

Candidato #15Hb-

ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAAGAATGAGGAGGATGAAGGCC
A TCAAACCTCT CCAC A A A GAA CA C ACG C AA GAAAATGTTTATAGGA
GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTG
CACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGGTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCGGGGA
GTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTGAATGGGAAAGTCATTGATCCTAAAGGGCCAAAG
CCATGAAAACAAAAGAGCCCCTCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAA
ATAAGAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAA
GAGGCGTGGGTTCCGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACC
ACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTGCGAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAG
TGGGGATCTAGAGGAGGTTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCCGTTGATCAGCAGAGTGGTTGTGGGAA
AGTATCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA

Candidato #6Hb-

ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGG ACGG AC G AA AAT GAAAATGTTTATAGGAGGCCTTAGCT
GGGATACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACTCTGAAG
TTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAA
GGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTGAATGGGAAAGTCATTGACCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAGA
CAAAGAGCCCCTCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAA
GAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGG
CGTGGGTTCTGTTTCATTTCTTTAAGGAAGAGGAACCAAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAA
TGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTGCGAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGG
GATCTAGAGGAGGTTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCCGTTGGCCCAGTCAAACCTGGAACCAGGGA
TATAGTAACTATTGGAACCAAGGCTATGGCAGCTATGGATATAACAGCCAAGGGTACGGTGGTTAT
GGAGGATATGACTACACTGGTTACAACAGC ACTATGGATATGGTACTATAGCAATCAGCAGAGTGGTTA
TGGGAAAGTATCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA

Candidato #4Hb-

ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGG A GCA AGC GGAA AA GAAAATGTTTATAGGAGGCCTTAGCT
GGGATACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACTCTGAAG
TTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGYCGGAGAGTGTAGATAA
GGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTGAATGGGAAAGYCATGACCCCTAAAAGGGCCAAAGCCCATGAA
GACCAAAGAGCCCCCTCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCTTTCTCCAGCACACCTGAAGAAAAAATAAG
AGAGTCTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCG
TGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAATG
TTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTGCGAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGTGGGGATCT
AGAGGAGGTTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCCGTTGGCCCAGTCAAACCTGGAACCAGGGATATAG
TAACTATTGGAACCAAGGCTATGGCAGC ATGGATATAACAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAGGATATG
ACTACACTGGTTACAACAGCTACTATGGATATGGTACTATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTA
TCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA

Candidato #3Hb+

ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGCACCGAAGAGGCAGCACCGAGGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGT
AGAATGAGGAGGATGAAGGCCA TCAA CT C CA G A A
A AA GGAAAATGTTTATAGGAGGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCA
AATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTATCACAGGGCGATCAAGGGGTCTTGGCTTT
GTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATCAGAAAGAACATAAATTGAATGGGAAAGT
CATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCCCTCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCTTT
CTCCAGGCACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTTGGTGGTTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTG
CCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCGTGGGTTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAAGTGA
GAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAATGTGAAATAAAAGTAGCCATGTGCGAAGG
AGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGTTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCCGTT
GGCCCAGTCAAACCTGGAACCAGGGATATAGTAACTATTGGAGCCAAGGCTATGGCAGCTATGGATATAA
CAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAGGATATGACTACACCGGTTACAACAGCTACTATGGATATGGTGA C
ATAGCAATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTATCCAGACGAGGTGGTCATCAAAATAGCTACAAACCATACT
TAA

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

**ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGCGGGCGGCGGCAACGGCGGGCGGTAGGAGGCAGCACCGA
GGCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGGCCA CAAA C C C C
ACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGG AA AAT GAAAATGTTTATAGGAGGCCCTTAGCTGGGACACCACA
AAGAAAGACCTGAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGACGTTGTAGACTGCACTCTGAAGTTAGATCCTAT
CACAGGGCGATCAAGGGGTTTTGGCTTTGTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGTCATGGATC
AGAAAGAACATAAATTGAATGGGAAAGTCATTGATCCTAAAAGGGCCAAAGCCATGAAAACAAAAGAGCCC
GTCAAAAAAATTTTTGTTGGTGGCCTTTCTCCAGACACACCTGAAGAAAAAATAAGAGAGTACTTTGGTGG
TTTTGGTGAGGTTGAATCCATAGAGCTGCCTATGGACAACAAGACCAATAAGAGGCGTGGGTTCTGTTTCA
TTACCTTTAAGGAAGAGGAACCAAGTGAAGAAGATAATGGAGAAGAAATACCACAATGTTGGTCTTAGTAAA
TGTGAAATAAAAGTAGCCATGTCGAAGGAGCAGTATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTT
TGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGAGGCGGTGATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTATCCAGACGAGGTGGTC
ATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA**

