Se aisló el promotor de la anexinal mediante PCR, obteniéndose un fragmento de aproximadamente 1594 pb, la cual se encontraba con bandas inespecíficas (Fig.13A), posteriormente a la reamplificación el producto amplificado se purificó a partir del gel (Fig.13B) y se caracterizó enzimáticamente mediante la enzima de restricción *Mspl*, dando el patrón de restricción esperado (Fig.13C).

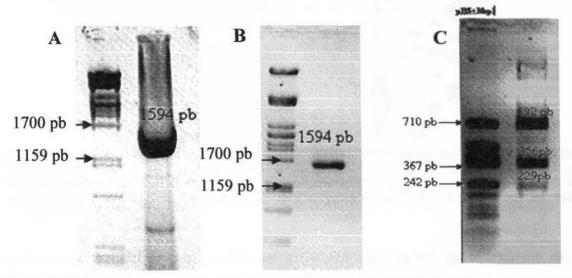


Figura 13. Aislamiento y caracterización del promotor de la anexinal. A) Aislamiento del promotor de la anexinal mediante PCR, a partir de DNA genómico de la línea celular Wnt1. B) purificación de la región promotora del gen de la anexinal a partir del gel. C) Caracterización de la región promotora de la anexinal mediante la enzima de restricción Mspl.

Una vez caracterizada la región promotora del gen de la anexinal se clonó en el vector PGEM-T easy (Promega), con lo que se obtuvo el vector pGEM-PromANXI, el cual fue caracterizado por enzimas de restricción y secuenciación (fig.14). A partir de la secuencia obtenida se realizó una búsqueda con el programa computacional BLAST del NCBI, para comprobar la identidad de la secuencia obtenida, identificando esta secuencia como el promotor de la anexinal (Fig.15).

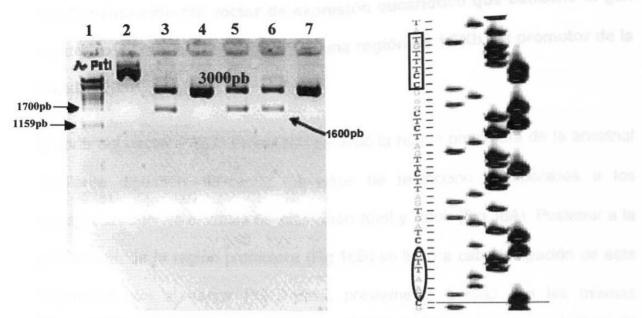


Figura 14. Caracterización de vector PGEM-PromANXI. A) Mediante la enzima de restricción EcoRI, carril 2 vector sin digerir, carriles 3,5 y 6 vectores con inserto, 4 y 7 vectores sin inserto, el inserto es de aproximadamente 1600pb. B) Mediante secuenciación, en el círculo se muestra el sitio de restricción EcoRI perteneciente al vector y en el cuadro uno de los posibles sitios de interacción de los factores transcripcionales TCF/LEF.

Una vez obtenida la secuencia del promotor se realizó la búsqueda de los posibles sitios de interacción con la familia de factores transcripcionales TCF/LEF para comprobar que se encontraran los 4 sitios predichos por bioinformática, Observándose que se encontraban en la región amplificada y clonada.

> 0 91		9 qb U25159.1 RNU25159 Rattus norvegicus lipocortin gene, pro	omoter	3
Ident	= 126 ities	4 bits (637), Expect = 0.0 - 728/744 (97%), Gaps = 15/744 (2%)		
Stran	d=Plus	/Hinus		
Query	1	AAATTTTGAATAGACTCAAACCACAGAGGCAGAGTATGAATCGAGCCCCGGTGTGGTAGA	60	
Sbjet	1730	AAATTTTGAATAGACTCAAACCACAGAGGCAGAGTATGAATCGAGCCCCGGTGTGGTAGA	1671	
Query	61	AGAGTGGAACAATAAGCCATGGCCTGGACCTCTGAGCTGTAAGGATTAGTGGGATGGCAC	120	
Sbjet	1670	AGAGTGGAACAATAAGCCATGGCCTG-ACCTCTGAGCTGTAAGGATTAGTGG-ATG-CAC	1614	
Query	121	CTACCACACACAGGTGCCATCAGAAATGTCCCAGCTAATGTAAAGAAGGGAACGTCAGT	180	
Sbjet	1613	CTACCACACACAGGTGCCATCAGAAATGTCCCAGCTAATGTAAAGAAGGGAACGTCAGT	1554	
Query	181	GTGATTCACTTCATTCTTAAAAATCTTTAAAACCAAAAAAATAGTTGTAGCTCTTTTCTC	240	
Spice	1553	GTGATTCACTTCATTCTTAATAAATCTTTAAAACAAAAAATAGTTGTAGCTCTTTTCTC	1494	
Query	241	TGATGTTGCATTGTACTTTTAAAAAGTAACTATTGTTTTATTTTATGTGCATTGGT	300	
Sbjct	1493	TGATGTTGCTTGCATTGTACTTTTAAAAAGTAACTATTGTTTTATTTTATGTGCATTGGT	1434	

Figura 15. Alineamiento de la secuencia obtenida utilizando el programa BLAST. Se comprobó que la secuencia clonada es la perteneciente al promotor de la anexinal, también llamada lipocortina, con algunas diferencias sin embargo los posibles sitios de interacción con los factores transcripcionales TCF/LEF se mantuvieron intactos..

4.3 Construcción del vector de expresión eucariótico que contiene el gen reportero de luciferasa dirigido por una región de 1.6Kb del promotor de la anexinal.

A partir del vector PGEM-PromANXI se aisló la región promotora de la anexinal mediante digestión, utilizando los sitios de restricción incorporados a los iniciadores, con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI* (Fig.16A). Posterior a la purificación de la región promotora (Fig.16B) se llevó a cabo la ligación de este fragmento con al vector PGL3-Basic previamente tratado con las mismas enzimas, y defosforilado (Fig.16C).

