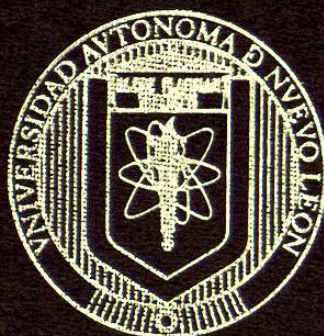


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



EFFECTO DEL ONCOGEN  $W_{nt}$  SOBRE LA EXPRESION  
DE LAS ISOFORMAS DE AUF1

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

PRESENTA:

Q.F.B. IVAN ALBERTO MARINO MARTINEZ

MONTERREY, NUEVO LEON

AGOSTO DE 2006



TM

QP624

.75

.P74

M47

2006

c.1



1080146422

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



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

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

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

**PRESENTA:**

**Q.F.B. IVAN ALBERTO MARINO MARTÍNEZ**

**Monterrey, Nuevo León**

**Agosto de 2006**



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

Aprobación de la Tesis:

---

**DR. JUAN FRANCISCO VELÁZQUEZ VADILLO**

Director de Tesis

---

**DR. GERARDO PADILLA RIVAS**

Co-Director de Tesis

---

**DRA. HERMINIA MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**

Co-Director de Tesis

---

**DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO**

Subdirector de Estudios de Postgrado

***DEDICADO A:***

**MIS PADRES:**

María Victoria Martínez Rodríguez y Alberto Marino Castañón

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

**MIS HERMANOS:**  
(Paulo, Gilberto y Jacob)

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

**MI NOVIA LAURA:**

Mi lado izquierdo, te amo.

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

***GRACIAS A:***

**MIS AMIGOS:**

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

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

**MIS MAESTROS:**

Dr. Juan Francisco Velázquez Vadillo.  
Por darme la oportunidad de seguir aprendiendo de su experiencia.

Dr. Gerardo Padilla Rivas.  
Por enseñarme que lo importante es saber donde buscar.

Dra. Herminia Martínez Rodríguez.  
Por toda su ayuda durante mi formación en el posgrado.

# ÍNDICE

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



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

## LISTA DE FIGURAS.

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

## **TABLA DE NOMENCLATURA**

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

## RESUMEN

**Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina.**

**Fecha de Graduación:** Agosto 2006

**Área de estudio:** Biología Molecular.

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

**Numero de páginas:** 35

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

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

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

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

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

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

**DR. JUAN FRANCISCO VELÁZQUEZ VADILLO** (Director de Tesis)

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

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



# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN.**

### **1.1 Introducción general.**

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

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

### **1.2 La vía canónica Wnt.**

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

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

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

### 1.3 Cáncer y estabilidad del ARNm.

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

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

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

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

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

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

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

# **CAPÍTULO II**

## **OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general:**

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

#### **2.1.1 Objetivo particular I:**

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

#### **2.1.2 Objetivo particular II:**

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



# **CAPÍTULO III**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Área de trabajo.**

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L, cuyo responsable es el Dr. Juan Francisco Velázquez Vadillo.

### **3.2. Reactivos.**

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

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

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

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

IRDye 800v2 Terminator mixes

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

QIAGEN Plasmid Midi Kit

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

Enzimas de restricción.

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

Advantage RT for PCR Kit

- **Invitrogen (California, USA)**

Iniciadores específicos

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

Glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ )

Acetato de potasio ( $CH_3COOK$ )

Acetato de sodio ( $CH_3COONa$ )

Alcohol etílico ( $C_2H_5OH$ )

Hidróxido de amonio ( $NH_4OH$ )

Hidróxido de sodio ( $NaOH$ )

Cloruro de sodio ( $NaCl$ )

Cloruro de potasio ( $KCl$ )

Cloruro de Calcio ( $CaCl_2$ )

SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)

EDTA (Acido Etileno Diamino Tetracético)

Cloroformo ( $CHCl_3$ )

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

Bacto agar

Extracto de levadura

Bacto triptona.

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

Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit.

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

PARIS Kit

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

Anticuerpos comerciales.

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

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

### **3.3 Equipo.**

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

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

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

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

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

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

Cámara de electroforesis de International Biotechnologies Inc.

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

Incubadora para cultivo celular con suplemento de CO<sub>2</sub> de NAPCO Scientific Company (USA).