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

CLUSTAL W (1.83) Alineamiento múltiple de secuencias

```
p45rat      ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGCGGGCGGCGGCAACGGCGGGCGGTAGGC 60
C27         ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGG----- 23
C26         ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGG----- 23
C3          ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGCGGGCGGCGGCAACGGCGGGCG----- 54
C2          ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGCGGGCGGCGGCG----- 44
C7          ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGG----- 23
C16hb-     ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGG----- 24
C15hb-     ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGG----- 23
C6hb-      ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGG----- 24
C4hb-      ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGG----- 24
C3hb+     ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGG----- 23
C5         ATGTCGGAGGAGCAGTTCGGAGGGGACGGGGCGGCGGGCGGCGGCAACGGCGGGCGGTAGG- 59
*****
```

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

```

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

p45rat      GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGGC A T AAA 240
C27      -----GAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGGCCATTCAAACCTCC 76
C26      GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGG AAA 115
C3      ----- C TT AAAC T 67
C2      GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGG AAAC 116
C7      -----AGGATGAAGG----- 33
C16hb-    -----
C15hb-    -----CAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGG ATT AAA T 82
C6hb-    -----
C4hb-    -----
C3hb+    GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGGC ATT AAAC 104
C5      GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAAGG ATT AAA 132

p45rat      TCCCCACGACACACTGAA CAGCGAGC A A CG AA AAT GAAAATGTTTATAGGA 300
C27      TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGCACAGCGGGAAGAATGGAAAATGTTTATAGGA 136
C26      TCCC ACGACACACTGAAG AG GA GGCA AA GAAAATGTTTATAGGA 175
C3      TC AC ACA A TGAAGCAG GA G A AG AA GAAAATGTTTATAGGA 127
C2      CCCA GACACAC GAA A A A A AAGAA GGAAAATGTTTATAGGA 176
C7      -----GAAAATGTTTATAGGA 49
C16hb-    -----GA GG A A AA GAAAATGTTTATAGGA 61
C15hb-    TCC AC A ACACT AAG A G A GAA AA GAAAATGTTTATAGGA 142
C6hb-    ----- A AA AA GAAAATGTTTATAGGA 61
C4hb-    ----- A GG A GAAAATGTTTATAGGA 60
C3hb+    TCC A ACA A G A A G GAAAATGTTTATAGGA 164
C5      TCCCCACGACACACTGAAGCAG GA G AA AA GAAAATGTTTATAGGA 192
*****

```

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

4.2 p26AUF1: probable nueva isoforma AUF1.

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

D	MSEEQFGGDGAAAAATAAVG	2	G TE 6
	MSEEQFGGDGAAAAATAAVG-----		GSTE 24
	*****		****
	AEGAKIDASKNEEDEGHNSSSPRHTEAATAQREEWKMFIGGLSWDTTKKDLKDYFSKFGD	120	
	AEGAKIDASKNEEDEGHNSSSPRHTEAATAQREEWKMFIGGLSWDT KKD K YFSKF D	84	

p4 A 1	VVDCTLKLDPITGRSRGFGFVLFKESESVDKVMQKEHKLNGKVIDPKRAKAMKTKEPVK	180	
	VVDCTLKLDPITGRSRGFGFVLFKESESVDKVMQKEHKLNGKVIDPKRAKAMKTKEPVK	144	

D	KIFVGGGLSPDTPEEKIREYFGGFGEVESIELPMDNKTNRKRGFCFITFKE	24	
	KIFVGGGLSPDTPEEKIREYFGGFGEVESIELPMDNKTNRK R FCFITFKEEPEVKKIMEK	04	

p40AUF1	KYHNVGLSKCEIKVAMSKEQYQQQQWGSRRGFAGRAR RGGDQQSGYGKVSRRGGHNS	300	
	KYHNVGLSKCEIKVAMSKEQYQQQQWGSRRGFAGRAR RGGDQQSGYGKVSRRGGHNS	264	

p40AUF1	YKPY	304	
	YKPY	268	

Figura 4. Alineamiento de los residuos de aminoácidos de la isoforma p40AUF1 y de la proteína p26AUF1. Se muestra el alineamiento de los residuos de aminoácidos de la proteína p40AUF1 y de la proteína p26AUF1. Las letras azules corresponden al exon2, y la letra D, en color magenta, indica el aminoácido que se genera por la ausencia del exón 7, y la unión de los exones 6 y 8.