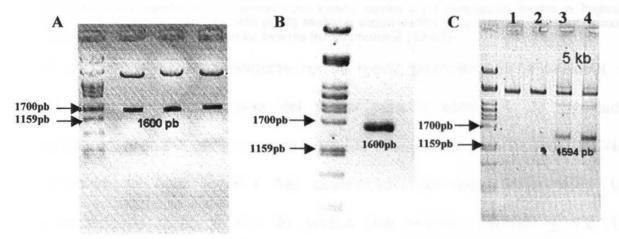


Figura 16. Construcción del vector de expresión eucariótico PGL-PromANXI. A) Reacciones de digestión del vector PGEM-PromANXI: la digestión de este vector con las enzimas de restricción KpnI y XhoI libera un fragmento de 1600pb correspondiente al promotor de la anexinal. B) Purificación del promotor de la anexinal a partir del gel de agarosa. C) Reacción de ligación del promotor de la anexinal en PGL3-Basic: Carril 1 y 2 vector sin y con ligasa respectivamente, carriles 3 y 4 reacción de ligación completa vector-promotor-T4 DNA ligasa, con diferentes concentraciones del inserto.

Posteriormente a la transformación de las reacciones de ligación, se llevó a cabo la caracterización de clonas candidatas con la enzima de restricción Sacl y por secuenciación (Fig.17). Una vez obtenida la secuencia del promotor se realizó la búsqueda de los posibles sitios de interacción con la familia de factores transcripcionales TCF/LEF para comprobar que se encontraran los 4 sitios

predichos por bioinformática, Observándose que se encontraban en la región clonada sin cambios en su secuencia.

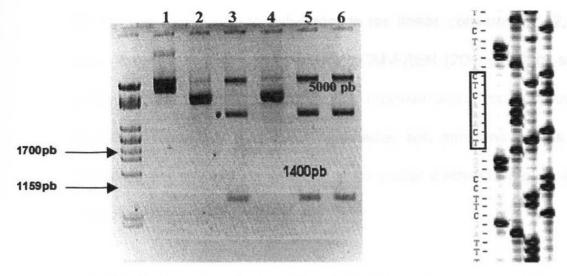


Figura 17. Caracterización de vector PGL3-PromANXI. A)Mediante la enzima de restricción Sacl, carril 1 vector sin digerir, carriles 3,5 y 6 vectores con inserto, carriles 2 y 4 vectores sin inserto, el fragmento liberado es de aproximadamente 1400 pb. B) Mediante secuenciación, en el recuadro se observa uno de los posibles sitos de interacción con los factores transcripcionales TCF/LEF.

Al contar con clonas candidatas con la región promotora de la anexinal, se realizaron medianas escalas del vector para la obtención de cantidades suficientes y la calidad necesaria para los ensayos de transfección. El DNAp obtenido de esta manera fue cuantificado por espectrofotometría UV, estableciendo como criterio de pureza una relación 260/280 ≤ 1.8. Los resultados de la cuantificación para este vector fue la siguiente: 70 ng/μl y una relación 260/280 de 1.4.

4.4 Ensayos de transfección para la región promotora de la anexinal.

A) pCMV-LUC.

En los ensayos de co-transfección de las líneas celulares PC12, Wnt1, HB+ y HB- con los vectores pCMV-LUC/ pCMV-REN (200ng/ 40ng) se encontraron altos niveles relativos de luciferasa (normalizando con los niveles del gen reportero Renilla) y que estos resultados son similares en las cuatro líneas celulares del modelo de estudio, y no existe diferencia significativa (p> 0.05) entre las líneas celulares (Fig.18).

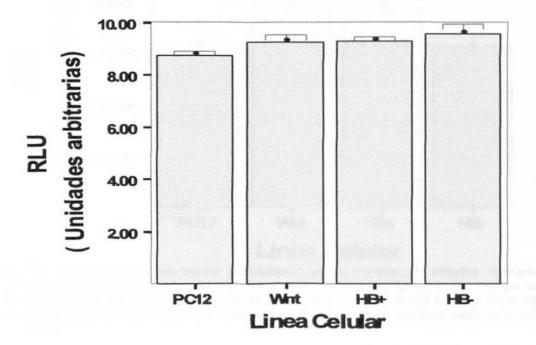


Figura 18. Transfecciones del vector pCMV-LUC en el modelo de estudio. A) Representación esquemática de los resultados de transfección con el vector pCMV-LUC, donde se observa que no existe diferencia significativa (p>0.05) en la expresión del gen reportero de la luciferasa entre las líneas celulares. Resultados de dos ensayos independientes realizados por triplicado (RLU Unidades relativas de luciferasa, estas unidades se obtienen de la relación de los valores de la luciferasa entre los valores de la renilla; NA, no aplica)

B) pGL3-Basic.

En los ensayos de co-transfección de las líneas celulares PC12, Wnt1, HB+ y HB- con los vectores pGL3-Basic / pCMV-REN (200ng / 40ng) se encontraron bajos niveles relativos de luciferasa (normalizando con los niveles del gen reportero Renilla) y estos mismos son similares en las cuatro líneas celulares del modelo de estudio, y no existe una diferencia significativa entre las líneas celulares (Fig.19).

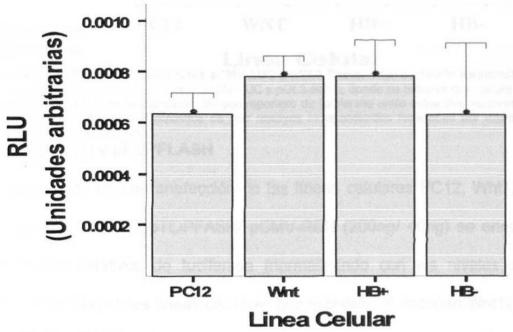


Figura 19. Transfecciones del vector pGL3-Basic en el modelo de estudio. Representación esquemática de los resultados de transfección con el vector pGL3-Basic, donde se observa que no existe diferencia significativa (p>0.05) en la expresión del gen reportero de la luciferasa entre las líneas celulares. Resultados de dos ensayos independientes realizados por triplicado (RLU Unidades relativas de luciferasa; NA, no aplica)

Al integrar los resultados obtenidos entre los vectores pCMV-LUC y PGL3 Basic se encuentra una diferencia estadísticamente significativa, entre estos vectores en las 4 líneas celulares del modelo de experimentación (Fig.20).

