



Luciferasa. Se adicionaron 50 μ l del reactivo Stop & Glo, se mezcló por pipeteo suave y se determinó la actividad para *Renilla*. El objetivo de estas dos primeras lecturas fue la determinación de los niveles de fluorescencia basal emitidos por la muestra y el buffer de lisis, dichos resultados fueron considerados durante el análisis de datos. El mismo procedimiento anteriormente descrito fue utilizado para la determinación de la actividad *Luciferasa/Renilla* para cada una de las muestras.

3. Análisis Estadístico de Resultados. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y los niveles de actividad de luciferasa en las líneas celulares que expresan *wnt1* (PC12wnt1 y PC12HB⁺) fueron comparados con los encontrados para la línea celular PC12HB⁻ mediante la prueba *t* de Student's, con 4 grados de libertad y un nivel de confianza del 95%; los valores de $t > 2.13$ fueron considerados significativos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. COMPROBACIÓN DEL SISTEMA CELULAR COMO UN MODELO DE ESTUDIO PARA INVESTIGAR LA RELACIÓN DE WNT1 EN LA ACUMULACIÓN DEL RNA_m DE VEGF-D.

a. Niveles de expresión de wnt1 en las líneas celulares PC12, PC12wnt1, PC12HB⁻ y PC12HB⁺.

Los niveles de expresión de wnt1 en las líneas celulares PC12 y PC12 HB⁻ son considerablemente más bajos que los obtenidos para las líneas celulares que expresan constitutivamente el oncogen wnt1 (PC12wnt1 y PC12HB⁺) Figura 13.

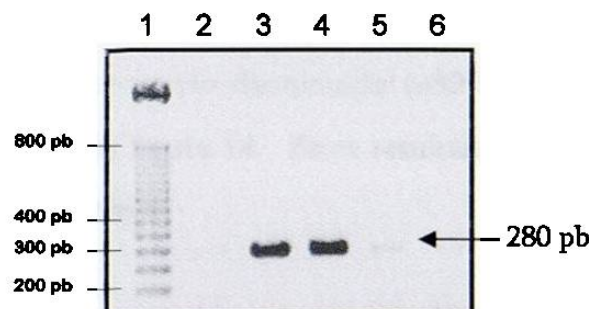


Figura 13. Amplificación de Wnt1. Gel de agarosa al 2.0% mostrando una banda de 280pb correspondiente al producto obtenido durante la reacción de amplificación de wnt1, a partir de DNAC de las líneas celulares PC12, PC12wnt1, PC12 HB⁺ y PC12HB⁻ (Carriles 2, 3, 4 y 5 respectivamente). En el carril 6 se muestra un control negativo de reacción.

b. Niveles de expresión de los genes RET, NEU, VEGF-D, c-myc, y β -Actina en las líneas celulares PC12, PC12wnt1, PC12HB⁻ y PC12HB⁺ mediante RT-PCR semicuantitativa.



- a. **β -Actina.** Mediante análisis densitométrico de las imágenes obtenidas de PCRs semicuantitativas para β -actina, se detectó una variación hacia la baja de aproximadamente el 21% en los niveles de expresión de β -actina en la línea celular PC12 en comparación con el resto de las líneas celulares, dicha variación fue considerada durante el análisis de datos, figura 14. Esta variación hacia la baja en las líneas celulares que no expresan *wnt1*, coinciden con los resultados encontrados por Velázquez (Datos no publicados) que en ensayos tipo Northern blot, encontró que las células PC12HB⁺, PC12HB⁻ y PC12wnt poseen 3 veces más RNAm de β -actina que la línea celular PC12.
- b. **NEU.** En comparación con la línea celular parental (PC12), los niveles de expresión de NEU son mayores (≈ 3.2 veces) en las líneas celulares que expresan constitutivamente el oncogen *wnt1*. En ausencia de expresión de *wnt1* los niveles de expresión NEU se mantuvieron elevados (línea celular PC12 HB⁻) figura 14. Estos resultados concuerdan con los resultados encontrados por Zeng y cols (1996)⁶⁵.
- c. **RET.** El nivel de expresión de RET en células PC12 no solo se incrementó (≈ 2 veces) por la expresión de *wnt1*, sino que se vio disminuido ($\approx 80\%$) en la línea celular PC12 HB⁻ (ausencia de expresión de *wnt1*) figura 14. Estos resultados concuerdan con los resultados encontrados por Zeng y cols (1996)⁶⁵.
- d. **VEGF-D.** De la misma manera que RET los niveles de expresión de VEGF-D se incrementaron con la expresión de *wnt1* (≈ 3 veces en la línea celular PC12HB⁺), mientras que en la línea celular PC12HB⁻, los niveles de expresión de VEGF-D, están disminuidos un 30%, en comparación con la línea celular PC12 HB⁺, figura 14.
- e. **c-myc.** La expresión de c-myc se incrementó con la expresión de *wnt1* (≈ 2.5 veces en la línea celular PC12HB⁺), mientras que en la línea celular PC12HB⁻ los niveles de expresión de c-myc están disminuidos un 30% que en la línea celular PC12 HB⁺, figura 14. Estos resultados concuerdan con el hecho de que c-myc es un blanco transcripcional de la vía *wnt*.



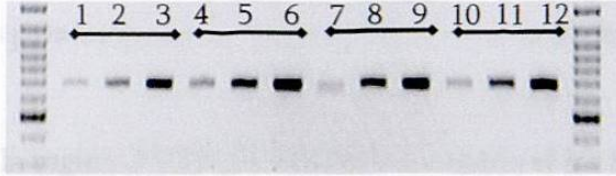

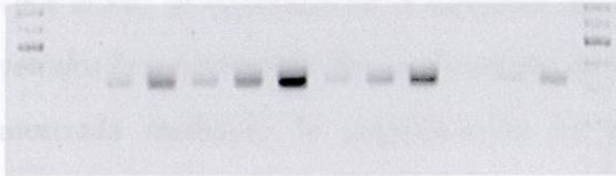

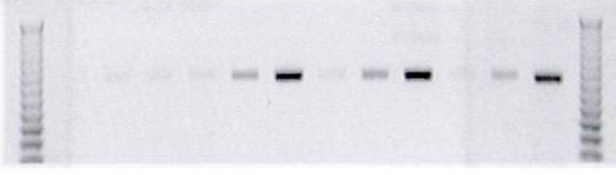
1. GEN	2. LÍNEA CELULAR				3. RESULTADOS DE LA DENSITOMETRÍA	
	PC12	PC12wnt1	PC12HB ⁺	PC12HB ⁻	Línea Celular	Nivel de Expresión
β -Actina					PC12	0,79
					PC12wnt1	0,94
					PC12HB ⁺	1,00
					PC12HB ⁻	0,95
NEU					PC12	0,25
					PC12wnt1	0,87
					PC12HB ⁺	0,88
					PC12HB ⁻	1,05
RET					PC12	0,44
					PC12wnt1	1,06
					PC12HB ⁺	0,52
					PC12HB ⁻	0,14
VEGF-D					PC12	0,47
					PC12wnt1	0,26
					PC12HB ⁺	1,00
					PC12HB ⁻	0,71
c-myc					PC12	0,39
					PC12wnt1	0,92
					PC12HB ⁺	1,00
					PC12HB ⁻	0,73

Figura 14. PCRs semicuantitativas. En la columna central se muestran los diferentes productos amplificados por PCR semicuantitativa en geles de agarosa/EtBr al 2.0%; dentro de esta columna, de manera vertical, los carriles del 1-3 corresponden a los productos amplificados a partir de DNAc de la línea celular PC12; los carriles del 4-6, del 7-9 y del 10-12 los resultados obtenidos a partir de DNAc de las líneas celulares PC12wnt1, PC12HB⁺ y PC12HB⁻ respectivamente. En la columna 1 se muestra el nombre del gen analizado, mientras que en la columna 3 se muestran los resultados obtenidos por densitometría.



4.2. AISLAMIENTO Y SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN 3'UTR DEL RNAm DE VEGF-D.

La obtención de la región 3'UTR de VEGF-D fue realizada por dos aproximaciones: 1). A partir de RNA total de la línea celular PC12HB⁺ utilizando el kit SMART RACE de Clontech y, 2). A partir de la clona comercial de DNAc con número de acceso CK473815. Los resultados obtenidos para cada uno de los procedimientos se muestran a continuación.

4.2.1. Obtención de la región 3'UTR de VEGF-D mediante el kit SMART RACE de Clontech

a. Control positivo del kit. Los resultados obtenidos en la amplificación de las regiones 5' y 3'UTR del receptor de la transferrina obtenidos a partir de RNA total y con oligonucleótidos específicos provistos por el kit, se muestran en la siguiente figura (*para detalles del método véase materiales y métodos la sección 3.6.1.5*). La obtención de la región 5' y 3'UTR de este receptor quedó demostrada mediante la amplificación de productos de 2.6 y 2.9kb respectivamente.

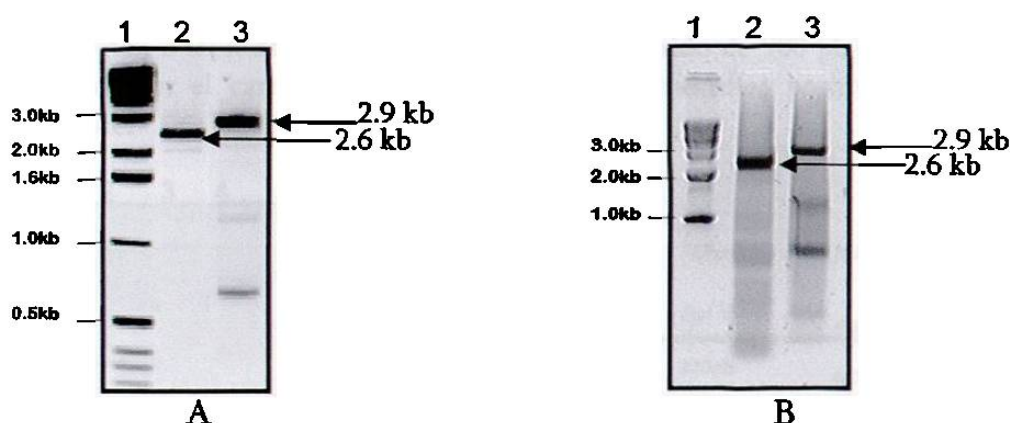


Figura 15. Amplificación de las regiones 5' y 3'UTR del Receptor de la Transferrina. Las reacciones control para el receptor de la transferrina producen los productos RACE de las líneas 2 y 3. El producto 5' de 2.6 kb y el producto 3' de 2.9 kb son mostrados en las figuras. La figura A es la imagen proporcionada en el catálogo con fines de comparación y la figura B son los resultados obtenidos a partir de RNA total provisto por el kit.



b. Amplificación, purificación y caracterización de la región 3'UTR de VEGF-D.

Una vez verificado tanto el kit como las condiciones de amplificación, se amplificó la región 3'UTR de VEGF-D, obteniéndose un fragmento predominante de aproximadamente 900 pb (figura 16A). Para verificar la identidad del fragmento, el producto obtenido fue purificado (figura 16B) y caracterizado por restricción con las enzimas *Bgl* II y *Apa* I, (figura 17).