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

Microscopio invertido marca Karl Zeiss.

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

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

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

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

### 3.4. Ácidos nucleicos.

#### 3.4.1. Oligonucleótidos.

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



### 3.4.2. Vectores.

#### 3.4.2.1. Vector pGEM-T Easy (Promega).

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

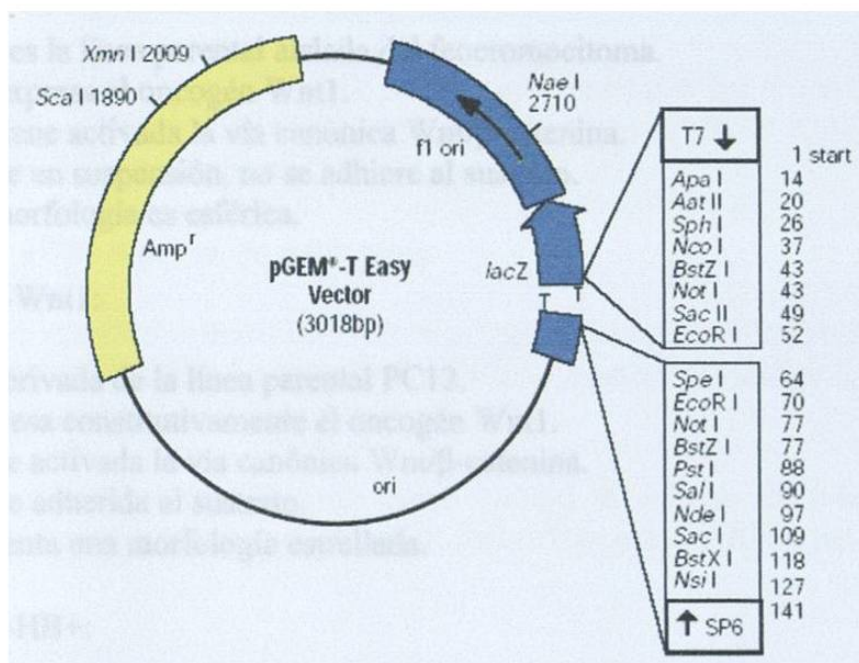


Figura 1. Mapa circular y sitios de referencia de la secuencia del vector pGEM-T Easy (PROMEGA).

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

- Sitio de inicio de la transcripción de la ARN polimerasa T7 1
- Región de clonación múltiple 10-128
- Promotor de la ARN polimerasa SP6 (-17 a +3) 139-158
- Sitio de inicio de la transcripción de la ARN polimerasa SP6 141
- Sitio de unión del primer de secuenciación pUC/M13 Reverse 176-197
- Codón de inicio de *lacZ* 180
- Operador *lac* 200-216
- Región codificante para B-lactamasa 1337-2197
- Región del fago f1 2380-2835
- Secuencias del operon *lac* 2836-2996, 166-395
- Sitio de unión del primer de secuenciación pUC/M13 Forward 2949- 2972
- Promotor de la ARN polimerasa T7 2999-3

### 3.5 Modelo celular.

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

- **Línea parental PC12:**
  - Esta es la línea parental aislada del feocromocitoma.
  - No expresa el oncogén Wnt1.
  - No tiene activada la vía canónica Wnt/ $\beta$ -catenina.
  - Crece en suspensión, no se adhiere al sustrato.
  - Su morfología es esférica.
- **Línea PC12-Wnt1:**
  - Es derivada de la línea parental PC12.
  - Expresa constitutivamente el oncogén Wnt1.
  - Tiene activada la vía canónica Wnt/ $\beta$ -catenina.
  - Crece adherida al sustrato.
  - Presenta una morfología estrellada.
- **Línea PC12-HB+:**
  - Es derivada de la línea parental PC12.
  - Expresa constitutivamente el oncogén Wnt1.
  - Tiene activada la vía canónica Wnt/ $\beta$ -catenina.
  - Crece adherida al sustrato.
  - Su morfología es estrellada.
- **Línea PC12-HB-:**
  - Se derivó de la línea PC12-HB+.
  - No expresa el oncogén Wnt1.
  - No tiene activada la vía canónica Wnt/ $\beta$ -catenina.
  - Crece adherida al sustrato.
  - Su morfología es estrellada.