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

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

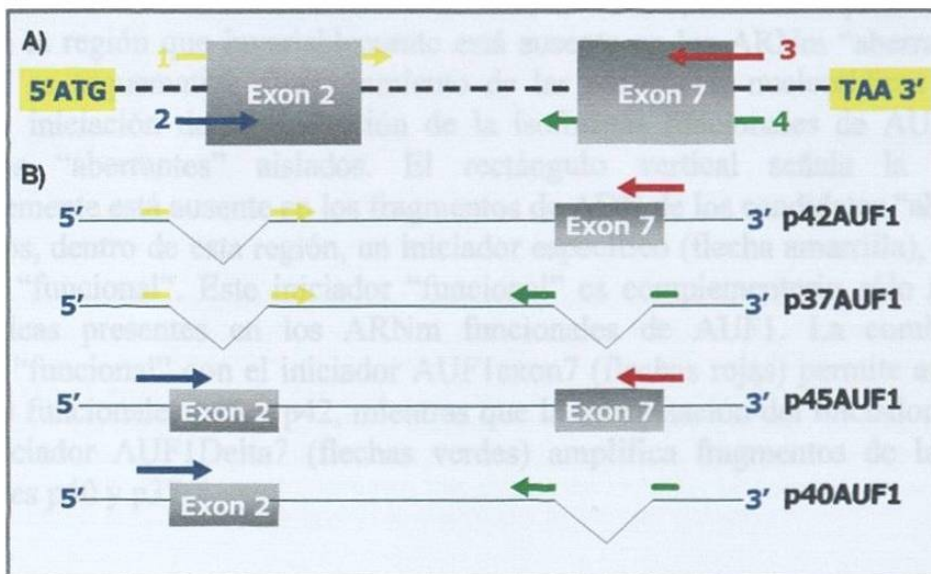


Figura 5. A) Estrategia para analizar por RT-PCR semicuantitativa los niveles del ARNm de las isoformas de AUF1. Se diseñaron iniciadores que amplifican de manera específica las isoformas p45 (iniciadores 2-3; presencia de exon 2 y de exon 7), p42 (iniciadores 1-3; ausencia de exon 2 y presencia de exon 7), p40 (iniciadores 2-4; presencia de exon 2 y ausencia de exon 7) y p37 (iniciadores 1-4; ausencia de exones 2 y 7). Los nombres de los iniciadores mostrados en esta figura como 1, 2, 3 y 4 son: *AUF1 Delta2 (005)*, *AUF1 Exon 2 (004)*, *AUF1 Exon7 (006)* y *AUF1 Delta7 (007)* respectivamente.