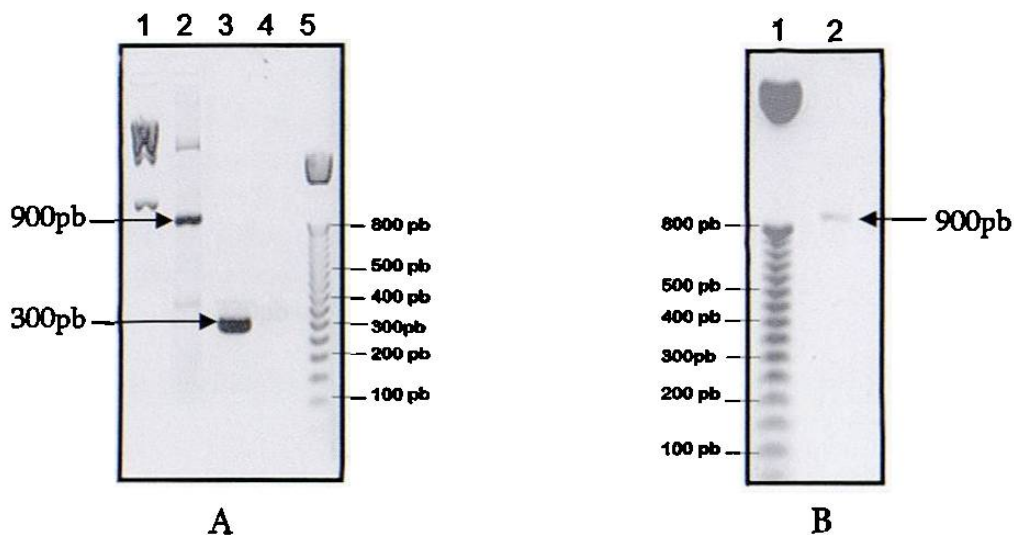


Figura 16. Producto 3'RACE de VEGF-D. Amplificación (A) y purificación (B) del fragmento que contiene la región 3'UTR de VEGF-D. El fragmento obtenido de 900 pb se muestra en el carril 2 de ambas figuras. En el carril 3 y 4 se muestran los controles positivo y negativo de reacción respectivamente.

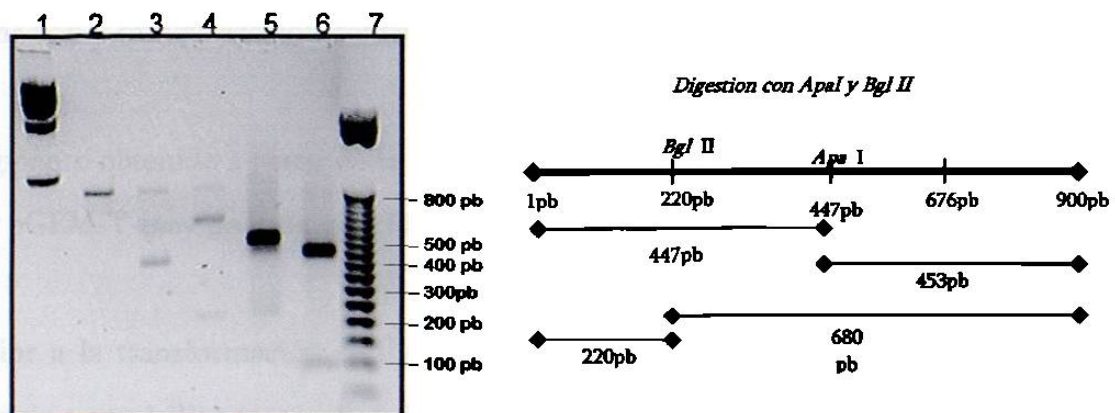


Figura 17. Caracterización del fragmento obtenido por PCR RACE. En el carril 2 se muestra el producto obtenido por PCR RACE sin digerir; la digestión del fragmento con *Apa* I genera una banda representativa de 2 fragmentos de 447 y 453 pb (Carril 3); en el caso de la digestión del fragmento con *Bgl* II se generan dos bandas de 680 y 220 pb respectivamente (carril 4). En el carril 5 y 6 se muestra un control de corte para *Apa* I.



Para realizar una caracterización más exhaustiva del producto obtenido por PCR RACE, se diseñó un oligonucleótido gen específico 5' interno a partir de la secuencia conocida de VEGF-D, este oligo, junto con el oligo anidado 3' provisto por el kit, amplifican un fragmento interno de VEGF-D de 320 pb. A partir del producto obtenido por PCR RACE sin purificar, se realizó una PCR anidada. La amplificación del fragmento de 320 pb confirmó la identidad del producto (figura 18).

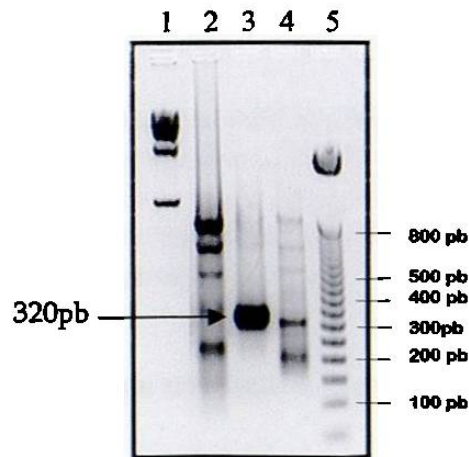


Figura 18. PCR anidada. En el carril 1 de la imagen se muestra el fragmento obtenido a partir de la PCR RACE; en el carril 2 el producto amplificado mediante PCR anidada; En el carril 4 se muestra un control positivo de reacción.

c. Clonación y caracterización del fragmento obtenido.

El fragmento obtenido a partir de la PCR anidada fue purificado (figura 19 A) y clonado en el vector pGEM-T-easy de Promega (Madison, WI, EUA).

Posterior a la transformación se llevó a cabo la selección de las clonas candidatas por su resistencia a ampicilina y se caracterizó el DNA plasmídico mediante restricción con *Eco* RI, dicha caracterización liberó un fragmento de 320 pb correspondiente al fragmento de interés (figura 19 B).

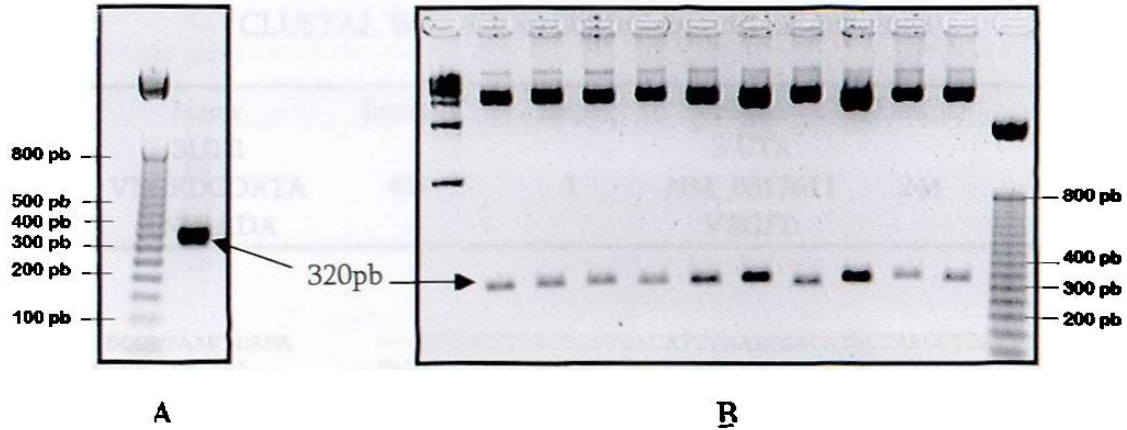


Figura 19. Purificación del fragmento obtenido mediante la PCR anidada (A) y caracterización de candidatos mediante su patrón de restricción con *Eco RI* (B). Geles de agarosa/EtBr al 2.0% mostrando los productos obtenidos (A) en la purificación del fragmento obtenido mediante PCR anidada y, (B) en la caracterización del DNA plasmídico de los candidatos del 9 al 18 con *Eco RI*. El producto esperado en ambos casos corresponde a un fragmento de 320 pb.

d. Secuenciación del fragmento que contiene la región 3'UTR de VEGF-D clonado en pGEM-T-easy.

La secuenciación del fragmento clonado en pGEM-T-easy permitió la obtención de una secuencia de 408 pb (denominada "Corta") correspondiente a la secuencia completa de la región 3'UTR de VEGF-D de rata (figura 20). La secuencia obtenida fue comparada con la secuencia parcial (NM_031761) reportada en el banco de datos mediante el programa *clustal W* v1.82; Los resultados del alineamiento muestran en la secuencia obtenida, la existencias de 3 inserciones de una base cada una (figura 21).

```

TTTGGTTTACTGGTGACATTTAAAGGACATACTAACCTGATTTATTGGGGCTCTTTTCTCTCAGGGCCCAAGCACACTCTTAAAG
GAACACAGACGTTTGGCCTCTAAGAAATACATGGAAGTATTATAGAGTGATGATTAAATTGTCTTCTTGTTCAAAACAGGGTCT
CATGAGTTACAGACCCGATTGCCATGCGTCCCGTCATGCTATCATGAGCGGAAAAGAAGTCACTGGCATTAAACAACAGGGTT
AAGAGAGGTTTGGCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCCTCCCTCTCTCTGTAGGCAAGACATTTAAAGATGA
CTATAAACCTTGAAGGCCATTGATGGGTTTGATCAATTTCAAATCTACCCAAACTAACCCTGAG
    
```

Figura 20. Secuencia completa de la región 3'UTR de VEGF-D. En la figura se muestran con fondo gris la secuencia completa de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de la región 3'UTR corta de VEGF-D, que originan un fragmento de 408pb. En color rojo se muestran los elementos desestabilizadores tipo ARE, en color azul la región rica en citosinas, en verde elementos estabilizadores típicos.



CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
1	3UTR VEGFDCORTA ANIDADA	408	2	3'UTR NM_0317611 VEGFD	244	98
	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			---	TTGGTTTACTGGTGACATTTAAAGGACATACTAACCTGATTTATTG	47
	3UTRVEGFDMN_031761			TAATTTGGTTTACTGGTGACATTTAAAGGACATACTAACCTGATTTATTG		50

	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			GGGCTCTTTTCTCTCAGGGCCCAAGCACACTCTTAAAGGAACACAGACGT		97
	3UTRVEGFDMN_031761			GGGCTCTTTTCTCTCAGGGCCCAAGCACACTCTTAAAGGAACACAGACGT		100

	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			TTGGCCTCTAAGAAATACATGGAAGTATTATAGAGTGATGATTAATGT		147
	3UTRVEGFDMN_031761			TTGGCCTCTAAGAAATACATGGAAGTATTATAGAGTGATGATTAATGT		150

	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			CTTCTTGTTTCAAACAGGGTCTCATGAGTTACAGACCCGTATTGCCATG		197
	3UTRVEGFDMN_031761			CTTCTTGTTTCAAACAGGGTCTCATGA-TTACAGACCCGTATTGCCATG		198

	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			CCTGCCGTCATGCTATCATGAGCGGAAAAGAGTCACTGGCATTAAACA		247
	3UTRVEGFDMN_031761			CCTGCCGTCATGCTATCATGAGCGGAAAAGAA-TCCTGGCATTAA---		244

	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			ACAGGGTTAAGAGAGGTTTGGCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC		297
	3UTRVEGFDMN_031761			-----		
	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			TCTCTCTCCCCCTCTCTCTGTAGGCAAGACATTTAAAGATGACTATAAA		347
	3UTRVEGFDMN_031761			-----		
	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			CCTGAAGGCCATTGATTGGGTTTTGATCAATTTCAAATCTACCCAAAC		397
	3UTRVEGFDMN_031761			-----		
	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			TAACCACTGAG		408
	3UTRVEGFDMN_031761			-----		

Figura 21. Alineamiento 3'UTR de VEGF-D obtenida vs secuencia parcial reportada. En la figura se muestra el alineamiento de la secuencia obtenida para la región 3'UTR corta de VEGF-D de rata con la secuencia parcial reportada para esta región (NM_0317611). En rojo se muestran las diferencias encontradas.

4.2.2. Obtención de la región 3'UTR de VEGF-D mediante la clona de DNAc CK473815.

La clona comercial con número de acceso en el banco de genes CK473815, se secuenció parcialmente a partir de su región 3' utilizando oligos M13. A partir de la secuencia parcial obtenida, se diseñó un oligonucleótido con sitio de restricción para *Bam HI*, que en conjunto



La secuencia obtenida para esta región fue de 1693pb, la señal de poliadenilación fue identificada a 22 nucleótidos río arriba del inicio de la cola de poli (A) (figura 23).

Debido a la diferencia en tamaño de esta región con la obtenida por PCR-RACE ("corta"), esta secuencia fue denominada "Larga" y fue comparada con la secuencia "Corta". El resultado del alineamiento se muestra en la figura 24. En dicho alineamiento puede observarse que no existen diferencias en secuencia entre ambas regiones (larga y corta) solo en longitud; y considerando además el hecho de que solo la región 3'UTR larga de VEGF-D posee señal de poliadenilación, es muy posible que la región obtenida por PCR-RACE (región 3'UTR de VEGF-D corta) sea solo un fragmento de la región completa (larga).