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



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

### 3.6 Metodología.

#### 3.6.1. Aislamiento de ARN total de las líneas celulares.

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

#### 3.6.2. Síntesis del ADNc a partir de ARN total.

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

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

Condiciones de la RT-PCR.

$\beta$ – actina	RT-PCR	Wnt1
2.6 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O NF	2.6 $\mu$ l
3.0 $\mu$ l	Go Taq Green MM 2 X	3.0 $\mu$ l
0.2 $\mu$ l	Mezcla de Primers 20p $\mu$ /l	0.2 $\mu$ l
0.2 $\mu$ l	ADNc	0.2 $\mu$ l

Programa de la PCR:

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

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

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

Condiciones de la PCR

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

Programa de la PCR:

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

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

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

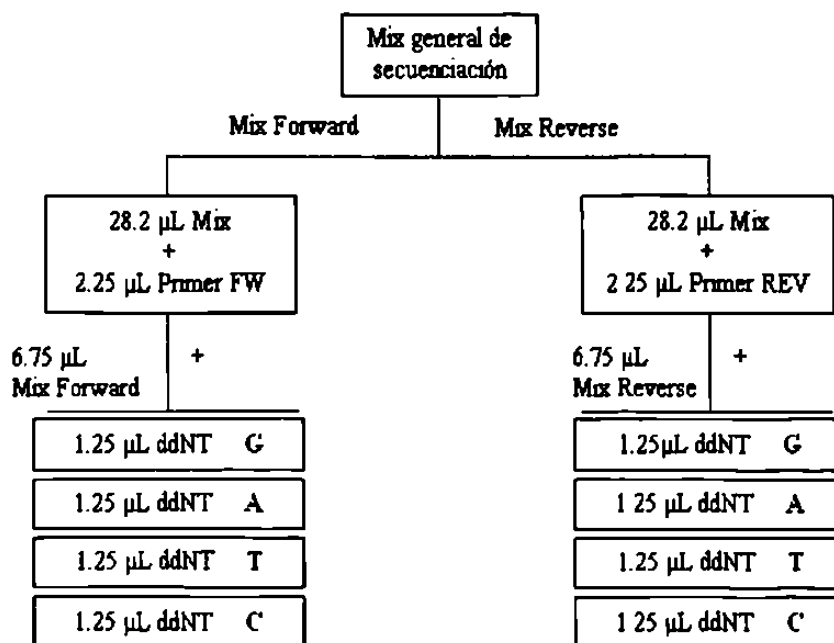
La caracterización por enzimas de restricción se hizo usando la enzima EcoRI que flanquea el sitio de inserción del producto amplificado en el vector pGEM-T-Easy de Promega. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 2% para discriminarlos por tamaño, los candidatos que presentaban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

Mezcla general para la reacción de secuenciación:

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

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

Secuenciación completa:



Programa de secuenciación:

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

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

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

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

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

Condiciones de la PCR:

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

Programa de la PCR:

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



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

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

Condiciones de la PCR:

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

Programa de la PCR:

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

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

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

Condiciones de la PCR:

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

Programa de la PCR:

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

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

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

Condiciones de la PCR:

RT-PCR	HuR
H <sub>2</sub> O NF	4.6 $\mu$ l
Go Taq Green MM 2 X	5.0 $\mu$ l
Mezcla de Primers 20p $\mu$ /p $\mu$ l	0.2 $\mu$ l
ADNc	0.2 $\mu$ l

Programa de la PCR:

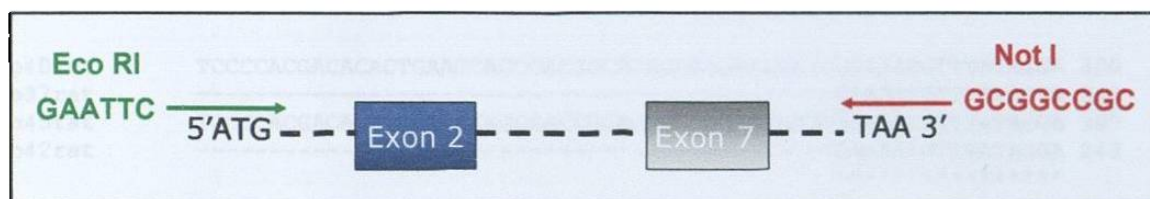
PROGRAMA PCR	HuR
Desnaturalización	94 °C – 5 minutos
Desnaturalización	94 °C – 30 segundos
Alineamiento / Extensión	68 °C – 90 segundos
Ciclos	29, 31, 33 y 35 ciclos
Terminación	4° C – $\alpha$