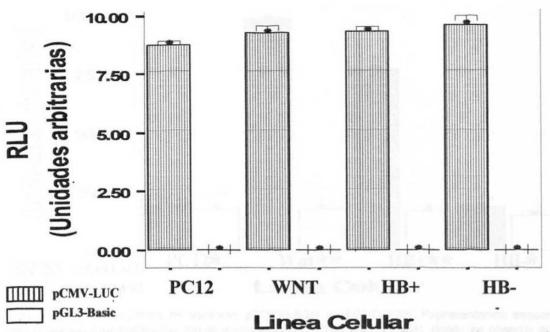


Figura 20. Transfecciones de vectores pCMV-LUC y pGL3-Basic. Representación esquemática de los resultados de transfección con el vector pCMV-LUC y pGL3-Basic, donde se observa que existe diferencia significativa (p<0.0001) en la expresión del gen reportero de luciferasa entre estos dos vectores, en cada una de las líneas celulares. Resultados de dos ensayos independientes realizados por triplicado (RLU Unidades relativas de luciferasa)

C) pTOPFLASH y pFOPFLASH

En los ensayos de co-transfección de las líneas celulares PC12, Wnt1, HB+ y HB- con los vectores pTOPFASH/ pCMV-REN (200ng/ 40ng) se encontraron altos niveles relativos de luciferasa (normalizando con los niveles del gen reportero Renilla) en las líneas celulares que expresan el oncogen Wnt1y niveles bajos relativos de luciferasa en aquellas líneas celulares que no expresan el oncogen Wnt1 y existe diferencia significativa (p<0.001) entre las mismas (Fig.15). En los ensayos de co-transfección de las líneas celulares PC12, Wnt1, HB+ y HB- con los vectores pFOPFASH/ pCMV-REN (200ng/ 40ng) se encontraron niveles similares del gen reportero de la luciferasa (Fig.21). Por lo que con estos resultados comprobamos que las líneas celulares que expresan el oncogen Wnt1 tienen los efectores necesarios para activar los genes blancos de la vía de señalización Wnt/ β-catenina.

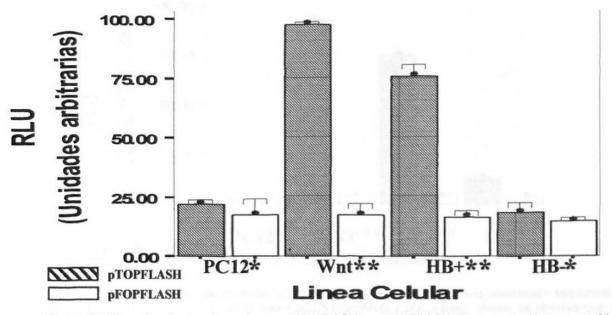


Figura 21. Transfecciones de vectores pTOPFLASH y pFOPFLASH. Representación esquemática de los resultados de transfección con el vector pTOPFLASH y pFOPFLASH, donde se observa que existe diferencia significativa (p<0.001) en la expresión del gen reportero de luciferasa del vector pTOPFLASH entre las líneas celulares que expresan el oncogen (**) y las líneas celulares que no lo expresan (*). En el vector pFOPFLASH no hay diferencia significativa en las líneas celulares del modelo de estudio (p>0.05). Resultados de dos ensayos independientes realizados por triplicado (RLU Unidades relativas de luciferasa)

D) pGL3-PromANXI

En los ensayos de co-transfección de las líneas celulares PC12, Wnt1, HB+ y HB- con los vectores pGL3-PromANXI/ pCMV-REN (200ng/ 40ng) se encontraron altos niveles relativos de luciferasa en las líneas celulares que expresan el oncogen Wnt1 (normalizando con los niveles del gen reportero Renilla) y bajos niveles relativos de luciferasa en las líneas celulares que no expresan el oncogen Wnt1, los resultados en la línea celular Wnt1 demuestran un aumento de 22 veces comparando con el vector pGL3-Basic; en la línea celular HB+ se observa un aumento de 20 veces con respecto al vector pGL3-Basic, y solo un aumento de 2 veces en la línea celular HB-, con lo que se demuestra una activación del gen reportero de luciferasa de esta construcción en función de la activación de la vía canónica Wnt1, por lo que este gen podría ser un blanco potencial de esta vía (Fig.22).

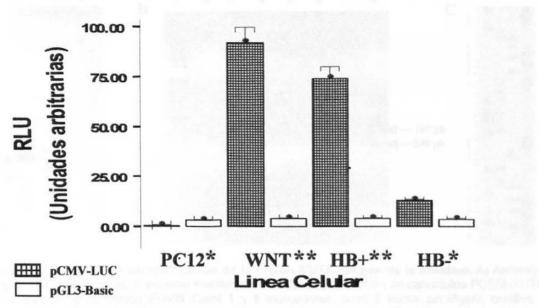


Figura 22. Transfecciones de vectores pGL3-PromANXI y pGL3-Basic. Representación esquemática de los resultados de transfección con el vector pGL3-PromANXI y pGL3-Basic, donde se observa que existe diferencia significativa en la expresión del gen reportero de luciferasa del vector pGL3-PromANXI entre las líneas celulares que expresan el oncogen (**) y las líneas celulares que no lo expresan (*). En el vector pGL3-Basic no existe diferencia significativa entre las líneas celulares (p>0.05). Resultados de dos ensayos independientes realizados por triplicado (RLU Unidades relativas de luciferasa)

4.5 Aislamiento de la región 3' UTR del gen de la anexinal por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Se logró aislar la región 3'UTR del gen de la anexinal mediante PCR, obteniéndose un fragmento de aproximadamente de 284 pb (Fig.23A), Una vez aislada la región 3'UTR del gen de la anexinal se clonó en el vector PGEM-T easy (Promega), con lo que se obtuvo el vector pGEM-3'UTRANXI, el cual fue caracterizado por enzimas de restricción y secuenciación (Fig.23). A partir de la secuencia obtenida se realizó una búsqueda con el programa computacional BLAST del NCBI, para comprobar la identidad de la secuencia obtenida, identificando esta secuencia como la región 3'UTR del gen de la anexinal (Fig.24)