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment.

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
1	3'UTR VEGFD CORTA	408	2	3'UTR VEGFD LARGA	844	100
3UTRVEGFD CORTA			TTTGGTTTACTGGTGACATTTAAAGGACATACTAACCTGATTTATTGGGG		50	
3UTRVEGFD LARGA			TTTGGTTTACTGGTGACATTTAAAGGACATACTAACCTGATTTATTGGGG		44	

3UTRVEGFD CORTA			CTCTTTTCTCTCAGGGCCCAAGCACACTCTTAAAGGAACACAGACGTTTG		100	
3UTRVEGFD LARGA			CTCTTTTCTCTCAGGGCCCAAGCACACTCTTAAAGGAACACAGACGTTTG		94	

3UTRVEGFD CORTA			GCCTCTAAGAAATACATGGAAGTATTATAGAGTGATGATTAATTTGTCTT		150	
3UTRVEGFD LARGA			GCCTCTAAGAAATACATGGAAGTATTATAGAGTGATGATTAATTTGTCTT		144	

3UTRVEGFD CORTA			CTTGTTTCAAACAGGGTCTCATGAGTTACAGACCCGTATTGCCATGCC		199	
3UTRVEGFD LARGA			CTTGTTTCAAACAGGGTCTCATGAGTTACAGACCCGTATTGCCATGCC		194	

3UTRVEGFD CORTAA			TGCCGTCATGCTATCATGAGCGGAAAAGAAGTCACTGGCATTAAACAAC		249	
3UTRVEGFD LARGA			TGCCGTCATGCTATCATGAGCGGAAAAGAAGTCACTGGCATTAAACAAC		244	

3UTRVEGFD CORTA			AGGGTTAAGAGAGGTTTGGCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC		299	
3UTRVEGFD LARGA			AGGGTTAAGAGAGGTTTGGCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC		294	

3UTRVEGFD CORTA			TCTCTCCTCCCCTCTCTCTGTAGGCAAGACATTTAAAGATGACTATAAA		347	
3UTRVEGFD LARGA			TCTCTCCTCCCCTCTCTCTGTAGGCAAGACATTTAAAGATGACTATAAA		344	

3UTRVEGFD CORTA			CCTTGAAGGCCATTGATTGGGTTTTGATCAATTTCAAATCTACCCAAAC		397	
3UTRVEGFD LARGA			CCTTGAAGGCCATTGATTGGGTTTTGATCAATTTCAAATCTACCCAAAC		394	



3UTRVEGFDCORTA	TAACCACTGAG-----	408
3UTRVEGFDLARGA	TAACCACTGAGATTTAAAAAATAAGCTTGTCTTTGTCAATTGCATAC *****	444
3UTRVEGFDCORTA	-----	
3UTRVEGFDLARGA	ACAGATAAGATGCAGTCTAATTATCTTTACTCCTACACTCTTAAGTCCAG	494
3UTRVEGFDCORTA	-----	
3UTRVEGFDLARGA	TCTATCCCTGGCGACCCACTTCCTCCTTACTTGTCTTTGTCAATTCGAG	544
3UTRVEGFDCORTA	-----	
3UTRVEGFDLARGA	TCTTTTTGTTTGGTTTGTGACCCAGTAAATGCAGCCAGGGCCATTTGTG	594
3UTRVEGFDCORTA	-----	
3UTRVEGFDLARGA	TGAGCACAGGCTTGGAGAAGTGTTTAGCTCACGTACCAGTTGGACCAC	644
3UTRVEGFDCORTA	-----	
3UTRVEGFDLARGA	AACTGAAGACGGTGACTTCCTTGTCTCCAGATTCTACCAGTAGCCACA	694
3UTRVEGFDCORTA	-----	
3UTRVEGFDLARGA	GCTCATTACTGCCACCCCAAAGAGTCCCTTCCAATGTATAATTAAGTGT	744
3UTRVEGFDCORTA	-----	
3UTRVEGFDLARGA	TGAGAACCTTGGCCTTGTATAGGCCGAGGGAAGATTATCACAGCTGTGTG	794
3UTRVEGFDCORTA	-----	
3UTRVEGFDLARGA	AGTTCCTGCTTGCAAAGTCTGCATCATGCCTAGAAGATGGTGTTCCTCG	844

Figura 24. Alineamiento 3'UTR larga de VEGF-D con la región 3'UTR corta de VEGF-D. En la figura se muestra un alineamiento parcial de la secuencia obtenida para la región 3'UTR larga de VEGF-D de rata con la secuencia 3'UTR corta. No se encontraron cambios nucleotídicos, por lo que la diferencia radica en la longitud de ambas.

Las diferencias existentes en tamaño (1693 pb) de las regiones 3'UTR de VEGF-D "Larga" y "Corta" (408 pb), permitió indagar acerca de la presencia de la región "Larga" en el sistema celular PC12.

A partir de DNAc de las diferentes líneas celulares mediante PCR se detectó la presencia de una banda de 1693 pb como resultado de la reacción de amplificación (figura 25). El fragmento obtenido se purificó y se secuenció parcialmente con fines de identificación.

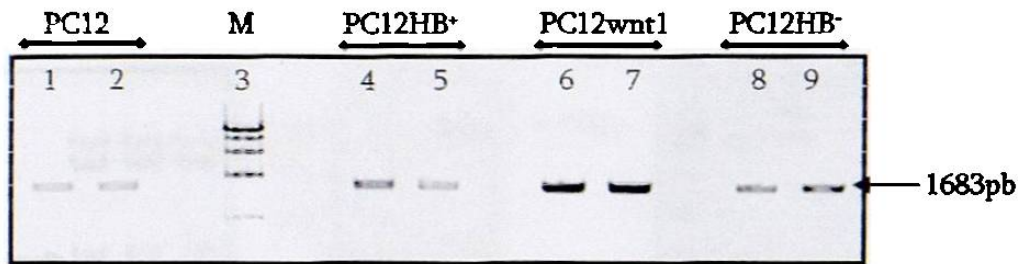


Figura 25. Amplificación de la región 3'UTR "Larga" de VEGF-D en el sistema celular PC12. Gel de Agarosa/EtBr al 1.0% mostrando una banda de 1693 pb correspondiente a la región 3'UTR "Larga" de VEGF-D. los carriles 1 y 2 corresponden a los productos amplificados a partir de DNAc de la línea celular PC12; los carriles 4 y 5, 6 y 7, 8 y 9 muestran los resultados obtenidos a partir de DNAc de las líneas celulares PC12wnt1, PC12HB⁺ y PC12HB⁻ respectivamente.

4.3. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS RELACIONADAS CON ESTABILIDAD DEL RNAm.

Una vez obtenidas las secuencias de las diferentes regiones 3'UTRs de VEGF-D, se identificaron de manera visual las regiones desestabilizadoras (regiones ricas en A-U, U) y las regiones estabilizadoras (regiones ricas en C y C-U). Los elementos ricos en A-U y U se muestran en rojo, mientras que los elementos ricos en C y C-U en azul y verde, (Figuras 21 y 23). En la región 3'UTR corta de VEGF-D se encontraron 4 elementos ARE tipo I, un repetido de 17 C-U's consecutivos y un posible elemento (CCTCC) estabilizador. En la región 3'UTR de VEGF-D larga se demostró la presencia de 6 elementos ARE tipo I mientras que 17 repetidos C-U's y 5 posibles elementos en *cis* definidos como elementos estabilizadores.

4.4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA REGIÓN 3'UTR DE VEGF-D.

a. Construcción del vector de expresión eucariótico que contiene el gen reportero luciferasa dirigido por el promotor de CMV (pMF).

A partir de DNAp del vector de expresión pUSE-wnt1 se aisló la región promotora de CMV (677 pb) mediante digestión con *Hinc* II/*Hind* I (figura 26A). Posterior a la purificación del promotor se llevó a cabo la ligación de este fragmento en el vector pGL3-Basic previamente digerido con *Sma* I/*Hin* dIII (figuras 26B y C).

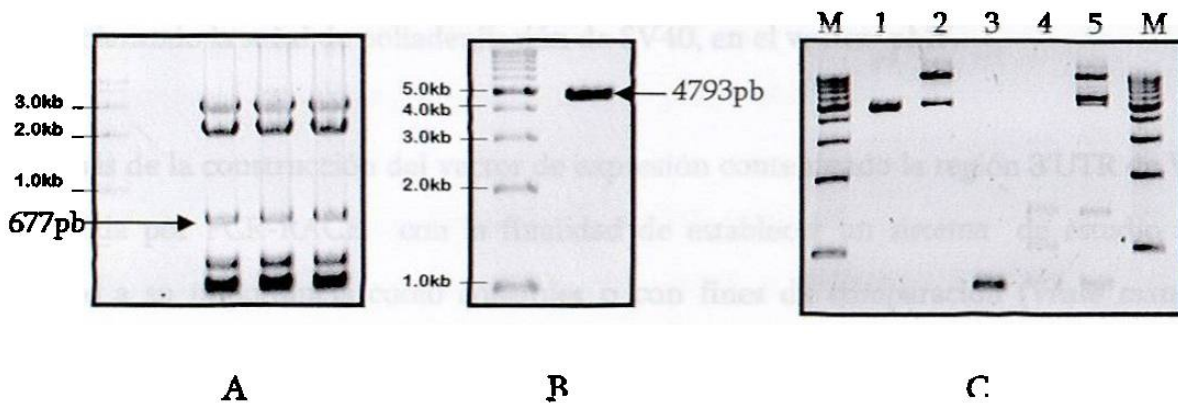


Figura 26. Construcción del vector de expresión eucariótico pMF. (A). Reacciones de digestión del plásmido pUSE wnt1: La digestión del plásmido pUSEwnt1 con las enzimas de restricción *HindII* y *HindIII* libera una banda de 677 pb correspondiente al promotor de CMV; (B). Reacción de digestión del plásmido pGL3-Basic: la digestión del vector pGL3-Basic con *Sma I* y *HindIII* genera una banda de 4793pb correspondiente al vector lineal. (C). Reacción de ligación del promotor CMV en pGL3-Basic: Carriles 1 y 2 vector sin y con T4 DNA ligasa respectivamente, carriles 3 y 4 promotor sin y con T4 DNA ligasa, en el carril 5 se muestra la reacción de ligación completa vector-promotor-T4 DNA ligasa.

Posterior a la transformación, se llevó a cabo la caracterización de clonas candidatas mediante restricción con las enzimas *Hind III* y *Sma I*. Los resultados se muestran en la figura 27. El DNA plasmídico de las clonas positivas fue purificado para usos posteriores.

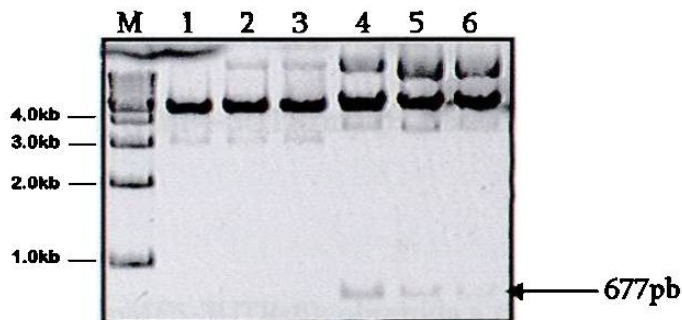


Figura 27. Caracterización de clonas candidatas (1-6) para pMF. Caracterización del DNAP de las clonas candidatas a contener el plásmido pMF mediante digestión con *Hin dIII* y *SmaI*. Los carriles 4,5 y 6 indican la presencia de una banda de 677 pb correspondiente al promotor de CMV.



b. Clonación de la región 3'UTR de VEGF-D de rata, río abajo del gen reportero luciferasa, reemplazando la señal de poliadenilación de SV40, en el vector pMF.