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

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

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



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

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

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

p40rat ATGTCTGGAGGAGCAGTTCTGGAGGGGACGGGGCGGCGGGCGGGCAACGGCGGCGGTAGGC 60  
p37rat ATGTCTGGAGGAGCAGTTCTGGAGGGGACGGGGCGGCGGGCGGGCAACGGCGGCGGTAGGC 60  
p45rat ATGTCTGGAGGAGCAGTTCTGGAGGGGACGGGGCGGCGGGCGGGCAACGGCGGCGGTAGGC 60  
p42rat ATGTCTGGAGGAGCAGTTCTGGAGGGGACGGGGCGGCGGGCGGGCAACGGCGGCGGTAGGC 60  
\*\*\*\*\*  
  
p40rat GGCTCGGCGGGCGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGCGGCGCAGGGGGCAGCGGCGGCG 120  
p37rat GGCTCGGCGGGCGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGCGGCGCAGGGGGCAGCGGCGGCG 120  
p45rat GGCTCGGCGGGCGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGCGGCGCAGGGGGCAGCGGCGGCG 120  
p42rat GGCTCGGCGGGCGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGCGGCGCAGGGGGCAGCGGCGGCG 120  
\*\*\*\*\*  
  
p40rat GCGGGAAGCGGGAGCGGCGGCGGCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAG 180  
p37rat GCGGGAAGCGGGAGCGGCGGCGGCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAG 180  
p45rat GCGGGAAGCGGGAGCGGCGGCGGCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAG 180  
p42rat GCGGGAAGCGGGAGCGGCGGCGGCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAG 180  
\*\*\*\*\*  
  
p40rat GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGG CATT AAACCTCC 240  
p37rat GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGG----- 227  
p45rat GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGG CATTCAAACCTC 240  
p42rat GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGG----- 227  
\*\*\*\*\*  
  
p40rat CCA GACACA TGAAG A C A CACA C AA AA GAAAATGTTTATAGGA 300  
p37rat -----GAAAATGTTTATAGGA 243  
p45rat TCCCCACGACACACTGAAG AG GA CACA AA AA GAAAATGTTTATAGGA 300  
p42rat -----GAAAATGTTTATAGGA 243  
\*\*\*\*\*  
  
p40rat GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGAC 360  
p37rat GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGAT 303  
p45rat GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGAC 360  
p42rat GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGAT 303  
\*\*\*\*\*  
  
p40rat GTTGCTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTGGCTTT 420  
p37rat GTTGCTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTGGCTTT 363  
p45rat GTTGCTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTGGCTTT 420  
p42rat GTTGCTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTGGCTTT 363  
\*\*\*\*\*  
  
p40rat GTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTG 480  
p37rat GTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTG 423  
p45rat GTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTG 480  
p42rat GTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTG 423  
\*\*\*\*\*  
  
p40rat AATGGGAAAGTCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAAA 540  
p37rat AATGGGAAAGTCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAAA 483  
p45rat AATGGGAAAGTCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAAA 540  
p42rat AATGGGAAAGTCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAAA 483  
\*\*\*\*\*  
  
p40rat AAAATTTTGTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTT 600  
p37rat AAAATTTTGTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTT 543  
p45rat AAAATTTTGTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTT 600  
p42rat AAAATTTTGTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTT 543  
\*\*\*\*\*

p40rat GGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGG 660  
p37rat GGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGG 603  
p45rat GGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGG 660  
p42rat GGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGG 603  
\*\*\*\*\*

p40rat CGTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAG 720  
p37rat CGTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAG 663  
p45rat CGTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAG 720  
p42rat CGTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAG 663  
\*\*\*\*\*

p40rat AAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTGCGAAGGAGCAG 780  
p37rat AAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTGCGAAGGAGCAG 723  
p45rat AAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTGCGAAGGAGCAG 780  
p42rat AAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTGCGAAGGAGCAG 723  
\*\*\*\*\*

p40rat TATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA 840  
p37rat TATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA 783  
p45rat TATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA 840  
p42rat TATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA 783  
\*\*\*\*\*

p40rat GGCGGTG----- 847  
p37rat GGCGGTG----- 790  
p45rat GGCGGTGGCCCCAGTCAAAACTGGAACCAGGGATATAGTAACTATTGGAACCAAGGCTAT 900  
p42rat GGCGGTGGCCCCAGTCAAAACTGGAACCAGGGATATAGTAACTATTGGAACCAAGGCTAT 843  
\*\*\*\*\*

