

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EL ONCOGEN WNT1 Y LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS AUF1
EN CÉLULAS PC12**

Por

M.C. IVAN ALBERTO MARINO MARTÍNEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS
con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Agosto, 2009

ÍNDICE

	Pag.
Índice	
Lista de Figuras	
Lista de tablas	
Abreviaturas	
Resumen	
Capítulo I. Introducción	1
1.1 Introducción general	1
1.2 Vía de señalización Wnt	2
1.3 Vía de señalización wnt/ β -catenina y cáncer	3
1.4 Degradación de ARNm mediado por elementos ricos en A y U	4
1.5 Los miembros de la familia AUF1	5
1.6 Mecanismos de regulación de la función de AUF1	6
Capítulo II. Objetivos	8
2.1 Objetivo general	8
2.1.1 Objetivos particulares	8
Capítulo III. Materiales y Métodos	9
3.1 Área de trabajo	9
3.2 Reactivos	9
3.3 Equipo	10
3.4 Ácidos nucleicos	11
3.4.1 Oligonucleótidos	11
3.4.2 Vectores	12
3.4.2.1 Vector pGEM-T Easy	12
3.4.2.2 Vector pCDNA3-Myc	13
3.4.2.3 Vectores pGEX-4T-AUF1	13
3.4.2.4 Vector pSG5-HA	15
3.4.2.5 Vectores pSG5-HA-rAUF1	15
3.4.2.6 Vectores pCMV-Myc-rAUF1	17
3.5 Modelo celular	18
3.5.1 Línea celular PC12	18
3.5.2 Línea celular PC12/Wnt1+	18
3.5.3 Línea celular PC12/HB+	18
3.5.4 Línea celular PC12/HB-	18

3.6 Metodología	Pag. 19
3.6.1 Estrategia para la construcción de los vectores pSG5-HA-p37rAUF1, pSG5-HA-p40rAUF1 y pSG5-HA-p42rAUF1	19
3.6.2 Estrategia para la construcción de los vectores pCMV-Myc-AUF1	20
3.6.3 Estrategia para la construcción de los vectores pGEX4T-1-AUF1	21
3.6.3.1 Inducción de pGEX4T-1-p45rAUF1, pGEX4T-1-p37hAUF1, pGEX4T-1-p45hAUF1 y pGEX4T-1	22
3.6.4 Validación de los anticuerpos T10, G10 y AB995	23
3.6.5 Aislamiento de ARN total	24
3.6.6 Síntesis del ADNc a partir del ARN total	24
3.6.7 Obtención de los extractos proteicos	24
3.6.8 Amplificación del marco de lectura completo de AUF1, a partir de ADNc de células PC12 y de las secuencias clonadas en los vectores pSG5HA-rAUF1.	25
3.6.9 Análisis del efecto de la expresión de Wnt1 sobre la distribución núcleo-citoplasma de AUF1 mediante Western Blot,	27
Capítulo IV. Resultados	28
4.1 Construcción de los vectores pSG5-HA-p37rAUF1, pSG5-HA-p40rAUF1 y pSG5-HA-p42rAUF1	28
4.2 Construcción de los vectores pCMV-Myc-AUF1	29
4.3 Construcción de los vectores pGEX4T-1-rAUF1	30
4.3.1 Producción de GST-AUF1 en <i>E. coli</i> Top10F'	31
4.4 Validación de la funcionalidad de anticuerpos Anti-AUF1	32
4.5 Validación del modelo celular	34
4.6 El elevado contenido de G y C en la secuencia de los exones 1 y 2 del marco de lectura de AUF1 provoca deleciones que se generan durante la amplificación por PCR	34
4.7 Las proteínas AUF1 se expresan en bajos niveles en las líneas celulares PC12	36
Capítulo V. Discusión y conclusiones	38
5.1 Origen de las secuencias "aberrantes"	39
5.2 Las proteínas de AUF1 se expresan en bajos niveles en células PC12 y aparentemente no sufren cambios en su distribución núcleo-citoplasma por la activación constitutiva de la vía clásica de Wnt	41
Anexo I	
Anexo II	
Referencias bibliográficas	

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Vía de señalización clásica de Wnt.	3
Figura 2. Degradación de ARNm mediada por ARE's.	5
Figura 3. Representación esquemática de las isoformas de AUF1.	6
Figura 4. Mapa del vector T, pGEM-T Easy.	12
Figura 5. Vector pcDNA3-Myc.	13
Figura 6. Vectores pGEX-4T-AUF1.	14
Figura 7. Vector de expresión procariota pSG5-HA.	15
Figura 8. Vectores pSG5-HA-rAUF1.	16
Figura 9. Mapa de las construcciones pCMV-Myc-rAUF1.	17
Figura 10. Líneas celulares PC12, PC12-Wnt1+, PC12-HB+ y PC12-HB-.	19
Figura 11. Estrategias para generar los vectores pSG5-HA-p37rAUF1, pSG5-HA-p40rAUF1 y pSG5-HA-p42rAUF1.	20
Figura 12. Estrategia para construir los vectores pCMV-Myc-rAUF1.	21
Figura 13. Estrategia para la construcción de los vectores pGEX4T-AUF1.	22
Figura 14. Construcción de pSG5-HA-p37rAUF1.	28
Figura 15. Construcción de los vectores pSG5HA-p40rAUF1 y pSG5HA-p42rAUF1.	29
Figura 16. Generación de los vectores pCMV-Myc-AUF1.	30
Figura 17. Construcción de los vectores PGX4T1-AUF1.	31
Figura 18. Producción de GST, GST-p45rAUF1, GST-p37hAUF1 y GST-p45hAUF1 en <i>E. coli</i> Top10F'.	32
Figura 19. Validación de la funcionalidad de anticuerpos Anti-AUF1.	33
Figura 20. Expresión de wnt1 en células PC12.	34
Figura 21. Representación esquemática del contenido de GC en el marco de lectura de AUF1.	35
Figura 22. Las secuencias aberrantes de AUF1 corresponden a artefactos generados durante la PCR.	35
Figura 23. Secuencias ricas GC en el ORF de AUF1 genera errores durante la PCR.	36
Figura 24. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, de extractos citoplásmicos (20µg) y nucleares (5µg).	37
Figura 25. Western Blot contra AUF1 en compartimentos citoplásmicos y nucleares.	37
Figura 26. Modelo que explica la formación de secuencias "aberrantes" durante la amplificación del marco de lectura de AUF1.	40

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla I. Lista de oligonucleótidos.	11
Tabla II. Valores de DO ₆₀₀ de las muestras de inducción de p45rAUF1, p37hAUF1 y p45hAUF1 y cálculo de volúmenes equivalentes.	23

ABREVIATURAS

TERMINO	SIGNIFICADO
ORF	Marco de lectura abierto (Open Reading Frame)
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico codificante
ARN	Acido Ribonucleico
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
ARE	Elemento rico en Adeninas y Uracilos (A+U-Rich Element)
N-terminal	Extremo amino-terminal de una proteína
C-terminal	Extremo Carboxilo-terminal de una proteína
ARE	Elemento Rico en A y U (AU-rich element)
ABP	Proteína de unión a AREs (ARE's Binding Protein)
RT-PCR	Retro transcripción – Reacción en cadena de la polimerasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
H₂O NF	Agua libre de nucleasas (Water Nuclease Free)
Pb	Pares de Bases

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción general

El control de la expresión génica se da a nivel de transcripción y post-transcripción, a través de una serie de mecanismos diferentes. El equilibrio entre los mecanismos de síntesis y degradación del ARNm es el responsable del patrón final de expresión de un gen. A nivel post-transcripcional, pasos como la poliadenilación, el procesamiento, transporte al citoplasma y degradación de ARNm surgen como pasos clave en el control de la expresión. Dado que un ARNm puede ser traducido por los ribosomas en repetidas ocasiones antes de ser degradado en el citoplasma, los mecanismos que determinan su tiempo de vida media ($t_{1/2}$) juegan un rol importante en mantener niveles controlados de expresión.

Uno de los mecanismos que determinan el tiempo de vida media del ARNm es la denominada “Vía de “degradación de ARNm mediada por elementos ricos en Adeninas y Uracilos” (AMD por sus siglas en inglés). Los elementos ricos en A y U (ARE por sus siglas en inglés) son secuencias que se caracterizan por presentar repeticiones continuas o dispersas del pentanucleótido “AUUUA” dentro de su región 3’ no traducible (3’UTR) y actúan como elementos en *Cis* a los cuales se unen proteínas específicas. Las denominadas “proteínas de unión a ARE” (ABP) como KSRP, TTP, BRF1, HuR y AUF1 son elementos que actúan en *Trans*, que se unen a secuencias ARE modulando diferencialmente la estabilidad de ARN mensajeros que contienen secuencias ARE en su región 3’UTR. Mientras que la unión de HuR a secuencias ARE se relaciona con un aumento en la estabilidad del ARNm, la unión de KSRP, TTP y BRF1 se asocia con una disminución en la estabilidad del ARNm. En el caso de AUF1 algunos autores reportan que su unión a ARE, tiene un efecto dual sobre la estabilidad del ARNm y que depende del contexto celular, del perfil de expresión de AUF1 y de la presencia de secuencias determinantes en su región 3’UTR. (1-7)

Citocinas y oncoproteínas de la familia de los conocidos como “genes de respuesta temprana” se expresan en respuesta a estímulos extracelulares y su ARNm que normalmente es altamente lábil se estabiliza transitoriamente permitiéndoles alcanzar niveles elevados estables en un corto tiempo. Una característica en común que comparten los ARN mensajeros de vida corta es que contienen elementos ARE en su región 3’UTR. La elevada actividad transcripcional que presentan los “Genes de respuesta temprana” después del estímulo extracelular se complementa con la estabilización transitoria de su ARNm a través de modular la expresión, distribución núcleo-citoplasma y modificaciones postraduccionales de las proteínas de unión a ARE (ABP).

Briata y cols. (2003) reportaron que la activación de la vía canónica de Wnt/ β -catenina modificaba los niveles citoplasmáticos de las ABP, favoreciendo la presencia de HuR sobre los niveles de KSRP, TTP y BRF1. El efecto obtenido era la estabilización de ARN mensajeros que poseían secuencias ARE en su región 3'UTR. (8)

Gherzi y cols. (2007) reportaron que el ARNm del principal efector de la vía canónica de Wnt, la β -catenina, posee un elemento desestabilizador en su región 3'UTR y que el principal determinante de la estabilidad de β -catenina es KSRP. El ARNm de β -catenina es estabilizado cuando se activa la vía canónica de Wnt y la vía de PI3K-AKT. Bajo estas circunstancias, KSRP es fosforilado por AKT en un único residuo de serina, favoreciendo su interacción con la proteína adaptadora 14-3-3, impidiendo la interacción entre KSRP y el exosoma (9,10). De manera interesante, la proteína 14-3-3 sigma es además una proteína que une a AUF1 y dicha unión facilita el transporte de AUF1, favoreciendo la degradación de ARNm en el citoplasma (11). En este trabajo pretendimos dilucidar el posible efecto de la activación de la vía de señalización canónica de Wnt sobre la expresión y localización subcelular de las proteínas AUF1.

1.2 Vía de señalización Wnt

Los miembros de la familia de proteínas Wnt, son un grupo de glicoproteínas, las cuales activan diferencialmente tres vías independientes: la vía canónica de Wnt/ β -catenina, la vía de Wnt dependiente de Ca^{2+} y la vía de polaridad celular planar.

La vía canónica de Wnt/ β -catenina (**Figura 1**) es activada solo por algunos de los miembros de la familia wnt como lo es Wnt1. La unión de Wnt a su receptor transmembranal Frizzled (Fzl) activa la vía clásica de Wnt a través de la inactivación de un complejo formado por GSK3beta, APC y Axina, el cual es responsable de la fosforilación de β -catenina para su destrucción vía proteosoma en el citoplasma. La unión extracelular de wnt a su receptor frizzled provoca la inhibición de GSK3beta lo que impide la fosforilación de β -catenina y genera su acumulación en citoplasma y su posterior traslocación al núcleo en donde β -catenina interactúa con miembros de la familia de factores de transcripción Tcf/Lef (T cell factor/ Lymphoid enhancer factor). El complejo transcripcional entre β -catenina -Tcf/Lef dirige la transcripción de genes específicos cuyos promotores presentan sitios que responden al complejo transcripcional. Genes blanco de la vía clásica Wnt como c-myc, c-fos y ciclina-D1, son bien reconocidos por su participación en procesos como la proliferación celular y control del ciclo celular. (12-16)

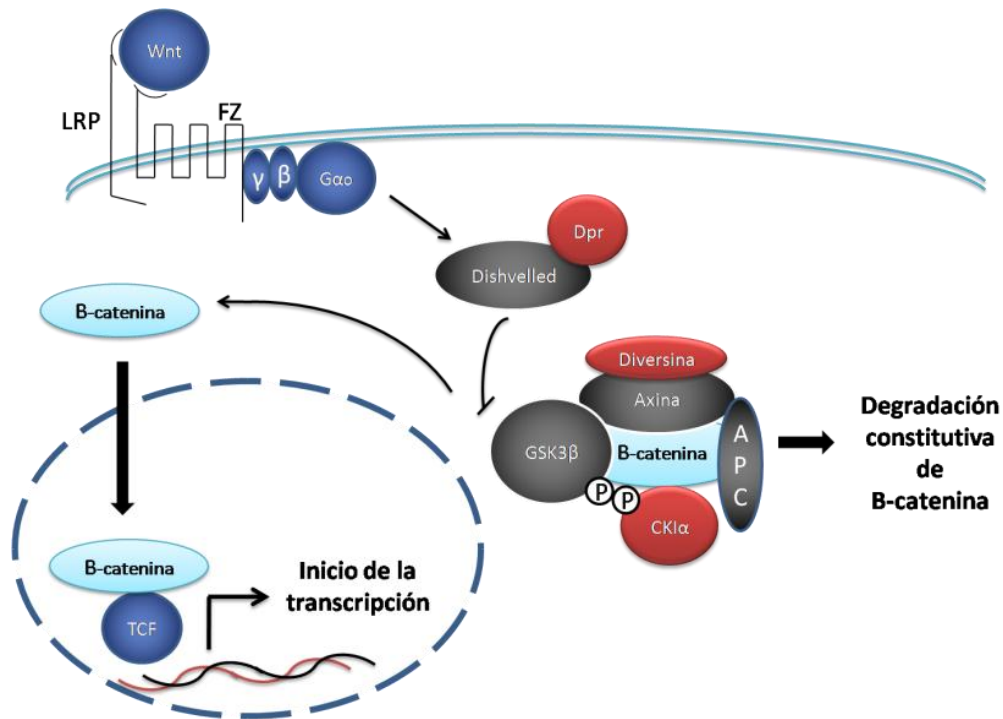


Figura 1. Vía de señalización clásica de Wnt. (Adaptada de <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>) La activación de la vía por la unión de Wnt a su receptor transmembranal Frizzled, inactiva a GSK3B a través de Dishvelled. Esto impide la fosforilación de β -catenina y su degradación vía proteosoma. La β -catenina es transportada al núcleo para interaccionar factores de transcripción TCF/LEF dirigiendo la expresión de diversos blancos transcripcionales.

1.3 Vía de señalización wnt/ β -catenina y cáncer.

La regulación de la vía de señalización clásica de Wnt, cobra importancia por la relevancia de sus blancos transcripcionales. El control de la vía se da a través de la participación de diversos elementos, los cuales ejercen una función determinada en el control de la activación de la vía clásica de Wnt.

APC es uno de los componentes de la vía clásica Wnt más estudiados por su participación en la poliposis adenomatosa familiar, un padecimiento caracterizado por el desarrollo de múltiples pólipos en el colon. APC participa en la conformación de un complejo multiproteico responsable de la degradación en el citoplasma, de la proteína β -catenina. Se sabe que diferentes mutaciones en APC generan diferentes grados de activación de la vía clásica de Wnt y diferentes grados de susceptibilidad a desarrollar tumores. En general se considera que la pérdida de función de APC provoca una acumulación de β -catenina en el citoplasma y su traslocación al núcleo para dirigir la expresión de los blancos propios de la vía clásica Wnt (17,18).

No obstante que la activación constitutiva de la vía clásica de Wnt ha sido identificada como una de las razones de desarrollo de adenomas, se sabe también de su participación en la fisiología normal del intestino. La inhibición completa de la vía clásica de Wnt por expresión constitutiva del inhibidor Dickkopf1 (Dkk-1) resulta en la pérdida de la proliferación celular en el intestino fetal y adulto (19-21).

La β -catenina es considerada el efector final de la vía clásica de Wnt. En condiciones normales β -catenina se une a APC, Axina1 o Axina2 y a GSK3B la cual fosforila residuos específicos de serina y treonina en la región N-terminal. La β -catenina fosforilada es dirigida a degradación vía proteosoma.

Después de la interacción extracelular de Wnt y su receptor transmembranal, GSK3B es inactivada y β -catenina se estabiliza, lo cual lleva a una acumulación en el citoplasma y su traslocación al núcleo donde interacciona con factores de transcripción de la familia TCF (22,23)

Mutaciones en los sitios de fosforilación en la región N-terminal de β -catenina, resulta en la estabilización de β -catenina. Niveles elevados de β -catenina han sido identificados en tumores humanos y líneas celulares. Niveles de β -catenina elevados correlacionan con un mal pronóstico de adenocarcinoma humano de glándula mamaria (24).

1.4 Degradación de ARNm mediado por elementos ricos en A y U

La vía de “degradación de ARNm mediada por secuencias ARE” (AMD) es uno de los mecanismos del metabolismo de ARN, más ampliamente estudiados. Es responsable de la degradación de ARN mensajeros con tiempos de vida media ($t_{1/2}$) muy cortos y que requieren de una regulación estricta, como citocinas y oncogenes. El mecanismo de AMD depende de la conjunción de tres eventos: 1) la presencia de secuencias ARE en la región 3'UTR del ARNm, 2) la unión de una proteína desestabilizadora a secuencias ARE (KSRP, AUF1 y TTP) y 3) el reclutamiento del exosoma (25).

La clasificación de las secuencias ARE, permite identificar tres tipos diferentes. Los ARE tipo I constan de múltiples repeticiones continuas del pentanucleótido “AUUUA” dentro de la región 3'UTR, los ARE tipo II son 2 o 3 repeticiones dispersas del pentanucleótido “AUUUA” en la región 3'UTR y los ARE tipo III que son regiones ricas en uracilos (8).

Una vez que el exosoma es reclutado por el complejo ARE/ARE-BP se desencadenan tres acontecimientos principales: i) el acortamiento rápido de la cola de poli A, ii) La remoción del CAP en el extremo 5' del ARNm y iii) la degradación en el sentido 3'-5' por el exosoma .(25,26)
(Figura 2)

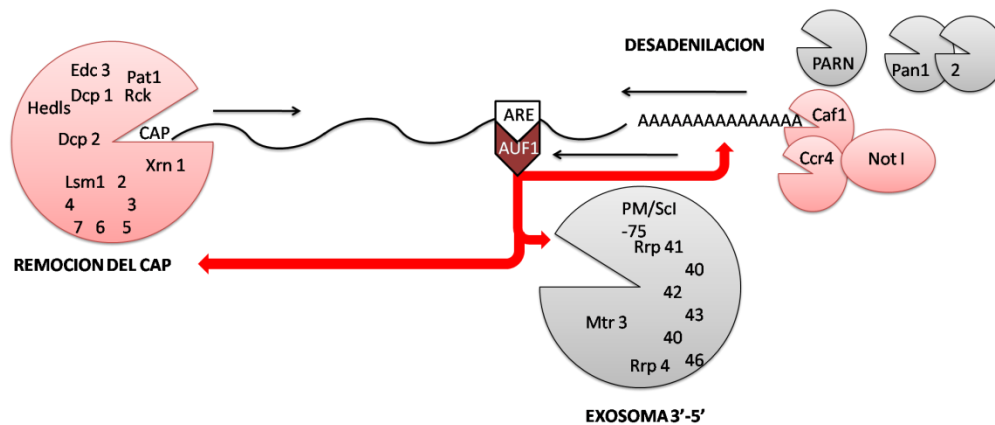


Figura 2. Degradación de ARNm mediada por ARE's. (Adaptada de <http://www.dkfz-heidelberg.de>)

La degradación rápida de ARN mensajeros que contienen AREs requiere de la unión de una proteína de unión a ARN como AUF1 o TTP. A la vez que AUF1 se une al ARE, se activa la desadenilación del ARNm. AUF1 interacciona tanto con el exosoma responsable de la degradación en la dirección 3'-5' como con el complejo responsable de la remoción del CAP y de la degradación en sentido 5'-3'.

1.5 Los miembros de la familia AUF1

AUF1 es una familia de 4 isoformas de 37, 40, 42 y 45 KD, generadas por "splicing alternativo" a partir de un transcrito primario en común, codificado en el locus 4q21.1 y 21.2. Las cuatro isoformas presentan en su estructura dos sitios de reconocimiento de ARN (RRM1 y RRM2) (**Figura 3**) La diferencia entre las isoformas radica en la presencia y/o ausencia del exón 2 y el exón 7. El exón 2 que codifica para 19 aminoácidos está presente en las isoformas de 45 y 40 KD, mientras que en las isoformas de 37 y 42 KD está ausente. Por otra parte el exón 7 que codifica para 49 aminoácidos está contenido en las isoformas de mayor tamaño (p42AUF1 y p45AUF1) y ausente en las más pequeñas (p37AUF1 y p40AUF1). (27-29)

El "splicing" alternativo de los exones 2 y 7, determina entre otras características la afinidad y especificidad por secuencias ARE en el ARN. La ausencia de 19 aminoácidos codificados en el exón 2, aumenta la afinidad por las secuencias ARE. Las isoformas p37AUF1 y p42AUF1 que carecen del inserto de 19 aminoácidos presentan una afinidad mayor por las secuencias ARE (9.5 y 40 nM respectivamente) que las isoformas p40AUF1 y p45AUF1 (330 y 90 nM respectivamente). El inserto de 19 aminoácidos parece alterar la especificidad de unión por el ARN, la isoforma p40AUF1 que se une al pre-ARNm en el sitio de "splicing" r(UUAG/G) con una Kd aparente de 34 nM, una afinidad 10 veces mayor que por las secuencias ARE. Los 49 aminoácidos codificados por el exón 7, también tienen influencia sobre la unión a ARN, pudiendo ser positiva o negativa dependiendo de si está o no presente el inserto de 19 aminoácidos del exón 2 en el RRM1, es decir, la afinidad por las secuencias ARE de la isoforma que contiene el inserto de 49 aminoácidos, p42AUF1 es de 40 nM, menor que la afinidad de p37AUF1 de 9.5 nM, aunque ambas carezcan del inserto de 19 aminoácidos dentro del RRM1.

Sin embargo afecta de manera positiva la afinidad por secuencias ARE cuando el inserto de 19 aminoácidos está presente. La afinidad por secuencias ARE de p45AUF1 que contiene el inserto de 49 aminoácidos es de 90 nM, contra 330 nM de p40AUF1 que carece de él. (30,31)

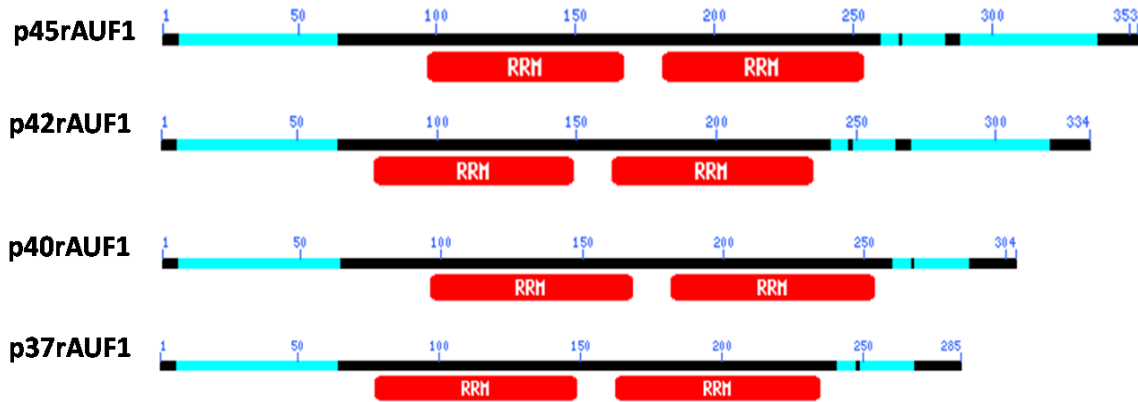


Figura 3. Representación esquemática de las isoformas de AUF1. Se muestran en rojo los dominios de reconocimiento a ARN (RRM por sus siglas en inglés). El dominio del exón 2 de 19 aminoácidos cae dentro del dominio de reconocimiento a ARN (RRM1) mientras que el dominio del exón 7 no afecta el RRM2.

1.6 Mecanismos de regulación de la función de AUF1

Inicialmente fueron descritas como proteínas nucleares, de ahí que sean agrupadas en la familia de ribo-proteínas heterogéneo nucleares (Hnrp). Existen reportes que describen la capacidad de las isoformas de AUF1 para viajar y distribuirse entre el núcleo y el citoplasma. Mientras algunos autores reportan que todas las isoformas viajan entre núcleo y citoplasma (32), otros aseguran que solo las isoformas de menor tamaño poseen esta capacidad y que las isoformas mas pesadas de AUF1 permanecen ancladas a proteínas de la matriz nuclear como SAF-B (33).

A la fecha no existe una explicación contundente del porque de las diferencias en los hallazgos de diferentes grupos de investigación sobre la localización subcelular de AUF1; sin embargo algunos adjudican estas discrepancias a los tipos celulares que han utilizado para sus estudios (33). La localización subcelular de AUF1 es importante por la fuerte asociación con la su función. Por ejemplo la localización en citoplasma de AUF1 correlaciona con una baja en la estabilidad de ARN mensajeros que contiene secuencias ARE en su región 3'UTR (8,11). Se piensa que la función de AUF1 puede estar determinada no solo por sus niveles de expresión o por su localización subcelular, además se cree que en su regulación intervienen modificaciones post-traduccionales como la fosforilacion de residuos específicos, el control del splicing alternativo de los exones 2 y 7, etc (34-36).

La fosforilación de los residuos de Serina 87 y Serina 87 en p40AUF1 y codificados en el exón 2, es un evento que determina la función en la unión y modulación de la estabilidad de ARN mensajeros con secuencias ARE en su región 3'UTR. Se ha demostrado que la defosforilación de los residuos de Serina 83 y Serina 87 aumenta la afinidad de p45AUF1 por los sitios ARE, induciendo un cambio de conformación del ARN y disminuyendo la afinidad por p37AUF1, principal isoforma implicada en la degradación de ARNm mediada por secuencias ARE (34). El estudio de AUF1 se hace difícil debido a la amplia variedad de estímulos que pueden afectar la regulación de la función de las isoformas de AUF1, al incidir en eventos como el control de los niveles de expresión, modificando su distribución núcleo-citoplasma y regulando los eventos postraduccionales como la fosforilación de dominios importantes.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Analizar el efecto de la expresión del oncogen Wnt1 sobre la expresión de las proteínas AUF1 en células PC12.

2.1.1 Objetivos particulares

- 1)** Determinar, mediante ensayos de Western Blot, el efecto de la expresión del oncogen wnt1 sobre la distribución subcelular de las proteínas AUF1 en línea celular PC12.

- 2)** Aislamiento y clonación de los cDNAs conteniendo el marco de lectura de las isoformas de AUF1 expresadas en células PC12.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de trabajo

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., cuyo titular es el Dr. Juan Francisco Velázquez Vadillo.

3.2 Reactivos

Los reactivos utilizados para la realización de la tesis se enlistan a continuación agrupados por casa comercial:

PROMEGA Corporation (Madison, WI, USA)

Enzimas de restricción, Go Taq Green Master Mix, T4 ADN ligasa, TransFast Transfection System, Wizard SV Gel and PCR Clean-up System, pGEM-T Easy vector System, Agarosa.

LI-COR (Lincoln, NB, USA)

IRDye800v2 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, LB Broth Base y LB Broth Base Agar.

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 ($CaCl_2$), Dodecil sulfato de sodio (SDS), Acido etilen-di-amino tetracético (EDTA), Cloroformo ($CHCl_3$), Tween 20 e iniciadores específicos.

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, Western blot Luminol reagent, TBST-BlottoA Marcadores de peso molecular para proteínas.

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, USA)

Incubadora para cultivo celular con suplemento de CO₂ de NAPCO Scientific Company (USA)

Microscopio invertido marca Karl Zeiss

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

Ultra congelador 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 nucleídos

3.4.1 Oligonucleótidos

CLAVE	NOMBRE	SECUENCIA	APLICACIÓN
001	5' ORF rAUF1 (Eco RI)	5' TAA CTT GGA ATT CGA TGT CGG AGG AGC AGT TCG GAG G 3'	Amplificación del marco de lectura de rAUF1
002	3' ORF rAUF1 (Not I)	5' TAA CTT GCG GCC GCT TAG TAT GGT TTG TAG CAT TTT TGA TG 3'	Amplificación del marco de lectura de rAUF1
003	AUF1 Exon2	5' GAG GAG GAT GAA GGC CAT TCA AAC 3'	Identificación de p40 y p45 rAUF1.
004	AUF1 Delta2	5' GAG GAT GAA GGG AAA ATG TTT ATA GG 3'	Identificación de p37 y p42 rAUF1.
005	AUF1 Exon7	5' CCA CTC TGC TGA TTG CTA TAG TC 3'	Identificación de p42 y p45 rAUF1.
006	AUF1 Delta7	5' CCA CTC TGC TGA TCA CCG CCT C 3'	Identificación de p37 y p40 rAUF1
007	5' Wnt1	5' GAA ACA GCG TTC ATC TTC GCA ATC AC 3'	Amplificación de Wnt1
008	Wnt1 3'	5' CTC GTT GTT GTG AAG GTT CAT GAG G 3'	Amplificación de Wnt1
009	Seq 5' AUF1	5'GTC TTG TTG TCC ATA GGC AGC TC 3'	Secuenciar AUF1
010	Seq AUF1 3'	5'CCT TTC TCC AGA CAC ACC TGA AG 3'	Secuenciar AUF1
011	CMV 5' (Pvu II)	5' TAA CTT <u>CAG CTG</u> AAG AAT CTG CTT AGG GTT AGG C 3'	Amplificación del promotor de CMV y la etiqueta de Myc.
012	Myc 3' (EcoRI)	5' TAA CTT <u>GAA TTC</u> GGG GTT CAG GTC TTC TTC AGA G 3'	Amplificación del promotor de CMV y la etiqueta de Myc.
013	Oligo T7		Secuenciación en pSG5-HA-AUF1 y pCMV-Myc-AUF1.
014	5' β -actina (XbaI)	5' CTT GTC TCT AGA GCG GAC TGT TAC TGA GCT GCG TTT TAC 3'	Amplificación de β-actina
015	3' β -actina (BamHI)	5' GAT CTT GGA TCC TAA GGT GTG CAC TTT TAT TAA AAC GG 3'	Amplificación de β-actina
016	M13 FW	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'	Secuenciar en pGEM-T Easy
017	M13 REV	5' AAC AGC TAT GAC CAT G 3'	Secuenciar en pGEM-T Easy

Tabla I. Lista de oligonucleótidos.

3.4.2 Vectores

3.4.2.1 Vector pGEM-T Easy

El vector pGEM-T Easy (**Figura 4**) de la compañía PROMEGA es un vector T, utilizado para clonar fragmentos de PCR directamente después de la reacción de PCR. Este vector lo utilizamos en esta tesis para clonar los fragmentos de PCR derivados del análisis de los niveles de ARN de las isoformas de AUF1. La selección de colonias recombinantes se realizó por alfa-complementación. Los fragmentos clonados dentro de pGEM-T Easy rompen el marco de lectura del gen Lac Z que codifica para el péptido alfa de la enzima beta-galactosidasa, Como consecuencia bacterias deficientes del gen LacZ con plásmido recombinante, crecidas sobre IPTG y X-Gal son blancas, mientras que bacterias con plásmido religado adquieren una tonalidad azul debida a los subproductos del rompimiento enzimático del X-Gal por la enzima beta-galactosidasa. Para secuenciar los fragmentos clonados en este vector se utilizaron los oligonucleótidos generales M13 "Forward" y "Reverse" (**Ver lista de oligonucleótidos**).

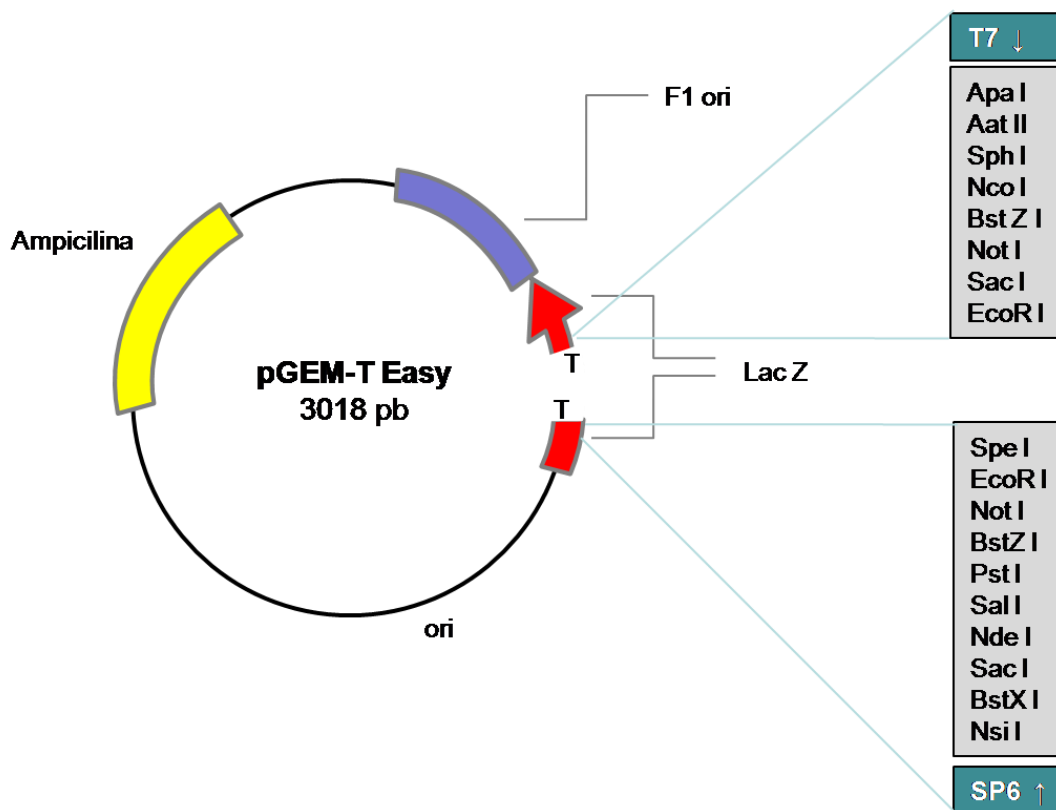


Figura 4. Mapa del vector T, pGEM-T Easy. Mapa de las secuencias más relevantes dentro de pGEM-T Easy como el gen de resistencia a ampicilina, y el gen Lac Z.

3.4.2.2 Vector pcDNA3-Myc

El vector pcDNA3-Myc (**Figura 5**) es un vector derivado del plásmido pcDNA3 de la casa comercial Invitrogen, al cual se le agrego la etiqueta de Myc (MEQKLISEEDL), entre los sitios BstXI y EcoRI. Presenta resistencia a ampicilina y a neomicina, la expresión de las proteínas está dirigida por el promotor constitutivo de CMV. En esta tesis utilizamos un vector cuya base es pcDNA3-Myc, en el cual está clonada la piruvato quinasa (PK) entre los sitios EcoRI y NotI. Lo utilizamos como templado para amplificar un fragmento que contiene el promotor de CMV y la etiqueta de Myc.

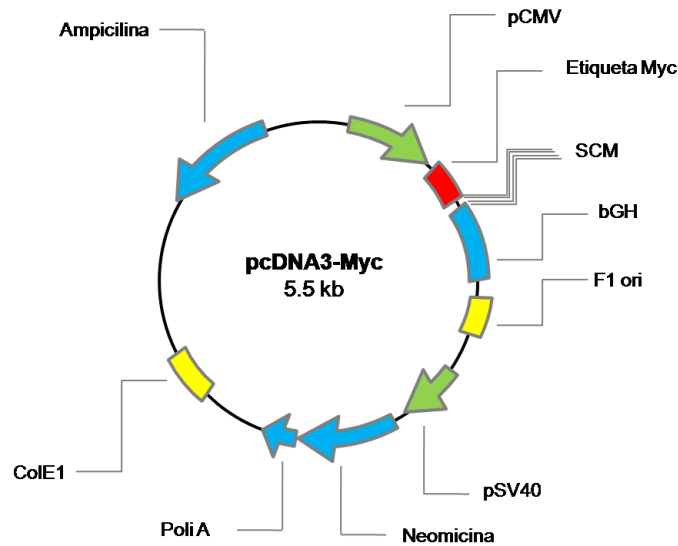


Figura 5. Vector pcDNA3-Myc. Mapa del vector de expresión eucariota pcDNA3-Myc, con los promotores de citomegalovirus y del virus del simio 40 (pCMV y pSV40), el sitio de clonación múltiple (SCM), la región 3'UTR de la hormona de crecimiento bovina (bGH), la resistencia a Neomicina y Ampicilina y los orígenes de replicación (ColE1 y F1 ori)

3.4.2.3 Vectores pGEX-4T-AUF1

Este tipo de vectores son parte de un sistema de purificación de proteínas que se expresan en bacterias (*E. coli*), fusionadas a glutatión-S transferasa (GST) en la región N-terminal. La purificación se realiza a través de una columna de glutatión inmovilizado en una resina de Sepharosa. El vector pGEX-4T-1 (**Figura 6A**) posee un sitio de corte para la enzima Trombina entre la secuencia de GST y las proteínas clonadas en él, lo que permite la remoción de la GST y la obtención de la proteína recombinante pura y con mínimas modificaciones. Clonamos las secuencias de p37 y p45 AUF1 humanas y la versión de rata de p37AUF1 en el vector pGEX-4T-1 entre los sitios EcoRI y Sal I. Las secuencias de AUF1 se obtuvieron por digestión a partir de los vectores pSG5-HA-AUF1.

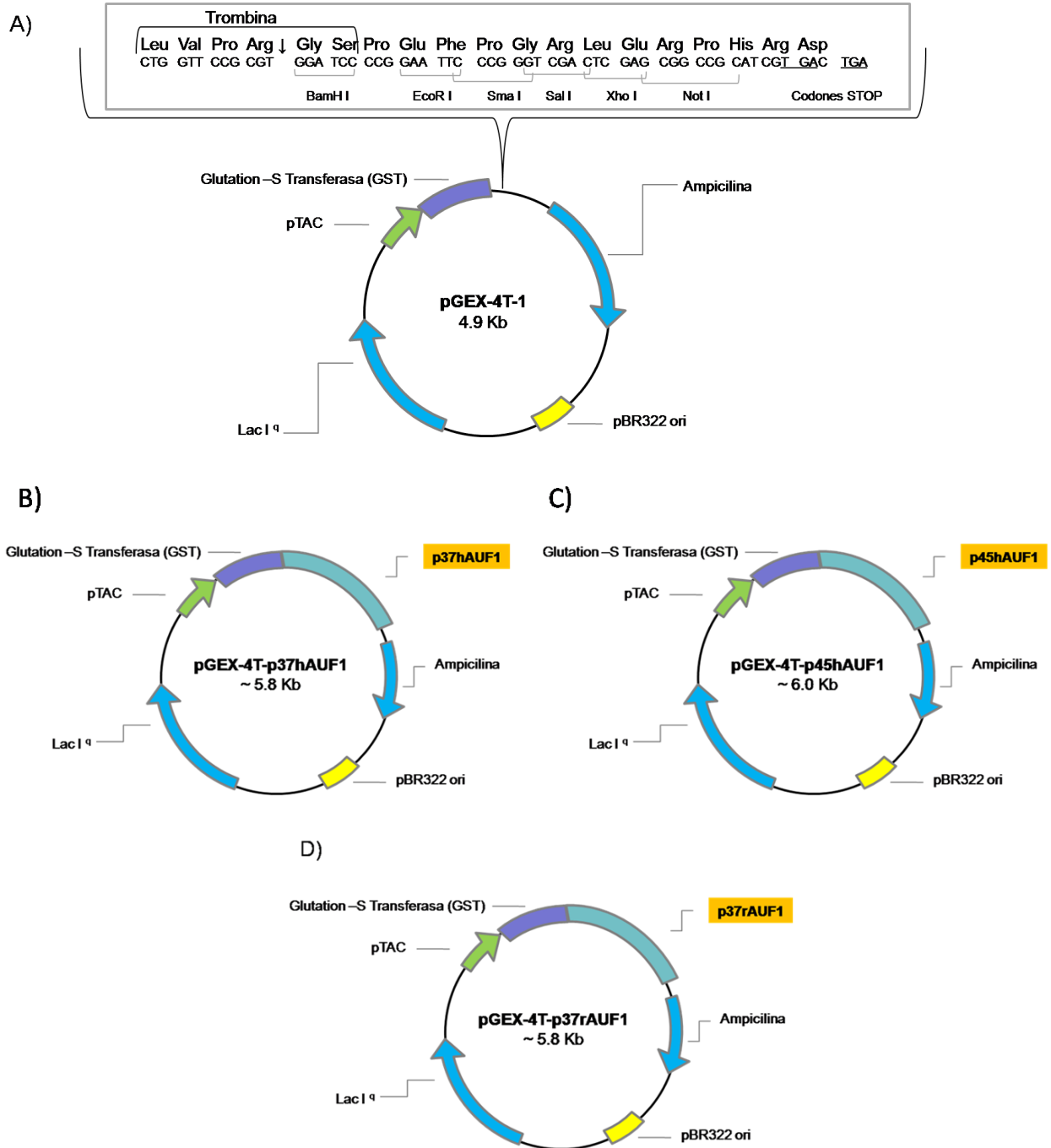


Figura 6. Vectores pGEX-4T-AUF1. A) El vector de expresión en bacterias, pGEX-4T-1 de Amersham Bioscience. B),C) y D) corresponden a los mapas de los vectores de expresión en bacterias pGEX-4T-1 con las secuencias clonadas de p37hAUF1, p45hAUF1 y p37rAUF1 respectivamente.

3.4.2.4 Vector pSG5-HA

El vector de expresión procariota pSG5-HA (**Figura 7**) expresa proteínas recombinantes fusionadas a una etiqueta de hemaglutinina (HA) en la porción amino terminal de las proteínas. La expresión de las fusiones es dirigida por el promotor de SV40 (Simian virus 40). Clonadas en este vector obtuvimos del Dr. Schneider (Cornell University), las secuencias completas de las versiones humanas de AUF1 y p37 y p45 de rata, clonadas entre los sitios EcoR I y BamH I/Bgl II.

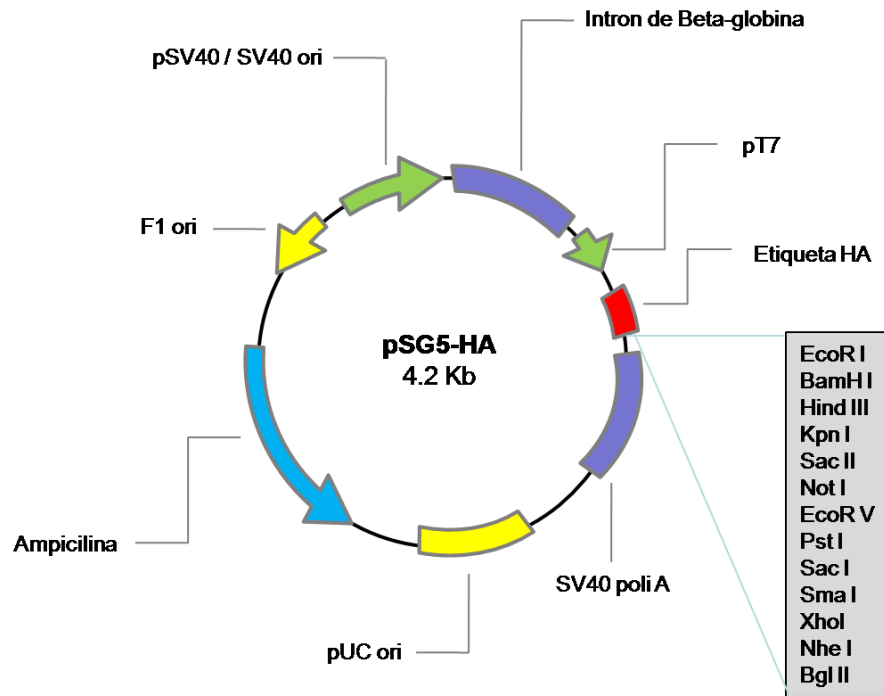


Figura 7. Vector de expresión procariota pSG5-HA. En la figura se muestran las regiones de mayor relevancia del vector pSG5-HA: el gen de resistencia a ampicilina, el origen bacteriano de pUC, la señal de poliadenilación de SV40, el promotor del fago T7, un intrón de beta-globina el promotor de SV40 y el sitio múltiple de clonación.

3.4.2.5 Vectores pSG5-HA-rAUF1

Las secuencias que codifican para las versiones de rata de las proteínas AUF1 de 37 y 45 KD, fueron donadas amablemente por el Dr. Robert Schneider (Cornell University, NY, USA), clonadas en el vector de expresión eucariota pSG5-HA (**Figura 7**), además de la colección completa de las versiones humanas de AUF1 en el mismo vector. Dicho vector permite la expresión de las proteínas, fusionadas en su parte amino terminal a una etiqueta de hemaglutinina (HA), dirigida por el promotor viral de SV40. A partir de las construcciones donadas por el Dr. Schneider (**Figuras 8A y 8B**), se construyeron por digestión enzimática e intercambio de secuencias, las versiones de rata de p37rAUF1, p40rAUF1 y p42rAUF1 clonadas en fase con la etiqueta de hemaglutinina en el vector pSG5-HA (**Figuras 8C, 8D y 8E**).

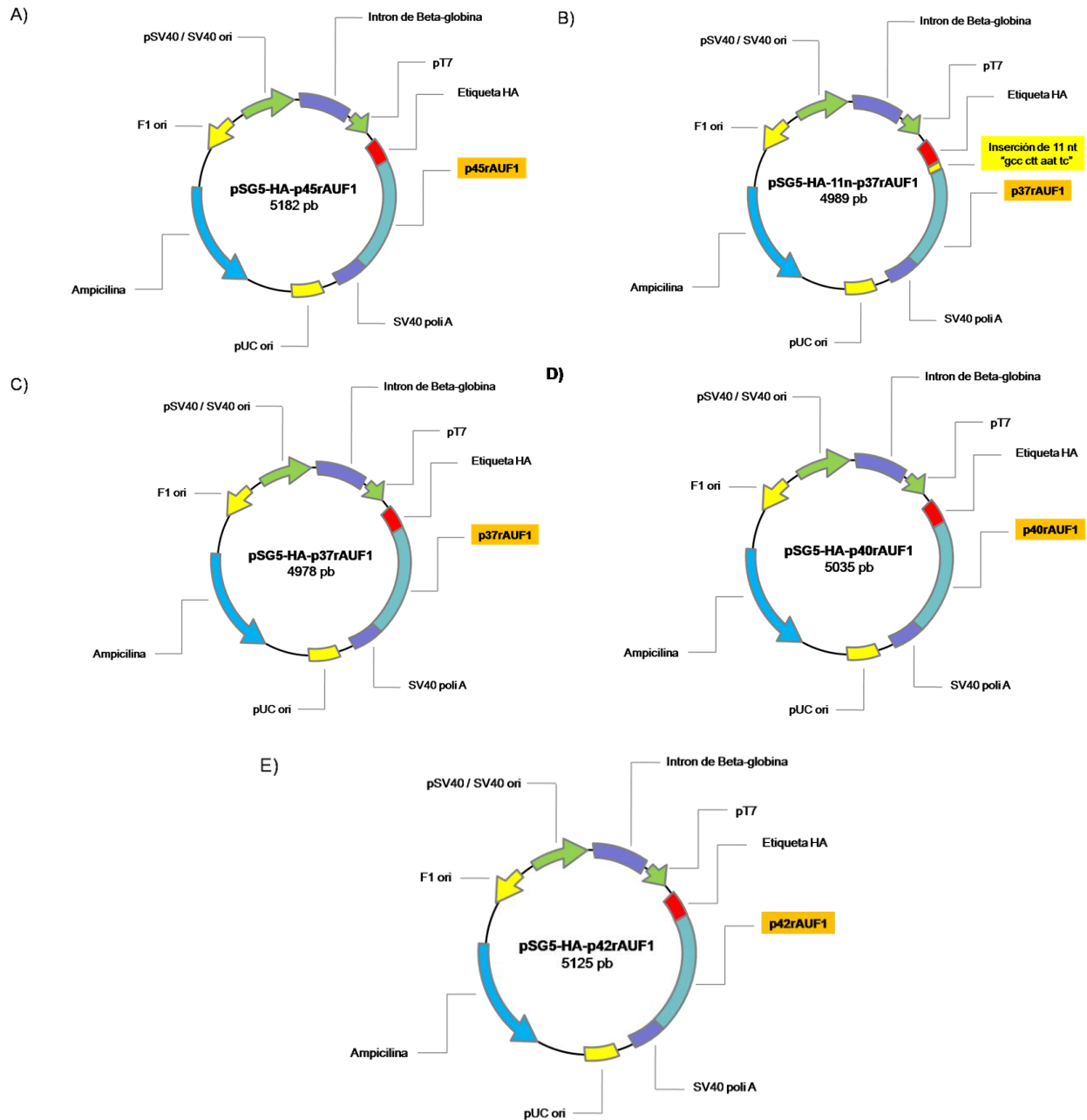


Figura 8. Vectores pSG5-HA-rAUF1. A) Secuencia de p45rAUF1 clonada en el vector pSG5-HA. B) Secuencia de p37rAUF1 clonada en el vector pSG5-HA. Esta construcción no funciona porque presenta un inserto de 11 nucleótidos entre HA y p37rAUF1, que rompe el marco de lectura de p37rAUF1. A y B fueron donadas por el Dr. Robert Schneider (Cornell University, NY). C) Secuencia de p37rAUF1 clonada en fase con la etiqueta de HA, en el vector pSG5-HA, se generó eliminando el inserto de 11 nucleótidos del vector pSG5-HA-11n-p37rAUF1. D) y E) son las secuencias completas de p40rAUF1 y p42rAUF1 respectivamente, clonadas en fase con la etiqueta de HA en el vector pSG5-HA. C, D y E se generaron en el laboratorio para fines de la presente tesis.

3.4.2.6 Vectores pCMV-Myc-rAUF1

Las construcciones pCMV-Myc-rAUF1 (**Figura 9**) son resultado de la sustitución del promotor de SV40, y la etiqueta de HA en los vectores pSG5-HA-rAUF1, por el promotor CMV y la etiqueta de Myc. Fueron utilizados para monitorear de manera individual la distribución núcleo-citoplasma de cada una de las isoformas de AUF1 en líneas celulares PC12 que expresan el oncogen wnt1 y líneas PC12 que no expresan wnt1, utilizando un anticuerpo contra la etiqueta de Myc.

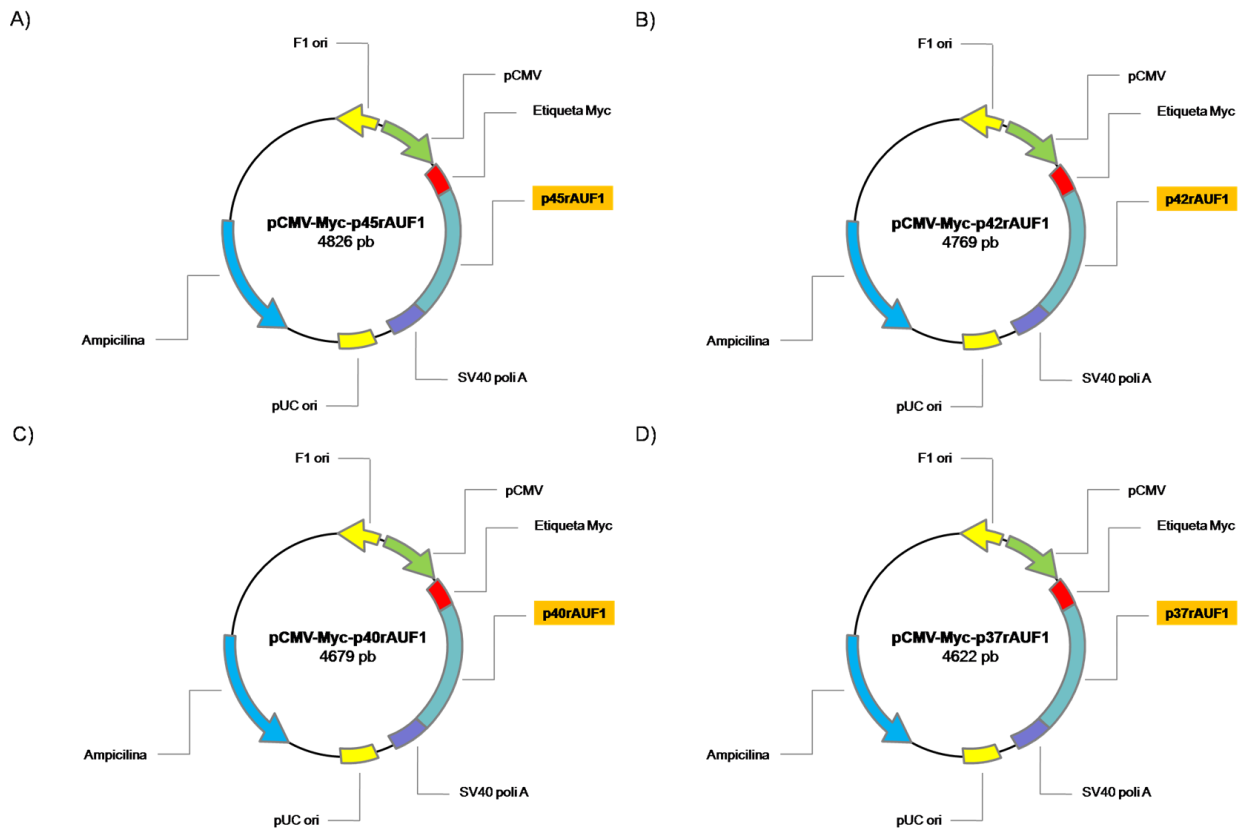


Figura 9. Mapa de las construcciones pCMV-Myc-rAUF1. Los vectores pCMV-Myc-rAUF1 expresan las isoformas de AUF1 de rata fusionadas en su extremo amino terminal a una etiqueta de Myc. Estas cuatro construcciones se realizaron para fines de la tesis en el laboratorio de biología molecular.

3.5 Modelo celular

El modelo celular utilizado en este trabajo es la línea celular PC12 derivada de un tumor (feocromocitoma) de células adrenales de rata. La línea fue establecida como una línea noradrenérgica que respondía al factor de crecimiento neuronal (NGF) en 1976. Desde entonces ha sido ampliamente difundido su uso como modelo de diferenciación neuronal y como modelo para analizar la expresión de genes. En el laboratorio contamos con cuatro líneas celulares PC12 que incluyen la línea parental PC12, PC12/Wnt1+, PC12/HB+ y PC12/HB- (**Fig. 10**).

3.5.1 Línea celular PC12

La línea celular parental PC12 proviene de un feocromocitoma de células adrenales de rata, crece en suspensión y presenta una morfología esférica. No expresa el oncogén Wnt1 por lo tanto no tiene activada la vía Wnt/ β -catenina.

3.5.2 Línea celular PC12/Wnt1+

La línea celular PC12/Wnt1 se obtuvo por infección de la línea parental PC12, con un vector retroviral basado en el virus del sarcoma murino que expresa el oncogén Wnt1 (MV-Wnt1) (A M Brown 1992). Expresa constitutivamente Wnt1 y tiene activada la vía Wnt/ β -catenina. Crece adherida al sustrato y presenta una morfología aplanada y estrellada.

3.5.3 Línea celular PC12/HB+ (Bruce D Howard 1996)

La línea celular PC12/HB+ expresa constitutivamente el oncogén Wnt1 y tiene activada la vía Wnt/ β -catenina. Esta línea celular fue transformada por un vector retroviral.

3.5.4 Línea celular PC12/HB- (Bruce D Howard 1996)

La línea PC12/HB- proviene de la línea PC12/HB+ y a través del tiempo dejó de expresar el oncogén Wnt1. No tiene activada la vía de señalización Wnt/ β -catenina, pero mantiene una morfología aplanada y estrellada. Crece adherida al plato de cultivo.

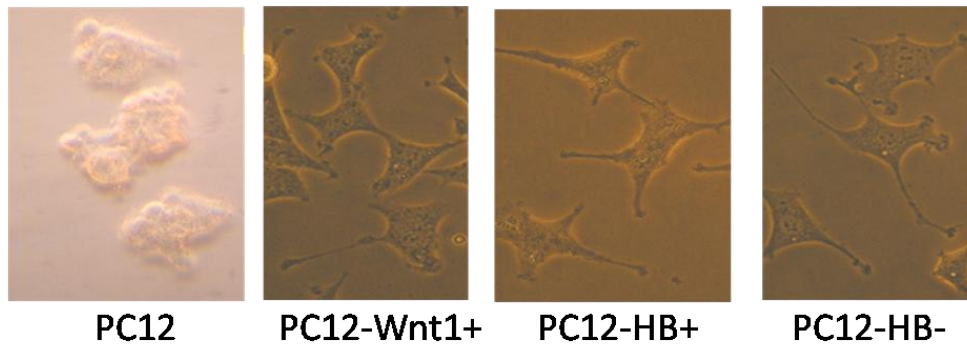


Figura 10. Líneas celulares PC12, PC12-Wnt1+, PC12-HB+ y PC12-HB-. Las líneas celulares PC12 y PC12-Wnt1+ fueron donadas por el Dr. A.M Brown de la Cornell University. Las líneas celulares PC12-HB+ y PC12-HB- fueron donadas por el Dr. Bruce Howard de la UCLA.

3.6 Metodología

3.6.1 Estrategia para la construcción de los vectores pSG5-HA-p37rAUF1, pSG5-HA-p40rAUF1 y pSG5-HA-p42rAUF1.

De las dos construcciones de secuencias de rata, obtenidas del Dr. Schneider únicamente p45rAUF1 estaba clonada en fase con la etiqueta de HA entre los sitios EcoRI-BamHI/BglIII en el vector pSG5-HA (**Figura 8A**). En el caso de p37rAUF1 la secuencia estaba correcta, sin embargo presentaba una inserción de 11 nucleótidos entre el sitio EcoRI y el codón de inicio de la traducción de p37rAUF1 lo que provocaba un desplazamiento en el marco de lectura (**Figura 8B**). Eliminando las 11 bases insertadas entre el sitio EcoRI y el codón de inicio de la traducción de p37rAUF1, obtuvimos el vector pSG5-HA-p37rAUF1 (**Figura 8C**).

El vector pSG5-HA-11n-p37rAUF1 se digirió con las enzimas EagI y AseI para generar dos fragmentos de 2932pb y 2057pb. El fragmento de 2932pb se eliminó y fue sustituido por un fragmento de 2921pb obtenido de la digestión de pSG5-HA-p45rAUF1 con las mismas enzimas (**Figura 11 A**).

Utilizando pSG5-HA-p45rAUF1 y el recién generado pSG5-HA-p37rAUF1, por digestión con las enzimas EcoRI y SacI se obtuvieron los fragmentos de 4340 pb/ 842pb y 4193 pb / 785 pb respectivamente. Por intercambio de secuencias se generaron los vectores pSG5-HA-p40rAUF1 y pSG5-HA-p42rAUF1 (**Figura 8D y 8E**). (**Figura 11 B**).

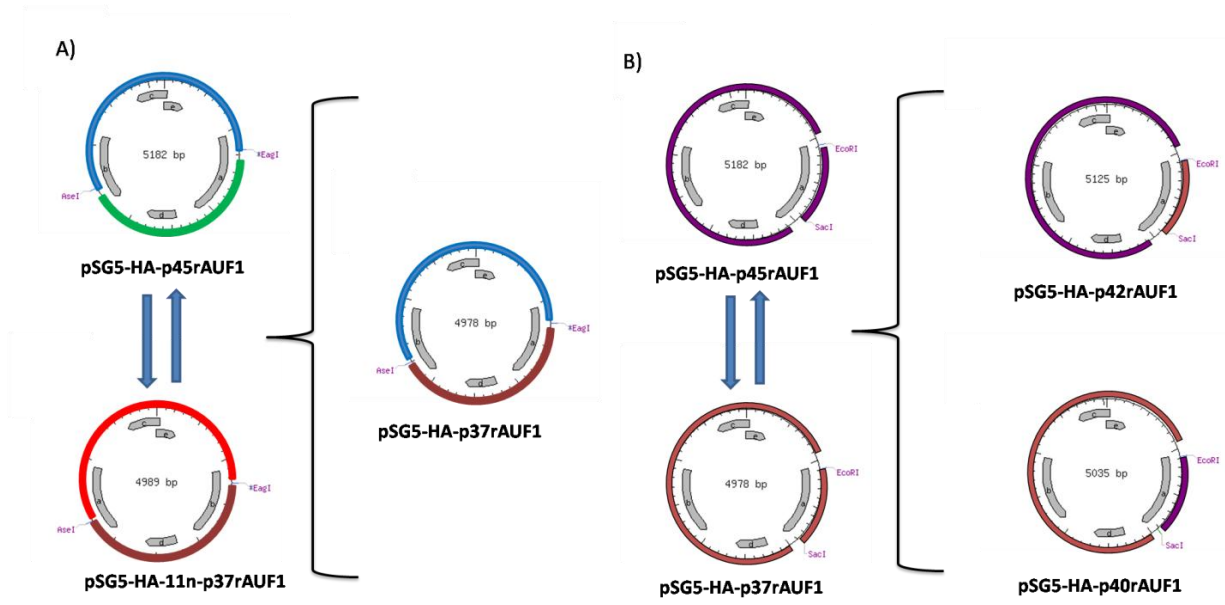


Figura 11. Estrategias para generar los vectores pSG5-HA-p37rAUF1, pSG5-HA-p40rAUF1 y pSG5-HA-p42rAUF1. En la figura A se ejemplifica como se generó pSG5-HA-p37rAUF1 sin el inserto de 11 nucleótidos. El inserto de 11 nt se eliminó dentro de un fragmento de 2932pb entre los sitios AseI y EagI y se sustituyó por un fragmento de 2921pb derivado de la digestión de pSG5-HA-p45rAUF1 con las mismas enzimas EagI y AseI. En la figura B se explica la estrategia para la obtención de pSG5-HA-p40rAUF1 y pSG5-HA-p42rAUF1 a partir de pSG5-HA-p45rAUF1 y pSG5-HA-p37rAUF1, por medio de restricción e intercambio de secuencias entre los sitios EcoRI y SacI.

3.6.2 Estrategia para la construcción de los vectores pCMV-Myc-AUF1

Los vectores pSG5-HA-p45rAUF1, pSG5-HA-p42rAUF1, pSG5-HA-p40rAUF1 y pSG5-HA-p37rAUF1 se digirieron con las enzimas PvuII y EcoRI para eliminar una región de 1179pb (suma de dos fragmentos de 119pb y 1060pb), que contiene el promotor de SV40, un intrón de beta-globina y la etiqueta de HA. Esta región se sustituyó por un fragmento de aproximadamente 840pb que contiene el promotor de CMV y la etiqueta de Myc, amplificado con los primers CMV 5' PvuII () y Myc 3' EcoRI a partir del vector pcDNA3-Myc-TBP. Se purificó el fragmento se generaron sitios compatibles y se ligó en los vectores abiertos PvuII/EcoRI (**Figura 12**).

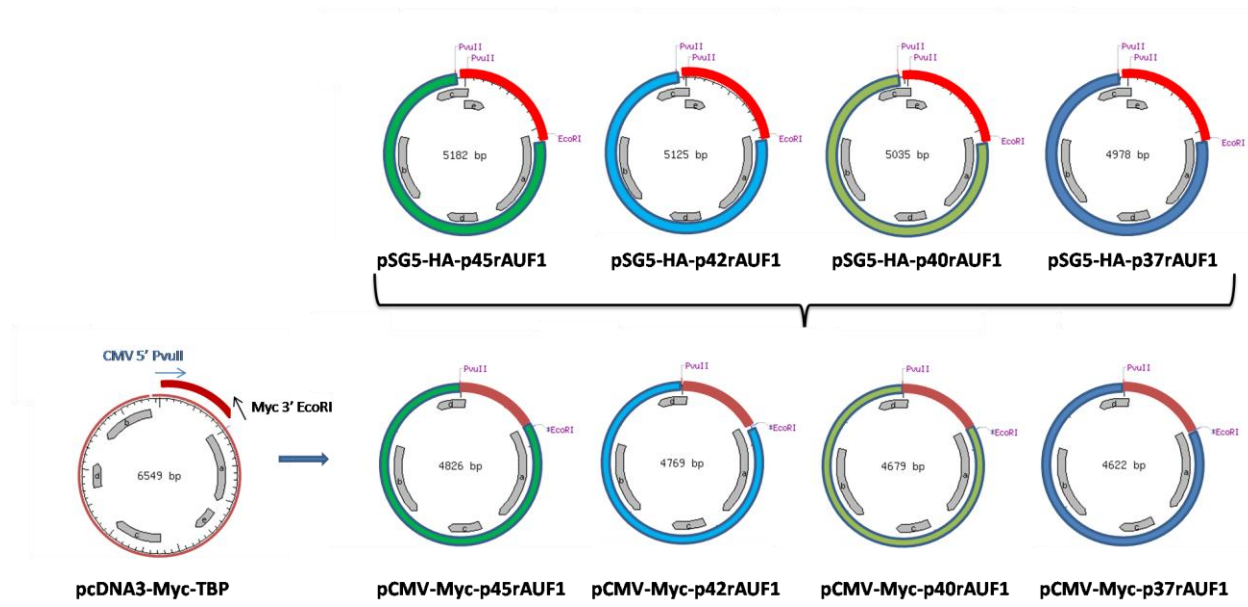


Figura 12. Estrategia para construir los vectores pCMV-Myc-rAUF1. Los vectores pCMV-Myc-rAUF1 provienen de los vectores pSG5-HA-rAUF1 a los cuales se les eliminó una región de 1179pb que contiene el promotor de SV40, el intrón de beta-globina y la etiqueta de hemaglutinina (HA), entre los sitios PvuII y EcoRI. Esta región se sustituyó por un fragmento de aproximadamente 840pb amplificado de pcDNA3-Myc-TBP.

3.6.3 Estrategia para la construcción de los vectores pGEX4T-1-AUF1

La construcción de los vectores pGEX4T-1-p37hAUF1, pGEX4T-1-p45hAUF1 y pGEX4T-1-p45rAUF1 (**Figuras 6B, 6C y 6D**), cumplió con el fin de producir de manera *in vitro* las proteínas AUF1, para utilizarlas como control positivo en los ensayos de Western Blot y para probar la funcionalidad de los anticuerpos con los que contamos en el laboratorio de biología molecular. Las secuencias de p37rAUF1, p45rAUF1, p37hAUF1 y p45hAUF1 fueron obtenidas por digestión enzimática con EcoRI/Sal I de las construcciones en pSG5-HA y subclonadas entre los mismos sitios en el vector pGEX4T-1 (**Figura 13**). El vector pGEX4T-1 (**Figura 6A**) produce las proteínas fusionadas a GST (glutación S transferasa) en su extremo amino terminal, dirigido por el promotor procarionta Tac, inducible por IPTG.

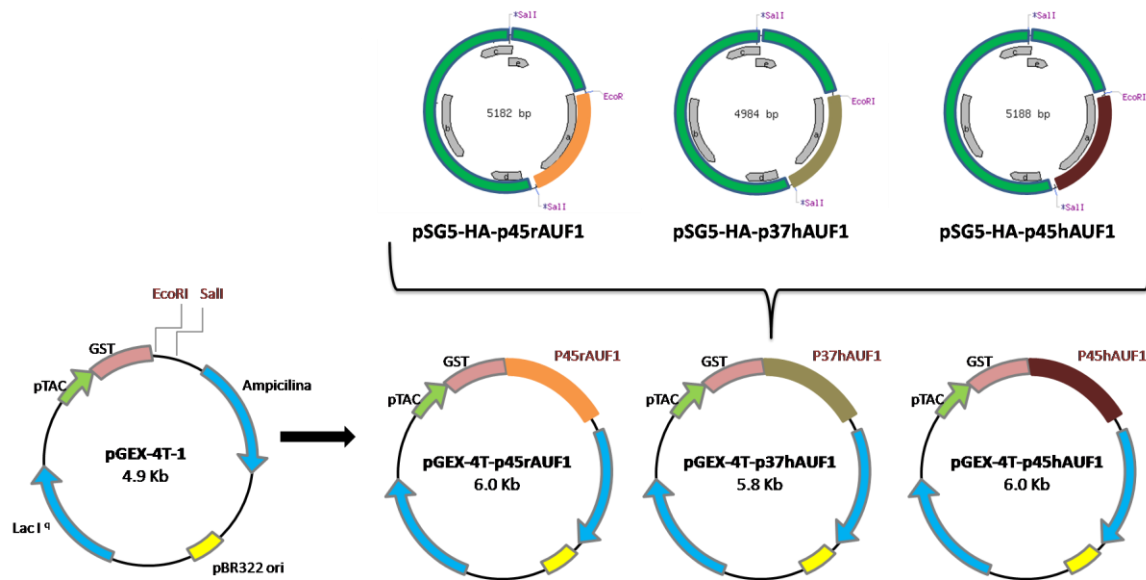


Figura 13. Estrategia para la construcción de los vectores pGEX4T-AUF1. Se muestra el vector pGEX4T-1 con los sitios EcoRI y Sall río abajo de la etiqueta de GST, en donde se insertaron las secuencias de p45hAUF1, p37hAUF1 y p45rAUF1, obtenidas por digestión con EcoRI y Sall de los vectores pSG5-HA-p45hAUF1, pSG5-HA-p37hAUF1 y pSG5-HA-p45rAUF1 (donadas por el Dr. Robert Schneider)

3.6.3.1 Inducción de pGEX4T-1-p45rAUF1, pGEX4T-1-p37hAUF1, pGEX4T-1-p45hAUF1 y pGEX4T-1

Se transformaron los plásmidos pGEX4T-1, pGEX4T-p45rAUF1, pGEX4T-p37hAUF1 y pGEX4T-p45hAUF1 en *E. coli* de la cepa Top10F'. Se sembraron en medio sólido LB-Ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37°C. De cada transformación se aislaron colonias independientes y se creció un pre-inóculo en 20 mL de medio líquido LB-Ampicilina. El pre-inóculo se creció a 37°C durante 18 horas en agitación. Se sembraron 100µL del pre-inóculo en un matraz con 50mL de medio líquido LB-ampicilina hasta llegar a una $DO_{600nm} = 0.1$, alcanzándose aproximadamente a las 2 horas a 37°C y en agitación. Una vez alcanzada la DO adecuada se indujo con 125µL de IPTG 200mM para una concentración final de 0.5mM y se tomaron muestras de 2 ml del cultivo a los tiempos de 0, 2 y 4 horas, congelándose inmediatamente a -20°C para su posterior análisis.

Con base en las densidades ópticas de las muestras tomadas a las 0, 2 y 4 horas de inducción de los plásmidos pGEX4T-1, pGEX4T-p45rAUF1, pGEX4T-p37hAUF1 y pGEX4T-p45hAUF1 en bacterias Top10F', se calcularon los volúmenes utilizados para obtener una pastilla de bacterias equivalente, para cargarse al gel (**Tabla I**). Se asignó arbitrariamente el volumen máximo de 60µL a la muestra con la absorbancia menor (0.073) y basándonos en eso calculamos la equivalencia para el resto de las muestras.

Vector	DO ₆₀₀ (0 h)	μL p/pastilla	DO ₆₀₀ (2 h)	μL p/pastilla	DO ₆₀₀ (4 h)	μL p/pastilla
pGEX4T-p45rAUF1	0.073	60	0.095	50	0.089	50
pGEX4T-p37hAUF1	0.075	58.4	0.094	49	0.088	50
pGEX4T-p45hAUF1	0.166	26.4	0.201	23.1	0.172	25.9
pGEX4T-1	0.094	46.6	0.129	36	0.114	39

Tabla II. Valores de DO₆₀₀ de las muestras de inducción de p45rAUF1, p37hAUF1 y p45hAUF1 y cálculo de volúmenes equivalentes.

Los volúmenes calculados en la tabla I se centrifugaron a máxima velocidad por 2 minutos, se retiró el sobrenadante y la pastilla de bacterias se suspendió en 10μL de agua + 10μL de buffer de carga 2X para SDS-PAGE. Se calentaron las muestras a 94°C por 5 minutos, se cargaron en un gel desnaturante de acrilamida al 12 % y se corrieron durante 4 horas a 70V. El gel se reveló mediante tinción con azul de comassie.

3.6.4 Validación de los anticuerpos T10, G10 y AB995

Las muestras de 2 horas de cada experimento de inducción se corrieron por triplicado en geles desnaturantes de acrilamida al 12%. Se tomaron volúmenes equivalentes de los cultivos de producción de GST, GST-p45rAUF1, GST-p37hAUF1 y GST-p45hAUF1 (72μL 100μL, 100μL y 50μL respectivamente). Las muestras se centrifugaron a máxima velocidad por 2 minutos, se retiró el sobrenadante y la pastilla de bacterias se suspendió en 10μL de agua + 10μL de buffer de carga 2X para SDS-PAGE. Se calentaron las muestras a 94°C por 5 minutos. Los geles se corrieron a 70V durante 4 horas y fueron transferidos a una membrana de PVDF previamente activada con metanol al 100% durante 2 minutos, la transferencia se realizó durante toda la noche a 4°C y a 35V. La transferencia se confirmó mediante tinción con el colorante rojo de Ponceu para las tres membranas. Las membranas se lavaron con TBST 1X hasta eliminar el colorante rojo de Ponceu y se reactivaron con metanol 100% durante 2 minutos antes de bloquearlas con la solución TBST-Blotto A durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tiempo de bloqueo, se incubó cada membrana con un único anticuerpo en una dilución 1:1000 del anticuerpo primario en TBST 1X durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Los anticuerpos primarios anti AUF1 utilizados fueron el anticuerpo AB995 donado por Dr. Robert Schneider y los anticuerpos G10 y T10 de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology. Después de la incubación con los anticuerpos primarios se dieron tres lavados de 5 minutos en agitación con TBST 1X y se incubaron las membranas durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente, con su anticuerpo secundario correspondiente en una dilución 1:3000 en TBST 1X. Para AB995 se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a HRP y para G10 y T10 se utilizó un anticuerpo secundario anti- IgG de cabra conjugado a HRP. Se lavó la membrana 5 minutos por triplicado con TBST 1X y una vez más durante 5 minutos con TBS 1X.

El western blot se reveló mediante detección de quimioluminiscencia utilizando los reactivos del estuche “Western Blot Luminol Reagent” de la casa comercial Santa Cruz biotechnology.

3.6.5 Aislamiento de ARN total

El aislamiento del ARN total se realizó a partir de células PC12, PC12-Wnt1+, PC12-HB+ y PC12-HB-, utilizando el estuche RNAqueous-4PCR de AMBION siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.6.6 Síntesis del ADNc a partir del 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 β -actina. El modelo de estudio además se validó mediante una RT-PCR específica contra el mensajero del oncogen wnt1.

Condiciones de la RT-PCR:

β -actina (μ L)	RT-PCR	Wnt1 (μ L)
2.6	H ₂ O NF	2.6
3.0	Go Taq Green MM 2X	3.0
0.2	Mezcla de oligos 20pM/ μ L	0.2
0.2	ADNc	0.2

Programa de PCR:

β -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 - α	Terminación	4°C - α

3.6.7 Obtención de los extractos proteicos

La obtención de las fracciones proteicas de núcleo y citoplasma, se obtuvieron a partir de las líneas celulares en cultivo PC12, PC12-Wnt1+, PC12-HB+ y PC12-HB-, utilizando el estuche comercial PARIS Kit de AMBION siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los extractos proteicos correspondientes a núcleo y citoplasma fueron resueltos por electroforesis, en un gel de acrilamida al 12% y revelados mediante tinción con azul brillante de comassie, para confirmar su integridad.

3.6.8 Amplificación de los marcos de lectura completos de las isoformas de AUF1, a partir de ADNc de células PC12 y de las secuencias clonadas en los vectores pSG5HA-rAUF1

Para establecer las condiciones óptimas de amplificación, utilizamos como templado en un ensayo de PCR, las secuencias completas de las cuatro isoformas de AUF1 contenidas en los plásmidos PSG5-HA (Figura 8 A, C, D y E).

PCR estándar del marco de lectura de AUF1 utilizando Green Gotaq Master Mix de Promega:

pSG5HA	p37rAUF1	p40rAUF1	p42rAUF1	p45rAUF1
H ₂ O NF (μL)	3.5	3.5	3.5	3.5
Gotaq master mix (μL)	5.0	5.0	5.0	5.0
Mezcla de oligos 20pM/μL (μL)	0.5	0.5	0.5	0.5
ADNc PC12 (μL)	1	1	1	1

PROGRAMA PCR	
Desnaturalización	94°C -5 minutos
Desnaturalización	94°C -30 segundos
Alineamiento / Extensión	68°C – 2 minutos
Ciclos	37 ciclos
Terminación	4°C – α

Se montó un ensayo de PCR especializado en la amplificación de secuencias ricas en G y C con el estuche comercial Advantage for GC-rich de Clontech siguiéndose las recomendaciones de la casa comercial. Primeramente se estandarizaron las condiciones de uso del estuche comercial probándose dos temperaturas de alineamiento/extensión de 68°C y 64°C, y concentraciones de 0M, 0.5M y 1.0M de GC melt. Para la estandarización se utilizó como templado el ADNc de la línea celular PC12/Hb+ y para la amplificación del marco de lectura se utilizaron las secuencias completas de AUF1 procedentes de los vectores pSG5HA-rAUF1. Y se incluyó un control de amplificación del marco de lectura de AUF1 a partir de ADNc de células PC12 y utilizando el kit de amplificación Master Mix Go Taq polymerase (Promega)

Condiciones y PCR para estandarización:

Alineamiento/ Extensión	68°C			64°C		
	0M	0.5M	1.0M	0M	0.5M	1.0M
Concentración GC Melt						
H ₂ O NF (μL)	11.5	9.0	6.5	11.5	9.0	6.5
Buffer GC 5X (μL)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
GC Melt (μL)	0	2.5	5.0	0	2.5	5.0
ADNc PC12 (μL)	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
Mezcla de oligos 20pM/μL	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Mezcla de dNTP 50X (μL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Advantage GC polimerasa (μL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

68 C	PROGRAMA PCR	64 C
94°C -5 minutos	Desnaturalización	94°C -5 minutos
94°C -30 segundos	Desnaturalización	94°C -30 segundos
68°C -2 minutos	Alineamiento / Extensión	64°C – 2 minutos
37 ciclos	Ciclos	37 ciclos
4°C – α	Terminación	4°C – α

Condiciones y PCR para amplificar el Marco de lectura de AUF1 a partir de las secuencias clonadas en los vectores pSG5HA:

	pSG5HA- p37rAUF1	pSG5HA- p40rAUF1	pSG5HA- p42rAUF1	pSG5HA- p45rAUF1
H ₂ O NF (μL)	3.6	3.6	3.6	3.6
Buffer GC 5X (μL)	2.0	2.0	2.0	2.0
GC Melt (μL)	1.0	1.0	1.0	1.0
ADN (plásmido 1:5) (μL)	2.5	2.5	2.5	2.5
Mezcla de oligos 20pM/μL	0.5	0.5	0.5	0.5
Mezcla de dNTP 50X	0.2	0.2	0.2	0.2
Advantage GC Polimerasa	0.2	0.2	0.2	0.2

PROGRAMA PCR	
Desnaturalización	94°C -5 minutos
Desnaturalización	94°C -30 segundos
Alineamiento / Extensión	64°C – 2 minutos
Ciclos	37 ciclos
Terminación	4°C – α

3.6.9 Análisis del efecto de la expresión de Wnt1 sobre la distribución núcleo-citoplasma de AUF1 mediante Western Blot.

Se corrieron 50 µg de proteína total de citoplasma y 20 µg de proteína total nuclear de cada una de las líneas celulares en un gel desnaturalizante de acrilamida al 12% a 70 volts durante 4 horas. Las proteínas resueltas en el gel fueron transferidas a una membrana de PVDF a 35 volts durante 18 horas. Cada membrana se reveló mediante el uso del colorante rojo de Ponceu, y se utilizaron para la detección por western blot de las isoformas de AUF1 en ambas fracciones y para cada línea celular, utilizando un anticuerpo contra AUF1 denominado 995AB (**Ver sección 3.6.4 y 4.4**) el cual fue donado amablemente por el Dr. Robert Schneider (Cornell University). Las membranas se revelaron mediante el uso de quimioluminiscencia utilizando un estuche comercial Luminol Reagent de Santa Cruz Biotechnology.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Construcción de los vectores pSG5-HA-p37rAUF1, pSG5-HA-p40rAUF1 y pSG5-HA-p42rAUF1.

El vector pSG5-HA-11n-p37rAUF1 fue sometido a digestión con las enzimas EagI y AseI, generándose dos fragmentos de 2932 y 2057 pb respectivamente. El fragmento de 2057 pb se purificó de un gel de agarosa al 1.5% y se ligó con el fragmento purificado de 2921 pb, generado durante la digestión de pSG5-HA-p45rAUF1 con las enzimas EagI y AseI, para generar el vector pSG5-HA-p37rAUF1. La secuenciación comprobó que pSG5-HA-p37rAUF1 eliminó 11 nucleótidos entre el sitio EcoRI y el ATG inicial de p37rAUF1. (**Figura 14**) (**Secuencia ver Anexo I**)

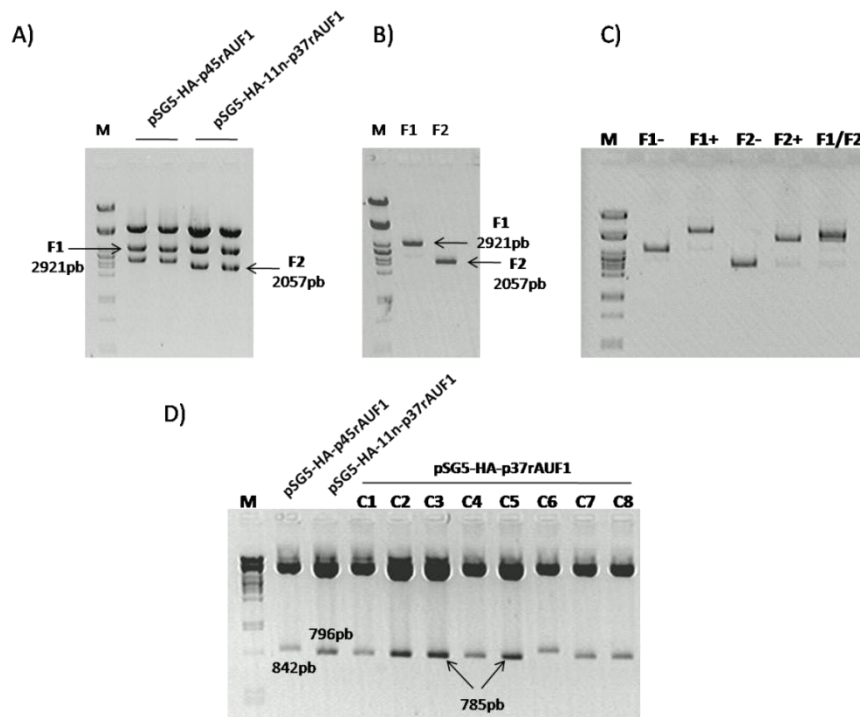


Figura 14. Construcción de pSG5-HA-p37rAUF1. A) Se muestran los fragmentos utilizados para generar el vector pSG5-HA-p37rAUF1, generados por la digestión EagI/AseI de los vectores pSG5-HA-p45rAUF1 y pSG5-HA-11n-p37rAUF1. B) Los fragmentos denominados como F1(2921pb) y F2(2057pb) se purificaron y se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%. C) Gel de ligación donde se muestran los controles sin ligasa (F1- y F2-) y con ligasa (F1+ y F2+), además de la ligación entre F1 y F2 (F1/F2). D) Imagen del gel utilizado para caracterizar los candidatos de la ligación F1/F2 (pSG5-HA-p37rAUF1) por medio de digestión EcoRI/SacI que genera para pSG37 una banda de 785pb correspondiente a la eliminación del inserto de 11 nucleótidos de pSG5-HA-11n-p37rAUF1. C3 y C2 se eligieron para su comprobación por secuenciación.

Para generar los vectores pSG5-HA-p40rAUF1 y pSG5-HA-p42rAUF1, se digirieron los vectores pSG5-HA-p37rAUF1 y pSG5-HA-p45rAUF1 con las enzimas EcoRI y SacI, generando fragmentos de 4193 pb / 785 pb y 4340 pb / 842 pb respectivamente y se intercambiaron los fragmentos de menor tamaño. Las construcciones fueron verificadas por restricción y secuenciación. (Figura 15)(Secuencias ver Anexo I)

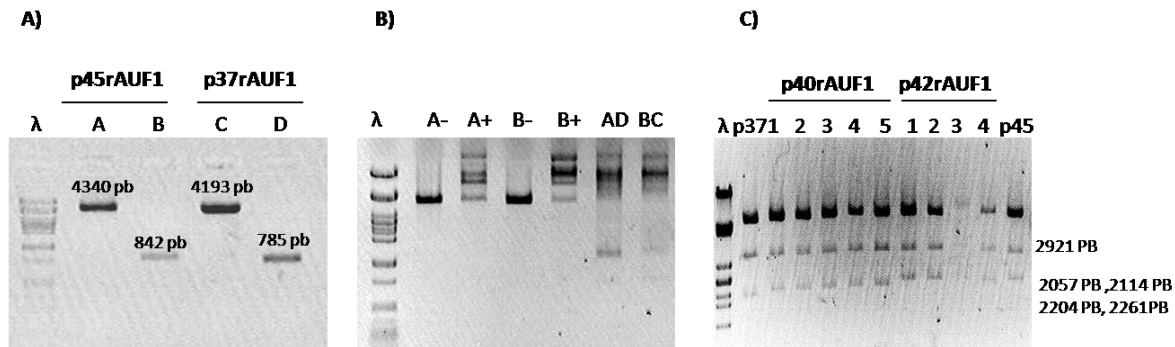


Figura 15. Construcción de los vectores pSG5HA-p40rAUF1 y pSG5HA-p42rAUF1. A) Digestión EcoRI/SacI de los plásmidos pSG5-HA-p45rAUF1 y pSG5-HA-p37rAUF1, se muestran los fragmentos purificados. B) Ligación entre los fragmentos de 4340 pb / 785 pb (AD) y 4193 pb / 842 pb (BC) para generar pSG5-HA-p42rAUF1 y pSG5-HA-p40rAUF1 respectivamente. C) Gel de caracterización de los candidatos de las ligaciones AD y BC, utilizando las enzimas EagI/Asel.

4.2 Construcción de los vectores pCMV-Myc-AUF1

Construimos los vectores pCMV-Myc-p37rAUF1, pCMV-Myc-p40rAUF1, pCMV-Myc-p42rAUF1 y pCMV-Myc-p45rAUF1, que expresan las isoformas de AUF1 fusionadas a una etiqueta de Myc en su región amino terminal y dirigidas por el promotor de citomegalovirus (pCMV) (Figura 9).

Se digirieron los plásmidos pSG5-HA-p37rAUF1, pSG5-HA-p40rAUF1, pSG5-HA-p42rAUF1 y pSG5-HA-p45rAUF1 con las enzimas PvuII y EcoRI. Se purificaron los fragmentos más grandes de cada digestión y fueron ligados de manera independiente con un fragmento de PCR con extremos compatibles (Figura 16). El fragmento de PCR se obtuvo utilizando los primers CMV 5' PvuII (011) y Myc 3'EcoRI (012) y como templado el plásmido pCDNA3-Myc-TBP (Figura 5). Los vectores pCMV-Myc-rAUF1 fueron secuenciados antes de ser utilizados para transfección. (Secuencia ver Anexo I)

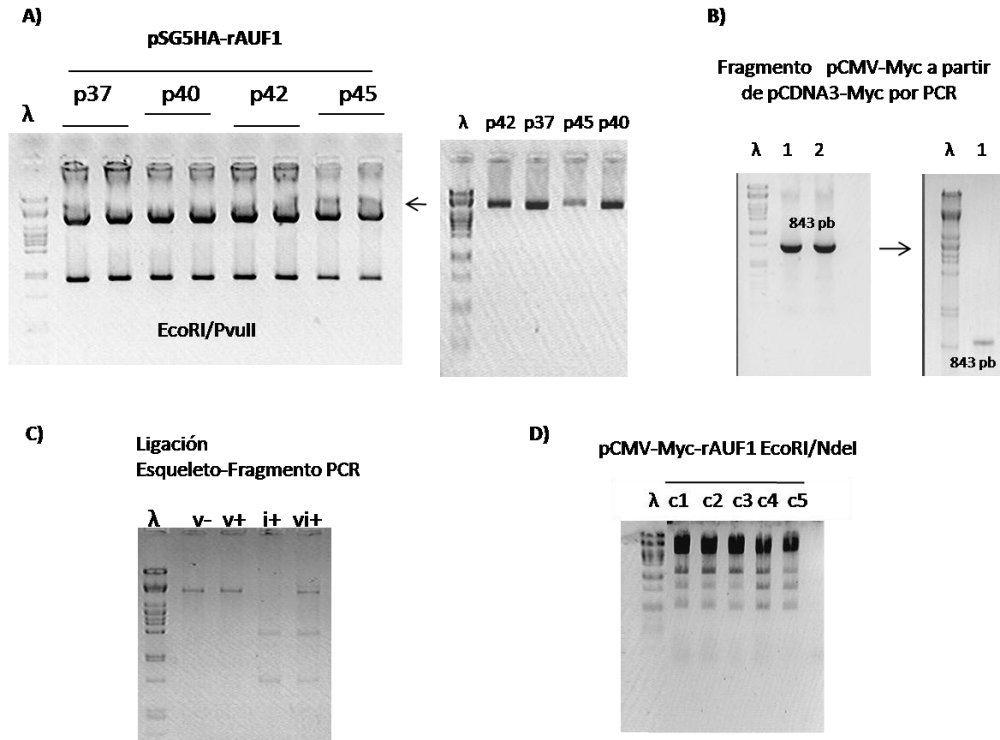


Figura 16. Generación de los vectores pCMV-Myc-AUF1. **A)** Digestión EcoRI/PvuII de los plásmidos pSG5-HA-p37rAUF1, pSG5-HA-p40rAUF1, pSG5-HA-p42rAUF1 y pSG5-HA-p45rAUF1, como estrategia para remover el promotor de SV40 y la etiqueta de hemaglutinina (HA); también se muestran los fragmentos de los esqueletos purificados. **B)** Amplificación por PCR del promotor de CMV y la etiqueta de Myc, con los iniciadores CMV 5' PvuII / Myc 3' EcoRI. **C)** Gel de ligación del fragmento CMV-Myc en el esqueleto pSG5-HA-rAUF1 entre los sitios PvuII y EcoRI, utilizando un vector (v) defosforilado para aumentar la eficiencia de ligación. **D)** Caracterización del vector pCMV-Myc-rAUF1 utilizando las enzimas NdeI/EcoRI. **C** y **D** corresponden a la ligación y caracterización del pCMV-Myc-p45rAUF1.

4.3 Construcción de los vectores pGEX4T-1-rAUF1

Los vectores pGEX4T-1-AUF1 fueron construidos para producir de manera rápida y sencilla, las proteínas AUF1 en un sistema bacteriano (E.coli), con la finalidad de utilizar las proteínas como controles positivos para evaluar los anticuerpos anti-AUF1 con los que contamos en el laboratorio de biología molecular mediante ensayos de western blot. Las secuencias clonadas en el vector pSG5-HA de las isoformas p45rAUF1, p37hAUF1 y p45hAUF1, se obtuvieron mediante digestión con las enzimas EcoRI y Sall (1222pb, 1024 y 1228pb respectivamente) y se clonaron entre los mismos sitios en el vector pGEX4T-1 donado amablemente por el Dr. Pavel Isa (UNAM) (**Figura 17**). Se clonaron dos secuencias de humano (p37hAUF1 y p45hAUF1) y una secuencia de rata (p45rAUF1), para confirmar que los anticuerpos sirven para esas especies. (**Secuencias ver Anexo I**)

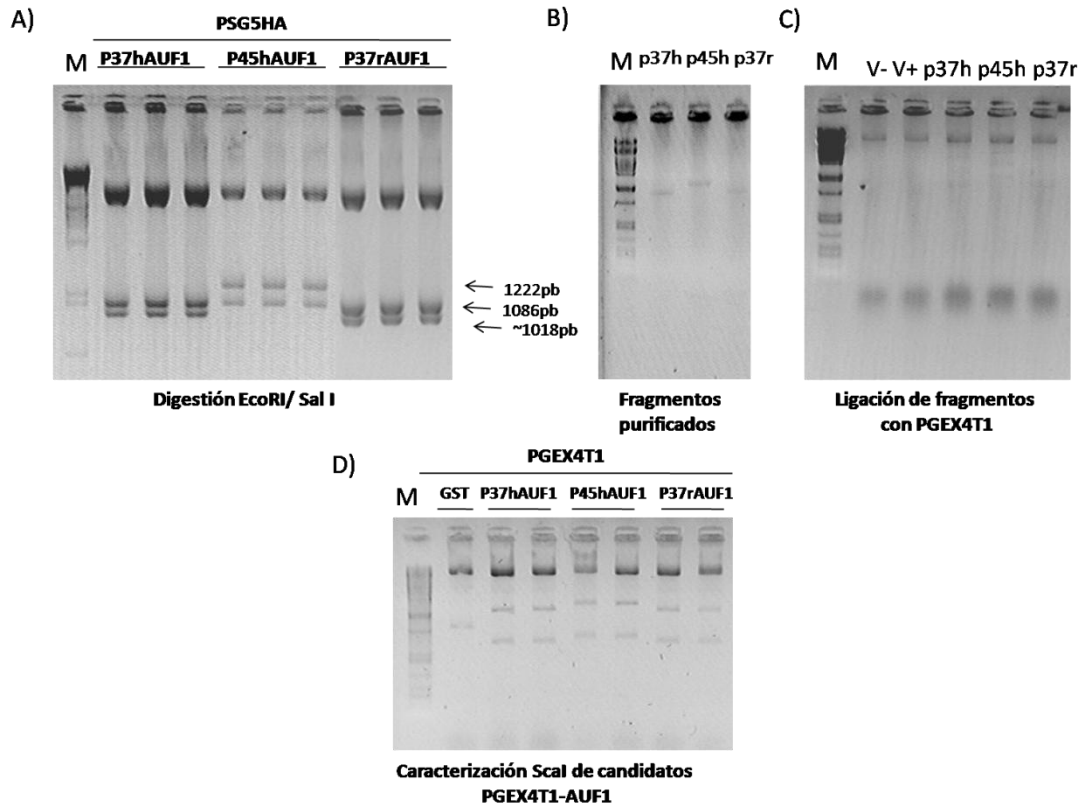


Figura 17. Construcción de los vectores PGX4T1-AUF1. A) Digestión de los vectores PSG5HA-AUF1 con enzimas EcoRI/Sal I. B) Se purificaron los fragmentos que contenían las secuencias de p45 y p37 de humano y la p37 de rata. C) Se ligó cada fragmento purificado con el vector PGEX4T1 digerido previamente con EcoRI/ Sal I. D) Se caracterizaron los candidatos mediante una digestión enzimática, utilizando la enzima Scal.

4.3.1 Producción de GST-AUF1 en *E. coli* Top10F'

La producción de las proteínas de fusión GST-p37hAUF1, GST-p45hAUF1 y GST-p45rAUF1 de aproximadamente 62KD, 70KD y 70KD respectivamente, se realizó en la cepa *E. coli* Top10F' utilizando los vectores pGEX4T-1-AUF1 (**Figura 6**). Se transformaron los vectores pGEX4T-1- que expresan las proteínas p37hAUF1, p45hAUF1 y p45rAUF1 fusionadas en su extremo N-terminal a la glutatión-S transferasa (GST) y pGEX4T-1 que solo expresa la GST. Se generó un pre-inóculo, se inoculó 50mL de medio, se incubó hasta una $DO_{600nm} = 0.6$ y se indujo con IPTG. El tiempo total de inducción fueron 4 horas durante las cuales se tomaron muestras de a las 0, 2 y 4 horas.

Utilizando geles de acrilamida desnaturalizantes se observó que la producción de las proteínas fusionadas a GST era notoria desde las 2 horas y que dicha producción no difería mucho a las 4 horas después de la inducción. Se utilizó el vector pGEX4T-1 como control de expresión el cual produce una banda de menor tamaño correspondiente a GST. (**Figura 18**)

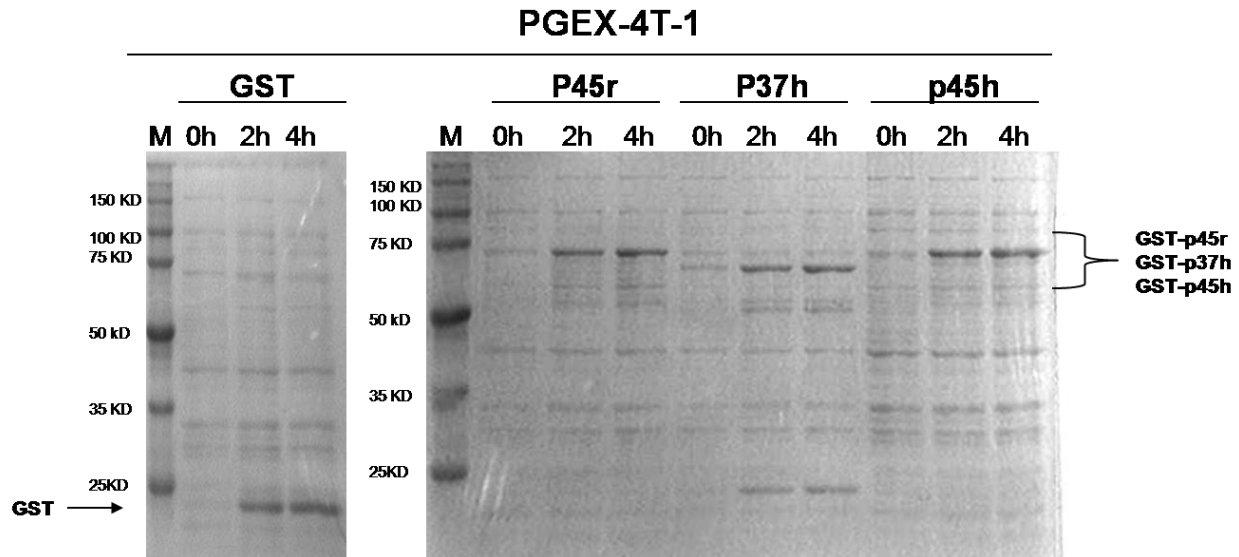


Figura 18. Producción de GST, GST-p45rAUF1, GST-p37hAUF1 y GST-p45hAUF1 en *E. coli* Top10F'. En la imagen se muestra la producción de las proteínas de fusión GST-p45rAUF1, GST-p37hAUF1 y GST-p45hAUF1 en la cepa Top10F' a partir de las construcciones en el vector pGEX4T-1 y como control la expresión de GST del vector pGEX4T-1 vacío. Para las proteínas de fusión y el control, observamos una banda incrementada del tamaño esperado, hasta las 2 horas la cual se mantuvo a las 4 horas.

4.4 Validación de la funcionalidad de anticuerpos Anti-AUF1.

En el laboratorio de biología molecular contamos con tres diferentes anticuerpos contra las proteínas AUF1: **T10**, **G10** de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology y **AB995** donado amablemente por el Dr. Robert Schneider (Cornell University, N.Y.). Mientras que AB995 y T10 fueron diseñados para detectar las cuatro posibles isoformas de AUF1, G10 fue diseñado para detectar únicamente a las isoformas p45AUF1 y p42AUF1. Las proteínas de fusión GST-p45rAUF1, GST-p37hAUF1 y GST-p45hAUF1 producidas a partir del vector pGEX4T-1, fueron utilizadas como control positivo para una evaluación de los anticuerpos T10, G10 y AB995 mediante western blot.

Se tomaron volúmenes equivalentes de los cultivos de producción de GST-p45rAUF1, GST-p37hAUF1 y GST-p45hAUF1, se centrifugaron se descartó el sobrenadante y las pastillas de bacterias se lisaron en 10 μ L de agua NF + 10 μ L de buffer de carga 2X para SDS-PAGE durante 5 minutos a 94 C. Se procesó también el cultivo de GST como control para diferenciar entre la señal producida por las fusiones GST-AUF1 y el fondo de proteínas de la bacteria. Lo anterior se realizó por triplicado para obtener una membrana por cada anticuerpo a ser probado.

Las muestras se corrieron en un gel desnaturalizante de acrilamida al 12 %. Cada set de muestras se transfirió a una membrana de PVDF. Se incubó cada membrana con su anticuerpo primario correspondiente diluido 1:1000 en TBST 1X y con una dilución de anticuerpo secundario 1:3000.

Únicamente la membrana utilizada para probar el anticuerpo AB995 presentó una señal clara en los tres extractos y no presentó reacción cruzada con las proteínas de la bacteria en el extracto de GST; sin embargo se presentó más de una banda en los extractos correspondientes a GST-AUF1. Esto se adjudica a productos de la degradación de las proteínas de fusión, debido a que el medio no fue suplementado con inhibidores de proteasas (**Figura 19**).

En el caso de T10 se observa una línea tenue en el carril de p37hAUF1 sin embargo la señal no es clara ni intensa y se presenta señal no específica en los otros extractos incluyendo el extracto para GST solo, lo que implica una reacción cruzada contra proteínas propias de la bacteria. En la membrana de G10 no se observa una banda definida, se aprecia un fondo inespecífico en todos los extractos (**Figura 19**).

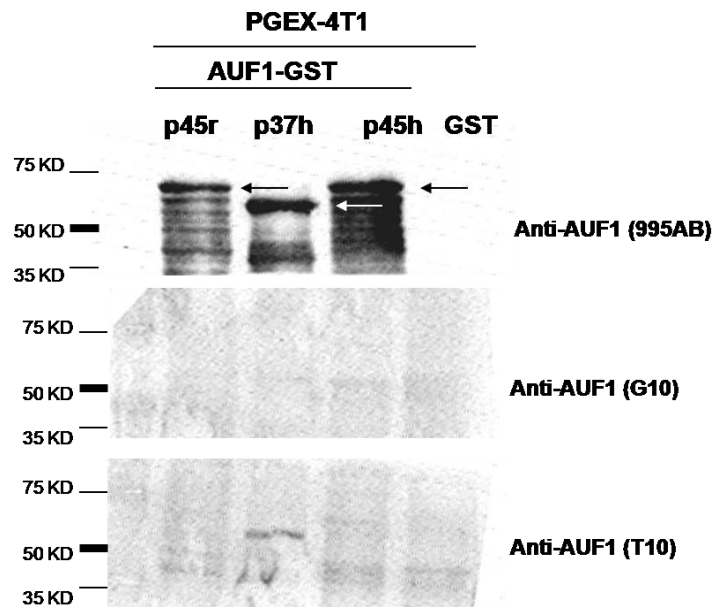


Figura 19. Validación de la funcionalidad de anticuerpos Anti-AUF1. Los anticuerpos AB995, G10 y T10 fueron probados contra extractos proteicos de bacterias que producen las proteínas de fusión GST-p45rAUF1, GST-p37hAUF1, GST-p45hAUF1 y GST sola, a partir de las construcciones pGEX4T-1-AUF1 y pGEX4T-1. Únicamente AB995 detecta de manera eficiente y específica a las tres proteínas de fusión indicadas por las flechas que señalan las tres bandas principales, las bandas inferiores corresponden a productos de degradación debido a que el medio no se suplemento con inhibidores de proteasas. G10 mostro un patrón inespecífico y T10 detecto GST-p37hAUF1 muy tenuemente pero no GST-p45hAUF1 y GST-p45rAUF1, además de presentar bandas inespecíficas en el extracto de GST solo.

4.5 Validación del modelo celular.

Para demostrar que únicamente las líneas celulares PC12/Wnt1+ y PC12/HB+ expresan el oncogen Wnt1 de manera constitutiva, se realizó un ensayo de RT-PCR en cDNA de líneas celulares PC12, para amplificar el gen Wnt1. En la **Figura 20** se muestra el resultado de la PCR en donde se observa amplificación únicamente en los carriles correspondientes a los cDNAs de PC12/Wnt1+ y PC12/HB+, mientras que no se detecta ninguna banda amplificada en los extractos de PC12 y PC12/HB-. Como control del experimento se realizó una PCR contra el gen de la b-actina.

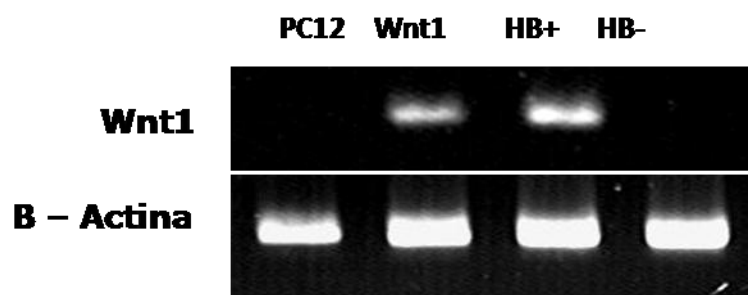


Figura 20. Expresión de wnt1 en células PC12. Por PCR se analizó la expresión del oncogen wnt1 en las cuatro líneas celulares de PC12 y se normalizó la carga de ADNc por medio de una PCR contra el mensajero de β -actina.

4.6 El elevado contenido de G y C en la secuencia de los exones 1 y 2 del marco de lectura de AUF1 provoca deleciones que se generan durante la amplificación por PCR.

Con anterioridad en un intento por aislar el marco de lectura de las cuatro isoformas de AUF1 a partir de células PC12, se aislaron secuencias aberrantes las cuales presentaban la ausencia de una región de tamaño variable localizada en el extremo 5' del marco de lectura comprendiendo la región de los exones 1 y 2. En su mayoría estas deleciones generaban codones prematuros de terminación lo que provocaba la no traducibilidad de estas secuencias; sin embargo la ausencia de la región comprendida entre las bases 59 y 168 generaba un marco de lectura completo de las secuencias que presentaban esta deleción, pudiendo también presentarse el splicing característico de los exones 2 y 7.

Con la posibilidad de haber aislado nuevas isoformas, generadas por un evento de "splicing" diferente a lo ya reportado, nos enfocamos en dilucidar el origen de las secuencias aisladas por PCR a partir de células PC12. En un análisis de secuencia del marco de lectura de AUF1 (**Figura 21**) se encontró que el contenido de G y C de la secuencia de los exones 1 y 2 corresponde al 70% mientras para el resto de la secuencia comprendida entre el exón 3 y el exón 8 el contenido de G y C es de 44%.

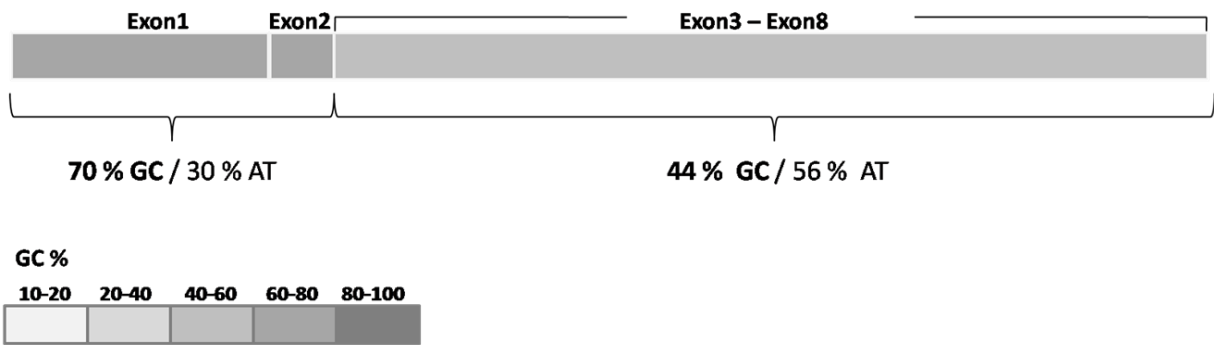


Figura 21. Representación esquemática del contenido de GC en el marco de lectura de AUF1.

Con anterioridad algunos autores han reportado problemas de amplificación relacionados al alto contenido de G y C en la secuencia del templado, por lo que montamos un experimento de PCR en donde nos aseguramos de partir de templados completos de las isoformas de AUF1, las secuencias están clonadas en los vectores pSG5HA-rAUF1 los cuales fueron confirmados por secuenciación (Ver anexo X). El resultado de este ensayo de PCR (**Figura 22 B**) nos indicó que mientras los tamaños esperados estaban entre los 850 y 1062 pares de bases, las 4 bandas principales estaban comprendidas entre las 700 y 900 pares de bases, similar a lo que se encontraba cuando se utilizaba como templado ADNc de células PC12 (**Figura 22A**). El resultado de la secuenciación de estos productos de PCR, nos indicaba que la generación de las secuencias aberrantes, se producía durante la amplificación del marco de lectura de AUF1 por PCR (**Ver Alineamiento Anexo II**).

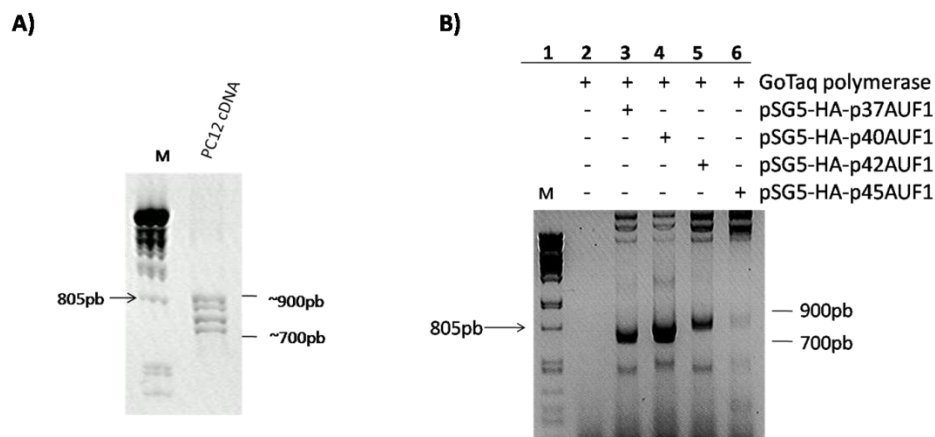


Figura 22. Las secuencias aberrantes de AUF1 corresponden a artefactos generados durante la PCR. A) Las 4 bandas principales se ubican entre 700 y 900 pb cuando se amplifica el marco de lectura de AUF1 a partir de ADNc de células PC12. **B)** Cuando se utilizan como templado las secuencias completas de AUF1 clonadas en el vector pSG5HA-rAUF1, los productos de la PCR se ubican también entre 700 y 900 pb, y son secuencias truncas confirmadas por secuenciación.

Utilizando el estuche Advantage GC 2-PCR de Clontech, especializado en la amplificación de templados con regiones ricas en G y C, se estandarizaron las condiciones de amplificación utilizando como templado el ADNc de células PC12 y se varió la temperatura de alineamiento/extensión y la concentración de agente desnaturalizante GC melt, y como control, la amplificación con el estuche de Master Mix Go Taq (Promega) de los marcos de AUF1 a partir de ADNc de células PC12. **(Figura 23 A)**. Una vez estandarizadas las condiciones fueron 64°C de alineamiento/extensión y 0.5M de GC melt y se montó un ensayo en el cual se utilizó como templado las secuencias clonadas en los vectores pSG5HA-rAUF1. El resultado de esta PCR **(Figura 23 B)** fue la amplificación de 4 bandas principales que se ubicaron entre los 850 y 1062 pares de bases por los que concluimos que la región rica en G y C de los exones 1 y 2 era la responsable de la generación de estos artefactos durante la amplificación por PCR.

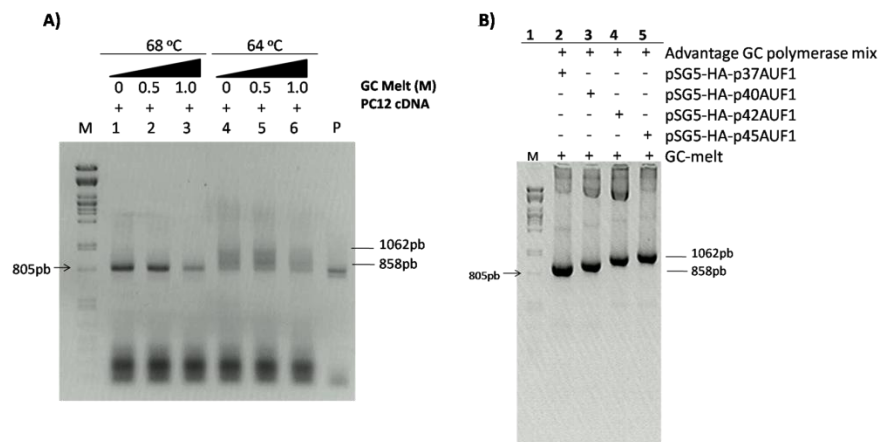


Figura 23. Secuencias ricas GC en el ORF de AUF1 genera errores durante la PCR. A) Ensayo de estandarización para el empleo del estuche comercial Advantage GC 2-PCR para la amplificación del marco de lectura de AUF1, empleando como templado el ADNc de células PC12 y variando la concentración de agente desnaturalizante y la temperatura de alineamiento/extensión. **B)** PCR empleando el estuche comercial Advantage GC 2-PCR en el cual se utilizan como templado las secuencias completas de cada isoforma de AUF1 clonadas en el vector pSG5HA.

4.7 Las proteínas AUF1 se expresan en bajos niveles en las líneas celulares PC12.

Una vez que se obtuvieron los extractos proteicos correspondientes a las fracciones nucleares y citoplásmicas de las líneas celulares PC12, PC12-Wnt1+, PC12-Hb+ y PC12-Hb-. Se corrieron el equivalente a 5 y 20 microgramos respectivamente en geles de poliacrilamida al 12% **(Figura 24)**.

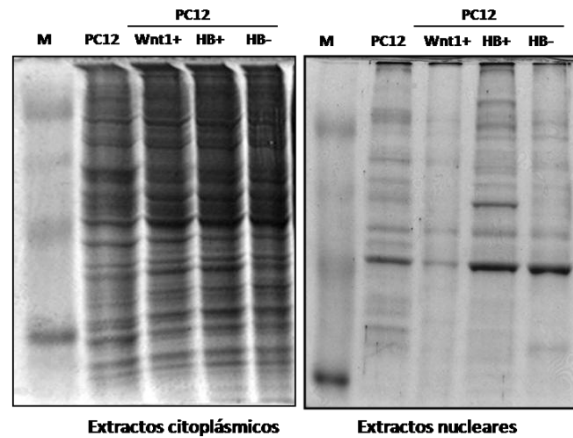


Figura 24. Geles de poliacrilamida al 12%. Extractos citoplásMICOS (20µg) y nucleares (5µg).

Dichos extractos se utilizaron para detectar la presencia de las isoformas de la proteína AUF1 en ambos compartimentos para cada una de las líneas celulares (**Figura 25**). Se utilizó el anticuerpo 995AB (IgG de Conejo-Anti-AUF1, donado por el Dr. Robert Schneider) para la detección de las isoformas de AUF1 en cada extracto de los cuales se cargaron cantidades equivalentes a 50 microgramos de extractos proteicos de citoplasma y 20 microgramos de extracto proteico de núcleo. Aun y cuando en los extractos citoplásMICOS y nucleares se utilizaron cantidades elevadas de proteína total (50 y 20 microgramos respectivamente), únicamente fue posible detectar la presencia de AUF1 en el compartimiento nuclear con una intensidad muy baja. Sin embargo fue imposible detectar señal alguna en los extractos correspondientes a citoplasma en los cuales si se pudo detectar la presencia del gen control β -actina. En ambos ensayos se utilizó como control positivo de la técnica, un extracto crudo de *E. coli* productora de GST-p37rAUF1, el cual dio señal en ambas membranas confirmando que la técnica fue bien realizada.

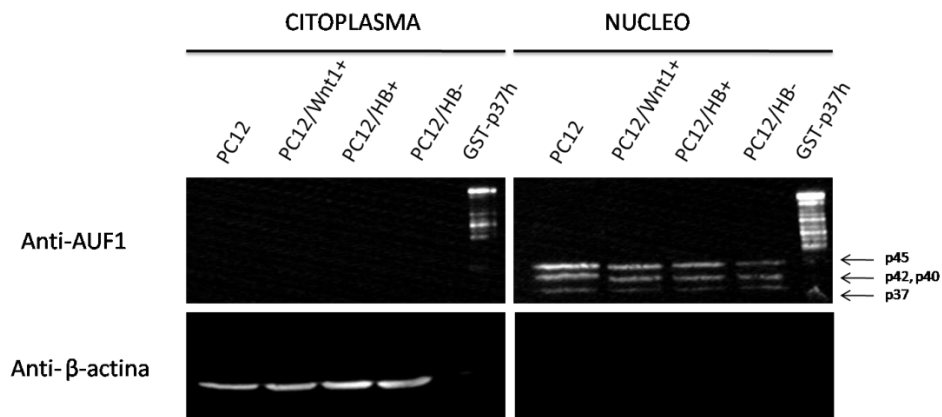


Figura 25. Western Blot contra AUF1 en compartimentos citoplásMICOS y nucleares. WB contra AUF1 utilizando el anticuerpo 995AB.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La expresión de un gene es la suma de la participación de varios mecanismos de regulación, los cuales son a su vez influidos por estímulos dependientes del entorno celular. Las isoformas de AUF1 están relacionadas al proceso de recambio de ARNm en el citoplasma a través de la unión de AUF1 a elementos ricos en A y U (ARE's por sus siglas en inglés) localizados en la región 3' no traducible (3' UTR) de los mensajeros blanco de AUF1.

Aunque la función de AUF1 depende principalmente de su expresión, existen además mecanismos que regulan su función a otros niveles tales como la distribución núcleo-citoplasma de las isoformas de AUF1, las cuales han sido reportadas como proteínas principalmente nucleares y que sin embargo poseen la capacidad de viajar a través de la membrana nuclear hacia el citoplasma en donde se sabe interaccionan con elementos ARE dirigiendo la degradación de mensajeros de citocinas y proto-oncogenes como c-Fos, c-Myc y ciclina D1 los cuales coincidentemente resultan ser blancos transcripcionales de la vía de señalización Wnt/ β -catenina.

En el 2006 en un intento por aislar las secuencias de las 4 isoformas de AUF1 por PCR a partir de ADNc de células PC12 nos encontramos con secuencias que denominamos "aberrantes", trucas en el extremo 5' de las isoformas en una región que abarcaba la secuencia de los exones 1 y 2, además estas secuencias trucas presentaban el "splicing" característico de las cuatro isoformas de AUF1. Aunque en la mayoría de las secuencias trucas aparecían codones de terminación que impedían la traducibilidad de las isoformas, la depleción de la secuencia comprendida entre la base 59 y 168 generaba marcos de lectura completos que sumados a los eventos de "splicing" de los exones 2 y 7 característicos de las secuencias de AUF1 resultaba en posibles nuevas isoformas mas pequeñas que las ya reportadas.

En este trabajo intentamos identificar el origen de las secuencias "aberrantes" aisladas en el 2006 a partir de ADNc de células PC12 y dilucidar el posible efecto de la denominada vía clásica de Wnt, sobre la expresión génica y la regulación de ciertos aspectos como la distribución núcleo-citoplasma de las isoformas de AUF1.

Durante el estudio identificamos dos aspectos importantes: a) las secuencias aberrantes aisladas a partir de ADNc de células PC12 son artefactos generados durante la PCR por efecto de una región rica en G y C ubicada en el dominio de los exones 1 y 2, b) Las proteínas de las isoformas de AUF1 son expresadas en niveles muy bajos en células PC12 siendo detectable únicamente en núcleo, por lo que hace imposible definir si una fracción no detectable por western blot está presente en la fracción citoplásmica.

5.1 Origen de las secuencias “aberrantes”

La amplificación por PCR de cuatro productos de menor tamaño a la esperado, partiendo de los templados completos de las isoformas de AUF1 (**Figura 22 A**), indica que las secuencias “aberrantes” son generadas durante la amplificación del marco de lectura de AUF1. Sin embargo las deleciones estaban delimitadas a una región conformada por los exones 1 y 2, lo que nos sugirió un efecto dependiente de la secuencia. La amplificación de cuatro productos del tamaño esperado a partir de los templados completos de las isoformas de AUF1 utilizando un estuche comercial especializado en la amplificación de regiones con altos contenidos de G y C (**Figura 23 B**) nos indicó que el efecto aberrante durante la amplificación, se debía al alto contenido de G y C en la secuencia del exón 1 y 2.

Existen reportes en los que altos contenidos de G y C eran responsables de impedir el paso de la polimerasa a través de este tipo de regiones por la formación de estructuras secundarias dentro del templado. El resultado generalmente era la ausencia de señal de la PCR (37,38).

Sin embargo existen además reportes de la formación de productos recombinantes a través del fenómeno de “template switching” en el cual una hebra naciente puede cambiar de templado alineando en sitios homólogos o parcialmente homólogos diferentes al sitio inicial de “priming”, resultando en la formación de productos totalmente diferentes (39-41). Un modelo que explica mejor la formación de las secuencias aberrantes de AUF1 durante la PCR del marco de lectura es aquel en el que se propone la formación de pseudo-primers como resultado de la amplificación trunca debida a las estructuras secundarias generadas por el alto contenido en G y C. Estos pseudo primers pueden en ciclos subsecuentes de PCR, alinear en sitios parcialmente homólogos río abajo del sitio original de alineamiento para el primer (**Figura 26**).

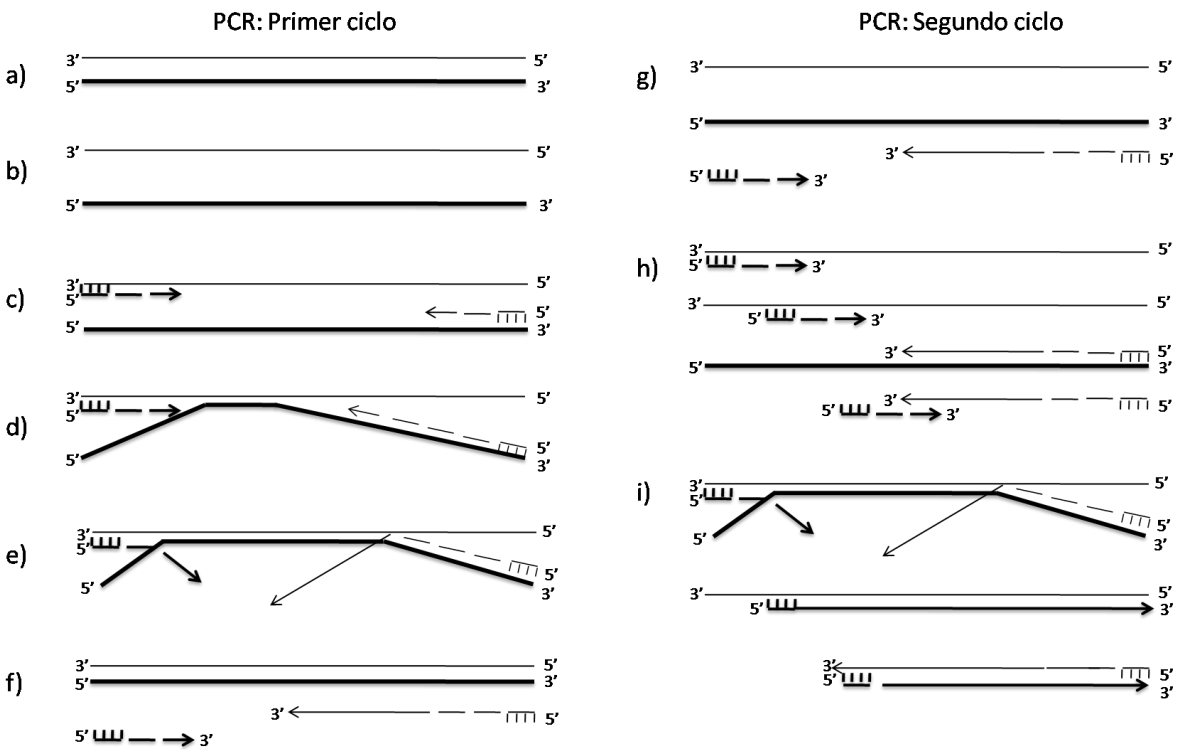


Figura 26. Modelo que explica la formación de secuencias “aberrantes” durante la amplificación del marco de lectura de AUF1. a), b) y c) ADN de doble cadena, paso de desnaturalización del ADN y alineamiento de los primers originales respectivamente. **d)** Rápida renaturalización de las cadenas de ADN en una zona rica en G y C provocando que se generen productos de amplificación truncos que conforme se da el paso de renaturalización son desplazados del templado **e)** y **f)**. **g)** Paso de desnaturalización durante el segundo ciclo de PCR, **h)** en el paso de alineamiento, los primers originales se alinean en su posición correcta mientras que los productos de amplificación truncos pueden actuar como primers alineando en sitios parcialmente homólogos en regiones río abajo del sitio original de alineamiento del primer. **i)** Mientras los primers originales son detenidos por la renaturalización de los templados, los pseudo primers amplifican secuencias completas omitiendo una porción de la secuencia en el extremo 5'.

5.2 Las proteínas de AUF1 se expresan en bajos niveles en células PC12 y aparentemente no sufren cambios en su distribución núcleo-citoplasma por la activación constitutiva de la vía clásica de Wnt.

No obstante que las proteínas de AUF1 son principalmente nucleares, el hecho de que únicamente fueron detectadas en la fracción nuclear, no elimina la posibilidad de que puedan estar presentes en niveles no detectables por Western Blot en la fracción de citoplasma. Es por eso que aunque aparentemente por Western Blot no existe efecto alguno sobre la distribución núcleo-citoplasma de las isoformas de AUF1, es importante validar este resultado mediante el uso de una técnica que no dependa de los niveles endógenos de proteína, como por ejemplo la inmunofluorescencia, que utiliza vectores que permiten la sobre expresión de cada isoforma fusionada a una etiqueta como el epítipo de MYC, para la cual existe ya un anticuerpo comercial disponible. Dichos vectores permitirán monitorear no solo el efecto de la vía clásica wnt sobre la localización núcleo-citoplasma de AUF1, si no que permitirán además probar el efecto de otros estímulos que puedan incidir de manera directa sobre la distribución subcelular de las isoformas de AUF1.

ANEXO I

SECUENCIAS DE LOS VECTORES

VECTORES PSG5-HA-rAUF1

Regiones resaltadas en el texto:

ATGGCTT ACCCATACGA TGTTCCAGAT TACGCT: Inicio de la traducción y epítopo HA

GAAT TC: Sitio de corte EcoRI

Texto en Azul y Negritas: Secuencia del marco de lectura de AUF1

PSG5-HA-p45rAUF1

```
GTCGACTTCT GAGGCGGAAA GAACCAGCTG TGGAATGTGT GTCAGTTAGG GTGTGGAAAG
TCCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAACC
AGGTGTGGAA AGTCCCCAGG CTCCCCAGCA GGCAGAAGTA TGCAAAGCAT GCATCTCAAT
TAGTCAGCAA CCATAGTCCC GCCCCTAACT CCGCCCATCC CGCCCCTAAC TCCGCCCAGT
TCCGCCCATT CTCCGCCCCA TGGCTGACTA ATTTTTTTTA TTTATGCAGA GGCCGAGGCC
GCCTCGGCCT CTGAGCTATT CCAGAAGTAG TGAGGAGGCT TTTTTGGAGG CCTAGGCTTT
TGCAAAAAGC TGGATCGATC CTGAGAACTT CAGGGTGAGT TTGGGGACCC TTGATTGTTT
TTTTTTTTTC GCTATTGTAA AATTCATGTT ATATGGAGGG GGCAAAGTTT TCAGGGTGTT
GTTTAGAATG GGAAGATGTC CTTGTATCA CCATGGACCC TCATGATAAT TTTGTTTCTT
TCACTTTCTA CTCTGTTGAC AACCATTGTC TCCTCTTATT TTCTTTTCAT TTTCTGTAAC
TTTTTCGTTA AACTTTAGCT TGCATTTGTA ACGAATTTTT AAATTCACTT TTGTTTATTT
GTCAGATTGT AAGTACTTTC TCTAATCACT TTTTTTCAA GGCAATCAGG GTATATTATA
TTGTACTTCA GCACAGTTTT AGAGAACAAT TGTATAAAT AAATGATAAG GTAGAATATT
TCTGCATATA AATTCTGGCT GCGGTGGAAA TATTCTTATT GGTAGAAACA ACTACATCCT
GGTCATCATC CTGCCTTCT CTTTATGGTT ACAATGATAT AACTGTTTG AGATGAGGAT
AAAATACTCT GAGTCCAAAC CGGGCCCCTC TGCTAACCAT GTTCATGCC TCTTCTTTTT
CCTACAGCTC CTGGGCAACG TGCTGGTTAT TGTGCTGTCT CATCATTTTG GCAAAGAATT
GTAATACGAC TCACTATAGG GCGAATTTCC ACCATGGCTT ACCCATACGA TGTTCCAGAT
TACGCTGAAT TCAGCACTAT GTCGGAGGAG CAGTTCGGAG GGGACGGGC GGCGGCGCG
GCAACGGCGG CGGTAGGCGG CTCGGCGGGC GAGCAGGAG GAGCCATGGT GGCGGCGCG
CAGGGGGCAG CGGCGGCGGC GGGAAGCGGG AGCGGCGGCG GCTCTGCGGC CGGAGGCACC
GAAGGAGGCA GCACCGAGGC AGAGGGAGCG AAGATCGACG CCAGTAAGAA TGAGGAGGAT
GAAGGCCATT CAAACTCCTC CCCACGACAC ACTGAAGCAG CGACGGCACA GCGGGAAGAA
TGGAAAATGT TTATAGGAGG CTTTAGCTGG GACACCACAA AGAAAGACCT GAAGGACTAC
TTTTCCAAAT TTGGGGACGT TGTAGACTGC ACTCTGAAGT TAGATCCTAT CACAGGGCGA
TCAAGGGGTT TTGGCTTTGT GCTATTTAAA GAGTCGGAGA GTGTAGATAA GGTCATGGAT
CAGAAAGAAC ATAAATTGAA TGGGAAAGTC ATTGATCCTA AAAGGGCCAA AGCCATGAAA
ACAAAAGAGC CCGTCAAAA AATTTTTGTT GGTGGCCTTT CTCCAGACAC ACCTGAAGAA
AAAATAAGAG AGTACTTTGG TGGTTTTGGT GAGGTTGAAT CCATAGAGCT GCCTATGGAC
AACAAGACCA ATAAGAGGCG TGGTCTCTGT TTCATTACCT TTAAGGAAGA GGAACCAGTG
AAGAAGATAA TGGAGAAGAA ATACCACAAT GTTGGTCTTA GTAAATGTGA AATAAAAGTA
GCCATGTCGA AGGAGCAGTA TCAGCAGCAG CAGCAGTGGG GATCTAGAGG AGGTTTTGCA
```

GGAAGAGCTC CCGGAAGAGG CGGTGGCCCC AGTCAAACT GGAACCAGGG ATATAGTAAC
TATTGGAACC AAGGCTATGG CAGCTATGGA TATAACAGCC AAGGGTACGG TGGTTATGGA
GGATATGACT ACAC TGGTTA CAACAGCTAC TATGGATATG GTGACTATAG CAATCAGCAG
AGTGGTTATG GGAAAGTATC CAGACGAGGT GGTCATCAAA ATAGCTACAA ACCATACTAA
GGATCTTATT AAAGCAGAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA TGGTTACAAA TAAAGCAATA
GCATCACAAA TTTCACAAAT AAAGCATTTT TTTCACTGCA TTCTAGTTGT GGTTTGTCCA
AACTCATCAA TGTATCTTAT CATGTCTGGT CGACTCTAGA CTCTTCCGCT TCCTCGCTCA
CTGACTCGCT GCGCTCGGTC GTTCGGCTGC GGCGAGCGGT ATCAGCTCAC TCAAAGGCGG
TAATACGGTT ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA GAACATGTGA GCAAAAAGGCC
AGCAAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC
CCCCTGACGA GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC
TATAAAGATA CCAGGCGTTT CCCCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC
TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG CTTTCTCAAT
GCTCACGCTG TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCGTTTC CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC
ACGAACCCCC CGTTCAGCCC GACCGCTGCG CTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA
ACCCGGTAAG ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG
CGAGGTATGT AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA
GAAGGACAGT ATTTGGTATC TGCGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG
GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTTT GTTTGCAAGC
AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT
CTGACGCTCA GTGGAACGAA AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTCATGAGA TTATCAAAAA
GGATCTTCAC CTAGATCCTT TTAAATTAAA AATGAAGTTT TAAATCAATC TAAAGTATAT
ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT ATCTCAGCGA
TCTGTCTATT TCGTTCATCC ATAGTTGCCT GACTCCCCGT CGTGTAGATA ACTACGATAC
GGGAGGGCTT ACCATCTGGC CCCAGTGCTG CAATGATACC GCGAGACCCA CGCTCACCGG
CTCCAGATTT ATCAGCAATA AACCAGCCAG CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA AGTGGTCCTG
CAACTTTATC CGCCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTGCCG GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT
CGCCAGTTAA TAGTTTGCGC AACGTTGTTG CCATTGCTAC AGGCATCGTG GTGTCACGCT
CGTCGTTTGG TATGGCTTCA TTCAGCTCCG GTTCCAACG ATCAAGGCGA GTTACATGAT
CCCCCATGTT GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT CTTTCGGTCC TCCGATCGTT GTCAGAAAGTA
AGTTGGCCGC AGTGTTATCA CTCATGGTTA TGGCAGCACT GCATAATTCT CTTACTGTCA
TGCCATCCGT AAGATGCTTT TCTGTGACTG GTGAGTACTC AACCAAGTCA TTCTGAGAAT
AGTGTATGCG GCGACCGAGT TGCTTTGCC CGGCGTCAAT ACGGGATAAT ACCGCGCCAC
ATAGCAGAAC TTAAAAAGTG CTCATCATTG GAAAACGTTT TTCGGGGCGA AAActCTCAA
GGATCTTACC GCTGTTGAGA TCCAGTTCGA TGTAACCCAC TCGTGCACCC AACTGATCTT
CAGCATCTTT TACTTTCACC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG CAAAATGCCG
CAAAAAGGG AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT CATACTCTTC TTTTTTCAAT
ATTATTGAAG CATTTATCAG GGTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATTT GAATGTATTT
AGAAAAATAA ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCCCCG AAAAGTGCCA CCTGACGCT
AAGAAACCAT TATTATCATG ACATTAACCT ATAAAAATAG GCGTATCACG AGGCCCTTT
CGTCTCGCGC GTTTCGGTGA TGACGGTCAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG
GTCACAGCTT GTCTGTAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG CCCGTCAGGG CGCGTCAGCG
GGTGTGGCG GGTGTCGGGG CTGGCTTAAC TATGCGGCAT CAGAGCAGAT TGTAAGTGA
GTGCACCATA TGCGGTGTGA AATACCGCAC AGATGCGTAA GGAGAAAAATA CCGCATCAGG
AAATTGTAAA CGTTAATATT TTGTTAAAAA TCGCGTTAAA TTTTTGTTAA ATCAGCTCAT
TTTTTAACCA ATAGGCCGAA ATCGGCAAAA TCCCTTATAA ATCAAAAAGAA TAGACCGAGA
TAGGGTTGAG TGTGTTCCA GTTTGGAACA AGAGTCCACT ATTAAGAAGC GTGGACTCCA
ACGTCAAAGG GCGAAAAACC GTCTATCAGG GCGATGGCCC ACTACGTGAA CCATCACCT
AATCAAGTTT TTTGGGGTCG AGGTGCCGTA AAGCACTAAA TCGGAACCTT AAAGGGAGCC
CCCGATTTAG AGCTTGACGG GGAAAGCCGG CGAACGTGGC GAGAAAGGAA GGAAGAAAG
CGAAAGGAGC GGGCGCTAGG GCGCTGGCAA GTGTAGCGGT CACGCTGCGC GTAACCACCA

CACCCGCCGC GCTTAATGCG CCGCTACAGG GCGCGTCGCG CCATTCGCCA TTCAGGCTAC
 GCAACTGTTG GGAAGGGCGA TCGGTGCGGG CCTCTTCGCT ATTACGCCAG CTGGCGAAGG
 GGGGATGTGC TGCAAGGCGA TTAAGTTGGG TAACGCCAGG GTTTTCCAG TCACGACGTT
 GTAAAACGAC GGCCAGTGAA TT

PSG5-HA-p37rAUF1

GTCGACTTCT GAGGCGGAAA GAACCAGCTG TGGAATGTGT GTCAGTTAGG GTGTGGAAAAG
 TCCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAACC
 AGGTGTGGAA AGTCCCCAGG CTCCCCAGCA GGCAGAAGTA TGCAAAGCAT GCATCTCAAT
 TAGTCAGCAA CCATAGTCCC GCCCCTAACT CCGCCCATCC CGCCCCTAAC TCCGCCCAGT
 TCCGCCCATT CTCCGCCCCA TGGCTGACTA ATTTTTTTTA TTTATGCAGA GGCCGAGGCC
 GCCTCGGCCCT CTGAGCTATT CCAGAAGTAG TGAGGAGGCT TTTTTGGAGG CCTAGGCTTT
 TGCAAAAAGC TGGATCGATC CTGAGAACTT CAGGGTGAGT TTGGGGACCC TTGATTGTTT
 TTTCTTTTTT GCTATTGTAA AATTCATGTT ATATGGAGGG GGCAAAGTTT TCAGGGTGT
 GTTTAGAATG GGAAGATGTC CTTGTATCA CCATGGACCC TCATGATAAT TTTGTTTCTT
 TCACTTTCTA CTCTGTTGAC AACCATTGTC TCCTCTTATT TTCTTTTCAT TTTCTGTAA
 TTTTTCGTTA AACTTTAGCT TGCATTTGTA ACGAATTTTT AAATTCACTT TTGTTTATTT
 GTCAGATTGT AAGTACTTTC TCTAATCACT TTTTTTTCAA GGCAATCAGG GTATATTATA
 TTGTACTTCA GCACAGTTTT AGAGAACAAT TGTTATAAAT AAATGATAAG GTAGAATATT
 TCTGCATATA AATTCTGGCT GCGGTGGAAA TATTCTTATT GGTAGAAACA ACTACATCCT
 GGTCAATCAT CTGCCTTTCT CTTTATGGTT ACAATGATAT ACACTGTTTG AGATGAGGAT
 AAAATACTCT GAGTCCAAAC CGGGCCCCTC TGCTAACCAT GTTCATGCCT TCTTCTTTTT
 CCTACAGCTC CTGGGCAACG TGCTGGTTAT TGTCGTGTCT CATCATTTTG GCAAAGAATT
 GTAATACGAC TCACTATAGG GCGAATTTCC ACCATGGCT ACCATAACA TTTTCCAGT
 TACGCTGAAT TCAGCACTAT GTCGGAGGAG CAGTTCGGAG GGGACGGGGC GGCGGCGGCG
 GCAACGGCGG CGGTAGGCGG CTCGGCGGGC GAGCAGGAGG GAGCCATGGT GGCGGCGGCG
 CAGGGGGCAG CGGCGGCGGC GGGAAGCGGG AGCGGCGGCG GCTCTGCGGC CGGAGGCACC
 GAAGGAGGCA GCACCGAGGC AGAGGGAGCG AAGATCGACG CCAGTAAGAA TGAGGAGGAT
 GAAGGAAAAA TGTTTATAGG AGGCCTTAGC TGGGACACCA CAAAGAAAGA CCTGAAGGAC
 TACTTTTCCA AATTTGGGGA TGTTGTAGAC TGCACCTGTA AGTTAGATCC TATCACAGGG
 CGATCAAGGG GTTTTGGCTT TGTCGTATTT AAAGAGTCGG AGAGTGTAGA TAAGGTCATG
 GATCAGAAAG AACATAAATT GAATGGGAAA GTCATTGATC CTAAAAGGGC CAAAGCCATG
 AAAACAAAAG AGCCCGTCAA AAAAATTTTT GTTGGTGGCC TTTCTCCAGA CACACCTGAA
 GAAAAAATAA GAGAGTACTT TGGTGGTTTT GGTGAGGTTG AATCCATAGA GCTGCCTATG
 GACAACAAGA CCAATAAGAG GCGTGGGTTT TGTTTCATTA CCTTTAAGGA AGAGGAACCA
 GTGAAGAAGA TAATGGAGAA GAAATACCAC AATGTTGGTC TTAGTAAATG TGAAATAAAA
 GTAGCCATGT CGAAGGAGCA GTATCAGCAG CAGCAGCAGT GGGGATCTAG AGGAGGGTTT
 GCAGGAAGAG CTCGCGGAAG AGGCGGTGAT CAGCAGAGTG GTTATGGGAA AGTATCCAGA
 CGAGGTGGTC ATCAAATAG CTACAAACCA TACTAAGGAT CTTATTAAAG CAGAACTTGT
 TTATTGCAGC TTATAATGGT TACAAATAAA GCAATAGCAT CACAAATTTT ACAAATAAAG
 CATTTTTTTT ACTGCATTCT AGTTGTGGTT TGTCCAAACCT CATCAATGTA TCTTATCATG
 TCTGGTTCGAC TCTAGACTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTGTTT
 GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG
 GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCCTAAAA
 AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCT TGACGAGCAT CACAAAAATC
 GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATAACCAG GCGTTTCCCC
 CTGGAAGCTC CCTCGTGC GC TCTCCTGTTT CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG
 CCTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCAATGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT
 CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC

GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC
CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG
AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG
CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA
CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTTGT TT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG
GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT
CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA
ATTA AAAATG AAGTTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT
ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTTCGT TCATCCATAG
TTGCCTGACT CCCCGTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA
GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACC
AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT
CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG
TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATFCA
GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG
TTAGCTCCTT CGGTCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGAGTG TTATCACTCA
TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTGATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG
TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT
CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA
TCATTGGAAA ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA
GTTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAAC TATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG
TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAA ATGCCGCAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC
GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCTTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT
ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTT
CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCATTATT ATCATGACAT
TAACCTATAA AAATAGGCGT ATCACGAGGC CCCTTTCGTC TCGCGCGTTT CCGTGATGAC
GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA CAGCTTGTC GTAAGCGGAT
GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG
CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC ACCATATGCG GTGTGAAATA
CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGAAAT TGTAACCGTT AATATTTTGT
TAAAATTCGC GTTAAATTTT TGTAAATCA GCTCATTTT TAACCAATAG GCCGAAATCG
GCAAAATCCC TTATAAATCA AAAGAATAGA CCGAGATAGG GTTGAGTGT GTTCCAGTTT
GGAACAAGAG TCCACTATTA AAGAACGTGG ACTCCAACGT CAAAGGGCGA AAAACCGTCT
ATCAGGGCGA TGGCCACTA CGTGAACCAT CACCCTAATC AAGTTTTTTTGG GGGTTCGAGGT
GCCGTAAAGC ACTAAATCGG AACCTAAAG GGAGCCCCCG ATTTAGAGCT TGACGGGGAA
AGCCGGCGAA CGTGGCGAGA AAGGAAGGGA AGAAAGCGAA AGGAGCGGGC GCTAGGGCGC
TGGCAAGTGT AGCGGTCACG CTGCGCGTAA CCACCACACC CGCCGCGCTT AATGCGCCGC
TACAGGGCGC GTCGCGCCAT TCGCCATTCA GGCTACGCAA CTGTTGGGAA GGGCGATCGG
TGCGGGCCTC TTCGCTATTA CGCCAGCTGG CGAAGGGGGG ATGTGCTGCA AGGCGATTAA
GTTGGGTAAC GCCAGGGTTT TCCAGTAC GACGTTGTAA AACGACGGCC AGTGAATT

PSG5-HA-p40rAUF1

GTCGACTTCT GAGGCGGAAA GAACCAGCTG TGGAATGTGT GTCAGTTAGG GTGTGGAAAG
TCCCAGGCT CCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAACC
AGGTGTGGAA AGTCCCAGG CTCCCAGCA GGCAGAAGTA TGCAAAGCAT GCATCTCAAT
TAGTCAGCAA CCATAGTCCC GCCCCTAACT CCGCCATCC CGCCCTAAC TCCGCCAGT
TCCGCCATT CTCCGCCCA TGGCTGACTA ATTTTTTTTA TTTATGCAGA GGCCGAGGCC
GCCTCGGCCT CTGAGCTATT CCAGAAGTAG TGAGGAGGCT TTTTTGGAGG CCTAGGCTTT
TGCAAAAAGC TGGATCGATC CTGAGAACTT CAGGGTGAGT TTGGGGACCC TTGATTGTTC

TTTCTTTTTT GCTATTGTAA AATTCATGTT ATATGGAGGG GGCAAAGTTT TCAGGGTGT
GTTTAGAATG GGAAGATGTC CCTTGTATCA CCATGGACCC TCATGATAAT TTTGTTTCTT
TCACTTTCTA CTCTGTTGAC AACCATTGTC TCCTCTTATT TTCTTTTCAT TTTCTGTAAC
TTTTTCGTTA AACTTTAGCT TGCATTTGTA ACGAATTTTT AAATTCACTT TTGTTTATTT
GTCAGATTGT AAGTACTTTC TCTAATCACT TTTTTTTCAA GGCAATCAGG GTATATTATA
TTGTACTTCA GCACAGTTTT AGAGAACAAT TGTTATAATT AAATGATAAG GTAGAATATT
TCTGCATATA AATTCTGGCT GCGTGGAAA TATTCTTATT GGTAGAAAACA ACTACATCCT
GGTCATCATC CTGCCTTTCT CTTTATGGTT ACAATGATAT ACACTGTTTG AGATGAGGAT
AAAATACTCT GAGTCCAAAC CGGGCCCCTC TGCTAACCAT GTTCATGCCT TCTTCTTTTT
CCTACAGCTC CTGGGCAACG TGCTGGTTAT TGTGCTGTCT CATCATTTTG GCAAAGAATT
GTAATACGAC TCACTATAGG GCGAATTTCC ACCATGGCTT ACCCATAACGA TGTTCAGAT
TACGCTGAAT TCAGCACTAT GTCGGAGGAG CAGTTCGGAG GGGACGGGGC GCGCGCGCGC
GCAACGGCGG CGGTAGGCGG CTCGGCGGGC GAGCAGGAGG GAGCCATGGT GCGCGCGCGC
CAGGGGGCAG CGGCGGCGGC GGAAGCGGG AGCGGCGGCG GCTCTGCGGC CGGAGGCACC
GAAGGAGGCA GCACCGAGGC AGAGGGAGCG AAGATCGACG CCAGTAAGAA TGAGGAGGAT
GAAGGCCATT CAAACTCCTC CCCACGACAC ACTGAAGCAG CGACGGCACA GCGGGAAGAA
TGGAAAATGT TTATAGGAGG CCTTAGCTGG GACACCACAA AGAAAGACCT GAAGGACTAC
TTTTCCAAAT TTGGGGACGT TGTAGACTGC ACTCTGAAGT TAGATCCTAT CACAGGGCGA
TCAAGGGGTT TTGGCTTTGT GCTATTTAAA GAGTCGGAGA GTGTAGATAA GGTCATGGAT
CAGAAAGAAC ATAAATTGAA TGGGAAAGTC ATTGATCCTA AAAGGGCCAA AGCCATGAAA
ACAAAAGAGC CCGTCAAAAA AATTTTTGTT GGTGGCCTTT CTCCAGACAC ACCTGAAGAA
AAAATAAGAG AGTACTTTGG TGGTTTTGGT GAGGTTGAAT CCATAGAGCT GCCTATGGAC
ACAAGACCA ATAAGAGGCG TGGGTTCTGT TTCATTACCT TTAAGGAAGA GGAACCAGTG
AAGAAGATAA TGGAGAAGAA ATACCACAAT GTTGGTCTTA GTAAATGTGA AATAAAAGTA
GCCATGTCGA AGGAGCAGTA TCAGCAGCAG CAGCAGTGGG GATCTAGAGG AGGGTTTGCA
GGAAGAGCTC GCGGAAGAGG CGGTGATCAG CAGAGTGGTT ATGGGAAAGT ATCCAGACGA
GGTGGTCATC AAAATAGCTA CAAACCATAC TAAGGATCTT ATTAAGCAG AACTTGTTTA
TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA ATAGCATCAC AAATTTTACA AATAAAGCAT
TTTTTTTCACT GCATTCTAGT TGTGGTTTTGT CCAAATCAT CAATGTATCT TATCATGTCT
GGTCGACTCT AGACTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG GTCGTTCCGGC
TGCGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG GTTATCCACA GAATCAGGGG
ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG
CCGCGTTGCT GCGTTTTTTC CATAGGCTCC GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC
GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG
GAAGCTCCCT CGTGCCTCT CTTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCCT
TTCTCCCTTC GGAAGCGTG GCGTTTTCTC AATGCTCACG CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG
TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG TGCACGAACC CCCCCTCAG CCCGACCGCT
GCGCCTTATC CGGTAACAT CACTTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC
TGGCAGCAGC CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT
TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT ATCTGCGCTC
TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAAACCA
CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTTGCA AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT
CTCAAGAAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACCTAC
GTTAAGGGAT TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT
AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC
AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT ATTTCTGTTCA TCCATAGTTG
CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACACGA TACGGGAGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG
CTGCAATGAT ACCGCGAGAC CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC
CAGCCGGAAG GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA
TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG CGCAACGTTG
TTGCCATTGC TACAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCGT TGGTATGGCT TCATTCAGCT

CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA
 GCTCCTTCGG TCCTCCGATC GTTGTGAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG
 TTATGGCAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA
 CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG AGTTGCTCTT
 GCCCGGCGTC AATACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG AACTTTAAAA GTGCTCATCA
 TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACCTCT CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT
 CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTTCAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT
 CTGGGTGAGC AAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAAGG GCGACACGGA
 AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCTTTTTTTC AATATTATTG AAGCATTAT TAT CAGGGTTATT
 GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA TAAACAAATA GGGGTTCCGC
 GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTAA
 CCTATAAAAA TAGGCGTATC ACGAGGCCCC TTTCGTCTCG CCGGTTTCGG TGATGACGGT
 GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC
 GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTG GCGGGTGTG GGGCTGGCTT
 AACTATGCGG CATCAGAGCA GATTGTACTG AGAGTGCACC ATATGCGGTG TGAAATACCG
 CACAGATGCG TAAGGAGAAA ATACCGCATC AGGAAATTGT AAACGTTAAT ATTTTGTAA
 AATTCGCGTT AAATTTTTGT TAAATCAGCT CATTTTTTAA CCAATAGGCC GAAATCGGCA
 AAATCCCTTA TAAATCAAAA GAATAGACCG AGATAGGGTT GAGTGTGTT CCAGTTTGGA
 ACAAGAGTCC ACTATTAAAG AACGTGGACT CCAACGTCAA AGGGCGAAAA ACCGTCTATC
 AGGGCGATGG CCCACTACGT GAACCATCAC CTAATCAAG TTTTTTGGGG TCGAGGTGCC
 GTAAAGCACT AAATCGGAAC CTAAGGGGA GCCCCGATT TAGAGCTTGA CGGGGAAAGC
 CGGCGAACGT GCGGAGAAAG GAAGGGAAGA AAGCGAAAG AGCGGGCGCT AGGGCGCTGG
 CAAGTGTAGC GGTACGCTG CGCGTAACCA CCACACCCGC CCGCTTAAT GCGCCGCTAC
 AGGGCGCGTC GCGCCATTCG CCATTCAGGC TACGCAACTG TTGGGAAGGG CGATCGGTGC
 GGGCCTCTTC GCTATTACGC CAGCTGGCGA AGGGGGGATG TGCTGCAAGG CGATTAAGTT
 GGGTAACGCC AGGGTTTTCC CAGTCACGAC GTTGTA AAAAC GACGGCCAGT GAATT

PSG5-HA-p42rAUF1

GTCGACTTCT GAGGCGGAAA GAACCAGCTG TGGAATGTGT GTCAGTTAGG GTGTGGAAAG
 TCCCAGGCT CCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAACC
 AGGTGTGGAA AGTCCCAGG CTCCCAGCA GGCAGAAGTA TGCAAAGCAT GCATCTCAAT
 TAGTCAGCAA CCATAGTCCC GCCCCTAACT CCGCCATCC CGCCCCTAAC TCCGCCAGT
 TCCGCCATT CTCCGCCCA TGGCTGACTA ATTTTTTTTA TTTATGCAGA GGCCGAGGCC
 GCCTCGGCCT CTGAGCTATT CCAGAAGTAG TGAGGAGGCT TTTTGGAGG CCTAGGCTTT
 TGCAAAAAGC TGGATCGATC CTGAGAACTT CAGGGTGAGT TTGGGGACCC TTGATTGTTT
 TTTCTTTTTT GCTATTGTAA AATTCATGTT ATATGGAGGG GGCAAAGTTT TCAGGGTGT
 GTTTGAATG GGAAGATGTC CTTGTATCA CCATGGACCC TCATGATAAT TTTGTTTCTT
 TCACTTTCTA CTCTGTTGAC AACCATGTC TCCTCTTATT TTCTTTTCAT TTTCTGTAAC
 TTTTTCGTTA AACTTTAGCT TGCATTTGTA ACGAATTTTT AAATCACTT TTGTTTATTT
 GTCAGATTGT AAGTACTTTC TCTAATCACT TTTTTTTCAA GGCAATCAGG GTATATTATA
 TTGTACTTCA GCACAGTTTT AGAGAACAAT TGTTATAATT AAATGATAAG GTAGAATATT
 TCTGCATATA AATTCCTGGCT GCGGTGGAAA TATTCTTATT GGTAGAAACA ACTACATCCT
 GGTCAATCAT CTGCCTTTCT CTTTATGGTT ACAATGATAT AACTGTTT AGATGAGGAT
 AAAATACTCT GAGTCCAAAC CGGGCCCCTC TGCTAACCAT GTTCATGCC TCTTCTTTTT
 CCTACAGCTC CTGGGCAACG TGCTGGTTAT TGCTGTGTCT CATCATTTTG GCAAAGAATT
 GTAATACGAC TCACTATAGG GCGAATTTCC ACCATGGCTT ACCCATACGA TGTTCCAGAT
 TACGCTGAAT TCAGCACTAT GTCGGAGGAG CAGTTCGGAG GGGACGGGGC GGCGGCGGGC
 GCAACGGCGG CGGTAGGCGG CTCGGCGGGC GAGCAGGAG GAGCCATGGT GGCGGCGGGC

CAGGGGGCAG CGGCGGCGGC GGAAGCGGG AGCGGCGGCG GCTCTGCGGC CGGAGGCACC
GAAGGAGGCA GCACCGAGGC AGAGGGAGCG AAGATCGACG CCAGTAAGAA TGAGGAGGAT
GAAGGGAAAA TGTTTATAGG AGGCCTTAGC TGGGACACCA CAAAGAAAGA CCTGAAGGAC
TACTTTTCCA AATTTGGGGA TGTTGTAGAC TGCACCTCTGA AGTTAGATCC TATCACAGGG
CGATCAAGGG GTTTTGGCTT TGTGCTATTT AAAGAGTCGG AGAGTGTAGA TAAGGTCATG
GATCAGAAAG AACATAAATT GAATGGGAAA GTCATTGATC CTAAGGGGC CAAAGCCATG
AAAAACAAAG AGCCCGTCAA AAAAATTTTT GTTGGTGGCC TTTCTCCAGA CACACCTGAA
GAAAAAATAA GAGAGTACTT TGGTGGTTTT GGTGAGGTTG AATCCATAGA GCTGCCTATG
GACAACAAGA CCAATAAGAG GCGTGGGTTT TGTTCATTA CCTTTAAGGA AGAGGAACCA
GTGAAGAAGA TAATGGAGAA GAAATACCAC AATGTTGGTC TTAGTAAATG TGAAATAAAA
GTAGCCATGT CGAAGGAGCA GTATCAGCAG CAGCAGCAGT GGGGATCTAG AGGAGGGTTT
GCAGGAAGAG CTCGCGGAAG AGGCGGTGGC CCCAGTCAA ACTGGAACCA GGGATATAGT
AACTATTGGA ACCAAGGCTA TGGCAGCTAT GGATATAACA GCCAAGGGTA CGGTGGTTAT
GGAGGATATG ACTACACTGG TTACAACAGC TACTATGGAT ATGGTGACTA TAGCAATCAG
CAGAGTGGTT ATGGGAAAGT ATCCAGACGA GGTGGTCAATC AAAATAGCTA CAAACCATAC
TAAAGGATCTT ATTAAAGCAG AACTTGTTTTA TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA
ATAGCATCAC AAATTTTACA AATAAAGCAT TTTTTTCACT GCATTCTAGT TGTGGTTTTGT
CCAAACTCAT CAATGTATCT TATCATGTCT GGTCGACTCT AGACTCTTCC GCTTCCTCGC
TCACTGACTC GCTGCGCTCG GTCGTTCCGGC TCGCGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG
CGGTAATACG GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG
GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GCGTTTTTTC CATAGGCTCC
GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA AACCCGACAG
GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT CGTGCCTCTT CCTGTTCCGA
CCCTGCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCTT TTCTCCCTTC GGAAGCGTG GCGCTTTCTC
AATGCTCACG CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG
TGCACGAACC CCCCCTTCCG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACATC CGTCTTGAGT
CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC CACTGGTAAC AGGATTAGCA
GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA
CTAGAAGGAC AGTATTTGGT ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG
TTGGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTTT TTTGTTTGCA
AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG
GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACCTCAC GTTAAGGGAT TTTGGTTCATG AGATTATCAA
AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA
TATATGAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG
CGATCTGTCT ATTTGCTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACTACGA
TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC CCACGCTCAC
CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC
CTGCAACTTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA
GTTTCGCCAGT TAATAGTTTG CGCAACGTTG TTGCCATTGC TACAGGCATC GTGGTGTAC
GCTCGTCGTT TGGTATGGCT TCATTAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT
GATCCCCCAT GTTGTGCAA AAAGCGGTTA GTCCTTCGG TCCTCCGATC GTTGTGAGAA
GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG
TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG
AATAGTGTAT GCGGCGACCG AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AATACGGGAT AATACCGCGC
CACATAGCAG AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACCTCT
CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT
CTTCAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAACAGGA AGGCAAAATG
CCGCAAAAAA GGAATAAGG GCGACACGGA AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCTTTTTTTC
AATATTATTG AAGCATTTAT CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA
TTTAGAAAAA TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG
TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTA CCTATAAAAA TAGGCGTATC ACGAGGCCCC
TTTCGTCTCG CGGTTTTCCG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG

ACGGTCACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA
 GCGGGTGTG GCGGGTGTG GGGCTGGCTT AACTATGCGG CATCAGAGCA GATTGTACTG
 AGAGTGCACC ATATGCGGTG TGAAATACCG CACAGATGCG TAAGGAGAAA ATACCGCATC
 AGGAAATTGT AAACGTTAAT ATTTTGTAA AATTTCGCGT AAATTTTTGT TAAATCAGCT
 CATTTTTTAA CCAATAGGCC GAAATCGGCA AAATCCCTTA TAAATCAAAA GAATAGACCG
 AGATAGGGTT GAGTGTGTT CCAGTTTGGGA ACAAGAGTCC ACTATTAAAG AACGTGGACT
 CCAACGTCAA AGGGCGAAAA ACCGTCTATC AGGGCGATGG CCCACTACGT GAACCATCAC
 CCTAATCAAG TTTTTTGGGG TCGAGGTGCC GTAAAGCACT AAATCGGAAC CCTAAAGGGA
 GCCCCGATT TAGAGCTTGA CGGGGAAAGC CGGCGAACGT GGCGAGAAAAG GAAGGGAAGA
 AAGCGAAAGG AGCGGGCGCT AGGGCGCTGG CAAGTGTAGC GGTACGCTG CGCGTAACCA
 CCACACCCGC CGCGCTTAAT GCGCCGCTAC AGGGCGCGTC GCGCCATTCG CCATTCAGGC
 TACGCAACTG TTGGGAAGGG CGATCGGTGC GGGCCTCTTC GCTATTACGC CAGCTGGCGA
 AGGGGGGATG TGCTGCAAGG CGATTAAGTT GGGTAACGCC AGGGTTTTTC CAGTCACGAC
 GTTGTA AAC GACGGCCAGT GAATT

PSG5-HA-11n-p37rAUF1

GTCGACTTCT GAGGCGGAAA GAACCAGCTG TGGAAATGTGT GTCAGTTAGG GTGTGGAAAAG
 TCCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAACC
 AGGTGTGGAA AGTCCCCAGG CTCCCCAGCA GGCAGAAGTA TGCAAAGCAT GCATCTCAAT
 TAGTCAGCAA CCATAGTCCC GCCCCTAACT CCGCCCATCC CGCCCTAAC TCCGCCAGT
 TCCGCCATT CTCCGCCCA TGGCTGACTA ATTTTTTTTA TTTATGCAGA GGCCGAGGCC
 GCCTCGGCCT CTGAGCTATT CCAGAAGTAG TGAGGAGGCT TTTTTGGAGG CCTAGGCTTT
 TGCAAAAAGC TGGATCGATC CTGAGAACTT CAGGGTGAGT TTGGGGACCC TTGATTGTTT
 TTTCTTTTTT GCTATTGTAA AATTCATGTT ATATGGAGGG GGCAAAGTTT TCAGGGTGT
 GTTTAGAATG GGAAGATGTC CTTGTATCA CCATGGACCC TCATGATAAT TTTGTTTCTT
 TCACTTTCTA CTCTGTTGAC AACCATTGTC TCCTCTTATT TTCTTTTCAT TTTCTGTAAC
 TTTTTTCGTTA AACTTTAGCT TGCATTTGTA ACGAATTTTT AAATTCACTT TTGTTTATTT
 GTCAGATTGT AAGTACTTTC TCTAATCACT TTTTTTTCAA GGCAATCAGG GTATATTATA
 TTGTACTTCA GCACAGTTTT AGAGAACAAT TGTTATAATT AAATGATAAG GTAGAATATT
 TCTGCATATA AATTCTGGCT GCGGTGGAAA TATTCTTATT GGTAGAAACA ACTACATCCT
 GGTCATCATC CTGCCTTTCT CTTTATGGTT ACAATGATAT AACTGTTTG AGATGAGGAT
 AAAATACTCT GAGTCCAAAC CGGGCCCCTC TGCTAACCAT GTTCATGCCT TCTTCTTTTT
 CCTACAGCTC CTGGGCAACG TGCTGGTTAT TGCTGTGCT CATCATTTTG GCAAAGAATT
 GTAATACGAC TCACTATAGG GCGAATTTCC ACCATGGCTT ACCCATAACGA TGTTCCAGAT
 TACGCTGAAT TC GCCCTTAA TTCAGCACTA TGTCGGAGGA GCAGTTCGGA GGGGACGGGG
 CGGCGGCGGC GGCAACGGCG GCGGTAGGCG GCTCGGCGGG CGAGCAGGAG GGAGCCATGG
 TGGCGGCGGC GCAGGGGGCA GCGGCGGCGG CGGGAAGCGG GAGCGGCGGC GGCTCTGCGG
 CCGGAGGCAC CGAAGGAGGC AGCACCAGG CAGAGGGAGC GAAGATCGAC GCCAGTAAGA
 ATGAGGAGGA TGAAGGGAAA ATGTTTATAG GAGGCCTTAG CTGGGACACC ACAAAGAAAG
 ACCTGAAGGA CTACTTTTCC AAATTTGGGG ATGTTGTAGA CTGCACTCTG AAGTTAGATC
 CTATCACAGG GCGATCAAGG GTTTTGGCT TTGTGCTATT TAAAGAGTCG GAGAGTGTAG
 ATAAGTTCAT GGATCAGAAA GAACATAAAT TGAATGGGAA AGTCATTGAT CCTAAAAGGG
 CCAAAGCCAT GAAAACAAAA GAGCCCGTCA AAAAAATTTT TGTTGGTGGC CTTTCTCCAG
 ACACACCTGA AGAAAAAATA AGAGAGTACT TTGGTGGTTT TGGTGAGGTT GAATCCATAG
 AGCTGCCTAT GGACAACAAG ACCAATAAGA GCGTGGGTT CTGTTTCATT ACCTTTAAGG
 AAGAGGAACC AGTGAAGAAG ATAATGGAGA AGAAATACCA CAATGTTGGT CTTAGTAAAT
 GTGAAATAAA AGTAGCCATG TCGAAGGAGC AGTATCAGCA GCAGCAGCAG TGGGGATCTA
 GAGGAGGGTT TGCAGGAAGA GCTCGCGGAA GAGGCGGTGA TCAGCAGAGT GGTTATGGGA
 AAGTATCCAG ACGAGGTGGT CATCAAATA GCTACAAACC ATACTAAGGA TCTTATTAAA

GCAGAACTTG TTTATTGCAG CTTATAATGG TTACAAATAA AGCAATAGCA TCACAAATTT
CACAAATAAA GCATTTTTTTT CACTGCATTC TAGTTGTGGT TTGTCCAAAC TCATCAATGT
ATCTTATCAT GTCTGGTCGA CTCTAGACTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG
CTCGGTTCGTT CGGCTGCGGC GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC
CACAGAATCA GGGGATAACG CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG
GAACCGTAAA AAGGCCGCGT TGCTGGCGTT TTTCCATAGG CTCCGCCCCC CTGACGAGCA
TCACAAAAAT CGACGCTCAA GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA
GGCGTTTTCCC CCTGGAAGCT CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCCTGC CGCTTACCGG
ATACCTGTCC GCCTTTCTCC CTTCGGGAAG CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG
GTATCTCAGT TCGGTGTAGG TCGTTCGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCCCGT
TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA
CGACTTATCG CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG
CGGTGCTACA GAGTTCCTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA GGACAGTATT
TGGTATCTGC GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTCGGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC
CGGCAAACAA ACCACCGCTG GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC AGATTACGCG
CAGAAAAAAA GGATCTCAAG AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG
GAACGAAAAC TCACGTTAAG GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACCTA
GATCCTTTTA AATTAATAAT GAAGTTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACTTG
GTCTGACAGT TACCAATGCT TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTTCG
TTCATCCATA GTTGCCTGAC TCCCGTCTGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC
ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC
AGCAATAAAC CAGCCAGCCG GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT GGTCTTGCAA CTTTATCCGC
CTCCATCCAG TCTATTAATT GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCGC CAGTTAATAG
TTTGCGCAAC GTTGTTGCCA TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT
GGCTTCATTC AGCTCCGGTT CCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG
CAAAAAGCG GTTAGCTCCT TCGGTCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCAGT
GTTATCACTC ATGGTTATGG CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG
ATGCTTTTTCT GTGACTGGTG AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATGCGGCG
ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT
AAAAGTGCTC ATCATTGGAA AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT
GTTGAGATCC AGTTCGATGT AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC
TTTCACCAGC GTTTCTGGGT GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT
AAGGGCGACA CGGAAATGTT GAATACTCAT ACTCTTCTTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT
TTATCAGGGT TATTGTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA
AATAGGGGTT CCGCGCACAT TTCCCCGAAA AGTGCCACCT GACGTCTAAG AAACCATTAT
TATCATGACA TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCACGAGG CCCCTTTCGT CTCGCGCGTT
TCGGTGATGA CGGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC ACAGCTTGTC
TGTAAGCGGA TGCCGGGAGC AGACAAGCCC GTCAGGGCGC GTCAGCGGT GTTGGCGGGT
GTCGGGGCTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT ACTGAGAGTG CACCATATGC
GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TCGGTAAGGA GAAAATACCG CATCAGGAAA TTGTAAACGT
TAATATTTTG TTAAAATTCG CGTTAAATTT TTGTTAAATC AGCTCATTTT TTAACCAATA
GGCCGAAATC GGCAAAATCC CTTATAAATC AAAAGAATAG ACCGAGATAG GGTTGAGTGT
TGTTCCAGTT TGGAACAAGA GTCCACTATT AAAGAACGTG GACTCCAACG TCAAAGGGCG
AAAACCGTC TATCAGGGCG ATGGCCCACT ACGTGAACCA TCACCCTAAT CAAGTTTTTT
GGGGTCGAGG TGCCGTAAAG CACTAAATCG GAACCCTAAA GGGAGCCCCC GATTTAGAGC
TTGACGGGGA AAGCCGGCGA ACGTGGCGAG AAAGGAAGGG AAGAAAGCGA AAGGAGCGGG
CGCTAGGGCG CTGGCAAGTG TAGCGGTCAC GCTGCGCGTA ACCACCACAC CCGCCGCGCT
TAATGCGCCG CTACAGGGCG CGTCGCGCCA TTCGCCATTC AGGCTACGCA ACTGTTGGGA
AGGGCGATCG GTGCGGGCCT CTTCGCTATT ACGCCAGCTG GCGAAGGGGG GATGTGCTGC
AAGGCGATTA AGTTGGGTAA CGCCAGGGTT TTCCCAGTCA CGACGTTGTA AAACGACGGC
CAGTGAATT

VECTORES pCMV-Myc-rAUF1

Regiones resaltadas en el texto:

ATG: Codón de inicio de la traducción.

GAGCAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTG: Epitope de Myc.

GAATTC: Sitio de corte de EcoRI.

Texto en Azul y Negritas: Secuencia del marco de lectura de AUF1.

PCMV-MYc-P45rAUF1

```
CTGAAGAATC TGCTTAGGGT TAGGCGTTTT GCGCTGCTTC GCGATGTACG GGCCAGATAT
ACGCGTTGAC ATTGATTATT GACTAGTTAT TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT
CATAGCCCAT ATATGGAGTT CCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA
CCGCCCAACG ACCCCCGCCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA
ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GACTATTTAC GGTAAACTGC CCACTTGGCA
GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCTATTG ACGTCAATGA CGGTAAATGG
CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC
TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAT CAATGGGCGT
GGATAGCGGT TTGACTCACG GGGATTTCCA AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT
TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAATGTC GTAACAACCT CGCCCCATTG
ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA TAAGCAGAGC TCTCTGGCTA
ACTAGAGAAC CCACTGCTTA CTGGCTTATC GAAATTAATA CGACTCACTA TAGGGAGACC
CAAGCTTGGT ACCGAGCTCG GATCCACTAG TAACGGCCGC CAGCCATTGT GCTGGCCACC
ATGGGAGAGC AGAAACTGAT CTCTGAAGAA GACCTGAACC CCGAATTCAG CACTATGTCG
GAGGAGCAGT TCGGAGGGGA CGGGGCGGCG GCGGCGGCAA CGGCGGCGGT AGGCGGCTCG
GCGGGCGAGC AGGAGGGAGC CATGGTGGCG GCGGCGCAGG GGGCAGCGGC GGCGGCGGGA
AGCGGGAGCG GCGGCGGCTC TGCGGCCGGA GGCACCGAAG GAGGCAGCAC CGAGGCAGAG
GGAGCGAAGA TCGACGCCAG TAAGAATGAG GAGGATGAAG GCCATTCAA CTCCTCCCCA
CGACACACTG AAGCAGCGAC GGCACAGCGG GAAGAATGGA AAATGTTTAT AGGAGGCCTT
AGCTGGGACA CCACAAAGAA AGACCTGAAG GACTACTTTT CAAATTTGG GGACGTTGTA
GACTGCACTC TGAAGTTAGA TCCTATCACA GGCGATCAA GGGTTTTTGG CTTTGTGCTA
TTTAAAGAGT CGGAGAGTGT AGATAAGGTC ATGGATCAGA AAGAACATA ATTGAATGGG
AAAGTCATTG ATCCTAAAAG GGCCAAAGCC ATGAAAACAA AAGAGCCCGT CAAAAAAATT
TTTGTTGGTG GCCTTTCTCC AGACACACCT GAAGAAAAAA TAAGAGAGTA CTTTGGTGTT
TTTGTTGAGG TTGAATCCAT AGAGCTGCCT ATGGACAACA AGACCAATA GAGGCGTGGG
TTCTGTTTCA TTACCTTTAA GGAAGAGGAA CCAGTGAAGA AGATAATGGA GAAGAAATAC
CACAATGTTG GTCTTAGTAA ATGTGAAATA AAAGTAGCCA TGTCGAAGGA GCAGTATCAG
CAGCAGCAGC AGTGGGGATC TAGAGGAGGG TTTGCAGGAA GAGCTCGCGG AAGAGGCGGT
GGCCCCAGTC AAAAC TGAA CCAGGGATAT AGTAACTATT GGAACCAAGG CTATGGCAGC
TATGGATATA ACAGCCAAGG GTACGGTGGT TATGGAGGAT ATGACTACAC TGGTTACAAC
AGCTACTATG GATATGGTGA CTATAGCAAT CAGCAGAGTG GTTATGGGAA AGTATCCAGA
CGAGGTGGTC ATCAAATAG CTACAAACCA TACTAAGGAT CTTATTAAAG CAGAACTTGT
TTATTGCAGC TTATAATGGT TACAAATAAA GCAATAGCAT CACAAATTTT ACAAATAAAG
CATTTTTTTT ACTGCATTCT AGTTGTGGTT TGTCCAAACCT CATCAATGTA TCTTATCATG
TCTGGTTCGAC TCTAGACTCT TCCGCTTCTT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTCGTTT
```


GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG
GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA
AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC
GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC
CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTT CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG
CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCAATGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT
CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC
GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC
CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG
AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT ACACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG
CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA
CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG
GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT
CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA
ATTA AAAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT
ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG
TTGCCTGACT CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA
GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACCC
AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT
CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG
TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA
GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG
TTAGCTCCTT CGGTCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG TTATCACTCA
TGTTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTGATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG
TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT
CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA
TCATTGGAAA ACGTTCCTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA
GTTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG
TTTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC
GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCTTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT
ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTT
CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCATTATT ATCATGACAT
TAACCTATAA AAATAGGCGT ATCACGAGGC CCCTTTCGTC TCGCGCGTTT CCGTGATGAC
GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA CAGCTTGCTT GTAAGCGGAT
GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG
CTTA ACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC ACCATATGCG GTGTGAAATA
CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGAAAT TGTAACCGTT AATATTTTGT
TAAAATTCGC GTTAAATTTT TGTAAATCA GTCATTTTTT TAACCAATAG GCCGAAATCG
GCAAAATCCC TTATAAATCA AAAGAATAGA CCGAGATAGG GTTGAGTGTG GTTCCAGTTT
GGAACAAGAG TCCACTATTA AAGAACGTGG ACTCCAACGT CAAAGGGCGA AAAACCGTCT
ATCAGGGCGA TGGCCCACTA CGTGAACCAT CACCCTAATC AAGTTTTTTT GGGTTCGAGGT
GCCGTA AAGC ACTAAATCGG AACCCATAAG GGAGCCCCCG ATTTAGAGCT TGACGGGGAA
AGCCGGCGAA CGTGGCGAGA AAGGAAGGGA AGAAAGCGAA AGGAGCGGGC GCTAGGGCGC
TGGAAGTGT AGCGGTCACG CTGCGCGTAA CCACCACACC CGCCGCGCTT AATGCGCCGC
TACAGGGCGC GTCGCGCCAT TCGCCATTCA GGCTACGCAA CTGTTGGGAA GGGCGATCGG
TGCGGGCCTC TTCGCTATTA CGCCAG

PCMV-Myc-p37rAUF1

CTGAAGAATC TGCTTAGGGT TAGGCGTTTT GCGCTGCTTC GCGATGTACG GGCCAGATAT
ACGCGTTGAC ATTGATTATT GACTAGTTAT TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT
CATAGCCCAT ATATGGAGTT CCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA
CCGCCAACG ACCCCCGCCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA
ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GACTATTTAC GGTAAACTGC CCACTTGGCA
GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCTATTG ACGTCAATGA CGGTAAATGG
CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC
TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAT CAATGGGCGT
GGATAGCGGT TTGACTCACG GGGATTTCCA AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT
TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CAAAATGTC GTAACAACCTC CGCCCCATTG
ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA TAAGCAGAGC TCTCTGGCTA
ACTAGAGAAC CCACTGCTTA CTGGCTTATC GAAATTAATA CGACTCACTA TAGGGAGACC
CAAGCTTGGT ACCGAGCTCG GATCCACTAG TAACGGCCGC CAGCCATTGT GCTGGCCACC
ATGGGAGAGC **AGAAACTGAT** **CTCTGAAGAA** **GACCTG**AACC CC**GAATTC**AG CACT**ATGTCC**
GAGGAGCAGT **TCGGAGGGGA** **CGGGGCGGCG** **GCGGCGGCAA** **CGGCGGCGGT** **AGGCGGCTCG**
GCGGGCGAGC **AGGAGGGAGC** **CATGGTGGCG** **GCGGCGCAGG** **GGCAGCGGC** **GGCGGCGGGA**
AGCGGGAGCG **GCGGCGGCTC** **TGCGGCCGGA** **GGCACC GAAG** **GAGGCAGCAC** **CGAGGCAGAG**
GGAGCGAAGA **TCGACGCCAG** **TAAGAATGAG** **GAGGATGAAG** **GGAAAATGTT** **TATAGGAGGC**
CTTAGCTGGG **ACACCACAAA** **GAAAGACCTG** **AAGGACTACT** **TTTCCAAATT** **TGGGGATGTT**
GTAGACTGCA **CTCTGAAGTT** **AGATCCTATC** **ACAGGGCGAT** **CAAGGGGTTT** **TGGCTTTGTG**
CTATTTAAAG **AGTCGGAGAG** **TGTAGATAAG** **GTCATGGATC** **AGAAAGAACA** **TAAATTGAAT**
GGGAAAGTCA **TTGATCCTAA** **AAGGGCCAAA** **GCCATGAAAA** **CAAAAGAGCC** **CGTCAAAAAA**
ATTTTTGTTG **GTGGCCTTTC** **TCCAGACACA** **CCTGAAGAAA** **AAATAAGAGA** **GTACTTTGGT**
GGTTTTGGTG **AGGTTGAATC** **CATAGAGCTG** **CCTATGGACA** **ACAAGACCAA** **TAAGAGGCGT**
GGGTTCTGTT **TCATTACCTT** **TAAGGAAGAG** **GAACCAGTGA** **AGAAGATAAT** **GGAGAAGAAA**
TACCACAATG **TTGGTCTTAG** **TAAATGTGAA** **ATAAAAGTAG** **CCATGTGCGAA** **GGAGCAGTAT**
CAGCAGCAGC **AGCAGTGGGG** **ATCTAGAGGA** **GGGTTTGCAG** **GAAGAGCTCG** **CGGAAGAGGC**
GGTGATCAGC **AGAGTGGTTA** **TGGGAAAGTA** **TCCAGACGAG** **GTGGTCATCA** **AAATAGCTAC**
AAACCATACT **AAGGATCTTA** **TTAAAGCAGA** **ACTTGTTTAT** **TGCAGCTTAT** **AATGGTTACA**
AATAAAGCAA TAGCATCACA AATTTACAAA ATAAAGCATT TTTTTCCTG CATTCTAGTT
GTGGTTTGTC CAAACTCATC AATGTATCTT ATCATGTCTG GTCGACTCTA GACTCTTCCG
CTTCCTCGCT CACTGACTCG CTGCGCTCGG TCGTTCGGCT GCGGCGAGCG GTATCAGCTC
ACTCAAAGGC GGTAATACGG TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAACATGT
GAGCAAAGG CCAGCAAAG GCCAGGAACC GTAAAAAGG CCGGTTGCTG GCGTTTTTCC
ATAGGCTCCG CCCCCTGAC GAGCATCACA AAAATCGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA
ACCCGACAGG ACTATAAAGA TACCAGGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC
CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT ACCGGATACC TGTCCGCCTT TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG
CGCTTTCTCA ATGCTCACGC TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC
TGGGCTGTGT GCACGAACCC CCGTTCAGC CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACTATC
GTCTTGAGTC CAACCCGGTA AGACACGACT TATCGCCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA
GGATTAGCAG AGCGAGGTAT GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT
ACGGCTACAC TAGAAGGACA GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG
GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTGGTTTTT
TTGTTTGCAA GCAGCAGATT ACGCGCAGAA AAAAAGGATC TCAAGAAGAT CCTTTGATCT
TTTCTACGGG GTCTGACGCT CAGTGGAACG AAAACTCACG TTAAGGGATT TTGGTCATGA
GATTATCAA AAGGATCTTC ACCTAGATCC TTTTAAATTA AAAATGAAGT TTTAAATCAA
TCTAAAGTAT ATATGAGTAA ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC AGTGAGGCAC
TATCTCAGC GATCTGTCTA TTTCGTTTAT CCATAGTTGC CTGACTCCCC GTCGTGTAGA

TAACTACGAT ACGGGAGGGC TTACCATCTG GCCCCAGTGC TGCAATGATA CCGCGAGACC
 CACGCTCACC GGCTCCAGAT TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAAGG GCCGAGCGCA
 GAAGTGGTCC TGCAACTTTA TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CGGGAAGCTA
 GAGTAAGTAG TTCGCCAGTT AATAGTTTGC GCAACGTTGT TGCCATTGCT ACAGGCATCG
 TGGTGTACAG CTCTGTCGTTT GGTATGGCTT CATTTCAGCTC CGGTTCCCAA CGATCAAGGC
 GAGTTACATG ATCCCCCATG TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG CTCCTTCGGT CCTCCGATCG
 TTGTCAGAAG TAAGTTGGCC GCAGTGTTAT CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT
 CTCTTACTGT CATGCCATCC GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAGTAC TCAACCAAGT
 CATTCTGAGA ATAGTGTATG CGGCGACCGA GTTGCTCTTG CCCGGCGTCA ATACGGGATA
 ATACCGCGCC ACATAGCAGA ACTTTTAAAAG TGCTCATCAT TGGAAAACGT TCTTCGGGGC
 GAAAACCTCTC AAGGATCTTA CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGCAC
 CCAACTGATC TTCAGCATCT TTTACTTTCA CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA
 GGCAAAATGC CGCAAAAAG GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCATACTCT
 TCTTTTTTCA ATATTATTGA AGCATTATC AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT
 TTGAATGTAT TTAGAAAAAT AAACAAATAG GGGTTCGCGC CACATTTCCC CGAAAAGTGC
 CACCTGACGT CTAAGAAACC ATTATTATCA TGACATTAAC CTATAAAAAAT AGGCGTATCA
 CGAGGCCCTT TTCGTCTCGC GCGTTTCGGT GATGACGGTG AAAACCTCTG ACACATGCAG
 CTCCCGGAGA CGGTCACAGC TTGTCTGTAA GCGGATGCCG GGAGCAGACA AGCCCGTCAG
 GCGCGCTCAG CGGGTGTTGG CGGGTGTCGG GGCTGGCTTA ACTATGCGGC ATCAGAGCAG
 ATTGTACTGA GAGTGCACCA TATGCGGTGT GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA
 TACCGCATCA GGAAATTGTA AACGTTAATA TTTTGTAAA ATTCGCGTTA AATTTTTGTT
 AAATCAGCTC ATTTTTTAAC CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAAG
 AATAGACCGA GATAGGGTTG AGTGTGTTC CAGTTTGGAA CAAGAGTCCA CTATTAAGA
 ACGTGGACTC CAACGTCAA GGGCGAAAAA CCGTCTATCA GGGCGATGGC CCACTACGTG
 AACCATCACC CTAATCAAGT TTTTGGGGT CGAGGTGCCG TAAAGCACTA AATCGGAACC
 CTAAAGGGAG CCCCCGATTT AGAGCTTGAC GGGGAAAGCC GGCGAACGTG GCGAGAAAGG
 AAGGGAAGAA AGCGAAAGGA GCGGGCGCTA GGGCGCTGGC AAGTGTAGCG GTCACGCTGC
 GCGTAACCAC CACACCCGCC GCGCTTAATG CGCCGCTACA GGGCGCGTCG CGCCATTCGC
 CATTTCAGGCT ACGCAACTGT TGGGAAGGGC GATCGGTGCG GGCCTCTTCG CTATTACGCC
 AG

PCMV-Myc-p40rAUF1

CTGAAGAATC TGCTTAGGGT TAGGCGTTTT GCGCTGCTTC GCGATGTACG GGCCAGATAT
 ACGCGTTGAC ATTGATTATT GACTAGTTAT TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT
 CATAGCCCAT ATATGGAGTT CCGCGTTACA TAACCTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA
 CCGCCCAACG ACCCCCGCCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA
 ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GACTATTTAC GGTAAACTGC CCACTTGGCA
 GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCTATTG ACGTCAATGA CGGTAAATGG
 CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC
 TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAT CAATGGGCGT
 GGATAGCGGT TTGACTCACG GGGATTTCCA AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT
 TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CAAAATGTC GTAACAACTC CGCCCCATTG
 ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGACGGTGG GAGGTCTATA TAAGCAGAGC TCTCTGGCTA
 ACTAGAGAAC CCACTGCTTA CTGGCTTATC GAAATTAATA CGACTCACTA TAGGGAGACC
 CAAGCTTGGT ACCGAGCTCG GATCCACTAG TAACGGCCGC CAGCCATTGT GCTGGCCACC
ATGGGAGAGC **AGAAACTGAT** **CTCTGAAGAA** **GACCTG**AACC CC**GAATTC**AG CACT**ATGTCG**
GAGGAGCAGT **TCGGAGGGGA** **CGGGGCGGCG** **GCGGCGGCAA** **CGGCGGCGGT** **AGGCGGCTCG**
GCGGGCGAGC **AGGAGGGAGC** **CATGGTGGCG** **GCGGCGCAGG** **GGGCAGCGGC** **GGCGGCGGGA**
AGCGGGAGCG **GCGGCGGCTC** **TGCGGCCGGA** **GGCACCGAAG** **GAGGCAGCAC** **CGAGGCAGAG**
GGAGCGAAGA **TCGACGCCAG** **TAAGAATGAG** **GAGGATGAAG** **GCCATTCAA** **CTCCTCCCCA**