Además de la construcción del vector de expresión conteniendo la región 3'UTR de VEGF-D obtenida por PCR-RACE, con la finalidad de establecer un sistema de estudio sólido y debido a su importancia como controles o con fines de comparación (*véase materiales y métodos sección 3.5.4*), se incluyeron dentro del análisis regiones 3'UTR adicionales; dichas regiones se enumeran a continuación:

1. 3'UTR VEGF-D de rata (pMF1-3UTRDrc): secuencia corta, obtenida a partir de DNAC de células PC12HB⁺.
2. 3'UTR VEGF-D de ratón (pMF2-3UTRDm): obtenida a partir de DNAP de clona comercial.
3. 3'UTR VEGF-D de humano (pMF3-3UTRDh): obtenida a partir de DNAP de clona comercial.
4. 3'UTR c-myc de rata (pMF4-3UTRrmyc): obtenida a partir de DNAC de células PC12HB⁺.
5. 3'UTR β -actina de rata (pMF5-3UTRr β): obtenida a partir de DNAC de células PC12HB⁺.
6. 3'UTR VEGF-D de rata (pMF6-3UTRDrl): secuencia larga obtenida a partir de clona comercial.
7. 3'UTR VEGF-D de rata (pMF7-3UTRDro): secuencia larga, obtenida a partir de DNAC de células PC12HB⁺.



8. pMF1-Δ: Secuencia corta de la región 3'UTR de VEGF-D de rata con las repeticiones CU's deletadas. Obtenido a partir del plásmido pMF1-3UTRDrc.
9. pMF6-Δ: 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.
10. pMF7-Δ: 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.

Cada una de estas regiones fue amplificada (figura 28) y clonada en el vector de expresión pMF-CMV reemplazando la señal de poliadenilación de SV40; esto dió origen a 7 vectores de expresión denominados pMF, numerados del 1 al 7 de acuerdo al orden en que aparecen en la lista anterior y cuya única variación, es la región 3'UTR introducida.

Adicionalmente se construyeron 3 vectores más, buscando establecer diferencias en la actividad del reportero al deletar las repeticiones CU's presentes en la región 3'UTR de VEGF-D de rata, tanto en la versión corta como en la larga; esto dió origen a los vectores pMF1-Δ, pMF6-Δ y pMF7-Δ.

En el caso de los vectores pMFs del 1-7, cada región, fue amplificada partiendo de DNAC de la línea celular HB⁺ o de DNAP de clonas comerciales; los fragmentos obtenidos fueron recuperados del gel y purificados (figura 28).

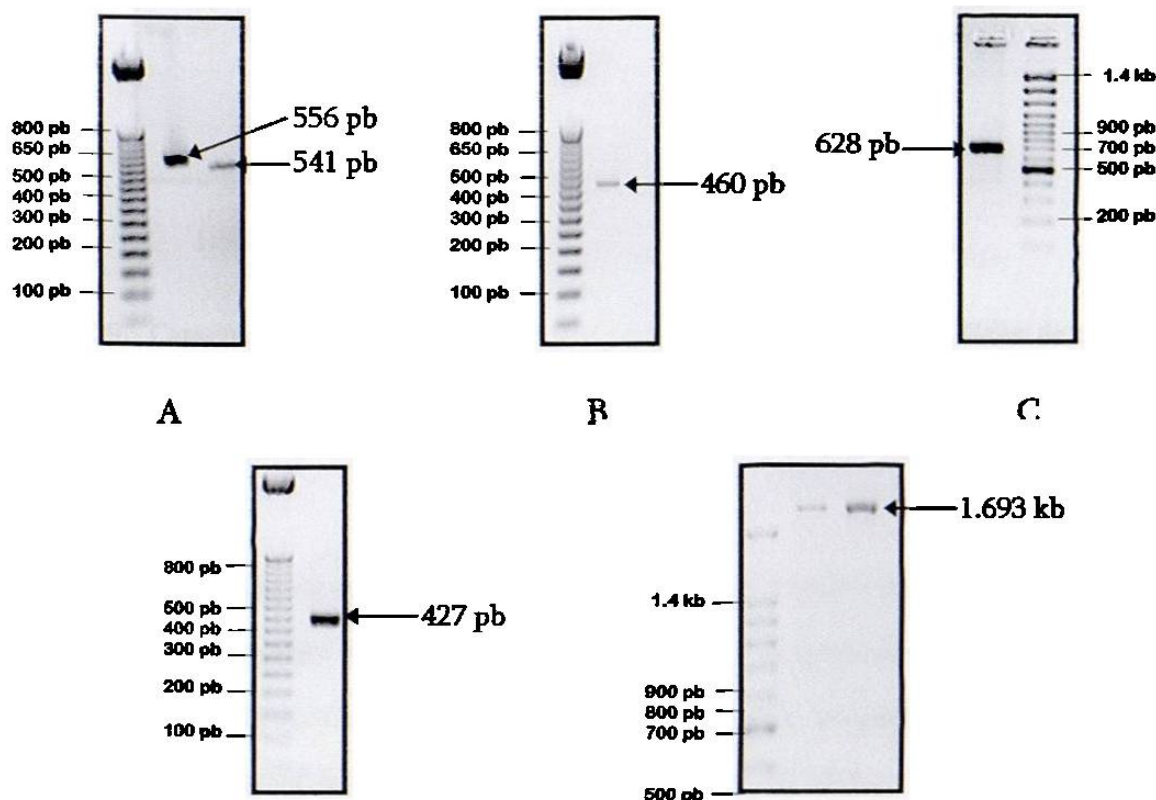


Figura 28. Amplificación de las diferentes regiones 3'UTR. Geles de agarosa/BrEt al 2.0% mostrando los fragmentos amplificados para las diferentes regiones 3'UTR de (A). humano y ratón; (B). *c-myc*; (C). β -actina; (D). secuencia corta de VEGF-D de rata; (E). secuencia larga de VEGF-D obtenida de DNAc de células PC12HB⁺ y de la clona comercial respectivamente.

Posteriormente los fragmentos fueron digeridos con *Xba* I y *Bam* HI y ligados en el vector pMF-CMV. Una vez realizada la transformación, el DNA plasmídico fue extraído y caracterizado por digestión con *Xba* I y *Bam* HI; los tamaños de los fragmentos liberados para cada caso corresponden con los tamaños esperados (figura 29).

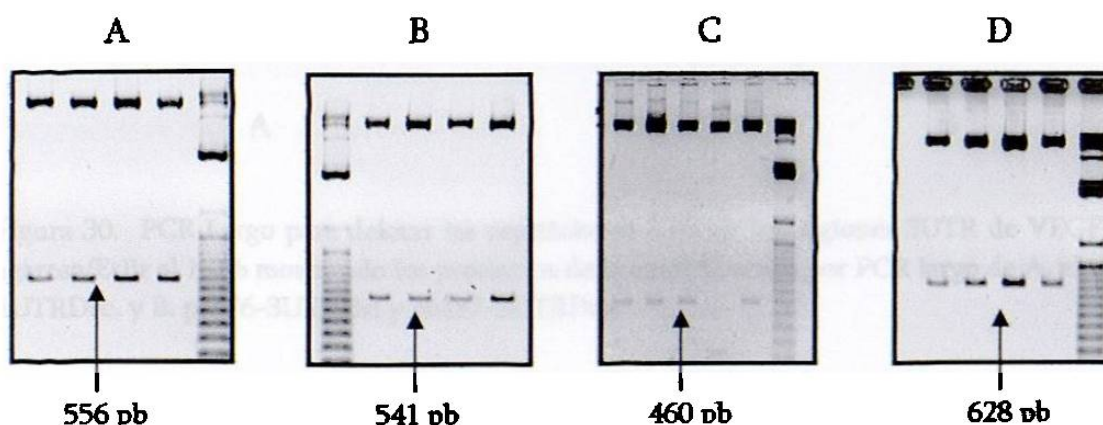




Figura 29. Caracterización de clonas candidatas por digestión enzimática. Geles de agarosa /BrEt al 2.0% mostrando los fragmentos liberados tras la caracterización con *XbaI/BamHI*, correspondiente a las diferentes regiones 3'UTR de (A). humano; (B). ratón; (C). c-myc; (D). β -actina; (E). secuencia larga de VEGF-D obtenida de DNAc de células PC12HB⁺ y F. secuencia larga de VEGF-D obtenida de la clona comercial.

Para la construcción de los vectores pMF1- Δ , pMF6- Δ y pMF7- Δ , se partió de los plásmidos pMF1-3UTRDrc, pMF6-3UTRDrl y pMF7-3UTRDro respectivamente (*para detalles de la estrategia de construcción véase en materiales y métodos las secciones 3.5.4 y 3.6.1.3*). Los resultados de la amplificación de los vectores pMF1-3UTRDrc, pMF6-3UTRDrl y pMF7-3UTRDro por PCR largo y su caracterización con enzimas de restricción, se muestran en las figuras 30 y 31 respectivamente.

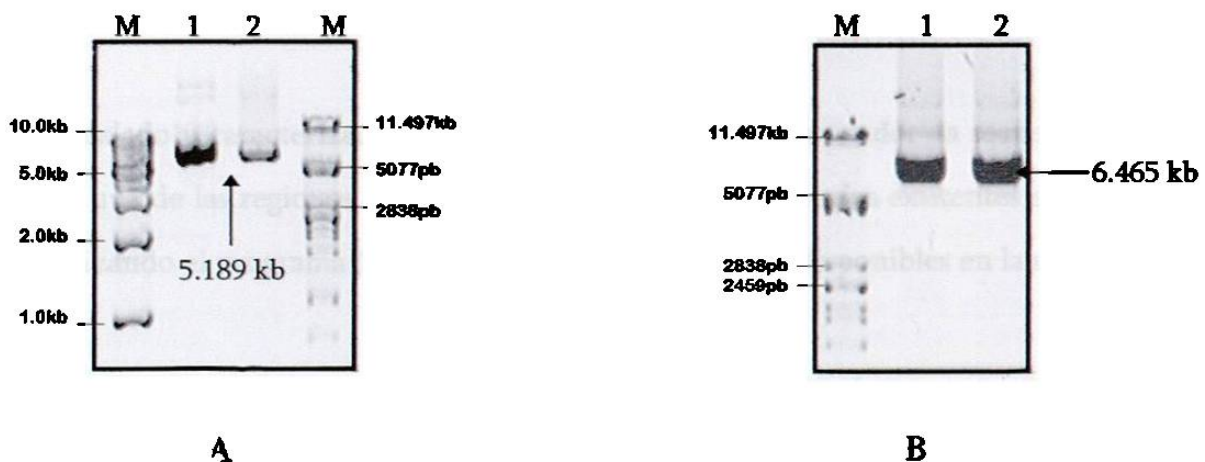


Figura 30. PCR Largo para deletar las repeticiones CT's de las regiones 3UTR de VEGF-D. Geles de agarosa/EtBr al 1.0% mostrando los productos de la amplificación por PCR largo de A. el vector pMF1-3UTRDrc, y B. pMF6-3UTRDrl y pMF7-3UTRDro.