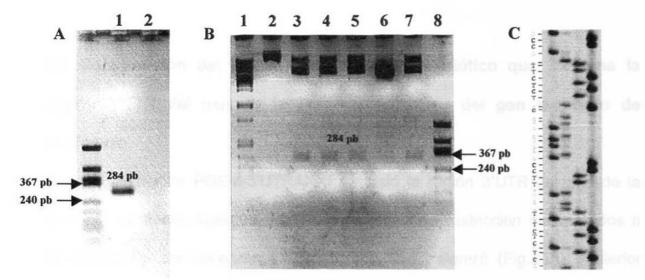


Figura 23. Aislamiento y caracterización de la región 3'UTR del gen de la anexinal. A) Aislamiento de la región 3'UTR del gen de la anexinal mediante PCR. B) Caracterización de candidatos PGEM-3'UTRANXI con la enzima de restricción *EcoRI*(Carril 1 y 8 marcadores, carril 2 vector sin digerir, carrilles 3 al 7 vectores con inserto. C) imagen del gel de secuenciación de la región 3' UTR del gen de la anexinal.

Una vez obtenida la secuencia se buscaron visualmente secuencias relacionadas con interacción con proteínas que intervienen en el metabolismo del RNAm, se identificó un posible sitio de interacción con las proteínas AUF o HUR, pero sin embargo es una región muy rica en uracilos y adeninas, que pudieran estar regulando la estabilidad de este gen.

```
>gi|6978500|ref|NE 012904.1| LES Rattus norvegicus annexin A1 (Anxal), mRNA
Length=1402
Score = 565 bits (285), Expect = 3e-158
Identities = 285/285 (100%), Gaps = 0/285 (0%)
Strand=Plus/Plus
          ACATCCCAACTGCTCTGTAAGATTCCGAGGAGAACATCTCTTAGCCGTTGTTTTCTTCCT
                                                          60
Query
          ......
                                                          1162
Sbict
     1103
          ACATCCCAACTGCTCTGTAAGATTCCGAGGAGAACATCTCTTAGCCGTTGTTTTCTTCCT
Query
          ATTGCAAGGCTTAAGTAGGAAAGTTGCTTTGTCAGTAAGTCTAATTACCTTCTTTGAATA
                                                          120
          1222
3bjct
     1163
          ATTGCAAGGCTTAAGTAGGAAAGTTGCTTTGTCAGTAAGTCTAATTACCTTCTTTGAATA
          ATGTAGCCTATAAATATGTTTTAGATCATTCATCTGTACAATAGAGAAATACTTGTTTTG
Query
     121
                                                          180
          ATGTAGCCTATAAATATGTTTTAGATCATTCATCTGTACAATAGAGAAATACTTGTTTTG
                                                          1282
3bjct
     1223
          TTAATTATGTTTATCCCAAATTATAAATCCCTGTAAGCAAGTCACTTTGGTACCATTCCT
     181
Query
          1283
          TTAATTATGTTTATCCCAAATTATAAATCCCTGTAAGCAAGTCACTTTGGTACCATTCCT
Shict
          GAGAAAGAAGTTTACATAGAATAAAATAAAACAATTTTATAAGAC
Query
     241
          1343
          GAGAAGAAGTTTACATAGAATAAAATAAAACAATTTTATAAGAC
                                              1387
Sbjct
```

Figura 24. Alineamiento de la secuencia obtenida utilizando el programa BLAST. Se comprobó que la secuencia clonada es la perteneciente a la región 3'UTR del gen de la anexinal, en el círculo se muestra la posible secuencia de interacción con proteínas relacionadas con el metabolismo del RNAm.

4.6 Construcción del vector de expresión eucariótico que contiene la región 3'UTR del gen de la anexinal río abajo del gen reportero de luciferasa

A partir del vector PGEM-3'UTRANXI se aisló la región 3'UTR del gen de la anexinal mediante digestión, utilizando los sitios de restricción incorporados a los iniciadores, con las enzimas de restricción Xbal y BamHI (Fig.25A). Posterior a la purificación de esta región se llevó a cabo la ligación de este fragmento con al vector PGL3-Basic previamente tratado con las mismas enzimas, y defosforilado (Fig.25B), posteriormente se caracterizó mediante PCR y secuenciación (Fig.25C)

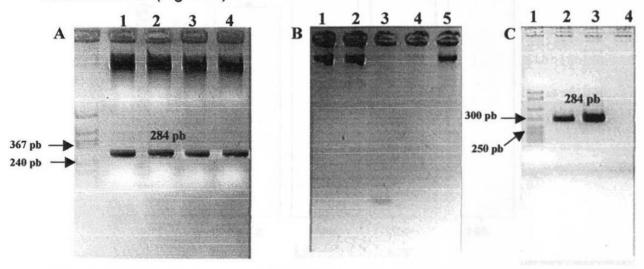


Figura 25. Construcción del vector de expresión eucariótico PGL3-3'UTRANXI. A) Reacciones de digestión del vector PGEM-3'UTRANX: la digestión de este vector con las enzimas de restricción Xbal y BamHI libera un fragmento de 284pb correspondiente a la región 3'UTR de la anexinal. B) Reacción de ligación de la región 3'UTR de la anexinal en PGL3-Basic: Carril 1 y 2 vector sin y con ligasa respectivamente, carriles 3 y 4 región 3'UTR de la anexinal sin y son ligasa respectivamente, carril 5 reacción de ligación completa vector-región 3'UTR-T4 DNA ligasa. C) Caracterización del vector construido mediante PCR donde se observan dos clonas candidatas.

4.7 Ensayos de transfección para la región 3'UTR del gen de la anexinal. A) pCMV-LUC.

En los ensayos de co-transfección de las líneas celulares PC12, Wnt1, HB+ y HB- con los vectores pCMV-LUC-3'UTRSV40/ pCMV-REN (200ng/ 40ng) se encontraron altos niveles relativos de luciferasa (normalizando con los niveles del gen reportero Renilla) y que estos resultados son similares en las cuatro líneas celulares del modelo de estudio, y no existe una diferencia significativa entre las líneas celulares (Fig.26).

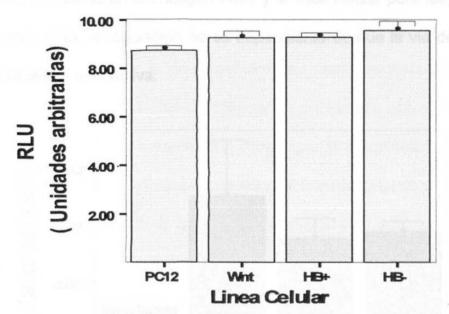


Figura 26. Transfecciones del vector pCMV-LUC-3'UTRSV40 en el modelo de estudio. Representación esquemática de los resultados de transfección con el vector pCMV-LUC, donde se observa que no existe diferencia significativa (p>0.05) en la expresión del gen reportero de la luciferasa entre las líneas celulares. Resultados de dos ensayos independientes realizados por triplicado (RLU Unidades relativas de luciferasa; NA, no aplica)

B) pGL3-3'UTRANXI

En los ensayos de co-transfección de las líneas celulares PC12, Wnt1, HB+ y HB- con los vectores pGL3-3'UTRANXI/ pCMV-REN se encontraron altos niveles relativos de luciferasa en las líneas celulares que expresan o expresaron el oncogen Wnt1 (normalizando con los niveles del gen reportero Renilla) y bajos niveles relativos de luciferasa en la línea celular parental que no expresa el oncogen Wnt1 (Fig.27), los resultados demuestran un aumento de 3 o 4 veces en la expresión del gen reportero de la luciferasa entre las líneas celulares que expresan o expresaron el oncogen Wnt1 y la línea celular parental, demostrando que a este nivel, la regulación no es dependiente de que la vía de señalización Wnt/β-catenina esté activa.

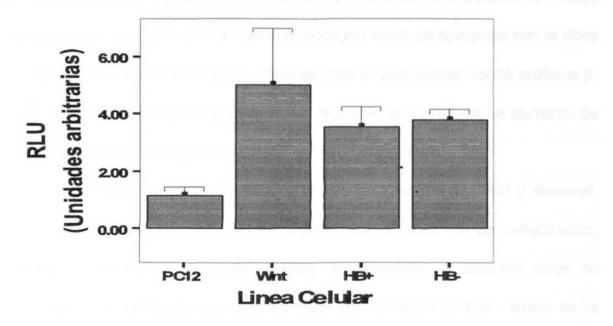


Figura 27. Transfecciones de vectores pGL3-3'UTRANXI. Representación esquemática de los resultados de transfección con el vector pGL3-3'UTRANXI , donde se observa que existe diferencia significativa (p<0.01) en la expresión del gen reportero de luciferasa entre las líneas celulares que expresan o expresaron el oncogen (**) y la línea celular parental (*). Resultados de dos ensayos independientes realizados por triplicado (RLU Unidades relativas de luciferasa)

CAPITULO V

DISCUSIÓN.

En este estudio se pudo corroborar que la expresión de Wnt1 en la línea celular PC12 incrementa los niveles del RNAm del gen de la anexinal y dichos niveles permanecen sin cambio una vez que Wnt1 deja de ser expresado (HB-). Este resultado concuerda con los resultados obtenidos por Velázquez-Vadillo, mediante microarreglos, RT-PCR semicuantitativa y northem blot (datos no publicados). Al igual que para el gen de la anexinal, los resultados coinciden con el comportamiento del gen NEU ya que los niveles del RNAm de este gen no son dependientes de que la vía de señalización Wnt/β-catenina este activa⁴². A nivel de proteína los niveles de anexinal se encuentran elevados en las líneas celulares que expresan o expresaron el oncogen Wnt1 comparando con la línea celular parental. Estos resultados coinciden con lo que sucede con la proteína β-TrCP donde la activación de la vía de señalización Wnt produce un aumento de los niveles del RNAm y de la proteína⁴³ entre muchos otros.

Los resultados demuestran una correlación en la expresión de Wnt1 y anexinal, indicando que este gen es un blanco potencial de esta vía de señalización, además de encontrar, mediante análisis bioinformático, 3 posibles sitios de interacción con la familia de factores transcripcionales TCF/LEF dentro de la secuencia del promotor de este gen, y uno más en el exon 1.

La hipótesis de que este gen es un blanco potencial de la vía Wnt, también es apoyada por los ensayos de transfección transitoria de la construcción del promotor de la anexinal dirigiendo la expresión del gen reportero de luciferasa.

en los cuales se encontró un aumento de 7 u 8 veces en la expresión del gen reportero en las líneas celulares que expresan constitutivamente el oncogen Wnt1 con respecto a aquellas que no expresan dicho oncogen. Sin embargo no solo por el aumento en la expresión del gen reportero en las líneas celulares que expresan el oncogen Wnt1 es suficiente para demostrar que es un blanco de esta vía de señalización, debido que recientemente se demostró que la regulación positiva de la ciclina D1 por la activación de la vía clásica Wnt, no se debe directamente a la interacción de los factores transcripcionales TCF/LEF, esto lo demostraron por la sobreexpresión de un miembro de esta familia de factores transcripcionales carente del dominio de unión a β-catenina, con lo que no puede ser transactivado, y no se observó una disminución en la expresión del gen reportero de luciferasa en estas condiciones, por lo que los autores concluyen que dicho gen no es un blanco directo de la vía clásica Wnt, y que el efecto es indirecto⁴⁴.

En cuanto a la participación de la región 3'UTR del gen de la anexinal sobre la regulación positiva por el oncogen Wnt1, se observó que también a este nivel es llevada a cabo, debido a que los ensayos de transfección transitoria con la construcción que contenía esta región se observó un aumento en la expresión del gen reportero en las líneas celulares que expresan o alguna vez expresaron el oncogen Wnt1 comparando con la línea celular parental. Al no encontrar más que una secuencia relacionada con la interacción con proteínas relacionadas con el metabolismo del RNAm, el estudio de esta región podría ser interesante para observar que otras proteínas están regulando la estabilidad del RNAm del

gen de la anexinal, debido a que esta zona es muy rica en uracilos y adeninas, y estas regiones están involucradas en la regulación de la localización, traducción y degradación de genes como citocinas y reguladores del ciclo celular⁴⁵, sin embargo ha sido reportado que la proteína HuR se puede unir a estas mismas secuencias y ocasiona la acumulación del RNAm de sus genes blanco⁴⁶.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES.

Los niveles de RNAm y Proteína de la anexinal son regulados positivamente por el oncogen Wnt1 en nuestro modelo de estudio.

La regulación positiva es llevada a cabo a nivel transcripcional, por lo que este gen podría ser un blanco transcripcional de la vía de señalización Wnt.

Esta regulación también es llevada a nivel post-transcripcional, y esta involucrada la región 3'UTR del gen de la anexinal.

CAPITULO VII

PERSPECTIVAS.

Los resultados de esta tesis sugieren que la anexinal podría ser un blanco de la vía de señalización Wnt, para comprobar esto, es necesario realizar cotransfecciones del vector reportero con activadores de esta vía en aquellas líneas celulares que no expresan el oncogen Wnt1 y represores de la misma en aquellas líneas que expresan el oncogen Wnt1.

Aunado a esto se tendría que realizar mutaciones en cada uno de los posibles sitios de interacción con los factores de transcripción TCF/LEF para evitar la unión de los mismos y la activación de este promotor, además de deleciones del promotor.

Para observar si en vivo se lleva a cabo la interacción entre los factores transcripcionales TCF/LEF y las secuencias contenidas en este promotor se tendría que realizar una inmunoprecipitacion de cromatina, utilizando anticuerpos contra TCF o β-catenina.

En cuanto a la región 3'UTR del gen de la anexinal se tendría que realizar ensayos de estabilidad del RNAm con actinomicinaD para observar si la regulación positiva se está realizando a este nivel. Si la regulación se llevara a cabo a este nivel, se tendría que realizar un escaneo por mutación para situar que secuencias están relacionadas con la estabilidad del RNAm.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1.-Benjamin, L. (2005) Genes VIII. Oxford University Press. N.Y.
- 2. Tijan R. (1995) Molecular machines that control genes. Sci. Am. February 38-45.
- 3.- Audic Y, Hartley RS. (2004) Post-transcriptional regulation in cancer. Biol Cell.96(7):479-98.
- 4.- Duret, L., Dorkeld, F., Gautier, C. (1993) Strong conservation of non-coding sequences during vertebrates evolution: potential involvement in posttranscriptional regulation of gene expression. Nucleic Acids Res 21, 2315–2322.
- 5.- Poyry, T.A., Kaminski, A., Jackson, R.J. (2004) What determines whether mammalian ribosomes resume scanning after translation of a short upstream open reading frame? Genes Dev 18, 62–75.
- Brown A. (2001) Wnt signaling in breast cancer: have we come full circle?
 Breast Cancer Res. 3: 351-355.
- 7. Brennan K. and Brown A. (2004) Wnt proteins in mammary development and cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia. Apr;9(2):119-31.
- 8.- Polakis P.(1999) The oncogenic activation of beta-catenin. Curr. Opin. Genet. Dev. 9: 15-21
- 9.- Polakis P.(2000) Wnt signaling and Cancer. Genes Dev. 14: 1837-1851.
- 10.- Logan C., Nusse R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. Anu. Rev. Cell Dev. Biol. 20: 781-810.

- 11 Kikuchi a., Kishida S., Yamamoto H. (2006) Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. Exp Mol Med. Feb 28;38(1):1-10.
- 12.- Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW.(1997) Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. J Biol Chem. Oct 3;272(40):24735-8.
- 13.- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R.(1997) Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. EMBO J. 1997 Jul 1;16(13):3797-804.
- 14.- Nelson WJ, Nusse R. (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. Science. Mar 5;303(5663):1483-7.
- 15.- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R.(2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. Nature.May 22;423(6938):448-52.
- 16.- Lustig B, Behrens J. (2003) The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. J Cancer Res Clin Oncol. Apr;129(4):199-221
- 17.- Waterman ML. (2004) Lymphoid enhancer factor/T cell factor expression in colorectal cancer. Cancer Metastasis Rev.Jan-Jun;23(1-2):41-52.
- 18.- Roose J, Clevers H (1999) TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. Biochim Biophys Acta. 1999 Oct 29;1424(2-3):M23-37 19.- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. Science. Sep 4;281(5382):1509-12.

- 20.- Tetsu O, McCormick F. (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. Nature. 1999 Apr 1;398(6726):422-6.
- 21.- Nusse R. (1999) Wnt targets. Repression and activation. Trends Genet. 1999 Jan;15(1):1-3.
- 22.- Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, Ishiguro H, Fujita M, Tokino T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Yamaoka Y, Nakamura Y.(2000) AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. Nat Genet. Mar;24(3):245-50.
- 23.- Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. Cell. Jan 7;100(1):57-70.
- 24.- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 96(10):5522-7.
- 25.- Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM. (1999) The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. Oncogene. 18(18):2883-91.
- 26.- Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. (2001) Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. Cancer Res. 61(16):6050-4.
- 27.- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. Science. 281(5382):1509-12.

- 28.- Yang F, Zeng Q, Yu G, Li S, Wang CY. (2006) Wnt/beta-catenin signaling inhibits death receptor-mediated apoptosis and promotes invasive growth of HNSCC. Cell Signal. 18(5):679-87.
- 29.- Marie JP. (2001) Drug resistance in hematologic malignancies. Curr Opin Oncol 13:463-469.
- 30.- Pommier Y, Sordet O, Antony S, Hayward RL, Kohn KW (2004) Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks.

 Oncogene 23: 2934-2949.
- 31.- Rickardson L, Fryknas M, Dhar S, Lovborg H, Gullbo J, Rydaker M, Nygren P, Gustafsson MG, Larsson R, Isaksson A. (2005) Identification of molecular mechanisms for cellular drug resistance by combining drug activity and gene expression profiles. Br J Cancer. Aug 22; 93(4):483-92
- 32.- Nygren P. (2001) What is cancer chemotherapy? Ada Oncol 40: 166-174
- 33.- Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. Toxicol Appl Pharmacol. 2005 May 1;204(3):216-37.
- 34. Parente L, Solito E. (2004) Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein.InflammRes.Apr;53(4):125-32.
- 35. Raynal P, Pollard HB. (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. Biochim Biophys Acta. Apr 5;1197(1):63-93.
- 36.- Gerke V, Moss SE. (2002) Annexins: from structure to function Physiol Rev. Apr;82(2):331-71.

- 37.- Wang Y, Serfass L, Roy MO, Wong J, Bonneau AM, Georges E. (2004)
 Annexin-I expression modulates drug resistance in tumor cells. Biochem Biophys
 Res Commun. 2004 Feb 6;314(2):565-70.
- 38.- Greene LA, Tischler AS. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A.73(7):2424-8.
- 39.- Shackleford GM, Willert K, Wang J, Varmus HE.(1993) The Wnt-1 protooncogene induces changes in morphology, gene expression, and growth factor responsiveness in PC12 cells. Neuron.11(5):865-75
- 40.- Bradley RS, Cowin P, Brown AM (1993) Expression of Wnt-1 in PC12 cells results in modulation of plakoglobin and E-cadherin and increased cellular adhesion. J Cell Biol.123(6 Pt 2):1857-65
- 41.- V. Korinek, N. Barker, P.J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K.W. Kinzler, B. Vogelstein and H. Clevers (1997) Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. Science 275 1784–1787
- 42.- Zheng S, Ramachandran B, Haigh JR, Palos TP, Steger K, Howard BD. The induction of ret by Wnt-1 in PC12 cells is atypically dependent on continual Wnt-1 expression. Oncogene 12(3): 555-562.
- 43.- Spiegelman VS, Slaga TJ, Pagano M, Minamoto T, Ronai Z, Fuchs SY. (2000) Wnt/beta-catenin signaling induces the expression and activity of betaTrCP ubiquitin ligase receptor. Mol Cell. 5(5):877-82

- 44.- Sansom OJ, Reed KR, van de Wetering M, Muncan V, Winton DJ, Clevers H, Clarke AR.(2005) Cyclin D1 is not an immediate target of beta-catenin following Apc loss in the intestine. J Biol Chem. 280(31):28463-7.
- 45.- Audic Y, Hartley RS.(2004) Post-transcriptional regulation in cancer. Biol Cell. 96(7):479-98
- 46.- Shim J, Karin M (2002) The control of mRNA stability in response to extracellular stimuli. Mol Cells. 14(3):323-31

ANEXOS.

PROTOCOLO PARIS.

- 1.- Colectar 10⁶ células y lavarlas con PBS 1X frio.
- 2.- Lisar las células en 500 µl de Cell Disrption Buffer
- 3.- Dividir el lisado para la extracción de RNA total y proteínas totales
- 4.- Para la extracción de proteínas totales :
- a) Incubar en hielo por 10 min.
- b) Centrifugar a 10,000 g a 4°C para darificar la muestra.
- 5.- para la extracción del RNA total:
- a) Mezcla el lisado son un volumen de 2X Lysis/Binding Solution
- b) Agrega un volumen de etanol al 100%
- c) Aplicar la mezcla en la columna ensamblada en el tubo colector
- d) Centrifugar a 14,000 rpm por 2 minutos
- e) Descartar la solución contenida en el tubo colector
- f) Lavar una vez con 700µl de Wash Solution 1
- g) Realizar 2 lavados con 500 µl de Wash Solution 2/3
- h) Eluir el RNA con 50µl a 95°C de Elution Solution
- i) Almacenar el RNA a -80°C

PROTOCOLO DE RETROTRANSCRIPCIÓN.

- 1.- Agregar 1 µl de oligo (dT) a 1µg de RNA total y calentar a 70°C
- 2.- Incubar en hielo y adicionar la siguiente mezcla:

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

- 3.- Mezclar por pipeteo e incubar a 42°C por 1 hora
- 4.-Calentar a 95°C por 5 minutos
- 5.- Adicionar 80µl de H₂O DEPC.
- 6.- Almacenar a -20°C

CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS MÉTODO DE BRADFORD MICROENSAYO (1 ml)

- Preparar en agua estéril una solución stock de Albúmina Sérica Bovina (BSA) a una concentración de 100 mg/ml.
- Hacer una dilución de 1:50 del stock de 100 mg/ml, para que quede a una concentración final de 2 mg/ml ó 2 μg/μl.
- Preparar directamente en las celdas de plástico los siguientes estándares empleando el stock diluido de BSA:

Estándar	μl del estándar de 2 mg/ ml	μl del agua	Concentración μg/μΙ
1	0	800	0
2	1	799	2
3	2.5	797.5	5
4	5	795	10
5	7.5	792.5	15

- Adicionar 200 μl del reactivo de Bradford concentrado a cada celda y mezclar.
- 5. Incubar las celdas a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las absorbancias aumentan con el tiempo de incubación, por lo que <u>no</u> se recomienda incubar las muestras por más de una hora.
- 6. Medir absorbancia a 595 nm en el biofotómetro (Eppendorf).

ELECTROFORÉSIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

- Ensamblar el cassette del gel conforme a las especificaciones de la compañía BIO-RAD (Mini-Protean 3 Cell).
- Preparar la solución del gel separador a una concentración del 12% de acrilamida.
- Aplicar con una pipeta serológica 4.5 ml de la solución del gel separador al vidrio que contiene el separador de 1 mm,
- Preparar la solución del gel concentrador al 4 %, vaciarlo hasta el límite del vidrio e inmediatamente colocar el peine.
- Colocar el gel en la cámara de corrimiento y ensamblarlo para después añadir el buffer de corrida 1X.
- Retirar el peine y lavar los pocillos con buffer para eliminar la acrilamida que no haya polimerizado.
- 7. Cargar las muestras que previamente deben ser mezcladas con buffer de desnaturalización en una relación 1:1, y calentarlas a 95°C por 4 minutos.
- 8. Correr el gel a 100V por 2 horas.
- 9. Realizar la tinción del gel separador con azul de coomassie

TRANSFERENCIA DEL GEL A LA MEMBRANA

- 1. Recortar la membrana de nitrocelulosa con las dimensiones del gel
- Equilibrar la membrana con buffer de transferencia 1X durante 5 minutos.
 Colocar también en el buffer de transferencia dos piezas de papel filtro.
- 3. Remover y descartar el gel concentrador (stacking gel).
- Colocar sobre el gel un papel filtro húmedo y despegar el gel del vidrio.
 Colocarlo sobre la esponja del set de transferencia.
- 5. Armar el sándwich colocando sobre el gel la membrana previamente equilibrada. Evitar la formación de burbujas.
- 6. Colocar un papel filtro humedecido sobre la membrana, y enseguida colocar la otra esponja.
- 7. Transferir a 4°C a 100V durante 1.5 horas.

WESTERN BLOT

- Después de la transferencia teñir la membrana con el reactivo rojo de Ponceau durante 5 minutos
- 2. Enjuagar la membrana teñida 3 veces con buffer PBS-T 1X,
- Sumergir la membrana en el buffer de bloqueo (Santa Cruz Biotech) a 4°C toda la noche con agitación.
- Posteriormente, lavar la membrana 2 veces con PBST 1X por 10 minutos cada uno de los lavados a temperatura ambiente.
- 5. Incubar la membrana con el anticuerpo primario en una dilución de 1:125 para la anexinal y 1:1000 para la β-actina, por una hora a temperatura ambiente.
- 6. Lavar la membrana 5 veces con el buffer PBS-T 1X por 10 minutos cada una y a temperatura ambiente.
- Incubar la membrana con el anticuerpo secundario (1:1000) por 1h a temperatura ambiente.
- Lavar la membrana 5 veces con el buffer PBS-T 1X por 10 minutos cada una y a temperatura ambiente.
- 9. Al terminar los lavados preparar el material necesario para efectuar el desarrollo de Quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotech).

PROTOCOLO DEL KIT WIZARD SV-GEL AND PCR CLEAN-UP SYSTEM.

- 1.- Cortar la banda de interés procurando exponer el menor tiempo posible el DNA a la luz UV
- 2.- Pesar exactamente el fragmento de agarosa que se corto del gel
- 3.- Agregar 1 µl de Membrane Binding Solution por cada mg de agarosa
- 4.- mezclar vigorosamente e incubar a 65°C por 10 minutos
- 5.- Transferir la mezcla a una columna ensamblada a su tubo colector
- 6.- Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente
- 7- Centrifugar a 14,000 rpm por 1 minuto
- 8.- Descartar el liquido colectado y agregar 700µl de Membrane Wash Solution
- 9.- Centrifugar a 14,000 rpm por 1 minuto
- 10.- Descartar el liquido colectado y agregar 500µl de Membrane Wash Solution
- 11.- Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos
- 12.- Transferir la columna a un tubo limpio
- 13.-Eluir con 50 μl de H₂O libre de nucleasas, incubar 1 minuto a temperatura ambiente
- 14.- Centrifugar a 14,000 rpm por 1 minuto
- 15.- Almacenar el DNA a 4°C

CLONACIÓN EN PGEMT-EASY.

1.- Realizar la mezcla siguiente:

Reactivo	Reacción	Control positivo	Control de fondo
2x Rapid Ligation Buffer	5 μΙ	الإ 5	5 µl
pGEMT-Easy Vector	1µl	1µl	1µI
Producto de PCR	ΧμΙ		
Inserto de DNA control		2µl	
T4 DNA ligasa	1µl	1µl	1µl
Volumen total	10 μΙ	10 µl	10 µl

- 2.- Mezclar las reacciones por pipeteo.
- 3.- Incubar 1 hr a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche.
- 4.- Transformar células calciocompetentes

REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN.

1.- Preparar la siguiente mezcla de reacción por cada muestra:

Reactivo	Volumen (μl)
H₂O	21.0
Buffer de reacción	1.5
Iniciador 5' 0 3' (20µM)	2.0
Thermo-sequenase (4U/µI)	0.5
DNAp (0.5μg/μl)	2.0
Volumen Total	27.0

- 2.- Etiquetar 4 tubos con las letras G, A, T y C. A cada tubo adicionar 6.75µl de la mezcla de reacción.
- 3.- Agregar a cada tubo 1.2µl de la mezcla de terminadores correspondiente.
- 4.- Realizar el siguiente programa de amplificación:

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
94°C	5 minutos	<u> </u>
94°C	30 segundos	
62°C	30 segundos	30 ciclos
72°C	1 minuto	
72°C	5 minutos	

- 5.- Agregar a cada tubo de reacción 1.0µl de acetato de sodio 3M pH5.2 y 1.0µl de Vivid Violet y 20µl de etanol al 100%.
- 6.- Mezclar e incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
- 7.- Centrifugar a 14,000 rpm por 15 minutos
- 8.- Retirar el sobrenadante y lavar la pastilla 2 veces con 100µl de etanol al 70%
- 9.- Retirar el exceso de etanol al 70% y secar por calentamiento a 80°C por 5 minutos
- 10.- Resuspender la pastilla con 3µl de solución STOP.

PROTOCOLO DE TRANSFECCIÓN (TRANSFAST)

- 1.- Agregar 200µl de medio de cultivo a 37°C por cada muestra a transfectar a un tubo estéril.
- 2.- Agregar 240 ng de DNAp al medio de cultivo.
- 3.- Agregar 2µl del reactivo Transfast a la mezcla anterior e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- 4.- Remover el medio de cultivo de las células.
- 5.- Agregar 200µl de la mezcla a cada pozo con 10⁶ células.
- 6.- Incubar a 37°C por 1 hora.
- 7.- Agregar 1 ml de medio de cultivo completo e incubar por 48 horas.
- 8.- Checar la eficiencia de transfección.

PROTOCOLO DEL KIT DUAL LUCIFERASE REPORTER ASSAY.

- 1.- Retirar el medio de cultivo y lavar 2 veces con PBS 1X
- 2.- Agregar 200µl de PLB 1X (Buffer de Lisis) e incubar con agitación por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Agregar a cada pozo de una placa de 96 pozos 100µl de LARII (substrato de la enzima luciferasa) y 20µl del lisado obtenido, mezclar por pipeteo
- 4.- Medir la actividad de luciferasa en el luminómetro
- 5.- Agregar 100µl del reactivo Stop & Glo (para detener actividad de la luciferasa y substrato de la enzima renilla) y mezclar por pipeteo
- 6.- Medir la actividad de Renilla en el luminómetro

ADQU ADQU

.