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

p40rat -----ATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTA 882  
p37rat -----ATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTA 825  
p45rat TACAACAGCTACTATGGATATGGTGACTATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTA 1020  
p42rat TACAACAGCTACTATGGATATGGTGACTATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTA 963  
\*\*\*\*\*

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

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

#### p45AUF1

**ATG**TCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGGCGGGCGGCAACGGCGGCGGTAGGCGGCTCGGCGG  
GCGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGGCGGCAGGGGGCAGCGGCGGCGGGGAAGCGGGAGCGGCGG  
CGGCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAGGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAG  
AATGAGGAGGATGAAGGCCA C C A ACT AA A C A G ACA AA  
AATGAAAATGTTTATAGGAGGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAA  
ATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTGGCTTT  
GTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTGAATGGGAAAG  
TCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCT  
TTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAG  
CTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCGTGGGTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAG  
TGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTC  
GAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA  
GGCGGTGGCCCCAGTCAAACTGGAACCAGGGATATAGTAACTATTGGAACCAAGGCTATGGCAGCTATGG  
ATATAACAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAGGATATGACTACACTGGTTACAACAGCTAC A GGATATG  
GTGACTATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTATCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTAC  
AAACCATACTAA

#### p42AUF1

**ATG**TCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGGCGGGCGGCAACGGCGGCGGTAGGCGGCTCGGCGGG  
CGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGGCGGCAGGGGGCAGCGGCGGCGGGGAAGCGGGAGCGGCGGGCG  
GCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAGGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAAT  
GAGGAGGATGAAGGGAAATGTTTATAGGAGGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTA  
CTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTT  
TTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTGAAT  
GGGAAAGTCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAAAAAAATTTTTGTTGG  
TGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCA  
TAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCGTGGGTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAA  
CCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCAT  
GTCGAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAA  
GAGGCGGTGGCCCCAGTCAAACTGGAACCAGGGATATAGTAACTATTGGAACCAAGGCTATGGCAGCTAT  
GGATATAACAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAGGATATGACTACACTGGT ACAACAGCTACTATGGATA  
TGGTGACTATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTATCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACA  
AACCATACTAA

#### p40AUF1

**ATG**TCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGGCGGGCGGCAACGGCGGCGGTAGGCGGCTCGGCGGG  
CGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGGCGGCAGGGGGCAGCGGCGGCGGGGAAGCGGGAGCGGCGGGCG  
GCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAGGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAAT  
GAGGAGGATGAAGGCC C C A A  
AA GGAAAATGTTTATAGGAGGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAA  
TTTGGGGACGTTGTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTTGT  
GCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTGAATGGGAAAGTCA  
TTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCTTTCT  
CCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCC  
TATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCGTGGGTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAGTGAAGA  
AGATAATGGAGAAGAAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTGAAGGAG  
CAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGTGA  
TCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTATCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA

### **p37AUF1**

**ATGTCGGAGGAGCAGTTTCGGAGGGGACGGGGCGGCGGCGGCGGCAACGGCGGCGGTAGGCGGCTCGGCGGG**  
CGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGCGGCGCAGGGGGCAGCGGCGGCGGCGGGAAGCGGGAGCGGCGGCG  
GCTCTGCGGCCGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAGGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAAT  
GAGGAGGATGAAGGAAAATGTTTATAGGAGGCCCTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTA  
CTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTT  
TTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTGAAT  
GGGAAAGTCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAAAAAAATTTTTGTTGG  
TGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCA  
TAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCGTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAA  
CCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCAT  
GTCGAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAA  
GAGGCGGTGATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTATCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCA  
TACTAA