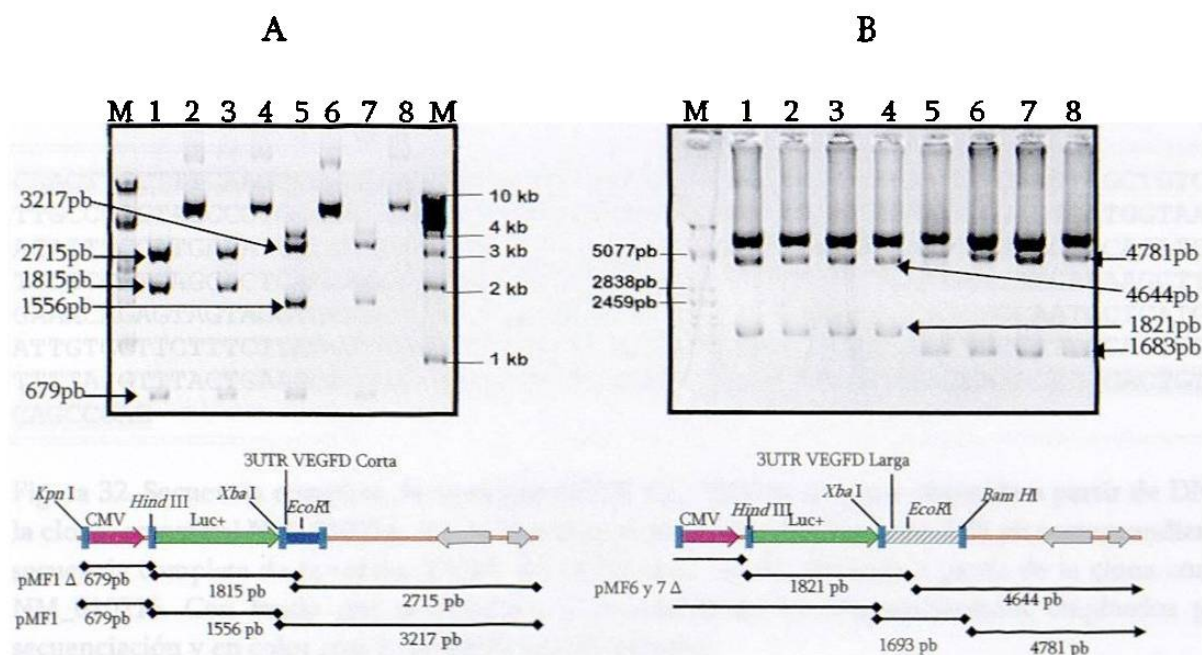


Figura 31. Caracterización de Candidatos de pMF1- Δ , pMF6- Δ , pMF7- Δ por digestión enzimática. (A) La caracterización con *Eco RI/Kpn I/Hin d III* del vector pMF1- Δ genera las bandas mostradas en los carriles 1 y 3 (679, 1815, 2725 pb respectivamente). La caracterización con *Kpn I/Hin dIII/Xba I* del vector pMF1-3UTRDrc genera los productos mostrados en los carriles 5 y 7 (679, 1556, 3217 pb respectivamente). (B) La caracterización con *Eco RI/Hin d III* del vector pMF6- Δ y pMF7- Δ genera las bandas mostradas en los carriles 1 y 2; y 3 y 4 (1821, 4644 pb respectivamente). La caracterización de ambos vectores con *Xba I/Bam HI* genera los productos mostrados en los carriles 5 y 6; y 7 y 8 (1693, 4781 pb respectivamente).

Una vez aislado y caracterizado, el DNA plasmídico fue secuenciado; la secuencia obtenida para cada una de las regiones 3'UTR se comparó con las secuencias existentes en el banco de genes utilizando el programa BLAST 2.2.11 y Clustal w v1.82 disponibles en la red.

Las secuencias obtenidas, así como los resultados de los alineamientos para cada una de las secuencias se muestra a continuación.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. COMPROBACIÓN DEL SISTEMA CELULAR COMO UN MODELO DE ESTUDIO PARA INVESTIGAR LA RELACIÓN DE WNT1 EN LA ACUMULACIÓN DEL RNA_m DE VEGF-D.

a. Niveles de expresión de wnt1 en las líneas celulares PC12, PC12wnt1, PC12HB⁻ y PC12HB⁺.

Los niveles de expresión de wnt1 en las líneas celulares PC12 y PC12 HB⁻ son considerablemente más bajos que los obtenidos para las líneas celulares que expresan constitutivamente el oncogen wnt1 (PC12wnt1 y PC12HB⁺) Figura 13.

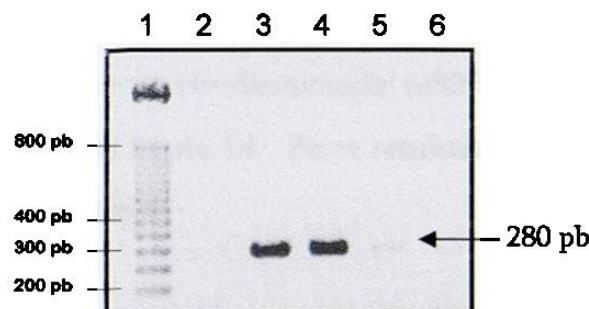


Figura 13. Amplificación de Wnt1. Gel de agarosa al 2.0% mostrando una banda de 280pb correspondiente al producto obtenido durante la reacción de amplificación de wnt1, a partir de DNAC de las líneas celulares PC12, PC12wnt1, PC12 HB⁺ y PC12HB⁻ (Carriles 2, 3, 4 y 5 respectivamente). En el carril 6 se muestra un control negativo de reacción.

b. Niveles de expresión de los genes RET, NEU, VEGF-D, c-myc, y β -Actina en las líneas celulares PC12, PC12wnt1, PC12HB⁻ y PC12HB⁺ mediante RT-PCR semicuantitativa.



- a. **β -Actina.** Mediante análisis densitométrico de las imágenes obtenidas de PCRs semicuantitativas para β -actina, se detectó una variación hacia la baja de aproximadamente el 21% en los niveles de expresión de β -actina en la línea celular PC12 en comparación con el resto de las líneas celulares, dicha variación fue considerada durante el análisis de datos, figura 14. Esta variación hacia la baja en las líneas celulares que no expresan *wnt1*, coinciden con los resultados encontrados por Velázquez (Datos no publicados) que en ensayos tipo Northern blot, encontró que las células PC12HB⁺, PC12HB⁻ y PC12wnt poseen 3 veces más RNAm de β -actina que la línea celular PC12.
- b. **NEU.** En comparación con la línea celular parental (PC12), los niveles de expresión de NEU son mayores (≈ 3.2 veces) en las líneas celulares que expresan constitutivamente el oncogen *wnt1*. En ausencia de expresión de *wnt1* los niveles de expresión NEU se mantuvieron elevados (línea celular PC12 HB⁻) figura 14. Estos resultados concuerdan con los resultados encontrados por Zeng y cols (1996)⁶⁵.
- c. **RET.** El nivel de expresión de RET en células PC12 no solo se incrementó (≈ 2 veces) por la expresión de *wnt1*, sino que se vio disminuido ($\approx 80\%$) en la línea celular PC12 HB⁻ (ausencia de expresión de *wnt1*) figura 14. Estos resultados concuerdan con los resultados encontrados por Zeng y cols (1996)⁶⁵.
- d. **VEGF-D.** De la misma manera que RET los niveles de expresión de VEGF-D se incrementaron con la expresión de *wnt1* (≈ 3 veces en la línea celular PC12HB⁺), mientras que en la línea celular PC12HB⁻, los niveles de expresión de VEGF-D, están disminuidos un 30%, en comparación con la línea celular PC12 HB⁺, figura 14.
- e. **c-myc.** La expresión de c-myc se incrementó con la expresión de *wnt1* (≈ 2.5 veces en la línea celular PC12HB⁺), mientras que en la línea celular PC12HB⁻ los niveles de expresión de c-myc están disminuidos un 30% que en la línea celular PC12 HB⁺, figura 14. Estos resultados concuerdan con el hecho de que c-myc es un blanco transcripcional de la vía *wnt*.



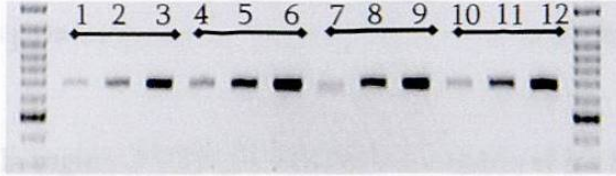

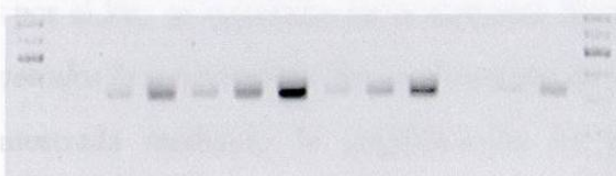
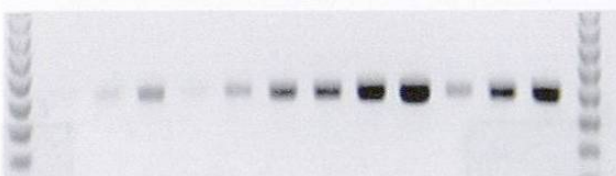
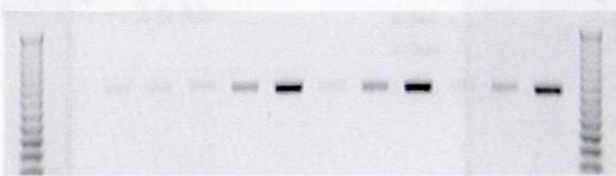
1. GEN	2. LÍNEA CELULAR				3. RESULTADOS DE LA DENSITOMETRÍA	
	PC12	PC12wnt1	PC12HB ⁺	PC12HB ⁻	Línea Celular	Nivel de Expresión
β -Actina					PC12	0,79
					PC12wnt1	0,94
					PC12HB ⁺	1,00
					PC12HB ⁻	0,95
NEU					PC12	0,25
					PC12wnt1	0,87
					PC12HB ⁺	0,88
					PC12HB ⁻	1,05
RET					PC12	0,44
					PC12wnt1	1,06
					PC12HB ⁺	0,52
					PC12HB ⁻	0,14
VEGF-D					PC12	0,47
					PC12wnt1	0,26
					PC12HB ⁺	1,00
					PC12HB ⁻	0,71
c-myc					PC12	0,39
					PC12wnt1	0,92
					PC12HB ⁺	1,00
					PC12HB ⁻	0,73

Figura 14. PCRs semicuantitativas. En la columna central se muestran los diferentes productos amplificados por PCR semicuantitativa en geles de agarosa/EtBr al 2.0%; dentro de esta columna, de manera vertical, los carriles del 1-3 corresponden a los productos amplificados a partir de DNAc de la línea celular PC12; los carriles del 4-6, del 7-9 y del 10-12 los resultados obtenidos a partir de DNAc de las líneas celulares PC12wnt1, PC12HB⁺ y PC12HB⁻ respectivamente. En la columna 1 se muestra el nombre del gen analizado, mientras que en la columna 3 se muestran los resultados obtenidos por densitometría.



4.2. AISLAMIENTO Y SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN 3'UTR DEL RNAm DE VEGF-D.

La obtención de la región 3'UTR de VEGF-D fue realizada por dos aproximaciones: 1). A partir de RNA total de la línea celular PC12HB⁺ utilizando el kit SMART RACE de Clontech y, 2). A partir de la clona comercial de DNAc con número de acceso CK473815. Los resultados obtenidos para cada uno de los procedimientos se muestran a continuación.

4.2.1. Obtención de la región 3'UTR de VEGF-D mediante el kit SMART RACE de Clontech

a. Control positivo del kit. Los resultados obtenidos en la amplificación de las regiones 5' y 3'UTR del receptor de la transferrina obtenidos a partir de RNA total y con oligonucleótidos específicos provistos por el kit, se muestran en la siguiente figura (*para detalles del método véase materiales y métodos la sección 3.6.1.5*). La obtención de la región 5' y 3'UTR de este receptor quedó demostrada mediante la amplificación de productos de 2.6 y 2.9kb respectivamente.

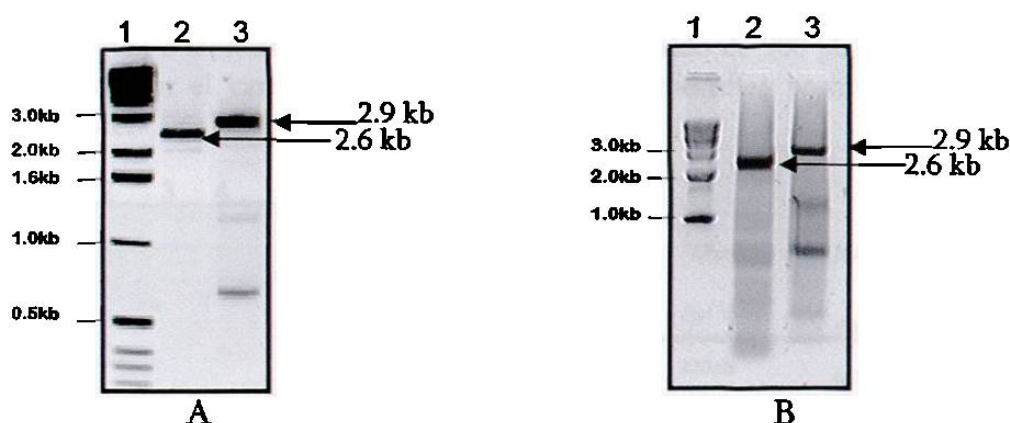


Figura 15. Amplificación de las regiones 5' y 3'UTR del Receptor de la Transferrina. Las reacciones control para el receptor de la transferrina producen los productos RACE de las líneas 2 y 3. El producto 5' de 2.6 kb y el producto 3' de 2.9 kb son mostrados en las figuras. La figura A es la imagen proporcionada en el catálogo con fines de comparación y la figura B son los resultados obtenidos a partir de RNA total provisto por el kit.



b. Amplificación, purificación y caracterización de la región 3'UTR de VEGF-D.

Una vez verificado tanto el kit como las condiciones de amplificación, se amplificó la región 3'UTR de VEGF-D, obteniéndose un fragmento predominante de aproximadamente 900 pb (figura 16A). Para verificar la identidad del fragmento, el producto obtenido fue purificado (figura 16B) y caracterizado por restricción con las enzimas *Bgl* II y *Apa* I, (figura 17).

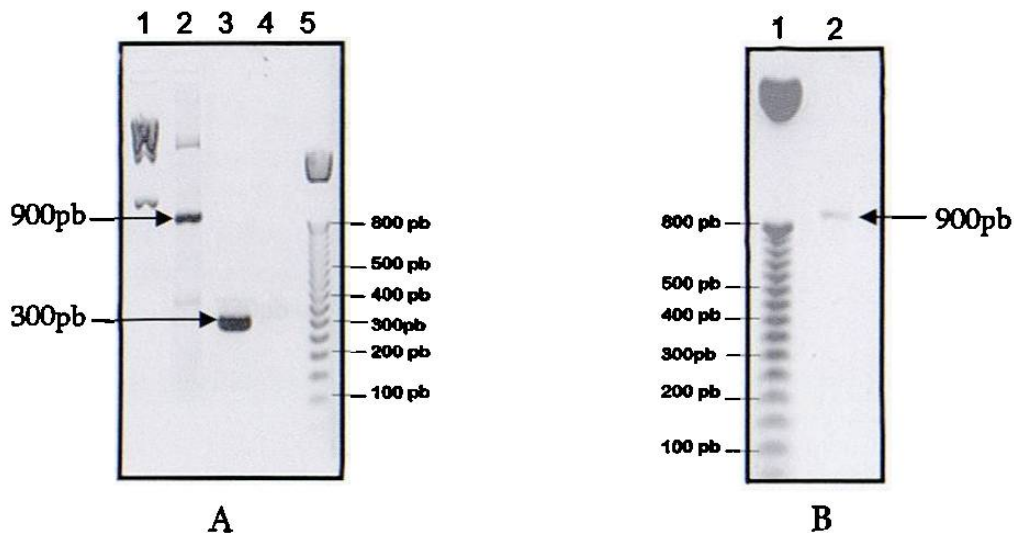


Figura 16. Producto 3'RACE de VEGF-D. Amplificación (A) y purificación (B) del fragmento que contiene la región 3'UTR de VEGF-D. El fragmento obtenido de 900 pb se muestra en el carril 2 de ambas figuras. En el carril 3 y 4 se muestran los controles positivo y negativo de reacción respectivamente.

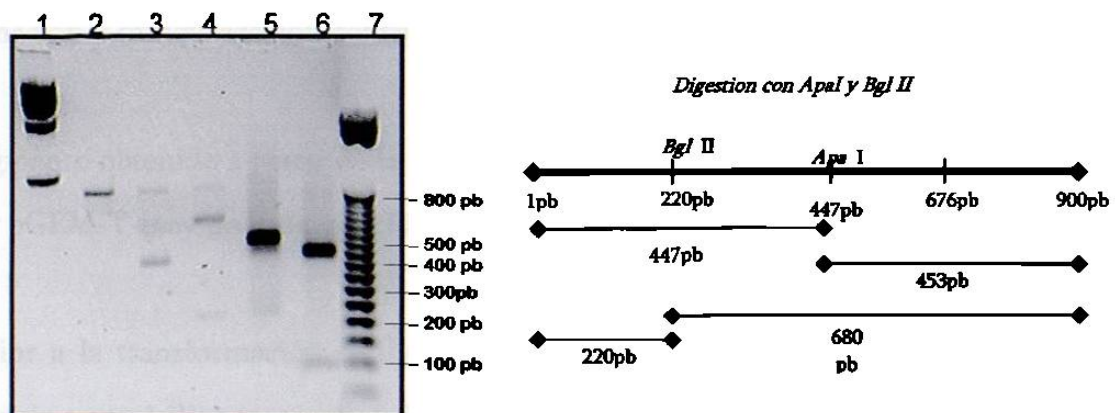


Figura 17. Caracterización del fragmento obtenido por PCR RACE. En el carril 2 se muestra el producto obtenido por PCR RACE sin digerir; la digestión del fragmento con *Apa* I genera una banda representativa de 2 fragmentos de 447 y 453 pb (Carril 3); en el caso de la digestión del fragmento con *Bgl* II se generan dos bandas de 680 y 220 pb respectivamente (carril 4). En el carril 5 y 6 se muestra un control de corte para *Apa* I.



Para realizar una caracterización más exhaustiva del producto obtenido por PCR RACE, se diseñó un oligonucleótido gen específico 5' interno a partir de la secuencia conocida de VEGF-D, este oligo, junto con el oligo anidado 3' provisto por el kit, amplifican un fragmento interno de VEGF-D de 320 pb. A partir del producto obtenido por PCR RACE sin purificar, se realizó una PCR anidada. La amplificación del fragmento de 320 pb confirmó la identidad del producto (figura 18).

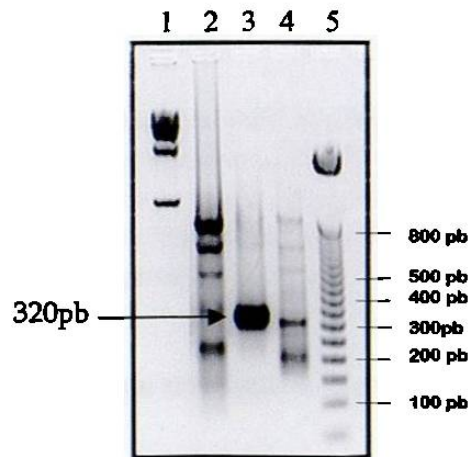


Figura 18. PCR anidada. En el carril 1 de la imagen se muestra el fragmento obtenido a partir de la PCR RACE; en el carril 2 el producto amplificado mediante PCR anidada; En el carril 4 se muestra un control positivo de reacción.

c. Clonación y caracterización del fragmento obtenido.

El fragmento obtenido a partir de la PCR anidada fue purificado (figura 19 A) y clonado en el vector pGEM-T-easy de Promega (Madison, WI, EUA).

Posterior a la transformación se llevó a cabo la selección de las clonas candidatas por su resistencia a ampicilina y se caracterizó el DNA plasmídico mediante restricción con *Eco* RI, dicha caracterización liberó un fragmento de 320 pb correspondiente al fragmento de interés (figura 19 B).



CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
1	3UTR VEGFDCORTA ANIDADA	408	2	3'UTR NM_0317611 VEGFD	244	98
	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			---	TTGGTTTACTGGTGACATTTAAAGGACATACTAACCTGATTTATTG	47
	3UTRVEGFDMN_031761			TAATTTGGTTTACTGGTGACATTTAAAGGACATACTAACCTGATTTATTG		50

	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			GGGCTCTTTTCTCTCAGGGCCCAAGCACACTCTTAAAGGAACACAGACGT		97
	3UTRVEGFDMN_031761			GGGCTCTTTTCTCTCAGGGCCCAAGCACACTCTTAAAGGAACACAGACGT		100

	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			TTGGCCTCTAAGAAATACATGGAAGTATTATAGAGTGATGATTAATGT		147
	3UTRVEGFDMN_031761			TTGGCCTCTAAGAAATACATGGAAGTATTATAGAGTGATGATTAATGT		150

	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			CTTCTTGTTTCAAAACAGGGTCTCATGAGTTACAGACCCGATTGCCATG		197
	3UTRVEGFDMN_031761			CTTCTTGTTTCAAA-CAGGGTCTCATGA-TTACAGACCCGATTGCCATG		198

	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			CCTGCCGTCATGCTATCATGAGCGGAAAAGAGTCACTGGCATTAAACA		247
	3UTRVEGFDMN_031761			CCTGCCGTCATGCTATCATGAGCGGAAAAGAA-TCCTGGCATTAA---		244

	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			ACAGGGTTAAGAGAGGTTTGGCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC		297
	3UTRVEGFDMN_031761			-----		
	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			TCTCTCCTCCCCCTCTCTCTGTAGGCAAGACATTTAAAGATGACTATAAA		347
	3UTRVEGFDMN_031761			-----		
	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			CCTGAAGGCCATTGATTGGGTTTTGATCAATTTCAAAATCTACCCAAAC		397
	3UTRVEGFDMN_031761			-----		
	3UTRVEGFDCORTAANIDADA			TAACCACTGAG		408
	3UTRVEGFDMN_031761			-----		

Figura 21. Alineamiento 3'UTR de VEGF-D obtenida vs secuencia parcial reportada. En la figura se muestra el alineamiento de la secuencia obtenida para la región 3'UTR corta de VEGF-D de rata con la secuencia parcial reportada para esta región (NM_0317611). En rojo se muestran las diferencias encontradas.

4.2.2. Obtención de la región 3'UTR de VEGF-D mediante la clona de DNAc CK473815.

La clona comercial con número de acceso en el banco de genes CK473815, se secuenció parcialmente a partir de su región 3' utilizando oligos M13. A partir de la secuencia parcial obtenida, se diseñó un oligonucleótido con sitio de restricción para *Bam HI*, que en conjunto



La secuencia obtenida para esta región fue de 1693pb, la señal de poliadenilación fue identificada a 22 nucleótidos río arriba del inicio de la cola de poli (A) (figura 23).

Debido a la diferencia en tamaño de esta región con la obtenida por PCR-RACE ("corta"), esta secuencia fue denominada "Larga" y fue comparada con la secuencia "Corta". El resultado del alineamiento se muestra en la figura 24. En dicho alineamiento puede observarse que no existen diferencias en secuencia entre ambas regiones (larga y corta) solo en longitud; y considerando además el hecho de que solo la región 3'UTR larga de VEGF-D posee señal de poliadenilación, es muy posible que la región obtenida por PCR-RACE (región 3'UTR de VEGF-D corta) sea solo un fragmento de la región completa (larga).

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment.

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
1	3'UTR VEGFD CORTA	408	2	3'UTR VEGFD LARGA	844	100
3UTRVEGFDCORTA			TTTGGTTTACTGGTGACATTTAAAGGACATACTAACCTGATTTATTGGGG			50
3UTRVEGFDLARGA			TTTGGTTTACTGGTGACATTTAAAGGACATACTAACCTGATTTATTGGGG			44

3UTRVEGFDCORTA			CTCTTTTCTCTCAGGGCCCAAGCACACTCTTAAAGGAACACAGACGTTTG			100
3UTRVEGFDLARGA			CTCTTTTCTCTCAGGGCCCAAGCACACTCTTAAAGGAACACAGACGTTTG			94

3UTRVEGFDCORTA			GCCTCTAAGAAATACATGGAAGTATTATAGAGTGATGATTAATTTGTCTT			150
3UTRVEGFDLARGA			GCCTCTAAGAAATACATGGAAGTATTATAGAGTGATGATTAATTTGTCTT			144

3UTRVEGFDCORTA			CTTGTTTCAAACAGGGTCTCATGAGTTACAGACCCGTATTGCCATGCC			199
3UTRVEGFDLARGA			CTTGTTTCAAACAGGGTCTCATGAGTTACAGACCCGTATTGCCATGCC			194

3UTRVEGFDCORTAA			TGCCGTCATGCTATCATGAGCGGAAAAGAAGTCACTGGCATTAAACAAC			249
3UTRVEGFDLARGA			TGCCGTCATGCTATCATGAGCGGAAAAGAAGTCACTGGCATTAAACAAC			244

3UTRVEGFDCORTA			AGGGTTAAGAGAGGTTTGGCGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC			299
3UTRVEGFDLARGA			AGGGTTAAGAGAGGTTTGGCGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC			294

3UTRVEGFDCORTA			TCTCTCCTCCCCTCTCTCTGTAGGCAAGACATTTAAAGATGACTATAAA			347
3UTRVEGFDLARGA			TCTCTCCTCCCCTCTCTCTGTAGGCAAGACATTTAAAGATGACTATAAA			344

3UTRVEGFDCORTA			CCTTGAAGGCCATTGATTGGGTTTTGATCAATTTCAAATCTACCCAAAC			397
3UTRVEGFDLARGA			CCTTGAAGGCCATTGATTGGGTTTTGATCAATTTCAAATCTACCCAAAC			394



3UTRVEGFDCORTA	TAACCACTGAG-----	408
3UTRVEGFDLARGA	TAACCACTGAGATTTAAAAAAATAAGCTTGTCTTTGTCAATTGCATAC *****	444
3UTRVEGFDCORTA	-----	
3UTRVEGFDLARGA	ACAGATAAGATGCAGTCTAATTATCTTTACTCCTACACTCTTAAGTCCAG	494
3UTRVEGFDCORTA	-----	
3UTRVEGFDLARGA	TCTATCCCTGGCGACCCACTTCCTCCTTACTTGTCTTTGTCAATTCGAG	544
3UTRVEGFDCORTA	-----	
3UTRVEGFDLARGA	TCTTTTTGTTTGGTTTTGTGACCCAGTAAATGCAGCCAGGGCCATTTGTG	594
3UTRVEGFDCORTA	-----	
3UTRVEGFDLARGA	TGAGCACAGGCTTGGAGAAGTGTTTAGCTCACGTACCAGTTGGACCAC	644
3UTRVEGFDCORTA	-----	
3UTRVEGFDLARGA	AACTGAAGACGGTGACTTCCTTGTCTCCAGATTCTACCAGTAGCCACA	694
3UTRVEGFDCORTA	-----	
3UTRVEGFDLARGA	GCTCATTACTGCCACCCCAAAGAGTCCCTTCCAATGTATAATTAAGTGT	744
3UTRVEGFDCORTA	-----	
3UTRVEGFDLARGA	TGAGAACCTTGGCCTTGTATAGGCCGAGGGAAGATTATCACAGCTGTGTG	794
3UTRVEGFDCORTA	-----	
3UTRVEGFDLARGA	AGTTCCTGCTTGCAAAGTCTGCATCATGCCTAGAAGATGGTGTTCCTCG	844

Figura 24. Alineamiento 3'UTR larga de VEGF-D con la región 3'UTR corta de VEGF-D. En la figura se muestra un alineamiento parcial de la secuencia obtenida para la región 3'UTR larga de VEGF-D de rata con la secuencia 3'UTR corta. No se encontraron cambios nucleotídicos, por lo que la diferencia radica en la longitud de ambas.

Las diferencias existentes en tamaño (1693 pb) de las regiones 3'UTR de VEGF-D "Larga" y "Corta" (408 pb), permitió indagar acerca de la presencia de la región "Larga" en el sistema celular PC12.

A partir de DNAc de las diferentes líneas celulares mediante PCR se detectó la presencia de una banda de 1693 pb como resultado de la reacción de amplificación (figura 25). El fragmento obtenido se purificó y se secuenció parcialmente con fines de identificación.

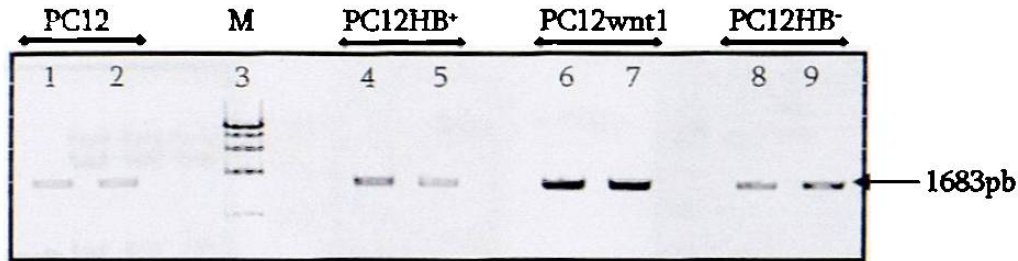


Figura 25. Amplificación de la región 3'UTR "Larga" de VEGF-D en el sistema celular PC12. Gel de Agarosa/EtBr al 1.0% mostrando una banda de 1693 pb correspondiente a la región 3'UTR "Larga" de VEGF-D. los carriles 1 y 2 corresponden a los productos amplificados a partir de DNAc de la línea celular PC12; los carriles 4 y 5, 6 y 7, 8 y 9 muestran los resultados obtenidos a partir de DNAc de las líneas celulares PC12wnt1, PC12HB⁺ y PC12HB⁻ respectivamente.

4.3. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS RELACIONADAS CON ESTABILIDAD DEL RNAm.

Una vez obtenidas las secuencias de las diferentes regiones 3'UTRs de VEGF-D, se identificaron de manera visual las regiones desestabilizadoras (regiones ricas en A-U, U) y las regiones estabilizadoras (regiones ricas en C y C-U). Los elementos ricos en A-U y U se muestran en rojo, mientras que los elementos ricos en C y C-U en azul y verde, (Figuras 21 y 23). En la región 3'UTR corta de VEGF-D se encontraron 4 elementos ARE tipo I, un repetido de 17 C-U's consecutivos y un posible elemento (CCTCC) estabilizador. En la región 3'UTR de VEGF-D larga se demostró la presencia de 6 elementos ARE tipo I mientras que 17 repetidos C-U's y 5 posibles elementos en *cis* definidos como elementos estabilizadores.

4.4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA REGIÓN 3'UTR DE VEGF-D.

a. Construcción del vector de expresión eucariótico que contiene el gen reportero luciferasa dirigido por el promotor de CMV (pMF).

A partir de DNAp del vector de expresión pUSE-wnt1 se aisló la región promotora de CMV (677 pb) mediante digestión con *Hinc* II/*Hind* I (figura 26A). Posterior a la purificación del promotor se llevó a cabo la ligación de este fragmento en el vector pGL3-Basic previamente digerido con *Sma* I/*Hin* dIII (figuras 26B y C).

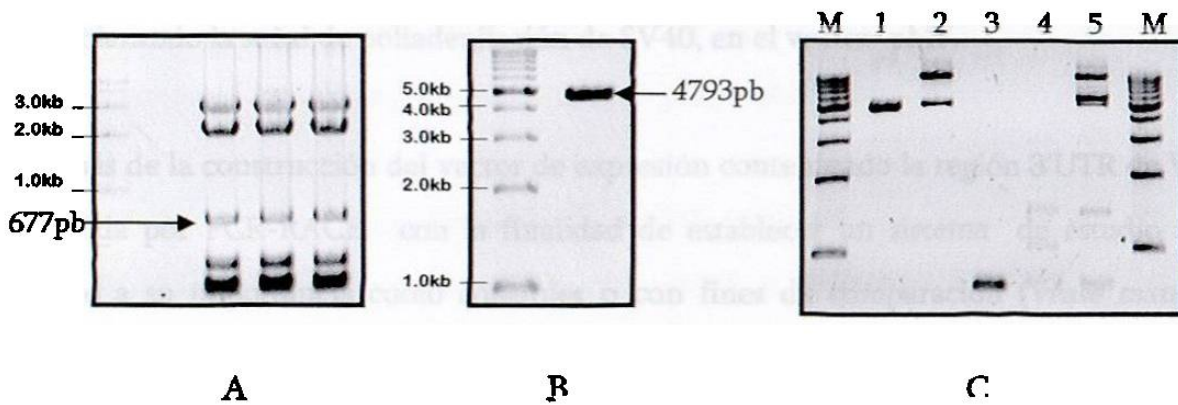


Figura 26. Construcción del vector de expresión eucariótico pMF. (A). Reacciones de digestión del plásmido pUSE wnt1: La digestión del plásmido pUSEwnt1 con las enzimas de restricción *HindII* y *HindIII* libera una banda de 677 pb correspondiente al promotor de CMV; (B). Reacción de digestión del plásmido pGL3-Basic: la digestión del vector pGL3-Basic con *Sma I* y *HindIII* genera una banda de 4793pb correspondiente al vector lineal. (C). Reacción de ligación del promotor CMV en pGL3-Basic: Carriles 1 y 2 vector sin y con T4 DNA ligasa respectivamente, carriles 3 y 4 promotor sin y con T4 DNA ligasa, en el carril 5 se muestra la reacción de ligación completa vector-promotor-T4 DNA ligasa.

Posterior a la transformación, se llevó a cabo la caracterización de clonas candidatas mediante restricción con las enzimas *Hind III* y *Sma I*. Los resultados se muestran en la figura 27. El DNA plasmídico de las clonas positivas fue purificado para usos posteriores.

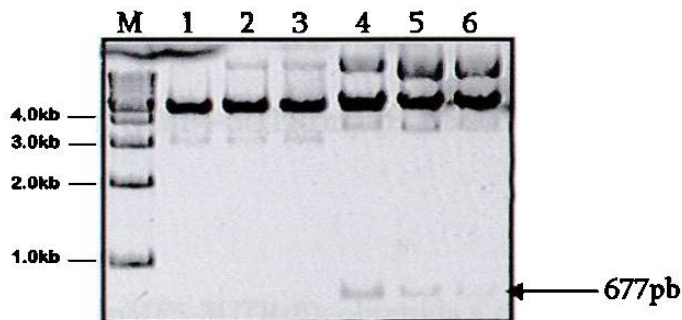


Figura 27. Caracterización de clonas candidatas (1-6) para pMF. Caracterización del DNAP de las clonas candidatas a contener el plásmido pMF mediante digestión con *Hin dIII* y *SmaI*. Los carriles 4,5 y 6 indican la presencia de una banda de 677 pb correspondiente al promotor de CMV.



b. Clonación de la región 3'UTR de VEGF-D de rata, río abajo del gen reportero luciferasa, reemplazando la señal de poliadenilación de SV40, en el vector pMF.

Además de la construcción del vector de expresión conteniendo la región 3'UTR de VEGF-D obtenida por PCR-RACE, con la finalidad de establecer un sistema de estudio sólido y debido a su importancia como controles o con fines de comparación (*véase materiales y métodos sección 3.5.4*), se incluyeron dentro del análisis regiones 3'UTR adicionales; dichas regiones se enumeran a continuación:

1. 3'UTR VEGF-D de rata (pMF1-3UTRDrc): secuencia corta, obtenida a partir de DNAc de células PC12HB⁺.
2. 3'UTR VEGF-D de ratón (pMF2-3UTRDm): obtenida a partir de DNAp de clona comercial.
3. 3'UTR VEGF-D de humano (pMF3-3UTRDh): obtenida a partir de DNAp de clona comercial.
4. 3'UTR c-myc de rata (pMF4-3UTRrmyc): obtenida a partir de DNAc de células PC12HB⁺.
5. 3'UTR β -actina de rata (pMF5-3UTRr β): obtenida a partir de DNAc de células PC12HB⁺.
6. 3'UTR VEGF-D de rata (pMF6-3UTRDrl): secuencia larga obtenida a partir de clona comercial.
7. 3'UTR VEGF-D de rata (pMF7-3UTRDro): secuencia larga, obtenida a partir de DNAc de células PC12HB⁺.



8. pMF1-Δ: Secuencia corta de la región 3'UTR de VEGF-D de rata con las repeticiones CU's deletadas. Obtenido a partir del plásmido pMF1-3UTRDrc.

9. pMF6-Δ: 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.

10. pMF7-Δ: 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.

Cada una de estas regiones fue amplificada (figura 28) y clonada en el vector de expresión pMF-CMV reemplazando la señal de poliadenilación de SV40; esto dió origen a 7 vectores de expresión denominados pMF, numerados del 1 al 7 de acuerdo al orden en que aparecen en la lista anterior y cuya única variación, es la región 3'UTR introducida.

Adicionalmente se construyeron 3 vectores más, buscando establecer diferencias en la actividad del reportero al deletar las repeticiones CU's presentes en la región 3'UTR de VEGF-D de rata, tanto en la versión corta como en la larga; esto dió origen a los vectores pMF1-Δ, pMF6-Δ y pMF7-Δ.

En el caso de los vectores pMFs del 1-7, cada región, fue amplificada partiendo de DNAC de la línea celular HB⁺ o de DNAP de clonas comerciales; los fragmentos obtenidos fueron recuperados del gel y purificados (figura 28).