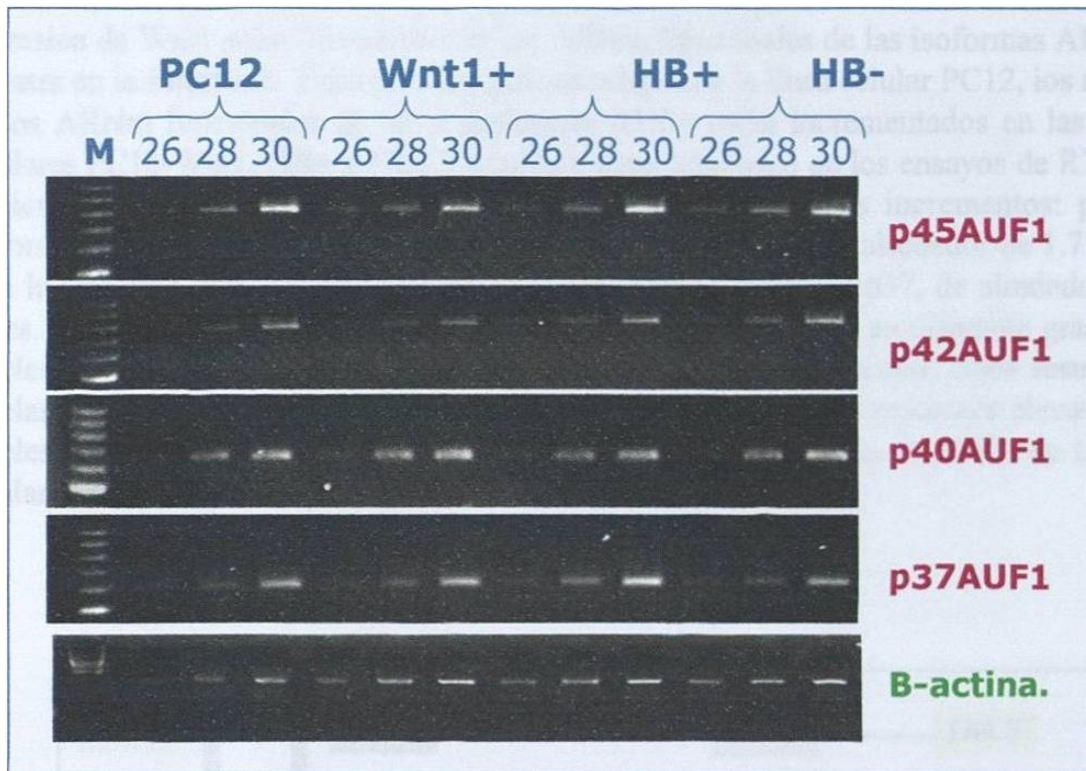


Figura 6. Resultado inicial del análisis de los niveles de ARNm de AUF1 por RT-PCR semicuantitativa. A partir de cDNA de las líneas celulares PC12 (PC12), PC12-Wnt1 (Wnt1), HB+ (HB+), HB- (HB-), y con los iniciadores *AUF1 Exon2 (004) / AUF1 Exon7 (006)* para p45AUF1, *AUF1 Delta2 (005) / AUF1 Exon7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

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

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

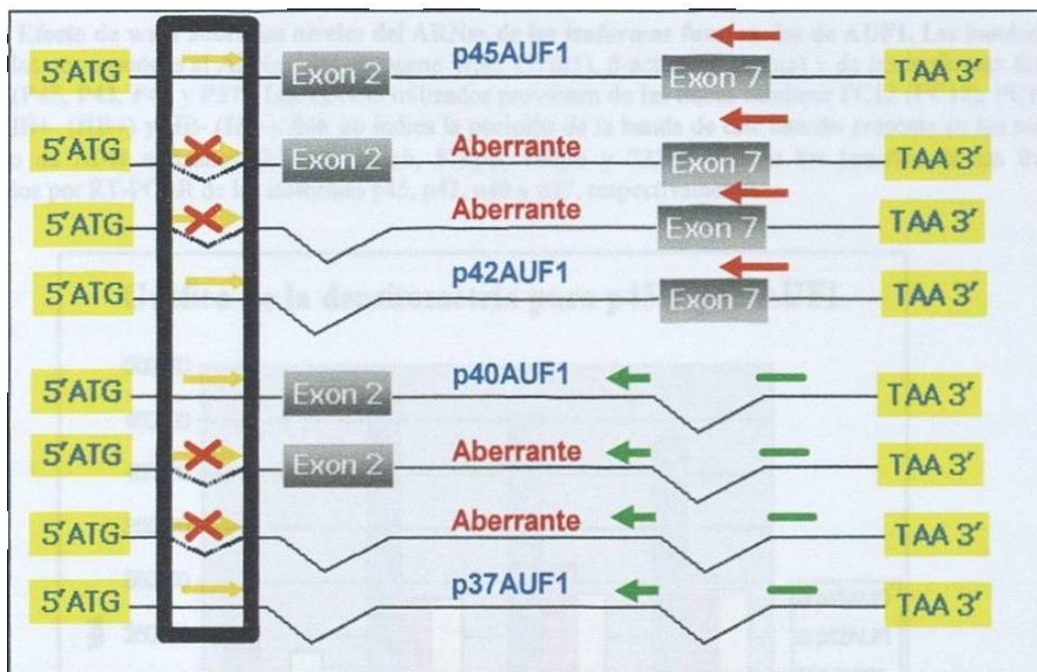


Figura 7. Estrategia para amplificar, por RT-PCR, los ARNm funcionales de las isoformas de AUF1 Se representan los marcos de lectura, desde el codón ATG de inicio de la traducción hasta el codón TAA de término de la traducción, de los ARNm funcionales de las isoformas p45AUF1, p42AUF1, p40AUF1 y p37AUF1.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