### **Candidato #27**

**ATGTCGGAGGAGCAGTTTCGGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGGCCATTCAA**  
AC CCTCCCCACGACACACT AA C GCGA G CG AA AA GGAAAATGTTTATAGGAGGCC  
TTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACT  
CTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGT  
AGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTGAATGGGAAAGTCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCA  
TGAAAACAAAAGAGCCCGTCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATA  
AGAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAG  
GCGTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACCACA  
ATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTCGAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGG  
GGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGTGGCCCCAGTCAAACTGGAACAGGG  
ATATAGTAACTATTGGAACCAAGGCTATGGCAGCTATGGATATAACAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAG  
GATATGACTACACTGGTTACAACAGCTACTATGGATATGGTGACTATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGG  
AAAGTATCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA

### **Candidato #6**

**ATGTCGGAGGAGCAGTTTCGGAGGCACCGAAGAGGCAGCACCGAGGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGT**  
AAGAATGAGGAGGATGAAGGCC C A ACA C  
A AATGGAAAATGTTTATAGGAGGCCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCA  
AATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTT  
GTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTGAATGGGAAAGT  
CATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCGTCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCTTT  
CTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTG  
CCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCGTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAAGTGA  
GAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTCGAAGG  
AGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGT  
GGCCCCAGTCAAACTGGAACCAAGGATATAGTAATATTGGAACCAAGGCTATGGCAGCTATGGATATAA  
CAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAGGATATGACTACACCGGTTACAACAGCTAC ATG A ATGG GACT  
ATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTATCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATAC  
TAA



### Candidato #3

ATGTCGGAGGAGCAGTTTCGGAGGGGACGGGGCGGCGGCGGCGGCAACGGCGGCGC AAA  
ACGACACACTGAAGCAG GA G A G AAGAA GAAAATGTTTATAGGAGGCCTTAGCTGGGAC  
ACCACAAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACTCGGAAGTTAGA  
TCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCA  
TGGATCAGAAAGAACATAAATTGAATGGGAAAGTCATCGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAA  
GAGCCCGTCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTT  
TGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCGTGGGTTCT  
GTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAATGTTGGTCTT  
AGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTGGAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGG  
AGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGTGATCAGCAGAGCGGTTATGGGAAAGTATCCAGACGAG  
GTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA

### Candidato #7

ATGTCGGAGGAGCAGTTTCGGAGGAGGATGAAGGGAAAATGTTTATAGGAGGCCTTAGCTGGGACACCACAA  
AGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATC  
ACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTTCATGGATCA  
GAAAGAACATAAATTGAATGGGAAAGTCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCG  
TCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTTGGTGG  
TTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCGTGGGTTCTGTTTCA  
TTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAA  
TGTGAAATAAAAGTAGCCATGTGGAAGGAGAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGCAGCAGCAGTGGGGAT  
CTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGTGA AGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTATCC  
AGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA

### Candidato #2

ATGTCGGAGGAGCAGTTTCGGAGGGGACGGGGCGGCGGCGGCGGCTCTGCGGCCGGAGACCGAAGAGGCAGC  
ACCGAGGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGG C  
ACGACA ACTGAA C ACA C AA AA GAAAATGTTTATAGGAGGCCTTAGCTGGGACA  
CCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCGAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACTCGGAAGTTAGAT  
CCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCAT  
GGATCAGAAAGAACATAAATTGAATGGGAAAGTCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAG  
AGCCCGTCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTT  
GGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCGTGGGTTCTG  
TTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAATGTTGGTCTTA  
GTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTGGAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGA  
GGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGTGA AGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTATCCAGACGAGG  
TGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA

### Candidato #16Hb-

ATGTCGGAGGAGCAGTTTCGGAGGGGACGGGCACAGCG GAAGAATGGAAAATGTTTATAGGAGGCCTTAGCT  
GGGATACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACTCTGAAG  
TTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAA  
GGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTGAATGGGAAAGTCATTGACCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAGA  
CAAAAGAGCCCGTCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAG  
TACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCGTGG  
GTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAATGTTG  
GTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTGGAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCT  
AGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGTGGCCCCAGTCAAACTGGAACCAGGGATA AG  
TAATAATTGGACCAAGGCTATGGCAGCTATGGATATAACAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAGGATATGA  
CTACACTGGTTACAACAGCTACTATGGATATGGTGACTATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTAT  
CCAGCGGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA