de 4.8.

⁵ Acetato de Amonio 7.5M: Pesar 57.81g de acetato de amonio y aforar a 100mL con agua destilada.



1. Se adicionó 1 µl de RNAsa (10mg/ml) y se incubó a 37°C por 15 minutos; se adicionaron 400 µl de H₂O mQ, 200 µl de fenol y se mezcló con la ayuda de vórtex.
2. Se adicionaron 200 µl de cloroformo, se mezcló por vórtex y se centrifugó a 14 000 r.p.m. por 1 minuto.
3. Se recuperó el sobrenadante y se adicionaron 400 µl de cloroformo. Se mezcló por vórtex y se centrifugó a 14 000 r.p.m por un minuto.
4. El sobrenadante fue recuperado y se llevó a cabo la precipitación del DNA con 400 µl de acetato de amonio 7.5M y 800 µl de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14 000 r.p.m por 5 minutos.
5. Se realizaron 2 lavados con etanol al 70% y por último la pastilla se resuspendió en un volumen de 30 µl.

3.6.3. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.

La purificación de DNA a partir de geles de agarosa fue llevada a cabo mediante el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega (Madison, WI, EUA). El sistema está basado en la capacidad del DNA de unirse a las membranas de sílica en presencia de sales caotrópicas (isotiocianato de guanidina: solución de unión a la membrana). El kit esta diseñado para la separación de fragmentos que van de 100 pb a 10 kb con un porcentaje de recuperación del 84 al 95% dependiendo del tamaño del fragmento. La cantidad máxima de DNA que puede ser purificada es de 40 µg totales. El procedimiento que se siguió fué el siguiente:

1. Posterior a la electroforesis y tinción del gel con bromuro de etidio, la banda de interés se visualizó al exponer el gel a luz ultravioleta (U.V) de un transiluminador, con la ayuda de un



bisturí, se cortó la banda procurando exponer el menor tiempo posible el DNA a la luz UV (con la finalidad de evitar daños en el DNA).

2. Se introdujo el fragmento de agarosa a un tubo eppendorf de 1.5 ml vacío previamente pesado, se pesó nuevamente y por diferencia se determinó el peso exacto del fragmento de agarosa que se cortó del gel.

3. Por cada mg de agarosa se adicionó 1 μ l de solución de unión (provista por el kit), se agitó con ayuda de vórtex y se incubó a 60°C hasta la disolución completa de la agarosa.

4. Se montó una columna por cada muestra a purificar sobre su respectivo tubo colector (previamente etiquetado).

5. Se transfirió la muestra a la columna, se incubó por 1 minuto. Se centrifugó a 14 000 r.p.m por 1 minuto.

6. Se retiró la columna, se descartó el líquido colectado (el DNA queda unido a la membrana de la columna), se reincorporó la columna al tubo colector y se adicionaron 700 μ l de solución de lavado⁶. Se centrifugó a 14 000 r.p.m por 1 minuto.

7. Se repitió el paso 6 solo que adicionando 500 μ l de solución de lavado y 10 minutos de centrifugación a 14 000 r.p.m.

8. Se transfirió la columna a un tubo eppendorf nuevo, se adicionaron 50 μ l de H₂O libre de nucleasas (provista por el kit), se incubó por 1 minuto y se centrifugó a 14 000 r.p.m. por 1 minuto.

⁶ Solución de lavado: Antes de utilizarse debe ser suplementada con 75 mL de etanol al 95%.



9. Se descartó la columna. El DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría y su integridad se verificó por electroforesis en gel de agarosa/EtBr.

3.6.4. Purificación de productos de PCR.

Los fragmentos de DNA obtenidos por PCR fueron purificados por columna con la finalidad de eliminar contaminantes tales como la enzima, oligonucleótidos y sales presentes en la mezcla de reacción que pudieran ser blanco de interferencia en usos posteriores. Con este fin se utilizó el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega (Madison, WI, EUA). El procedimiento que se siguió fue el mismo que el descrito en el apartado 3.5.2 con la siguiente modificación:

1. Por cada volumen de reacción de PCR se adicionó un volumen igual de solución de unión a la membrana. Se mezcló por pipeteo suave.
2. Se montó una columna por cada muestra a purificar sobre su respectivo tubo colector, previamente etiquetado. Se prosiguió igual que en el apartado 3.5.2 a partir del paso 5.

3.6.5. Digestión de DNA con endonucleasas de restricción

Las endonucleasas de restricción son enzimas capaces, por un lado de reconocer una pequeña secuencia de bases en el DNA y, por otro, de producir una ruptura en puntos específicos de la cadena.

Las enzimas de restricción fueron utilizadas de acuerdo a las instrucciones del proveedor; cada una de ellas posee condiciones óptimas de temperatura, concentración de sales y pH para su funcionamiento, como norma general la concentración final del tampón de reacción fue 1X, el volumen de la enzima no superó el 10% del volumen de reacción debido a la concentración de glicerol en la que es conservada la enzima (concentraciones altas de glicerol



pueden inhibir la actividad de la enzima). Para el montaje de cada reacción se partió del dato de que 1 unidad de enzima es capaz de digerir 1µg de DNA.

Se manejaron 2 tiempos de incubación el primero de ellos de 1 hora en aquellos casos donde solo se requirió caracterizar plásmidos o fragmentos y, de 12-16 horas en aquellos casos en que los fragmentos digeridos se utilizaron posteriormente con fines de clonación.

El DNA digerido se analizó por geles de agarosa/EtBr (cuando el objetivo fue caracterizar) o se purificó por columna para la eliminación de contaminantes.

3.6.6. Reacción de Ligación con T4 DNA ligasa.

De manera general: para una reacción de 20 µl cuya relación molar vector/inserto fue 2:1, se utilizó 1 µl de T4 DNA ligasa, la concentración final del tampon de reacción fue 1X y de 1mM para el ATP. Se manejaron 2 tiempos y 2 temperaturas de ligación: a 37°C por 1 hora para extremos cohesivos y, 16°C por 12-16 horas para extremos romos. Posteriormente la reacción fue verificada observando la escalera clásica de ligación por electroforesis en gel de agarosa/EtBr al 1%. El volumen restante de la reacción de ligación fue utilizado en procesos de transformación bacteriana.

3.6.7. Preparación y Transformación de Competentes: Método del CaCl₂.

A la hora de introducir DNA plasmídico por medio de procesos de transformación (muchas especies bacterianas carecen de sistemas naturales de transformación) se requiere una "disponibilidad" de la bacteria, por lo que se debe facilitar el paso de las moléculas de ADN a través de las barreras externas de la célula, este estado es lo que se denomina como "competencia" y las células que lo presentan se denominan "células competentes".



La obtención de células competentes en *E. coli* consiste en la concentración de un cultivo recogido en fase logarítmica, que se somete a lavados sucesivos en una solución fría (4°C) de CaCl₂. Posteriormente durante la transformación, las células se ponen en contacto con el DNA plasmídico y se someten a un choque térmico que altera las membranas de las bacterias haciéndolas más permeables y facilitando así la entrada del DNA al interior de la bacteria.

El método utilizado es una modificación del método descrito por *Sambrook y cols* (2001). Se producen aproximadamente de 5X10⁶ a 2X10⁷ colonias transformadas por µg de DNA plasmídico superenrollado.

1. Preparación: En un matraz erlenmeyer de 250 ml se inocularon 50 ml de medio de cultivo LB, con la cepa bacteriana *Escherichia coli* TOP 10. Se incubó a 37°C en un baño de agua orbital rotatorio con agitación de 300 r.p.m. hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nanómetros de 0.4 (D.O_{600nm} = 0.4).
2. Se transfirió el cultivo a un tubo falcon de 50 ml y se centrifugó a 3500 r.p.m por 5 minutos. Se retiró el medio de cultivo y el botón bacteriano se resuspendió por pipeteo suave con 20 ml de CaCl₂ 0.1M⁷ frío evitando la formación de grumos. Se incubó en hielo por 20 minutos.
3. Se centrifugó a 3500 r.p.m. por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y el botón bacteriano fue resuspendido por pipeteo suave en 2 ml de CaCl₂ 0.1M frío. Las bacterias calcio-competentes así preparadas se guardaron a 4°C toda la noche para mejorar la eficiencia de la transformación.
4. Transformación: El DNA plasmídico (50-500 ng) que se utilizó para las transformaciones se llevó a un volumen final de 20 µl en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se adicionaron 200 µl

⁷ CaCl₂ 0.1M: 11.098g de CaCl₂ anhidro aforar a 1L con H₂O mQ y esterilizar por filtración.



de las células calcio-competentes, se mezclaron por pipeteo suave y se incubaron en hielo durante 20 minutos.

5. Se sometió la mezcla a 42°C por 1 minuto y rápidamente se colocaron en hielo por 3 minutos. Se adicionó 1 ml de medio LB (sin antibiótico) y se incubaron a 37°C en un thermomixer con agitación de 300 r.p.m por 1 hora.

6. Se centrifugaron a 7000 r.p.m. se retiró aproximadamente 1 ml de sobrenadante y se resuspendió el botón bacteriano con el medio restante. Se sembraron 100 µl de esta suspensión bacteriana en placas de LB-Agar⁸ suplementadas con ampicilina. Las placas se incubaron a 37°C toda la noche. Posteriormente se realizó la selección y caracterización de candidatos con enzimas de restricción como se describe en el apartado 3.5.3.

3.6.8. Secuenciación de ácidos nucleicos.

El procedimiento utilizado fue descrito por Sanger y *col.* (1977). Es denominado método enzimático o de determinación didesoxi, debido a que implica la utilización de didesoxinucleótidos trifosfato (análogos de los desoxinucleótidos) que carecen del grupo OH en carbono 2' y 3' de la desoxirribosa, por lo que no pueden formar los enlaces fosfodiéster necesarios para la polimerización.

Se realizan 4 reacciones por separado cada una de las cuales contiene en su mezcla de reacción concentraciones elevadas de los dNTP's normales y concentraciones bajas de uno de los 4 ddNTP.

Durante la etapa de polimerización cada ddNTP es agregado al azar; esta adición inhibe el proceso de polimerización (debido a la falta del OH requerido para la adición del siguiente

⁸ **LB-Agar:** 10g de Bactotripton, 10g de NaCl, 5.0g de Extracto de levadura, 20g de agar bacteriológico, ajustar el volumen a 1L. Esterilizar por autoclave durante 20 min a 120°C. Se adiciona ampicilina a una concentración final de 100µg/mL. Se distribuye en placas de cultivo bacteriológico.



nucleótido). El resultado es una población de productos amplificados de tamaño variable, que representan todas las posiciones de las bases indicadas; dichos fragmentos pueden ser resueltos por electroforesis de las 4 reacciones en paralelo en gel de poliacrilamida-urea.

Debido a que los ddNTP's están marcados con colorantes, esto permite que dichos colorantes sean excitados con un láser que los hace emitir fluorescencia y ésta se detecta a su vez en un foto multiplicador acoplado a una computadora, que lee directamente el paso de los fragmentos durante la electroforesis. En la imagen resultante se visualiza directamente la secuencia del templado original representada por bandas ordenadas de acuerdo a su tamaño y al terminador empleado para cada tubo de reacción.

Se utilizó el sistema Termo Sequenase de USB (Cleveland, OH, EUA) en combinación con los terminadores IRDye 800v2 de LI-COR Biosciences (Lincoln, NB, EUA). Brevemente el procedimiento general para la realización de este ensayo consta de tres pasos que se describen a continuación:

1. Reacción de secuenciación: Por cada muestra se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen (μ l)
H ₂ O	21.0
Tampon de reacción Termo sequenase	1.5
Primer 5' o 3' (20 μ M)	2.0
Termo sequenase (4U/ μ l)	0.5
DNA plasmídico (0.5 μ g/ μ l)	2.0
Volumen Total	27.0

Se etiquetaron 4 tubos con las letras A, T, G, C. A cada tubo se le adicionó 1.2 μ l del terminador correspondiente y 6.75 μ l de la mezcla de reacción. Se centrifugaron brevemente para colectar el contenido en el fondo del tubo. Posteriormente se colocaron en un



termociclador de tapa caliente y se sometieron a los siguientes ciclos de tiempos y temperaturas:

Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
94°C	1 minuto	
94°C	30 segundos	
62°C	30 segundos	30 ciclos
72°C	1 minuto	
72°C	5 minutos	

2. **Precipitación:** Una vez terminada la reacción de secuenciación es necesario eliminar todos aquellos ddNTP's marcados que no hayan sido incorporados, así como todos aquellos contaminantes presentes en el tubo de reacción que pudieran arrojar ruido de fondo durante la electroforesis. Con esta finalidad se realizó un paso de precipitación previo a la electroforesis empleando acetato de sodio, etanol y vivid violet como se describe a continuación:

A cada tubo de reacción se le adicionó 1.0 µl de acetato de sodio⁹ 3M pH 5.2, 1.0 µl de Vivid Violet (provisto por el kit) y 20 µl de etanol al 100%.

Se mezcló brevemente con ayuda de vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó a 14000 r.p.m por 15 minutos.

Se retiró el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 100 µl de etanol al 70%. Se centrifugó a 14 000 r.p.m. por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y los restos de alcohol fueron eliminados por evaporación a 80°C por 3 minutos.

⁹ Acetato de sodio 3M pH 5.0. Pesar 24.6g de CH₃COONa diluir en 60mL de H₂O, ajustar el pH a 5.2 con ácido acético glacial y aforar a 100mL con H₂O. Esterilizar por autoclave durante 15 min a 120°C.



La pastilla fue resuspendida en 3.0 μ l de solución STOP (provista por el kit) y almacenadas a -20°C hasta el momento de la electroforesis.

3. Electroforesis: Una vez terminada la precipitación, las muestras fueron desnaturalizadas a 94°C por 5 minutos y 1.5 μ l de cada muestra fueron cargadas en un gel de poliacrilamida (3.75%)-urea (7M)¹⁰. La electroforesis fue llevada a cabo a 2500 volts, a una temperatura de 45°C y el tiempo total de cada corrida fue de 14 horas. La imagen fue analizada mediante el software e-Seq v 1.1 de LI-COR Biosciences (Lincoln, NB, EUA).

3.6.9. Transfección.

La transfección es el proceso a través del cual se introduce material genético al interior de una célula eucariótica mediante la utilización de vectores no virales. Los métodos de transfección son físicos y bioquímicos. Dentro de los métodos físicos se incluyen la electroporación y la microinyección y dentro de los bioquímicos la coprecipitación con fosfato de calcio y la utilización de lípidos catiónicos.

Para la realización de los ensayos de transfección se utilizó el kit TransFast Transfection Reagent de Promega (Madison, WI, EUA), que contiene una mezcla del lípido catiónico {yoduro de N,N[bis (2-hidroxietil)-N-metil-N-[2,3-di (tetradecanoiloxi) propil] amonio} y el lípido neutro DOPE. La preparación de reactivos, así como el protocolo empleado fueron realizados de acuerdo con las indicaciones del proveedor.

En los protocolos abajo descritos se utilizaron cultivos celulares con un 30-40% de confluencia en placas de 24 pozos. A manera de control y de blanco durante la

¹⁰Poliacrilamida (3.75%)-Urea (7M): Agregar 210g de Urea, 68.75 mL de solución de acrilamida/disacrilamida al 40%, 50mL de TBE 10X y llevar a 500 mL con H₂O m.Q. Esterilizar por filtración. En la etapa de preparación del gel, para un volumen total de 60mL adicionar 400 μ L de persulfato al 10% y 40 μ L de TEMED. Se dispone de 3-5 minutos para preparar el gel antes de que la solución polimerice. Para detalles véase el manual de operación de secuenciación de DNA de LI-COR.



cuantificación, en cada experimento se incluyó un pozo adicional en el cual a las células se les dio el mismo tratamiento que a las demás, con la diferencia de que no fueron puestas en contacto con el DNA.

Brevemente: Por cada pozo, se preparó un tubo con 200 μ l de medio de cultivo sin suero conteniendo el reactivo Transfast transfection y el DNAp de interés (0.3 μ g totales de DNA) en una relación 2:1, se mezcló con vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se retiró el medio de cultivo a cada pozo de la placa y se adicionó la mezcla de reacción (200 μ l por pozo). Se incubó la placa por una hora a 37°C; posteriormente se adicionó 1.0 ml de medio completo. Las placas se regresaron a la incubadora hasta el momento del análisis.

3.6.10. Ensayo de actividad de Luciferasa.

El ensayo de actividad de *Luciferasa* puede dividirse en 3 etapas: Reacción de lisis celular, cuantificación de fluorescencia y análisis estadístico de datos.

1. Reacción de lisis celular. Después de 48 horas de realizada la transfección las placas fueron retiradas de la incubadora, se retiró el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados con 500 μ l de PBS 1X¹¹. Las células fueron lisadas con 200 μ l de solución de lisis por pozo y fueron incubadas con agitación por 15 minutos a temperatura ambiente en una plancha rotatoria.

Los extractos celulares fueron recuperados y almacenados a -20°C hasta el momento del análisis.

2. Cuantificación de la fluorescencia. A una celda para luminometría se le adicionaron 50 μ l del reactivo LAR II, 20 μ l del lisado celular (control sin DNA) y se cuantificó la actividad de

¹¹ PBS 1X. 8g. de NaCl, 0.2g. de KCl, 1.44g de Na₂HPO₄ disolver en 800mL de H₂O m.Q. Ajustar a pH=7.4 con HCl y aforar a 1 litro con H₂O m.Q. Esterilizar en autoclave 15 min. a 120°C.