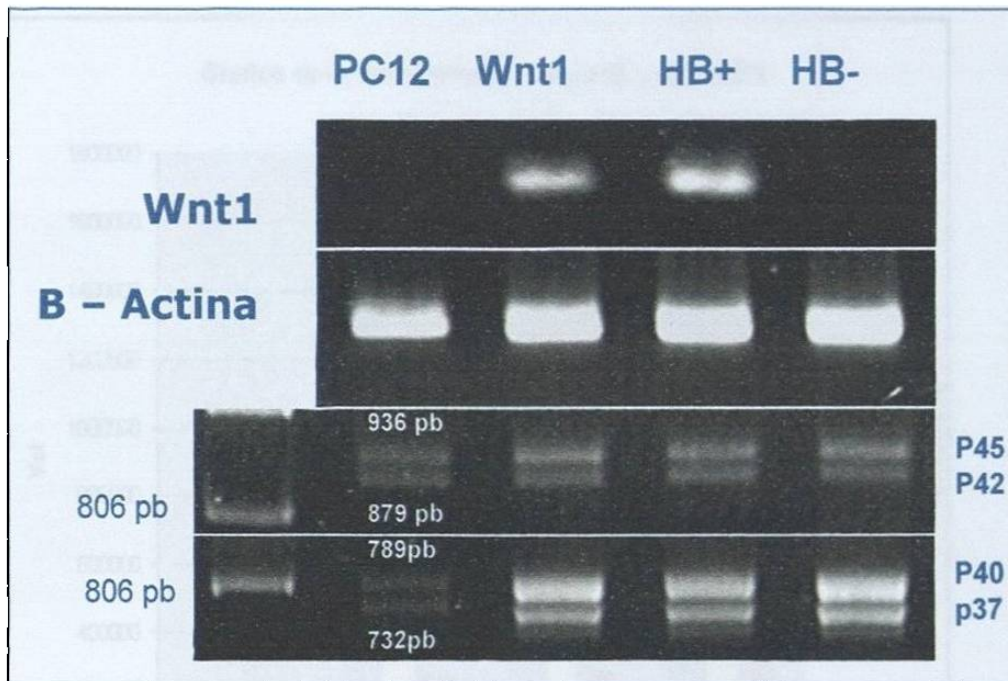


Figura 8. Efecto de wnt1 sobre los niveles del ARNm de las isoformas funcionales de AUF1. Las bandas de ADN amplificadas corresponden al ARNm del oncogene Wnt1 (Wnt1), β -actina (B actina) y de las isoformas funcionales de AUF1 (P45, P42, P40 y P37). Los cDNAs utilizados provienen de las líneas celulares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

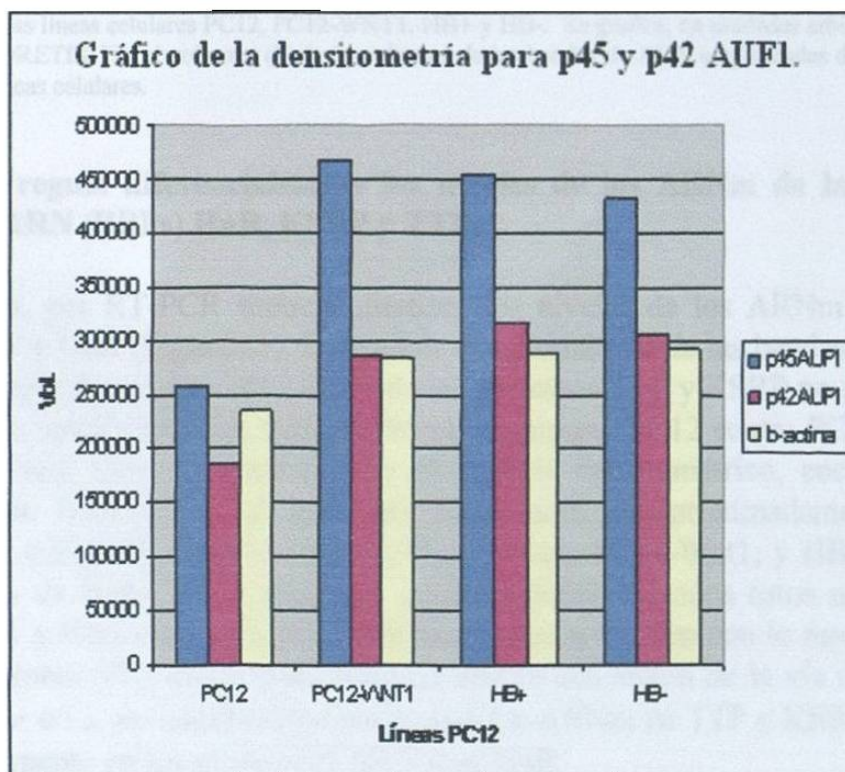


Figura 9. Análisis densitométrico de las bandas de ADN amplificadas al analizar por RT-PCR (Figura 8) los niveles de los ARNm funcionales de las isoformas p45AUF1 (barras azules), p42AUF1 (barras magenta) y b-actina (barras amarillas), en las líneas celulares PC12, PC12-WNT1, HB+ y HB-. Se grafica, en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

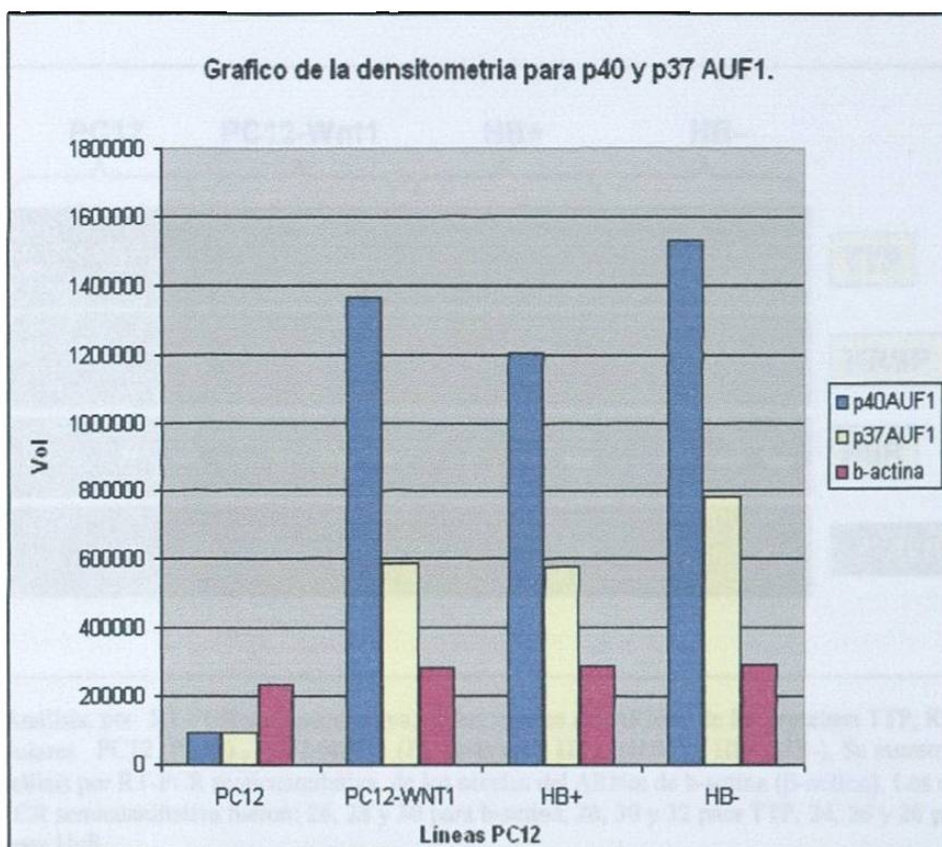


Figura 10. Análisis densitométrico de las bandas de ADN amplificadas al analizar por RT-PCR (Figura 8) los niveles de los ARNm funcionales de las isoformas p40AUF1 (barras azules), p37AUF1 (barras amarillas) y b-actina (barras magenta), en las líneas celulares PC12, PC12-WNT1, HB+ y HB-. Se grafica,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

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

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

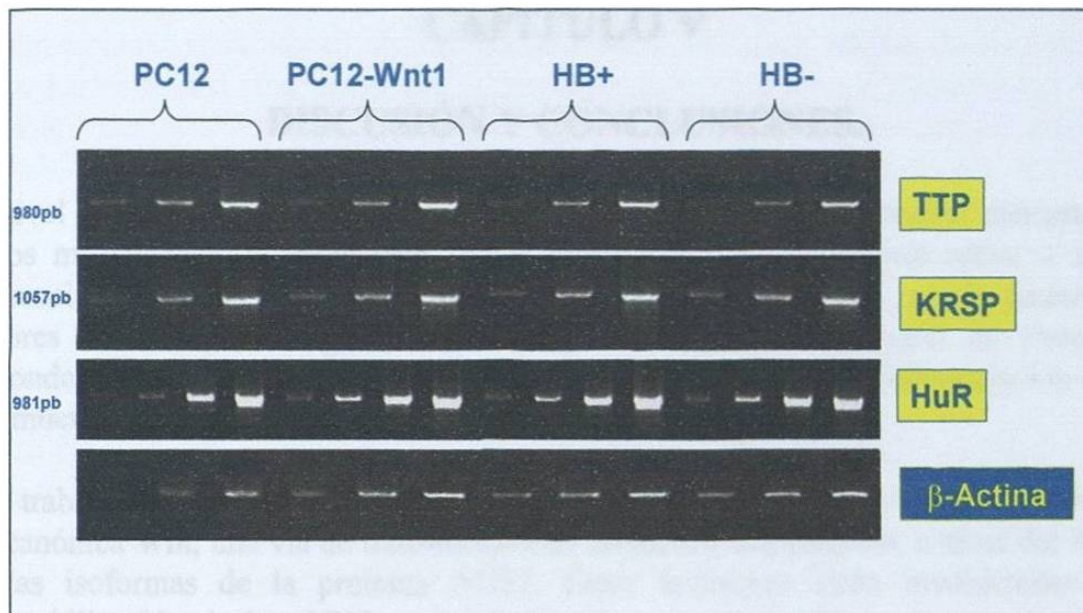


Figura 11. Análisis, por RT-PCR semicuantitativa, de los niveles del ARNm de las proteínas TTP, KRSP y HuR, en las líneas celulares PC12 (PC12), PC12-WNT1 (PC12-Wnt1), HB+ (HB+) y HB- (HB-). Se muestra, como control interno, el análisis por RT-PCR semicuantitativa, de los niveles del ARNm de b-actina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

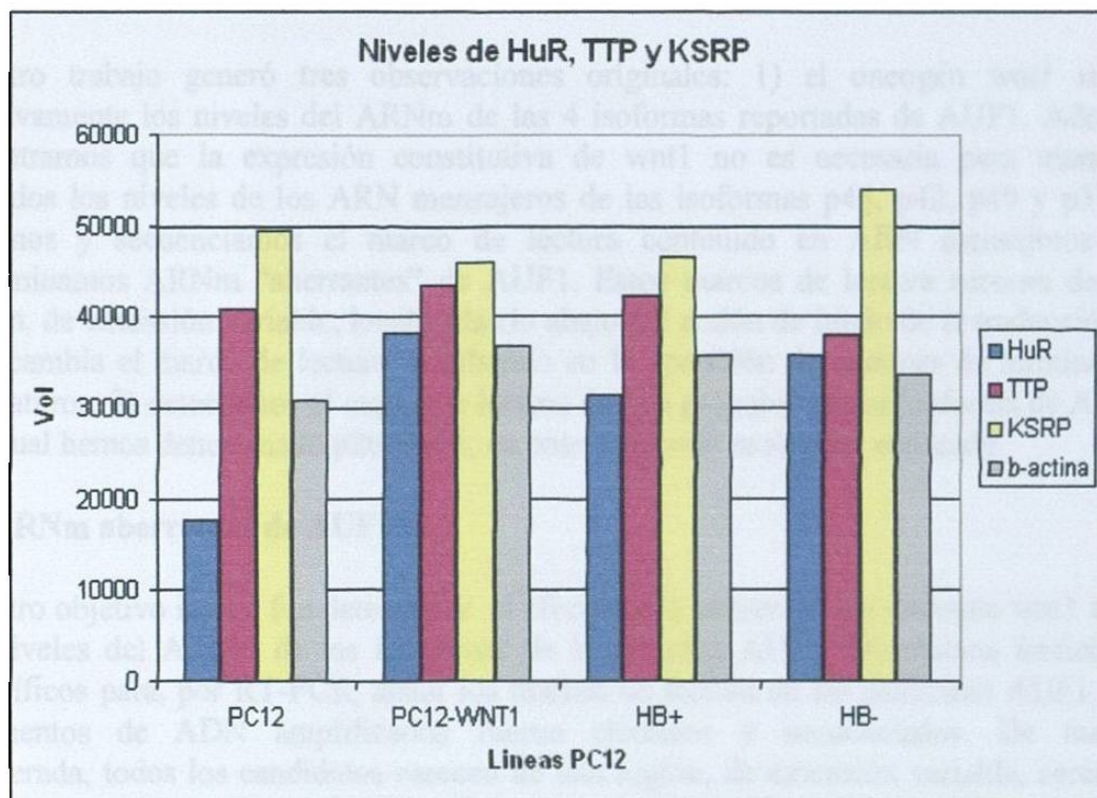


Figura 12. Análisis densitométrico de las bandas de ADN amplificadas al analizar por RT-PCR semicuantitativa (Figura 11) los niveles del ARNm de las proteínas HuR (barras azules), TTP (barras magenta), KSRP (Barras amarillas) y beta-actina (Barras grises) en las líneas celulares PC12, PC12-WNT1, HB+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

CAPITULO V

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

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

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

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

5.1 ARNm aberrantes de AUF1.

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

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

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

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

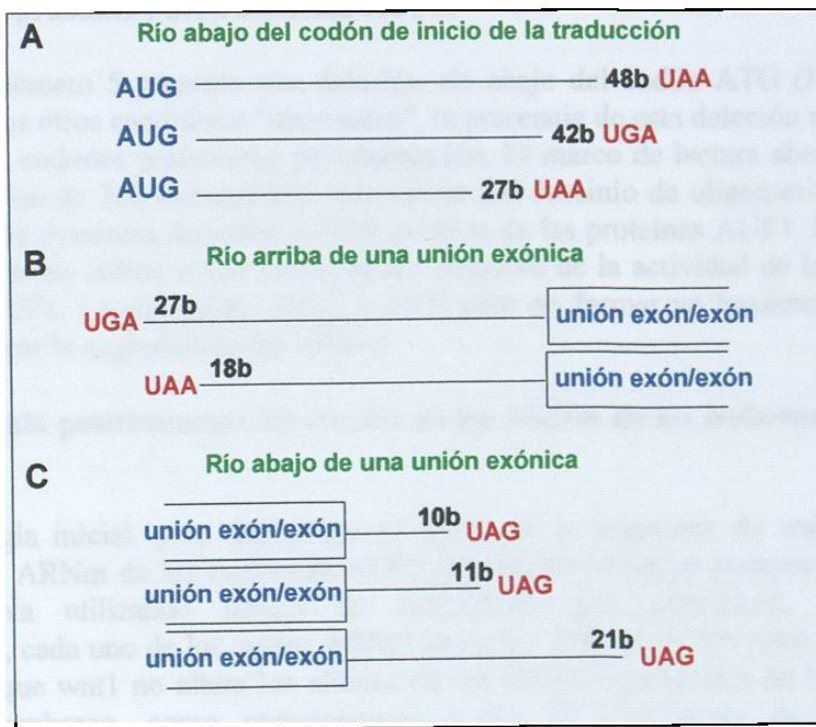


Figura 13 . Localización de los codones de terminación de la traducción prematuros. Se muestra la localización de codones de terminación de la traducción prematuros, presentes en los fragmentos de ADN amplificados a partir de ARNm “aberrantes” de AUF1, en relación al codón de inicio de la traducción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

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

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

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

5.3 p26AUF1: probable nueva isoforma AUF1.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

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

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

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

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

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