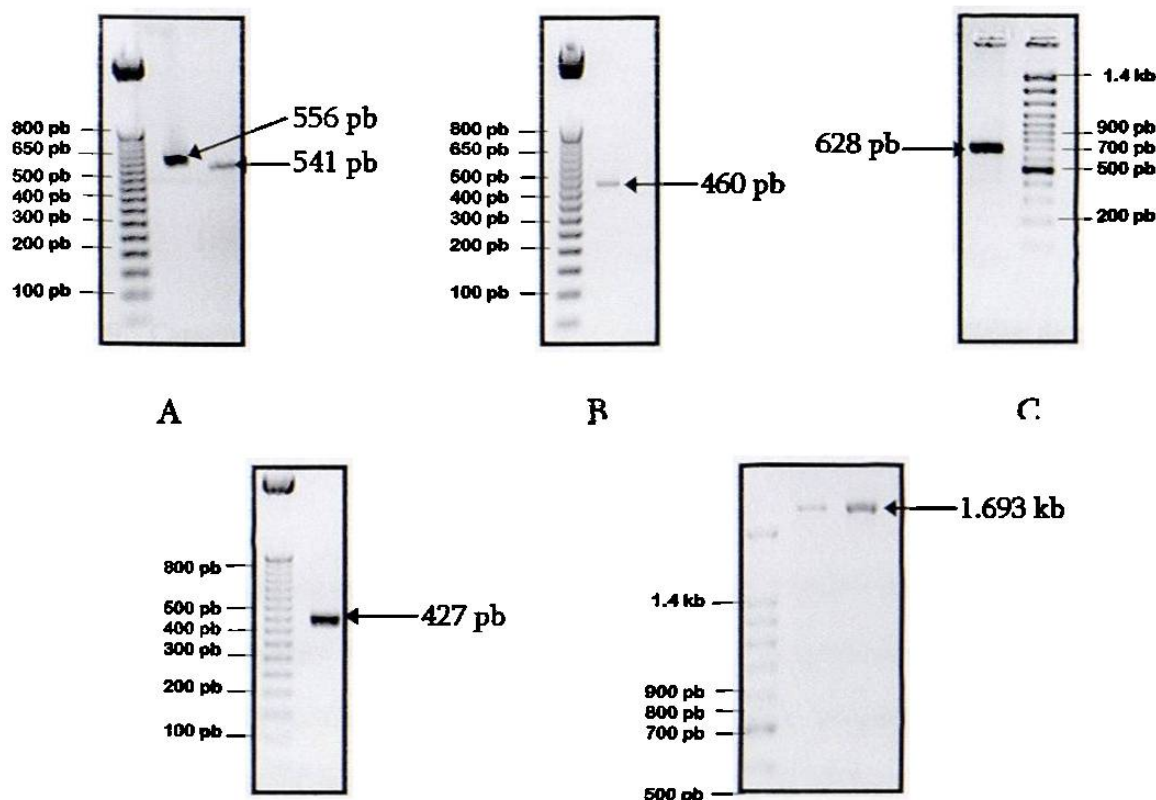


Figura 28. Amplificación de las diferentes regiones 3'UTR. Geles de agarosa/BrEt al 2.0% mostrando los fragmentos amplificados para las diferentes regiones 3'UTR de (A). humano y ratón; (B). *c-myc*; (C). β -actina; (D). secuencia corta de VEGF-D de rata; (E). secuencia larga de VEGF-D obtenida de DNAc de células PC12HB⁺ y de la clona comercial respectivamente.

Posteriormente los fragmentos fueron digeridos con *Xba* I y *Bam* HI y ligados en el vector pMF-CMV. Una vez realizada la transformación, el DNA plasmídico fue extraído y caracterizado por digestión con *Xba* I y *Bam* HI; los tamaños de los fragmentos liberados para cada caso corresponden con los tamaños esperados (figura 29).

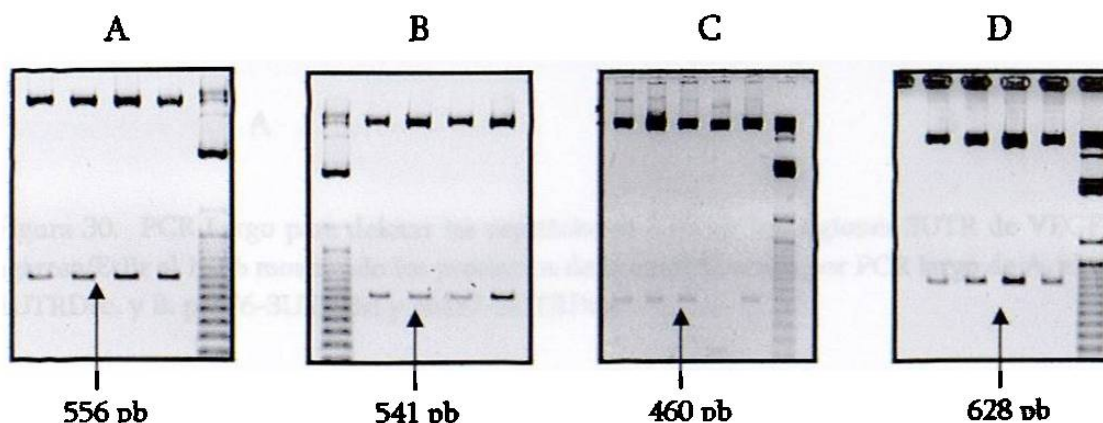




Figura 29. Caracterización de clonas candidatas por digestión enzimática. Geles de agarosa /BrEt al 2.0% mostrando los fragmentos liberados tras la caracterización con *XbaI/BamHI*, correspondiente a las diferentes regiones 3'UTR de (A). humano; (B). ratón; (C). c-myc; (D). β -actina; (E). secuencia larga de VEGF-D obtenida de DNAc de células PC12HB⁺ y F. secuencia larga de VEGF-D obtenida de la clona comercial.

Para la construcción de los vectores pMF1- Δ , pMF6- Δ y pMF7- Δ , se partió de los plásmidos pMF1-3UTRDrc, pMF6-3UTRDrl y pMF7-3UTRDro respectivamente (*para detalles de la estrategia de construcción véase en materiales y métodos las secciones 3.5.4 y 3.6.1.3*). Los resultados de la amplificación de los vectores pMF1-3UTRDrc, pMF6-3UTRDrl y pMF7-3UTRDro por PCR largo y su caracterización con enzimas de restricción, se muestran en las figuras 30 y 31 respectivamente.

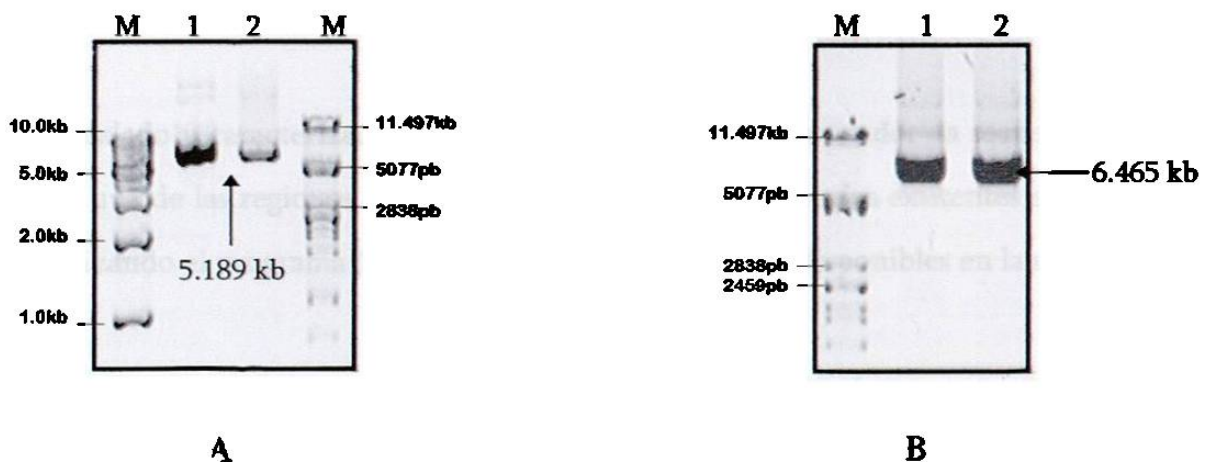


Figura 30. PCR Largo para deletar las repeticiones CT's de las regiones 3UTR de VEGF-D. Geles de agarosa/EtBr al 1.0% mostrando los productos de la amplificación por PCR largo de A. el vector pMF1-3UTRDrc, y B. pMF6-3UTRDrl y pMF7-3UTRDro.

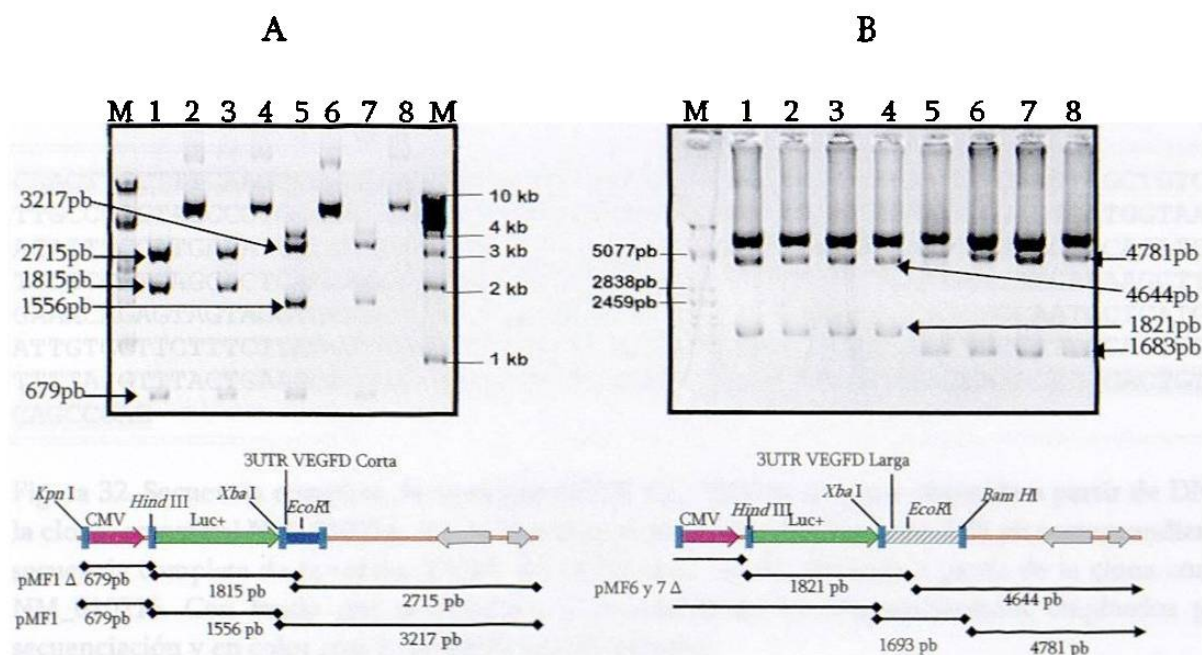


Figura 31. Caracterización de Candidatos de pMF1- Δ , pMF6- Δ , pMF7- Δ por digestión enzimática. (A) La caracterización con *EcoRI/KpnI/HindIII* del vector pMF1- Δ genera las bandas mostradas en los carriles 1 y 3 (679, 1815, 2725 pb respectivamente). La caracterización con *KpnI/HindIII/XbaI* del vector pMF1-3UTRDrc genera los productos mostrados en los carriles 5 y 7 (679, 1556, 3217 pb respectivamente). (B) La caracterización con *EcoRI/HindIII* del vector pMF6- Δ y pMF7- Δ genera las bandas mostradas en los carriles 1y 2; y 3 y 4 (1821, 4644 pb respectivamente). La caracterización de ambos vectores con *XbaI/BamHI* genera los productos mostrados en los carriles 5 y 6; y 7 y 8 (1693, 4781 pb respectivamente).

Una vez aislado y caracterizado, el DNA plasmídico fue secuenciado; la secuencia obtenida para cada una de las regiones 3'UTR se comparó con las secuencias existentes en el banco de genes utilizando el programa BLAST 2.2.11 y Clustal w v1.82 disponibles en la red.

Las secuencias obtenidas, así como los resultados de los alineamientos para cada una de las secuencias se muestra a continuación.