CGACACACTG AAGCAGCGAC GGCACAGCGG GAAGAATGGA AAATGTTTAT AGGAGGCCTT
AGCTGGGACA CCACAAAGAA AGACCTGAAG GACTACTTTT CCAAATTTGG GGACGTTGTA
GACTGCACTC TGAAGTTAGA TCCTATCACA GGGCGATCAA GGGGTTTTGG CTTTGTGCTA
TTTAAAGAGT CGGAGAGTGT AGATAAGGTC ATGGATCAGA AAGAACATAA ATTGAATGGG
AAAGTCATTG ATCCTAAAAG GGCCAAAGCC ATGAAAACAA AAGAGCCCGT CAAAAAATT
TTTGTGGTGG GCCTTTCTCC AGACACACCT GAAGAAAAAA TAAGAGAGTA CTTTGGTGGT
TTTGGTGAGG TTGAATCCAT AGAGCTGCCT ATGGACAACA AGACCAATAA GAGGCGTGGG
TTCTGTTTCA TTACCTTTAA GGAAGAGGAA CCAGTGAAGA AGATAATGGA GAAGAAATAC
CACAATGTTG GTCTTAGTAA ATGTGAAATA AAAGTAGCCA TGTCGAAGGA GCAGTATCAG
CAGCAGCAGC AGTGGGGATC TAGAGGAGGG TTTGCAGGAA GAGCTCGCGG AAGAGGCGGT
GATCAGCAGA GTGGTTATGG GAAAGTATCC AGACGAGGTG GTCATCAAAA TAGCTACAAA
CCATACTAAG GATCTTATTA AAGCAGAACT TGTTTTATTGC AGCTTATAAT GGTTACAAAT
AAAGCAATAG CATCACAAAT TTCACAAATA AAGCATTTTTT TTCACTGCAT TCTAGTTGTG
GTTTGTCCAA ACTCATCAAT GTATCTTATC ATGTCTGGTC GACTCTAGAC TCTTCCGCTT
CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGCTCGGTCCG TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT
CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAAG AACATGTGAG
CAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCG CTTGCTGGCG TTTTTCCATA
GGCTCCGCC CCCTGACGAG CATCACAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC
CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTT CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG
TTCCGACCTT GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC
TTTCTCAATG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTTCGC TCCAAGCTGG
GCTGTGTGCA CGAACCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC
TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CAGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA
TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG
GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA
AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG
TTTGAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT
CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT
TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT TAAATTAATA ATGAAGTTTT AAATCAATCT
AAAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA
TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA
CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC
GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA
GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG
TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG
TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG
TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCCGGTCT CCGATCGTTG
TCAGAAGTAA GTTGCCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC
TTACTGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT
TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA CGGGATAATA
CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA
AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGCACCCA
ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC
AAAAAGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCT
TTTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG
AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC
CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAAACCTA TAAAAATAGG CGTATCACGA
GGCCCTTTT GTCTCGCGCG TTTCGGTGAT GACGGTGAAA ACCTCTGACA CATGCAGCTC
CCGGAGACGG TCACAGCTTG TCTGTAAGCG GATGCCGGGA GCAGACAAGC CCGTCAGGGC
GCGTCAGCGG GTGTTGGCGG GTGTGCGGGC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT
GTACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
CGCATCAGGA AATTGTAAAC GTTAATATTT TGTTAAAAT CGCGTTAAAT TTTTGTAA

TCAGCTCATT TTTTAACCAA TAGGCCGAAA TCGGC AAAAT CCCTTATAAA TCAAAAAGAAT
AGACCGAGAT AGGGTTGAGT GTTGTTCAG TTTGGAACAA GAGTCCACTA TTAAAGAACG
TGGACTCCAA CGTCAAAGGG CGAAAAACCG TCTATCAGGG CGATGGCCCA CTACGTGAAC
CATCACCCTA ATCAAGTTTT TTGGGGTCTGA GGTGCCGTAA AGCACTAAAT CGGAACCCTA
AAGGGAGCCC CCGATTTAGA GCTTGACGGG GAAAGCCGGC GAACGTGGCG AGAAAGGAAG
GGAAGAAAGC GAAAGGAGCG GGCGCTAGGG CGCTGGCAAG TGTAGCGGTC ACGCTGCGCG
TAACCACCAC ACCCGCCGCG CTTAATGCGC CGCTACAGGG CGCGTCGCGC CATTTCGCCAT
TCAGGCTACG CAACTGTTGG GAAGGGCGAT CGGTGCGGGC CTCTTCGCTA TTACGCCAG

PCMV-Myc-p42rAUF1

CTGAAGAATC TGCTTAGGGT TAGGCGTTTT GCGCTGCTTC GCGATGTACG GGCCAGATAT
ACGCGTTGAC ATTGATTATT GACTAGTTAT TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT
CATAGCCCAT ATATGGAGTT CCGCGTTACA TAACCTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA
CCGCCAACG ACCCCCGCCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA
ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GACTATTTAC GGTAAACTGC CCACTTGGA
GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCTATTG ACGTCAATGA CGGTAAATGG
CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC
TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAT CAATGGGCGT
GGATAGCGGT TTGACTCACG GGGATTTCCA AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT
TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CAAAATGTC GTAACAACCTC CGCCCCATTG
ACGCAAATGG GCGGTAGGCG GTACGGTGG GAGGTCTATA TAAGCAGAGC TCTCTGGCTA
ACTAGAGAAC CCACTGCTTA CTGGCTTATC GAAATTAATA CGACTCACTA TAGGGAGACC
CAAGCTTGGT ACCGAGCTCG GATCCACTAG TAACGGCCGC CAGCCATTGT GCTGGCCACC
ATGGAGAGC AGAAACTGAT CTCTGAAGAA GACCTGAACC CCGAATTCAG CACTATGTCC
GAGGAGCAGT TCGGAGGGGA CGGGGCGGCG GCGGCGGCAA CGGCGGCGGT AGGCGGCTCG
GCGGGCGAGC AGGAGGGAGC CATGGTGGCG GCGGCGCAGG GGGCAGCGGC GGCGGCGGGA
AGCGGGAGCG GCGGCGGCTC TGCGGCCGGA GGCACCGAAG GAGGCAGCAC CGAGGCAGAG
GGAGCGAAGA TCGACGCCAG TAAGAATGAG GAGGATGAAG GGAAAATGTT TATAGGAGGC
CTTAGCTGGG ACACCACAAA GAAAGACCTG AAGGACTACT TTTCCAAATT TGGGGATGTT
GTAGACTGCA CTCTGAAGTT AGATCCTATC ACAGGGCGAT CAAGGGGTTT TGGCTTTGTG
CTATTTAAAG AGTCGGAGAG TGTAGATAAG GTCATGGATC AGAAAGAACA TAAATTGAAT
GGGAAAGTCA TTGATCCTAA AAGGGCCAAA GCCATGAAAA CAAAAGAGCC CGTCAAAAAA
ATTTTTGTTG GTGGCCTTTC TCCAGACACA CCTGAAGAAA AAATAAGAGA GTACTTTGGT
GGTTTTGGTG AGGTTGAATC CATAGAGCTG CCTATGGACA ACAAGACCAA TAAGAGGCGT
GGGTTCTGTT TCATTACCTT TAAGGAAGAG GAACCAGTGA AGAAGATAAT GGAGAAGAAA
TACCACAATG TTGGTCTTAG TAAATGTGAA ATAAAAGTAG CCATGTGCGAA GGAGCAGTAT
CAGCAGCAGC AGCAGTGGGG ATCTAGAGGA GGGTTTGCAG GAAGAGCTCG CGGAAGAGGC
GGTGGCCCA GTCAAAACCTG GAACCAGGGA TATAGTAACT ATTGGAACCA AGGCTATGGC
AGCTATGGAT ATAACAGCCA AGGGTACGGT GGTTATGGAG GATATGACTA CACTGGTTAC
AACAGCTACT ATGGATATGG TGACTATAGC AATCAGCAGA GTGGTTATGG GAAAGTATCC
AGACGAGGTG GTCATCAAAA TAGCTACAAA CCATACTAAG GATCTTATTA AAGCAGAACT
TGTTTATTGC AGCTTATAAT GGTTACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAAT TTCACAAATA
AAGCATTTTT TTCACTGCAT TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA ACTCATCAAT GTATCTTATC
ATGTCTGGTC GACTCTAGAC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGCTCGGTCCG
TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT
CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA
AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG CATCACAAAA
ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGCGGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTT

CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC GGATACCTGT
 CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT AGGTATCTCA
 GTTCGGTGTA GGTCGTTTCGC TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCC GTTCAGCCCC
 ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT
 CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA
 CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT
 GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC
 AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA
 AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA
 ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT
 TAAATTAATA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA
 GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA
 TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC
 CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA
 ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC
 AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA
 ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT
 TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG
 CGGTTAGCTC CTTCGGTCTT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC
 TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC TTACTGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT
 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT
 GCTCTTGCCC GCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAAAGTGC
 TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT
 CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA
 GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA
 CACGGAATG TTGAATACTC ATACTCTTCT TTTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG
 GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG
 TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA
 CATTAACCTA TAAAAATAGG CGTATCACGA GGCCCCTTTC GTCTCGCGCG TTTCCGGTGAT
 GACGGTGAAA ACCTCTGACA CATGCAGCTC CCGGAGACGG TCACAGCTTG TCTGTAAGCG
 GATGCCGGGA GCAGACAAGC CCGTCAGGGC GCGTCAGCGG GTGTTGGCGG GTGTGCGGGC
 TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT GTRACTGAGAG TGCACCATAT GCGGTGTGAA
 ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGA AATTGTAAAC GTTAATATTT
 TGTTAAAATT CCGTTAAAAT TTTTGTTAAA TCAGCTCATT TTTTAACCAA TAGGCCGAAA
 TCGGCAAAAT CCCTTATAAA TCAAAAAGAA AGACCGAGAT AGGGTTGAGT GTTGTTCAG
 TTTGGAACAA GAGTCCACTA TTAAAGAACG TGGACTCCAA CGTCAAAGGG CGAAAAACCG
 TCTATCAGGG CGATGGCCCA CTACGTGAAC CATCACCCTA ATCAAGTTTT TTGGGGTCGA
 GGTGCCGTAA AGCACTAAAT CGGAACCCTA AAGGGAGCCC CCGATTTAGA GCTTGACGGG
 GAAAGCCGGC GAACGTGGCG AGAAAGGAAG GGAAGAAAGC GAAAGGAGCG GGCGCTAGGG
 CGCTGGCAAG TGTAGCGGTC ACGCTGCGCG TAACCACCAC ACCCGCCGCG CTTAATGCGC
 CGCTACAGGG CCGTTCGCGC CATTGCCAT TCAGGCTACG CAACTGTTGG GAAGGGCGAT
 CGGTGCGGGC CTCTTCGCTA TTACGCCAG

VECTORES PGEX4T-1 Y PGEX4T1-rAUF1

Regiones resaltadas en el texto:

Texto en rojo: Secuencia codificante para GST.

GAATTC: Sitio de corte de la enzima EcoRI.

Texto en azul y negritas: Marco de lectura de AUF1.

GTCGAC: Sitio de corte de la enzima Sall

PGEX4T-1

```
ACGTTATCGA CTGCACGGTG CACCAATGCT TCTGGCGTCA GGCAGCCATC GGAAGCTGTG
GTATGGCTGT GCAGGTCGTA AATCACTGCA TAATTCGTGT CGCTCAAGGC GCACTCCCGT
TCTGGATAAT GTTTTTTTCG CCGACATCAT AACGGTTCTG GCAAATATTC TGAAATGAGC
TGTTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT GTGAGCGGAT AACAAATTTCA
CACAGGAAAC AGTATTCATG TCCCTATAC TAGGTTATTG GAAAATTAAG GGCCTTGTGC
AACCCACTCG ACTTCTTTTG GAATATCTTG AAGAAAAATA TGAAGAGCAT TTGTATGAGC
GCGATGAAGG TGATAAATGG CGAAACAAAA AGTTTGAATT GGGTTTGGAG TTTCCCAATC
TTCTTATTA TATTGATGGT GATGTTAAAT TAACACAGTC TATGGCCATC ATACGTTATA
TAGCTGACAA GCACAACATG TTGGGTGGTT GTCCAAAAGA GCGTGCAGAG ATTTCAATGC
TTGAAGGAGC GGTTTTGGAT ATTAGATACG GTGTTTCGAG AATTGCATAT AGTAAAGACT
TTGAAACTCT CAAAGTTGAT TTTCTTAGCA AGCTACCTGA AATGCTGAAA ATGTTCGAAG
ATCGTTTATG TCATAAAACA TATTTAAATG GTGATCATGT AACCCATCCT GACTTCATGT
TGTATGACGC TCTTGATGTT GTTTTATACA TGGACCCAAT GTGCCTGGAT GCGTTCCCAA
AATTAGTTTG TTTTAAAAAA CGTATTGAAG CTATCCCACA AATTGATAAG TACTTGAAAT
CCAGCAAGTA TATAGCATGG CTTTGCAGG GCTGGCAAGC CACGTTTGGT GGTGGCGACC
ATCCTCCAAA ATCGGATCTG GTTCCGCGTG GATCCCCGGA ATTCCCGGT CGACTCGAGC
GGCCGCATCG TGACTGACTG ACGATCTGCC TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC
TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA
GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC
AGTCACGTAG CGATAGCGGA GTGTATAATT CTTGAAGACG AAAGGGCCTC GTGATACGCC
TATTTTTATA GGTAAATGTC ATGATAATAA TGGTTTCTTA GACGTCAGGT GGCACTTTTC
GGGGAAATGT GCGCGGAACC CCTATTTGTT TATTTTTCTA AATACATTCA AATATGTATC
CGCTCATGAG ACAATAACCC TGATAAATGC TTCAATAATA TTGAAAAAGG AAGAGTATGA
GTATTCACAA TTTCCGTGTC GCCCTTATTC CCTTTTTTGC GGCATTTTGC CTTCCTGTTT
TTGCTCACCC AGAAACGCTG GTGAAAGTAA AAGATGCTGA AGATCAGTTG GGTGCACGAG
TGGGTTACAT CGAACTGGAT CTCAACAGCG GTAAGATCCT TGAGAGTTTT CGCCCCGAAG
AACGTTTTCC AATGATGAGC ACTTTTAAAG TTCTGCTATG TGGCGCGGTA TTATCCCCTG
TTGACGCCGG GCAAGAGCAA CTCGGTCCGC GCATACACTA TTCTCAGAAAT GACTTGGTTG
AGTACTCACC AGTCACAGAA AAGCATCTTA CGGATGGCAT GACAGTAAGA GAATTATGCA
GTGCTGCCAT AACCATGAGT GATAACACTG CGGCCAACTT ACTTCTGACA ACGATCGGAG
GACCGAAGGA GCTAACCGCT TTTTTCACACA ACATGGGGGA TCATGTAACCT CGCCTTGATC
GTTGGGAACC GGAGCTGAAT GAAGCCATAC CAAACGACGA GCGTGACACC ACGATGCCTG
CAGCAATGGC AACAACGTTG CGCAAATAT TAACTGGCGA ACTACTTACT CTAGCTTCCC
GGCAACAATT AATAGACTGG ATGGAGGCGG ATAAAGTTGC AGGACCACTT CTGCGCTCGG
CCCTTCCGGC TGGCTGGTTT ATTGCTGATA AATCTGGAGC CGGTGAGCGT GGGTCTCGCG
GTATCATTGC AGCACTGGGG CCAGATGGTA AGCCCTCCCG TATCGTAGTT ATCTACACGA
CGGGGAGTCA GGCAACTATG GATGAACGAA ATAGACAGAT CGCTGAGATA GGTGCCTCAC
TGATTAAGCA TTGGTAACTG TCAGACCAAG TTTACTCATA TATACTTTAG ATTGATTTAA
AACTTCATTT TTAATTTAAA AGGATCTAGG TGAAGATCCT TTTTGATAAT CTCATGACCA
AAATCCCTTA ACGTGAGTTT TCGTTCCTACT GAGCGTCAGA CCCCCTAGAA AAGATCAAAG
GATCTTCTTG AGATCCTTTT TTTCTGCGCG TAATCTGCTG CTTGCAAACA AAAAAACCAC
CGCTACCAGC GGTGGTTTGT TTGCCGGATC AAGAGCTACC AACTCTTTTT CCGAAGGTAA
CTGGCTTCAG CAGAGCGCAG ATACCAAATA CTGTCTTCTT AGTGTAGCCG TAGTTAGGCC
```

ACCACTTCAA GAACTCTGTA GCACCGCCTA CATACTCGC TCTGCTAATC CTGTTACCAG
TGGCTGCTGC CAGTGGCGAT AAGTCGTGTC TTACCGGGTT GGACTCAAGA CGATAGTTAC
CGGATAAGGC GCAGCGGTCG GGCTGAACGG GGGGTTTCGTG CACACAGCCC AGCTTGGAGC
GAACGACCTA CACCGAACTG AGATACCTAC AGCGTGAGCT ATGAGAAAAGC GCCACGCTTC
CCGAAGGGAG AAAGGCGGAC AGGTATCCGG TAAGCGGCAG GGTCGGAACA GGAGAGCGCA
CGAGGGAGCT TCCAGGGGGA AACGCCTGGT ATCTTTATAG TCCTGTCCGG TTTCCGCCACC
TCTGACTTGA GCGTTCGATTT TTGTGATGCT CGTCAGGGGG GCGGAGCCTA TGGAAAAACG
CCAGCAACGC GGCCTTTTTTA CGGTTCTCTG CTTTTTGCTG GCCTTTTGCT CACATGTTCT
TTCTTGCCTT ATCCCCTGAT TCTGTGGATA ACCGTATTAC CGCCTTTGAG TGAGCTGATA
CCGCTCGCCG CAGCCGAACG ACCGAGCGCA GCGAGTCAGT GAGCGAGGAA GCGGAAGAGC
GCCTGATGCG GTATTTTCTC CTTACGCATC TGTGCGGTAT TTCACACCGC ATAAATTCCG
ACACCATCGA ATGGTGCAA ACCTTTCGCG GTATGGCATG ATAGCGCCCC GAAGAGAGTC
AATTCAGGGT GGTGAATGTG AAACCAGTAA CGTTATACGA TGTCGCAGAG TATGCCGGTG
TCTCTTATCA GACCGTTTCC CGCGTGGTGA ACCAGGCCAG CCACGTTTCT GCGAAAAACG
GGGAAAAAGT GGAAGCGGCG ATGGCGGAGC TGAATTACAT TCCCAACCGC GTGGCACAAC
AACTGGCGGG CAAACAGTCG TTGCTGATTG GCGTTGCCAC CTCCAGTCTG GCCCTGCACG
CGCCGTCCGA AATTGTCCG GCGATTAAAT CTCGCGCCGA TCAACTGGGT GCCAGCGTGG
TGGTGTCCAT GGTAGAACGA AGCGGCGTCG AAGCCTGTAA AGCGGCGGTG CACAATCTTC
TCGCGCAACG CGTCAGTGGG CTGATCATT AACTATCCGCT GGATGACCAG GATGCCATTG
CTGTGGAAGC TGCCCTGCACT AATGTTCCGG CGTTATTTCT TGATGTCTCT GACCAGACAC
CCATCAACAG TATTATTTTC TCCCATGAAG ACGGTACCGG ACTGGGCGTG GAGCATCTGG
TCGCATTGGG TCACCAGCAA ATCGCGCTGT TAGCGGGCCC ATTAAGTTCT GTCTCGGCGC
GTCTGCGTCT GGCTGGCTGG CATAAATATC TCACTCGCAA TCAAATTCAG CCGATAGCGG
AACGGGAAGG CGACTGGAGT GCCATGTCCG GTTTTCAACA AACCATGCAA ATGCTGAATG
AGGGCATCGT TCCCCTGCG ATGCTGGTTG CCAACGATCA GATGGCGCTG GCGCAATGC
GCGCCATTAC CGAGTCCGGG CTGCGCGTTG GTGCGGATAT CTCGGTAGTG GGATACGACG
ATACCGAAGA CAGTCATGT TATATCCCGC CGTTAACCAC CATCAAACAG GATTTTCGCC
TGCTGGGGCA AACCAGCGTG GACCGCTTGC TGCAACTCTC TCAGGGCCAG GCGGTGAAGG
GCAATCAGCT GTTGCCCGTC TCACTGGTGA AAAGAAAAAC CACCCTGGCG CCCAATACGC
AAACCGCCTC TCCCCTGCGG TTGGCCGATT CATTAATGCA GCTGGCACGA CAGGTTTCCC
GACTGGAAAG CGGGCAGTGA GCGCAACGCA ATTAATGTGA GTTAGCTCAC TCATTAGGCA
CCCCAGGCTT TACACTTTAT GCTTCCGGCT CGTATGTTGT GTGGAATTGT GAGCGGATAA
CAATTTTACA CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGGAT TCACTGGCCG TCGTTTTACA
ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGCGTTAC CCAACTTAAT CGCCTTGCAG CACATCCCCC
TTTCGCCAGC TGCGTAATA GCGAAGAGGC CCGCACCGAT CGCCCTTCCC AACAGTTGCG
CAGCCTGAAT GGCGAATGGC GCTTTGCCTG GTTTCCGGCA CCAGAAGCGG TGCCGGAAAG
CTGGCTGGAG TCGATCTTC CTGAGGCCGA TACTGTCTGTC GTCCCCTCAA ACTGGCAGAT
GCACGGTTAC GATGCGCCCA TCTACACCAA CGTAACCTAT CCCATTACGG TCAATCCGCC
GTTTGTTCCT ACAGGAAATC CGACGGGTTG TTAATCGCTC ACATTTAATG TTGATGAAAG
CTGGCTACAG GAAGGCCAGA CGCAATTAT TTTTGATGGC GTTGAATT

PGEX4T1-p37hAUF1

ACGTTATCGA CTGCACGGTG CACCAATGCT TCTGGCGTCA GGCAGCCATC GGAAGCTGTG
GTATGGCTGT GCAGGTCGTA AATCACTGCA TAATTCGTGT CGCTCAAGGC GCACTCCCGT
TCTGGATAAT GTTTTTTGCG CCGACATCAT AACGGTCTG GCAAATATTC TGAAATGAGC
TGTTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT GTGAGCGGAT AACAAATTC A
CACAGGAAAC AGTATTCATG **TCCCCTATAC TAGGTTATTG GAAAATTAAG GGCCTTGTGC**
AACCCACTCG ACTTCTTTTG GAATATCTTG AAGAAAAATA TGAAGAGCAT TTGTATGAGC
GCGATGAAGG TGATAAATGG CGAAACAAAA AGTTTGAATT GGGTTTGAGG TTTCCCAATC

TTCCTTATTA TATTGATGGT GATGTTAAAT TAACACAGTC TATGGCCATC ATACGTTATA
TAGCTGACAA GCACAACATG TTGGGTGGTT GTCCAAAAGA GCGTGCAGAG ATTTCAATGC
TTGAAGGAGC GGTTTTGGAT ATTAGATACG GTGTTTCGAG AATTGCATAT AGTAAAGACT
TTGAAACTCT CAAAGTTGAT TTTCTTAGCA AGCTACCTGA AATGCTGAAA ATGTTCGAAG
ATCGTTTATG TCATAAAACA TATTTAAATG GTGATCATGT AACCCATCCT GACTTCATGT
TGTATGACGC TCTTGATGTT GTTTTATACA TGGACCCAAT GTGCCTGGAT GCGTTCCCAA
AATTAGTTTG TTTTAAAAAA CGTATTGAAG CTATCCCACA AATTGATAAG TACTTGAAAT
CCAGCAAGTA TATAGCATGG CCTTTGCAGG GCTGGCAAGC CACGTTTGGT GGTGGCGACC
ATCCTCCAAA ATCGGATCTG GTTCCGCGTG GATCCCCGGA ATTCAGCACT ATGTCGGAGG
AGCAGTTCGG CGGGGACGGG GCGGCGGCAG CGGCAACGGC GGCGGTAGGC GGCTCGGCGG
GCGAGCAGGA GGGAGCCATG GTGGCGGCGA CACAGGGGGC AGCGGCGGCG GCGGGAAGCG
GAGCCGGGAC CGGGGGCGGA ACCGCGTCTG GAGGCACCGA AGGGGGCAGC GCCGAGTCGG
AGGGGGCGAA GATTGACGCC AGTAAGAACG AGGAGGATGA AGGGAAAATG TTTATAGGAG
GCCTTAGCTG GGACACTACA AAGAAAGATC TGAAGGACTA CTTTTCCAAA TTTGGTGAAG
TTGTAGACTG CACTCTGAAG TTAGATCCTA TCACAGGGCG ATCAAGGGGT TTTGGCTTTG
TGCTATTTAA AGAATCGGAG AGTGTAGATA AGGTCATGGA TCAAAAAGAA CATAAATGA
ATGGGAAGGT GATTGATCCT AAAAGGGCCA AAGCCATGAA AACAAAAGAG CCGGTTAAAA
AAATTTTTGT TGGTGGCCTT TCTCCAGATA CACCTGAAGA GAAAATAAGG GAGTACTTTG
GTGGTTTTGG TGAGGTGGAA TCCATAGAGC TCCCATGGA CAACAAGACC AATAAGAGGC
GTGGTTCCTG CTTTATTACC TTTAAGGAAG AAGAACCAGT GAAGAAGATA ATGGAAAAGA
AATACCACAA TGTTGGTCTT AGTAAATGTG AAATAAAAGT AGCCATGTCTG AAGGAACAAT
ATCAGCAACA GCAACAGTGG GGATCTAGAG GAGGATTTGC AGGAAGAGCT CGTGGAAAGG
GTGGTGACCA GCAGAGTGGT TATGGGAAGG TATCCAGGCG AGGTGGTCAT CAAAATAGCT
ACAAACCATA CTAAGGATCT TATTAAAGCA GAACTTGTTT ATTCAGCTT ATAATGGTTA
CAAATAAAGC AATAGCATCA CAAATTTTAC AAATAAAGCA TTTTTTTTAC TGCATTCTAG
TTGTGGTTTTG TCCAAACTCA TCAATGTATC TTATCATGTC TGTATCATGT CTGCTCGAC
CGAGCGGCCG CATCGTGAAT GACTGACGAT CTGCCTCGCG CGTTTTCGGTG ATGACGGTGA
AAACCTCTGA CACATGCAGC TCCCGGAGAC GGTCACAGCT TGTCTGTAAG CGGATGCCGG
GAGCAGACAA GCCCGTCAGG GCGCGTCAGC GGGTGTGGC GGGTGTGGG GCGCAGCCAT
GACCCAGTCA CGTAGCGATA GCGGAGTGTA TAATTCTTGA AGACGAAAGG GCCTCGTGAT
ACGCCTATTT TTATAGGTTA ATGTCATGAT AATAATGGTT TCTTAGACGT CAGGTGGCAC
TTTTCGGGGA AATGTGCGCG GAACCCCTAT TTGTTTATTT TTCTAAATAC ATTCAAATAT
GTATCCGCTC ATGAGACAAT AACCCGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA AAAGGAAGAG
TATGAGTATT CAACATTTCC GTGTGCCCCC TATTCCTTTT TTTGCGGCAT TTTGCCTTCC
TGTTTTTGCT CACCCAGAAA CGCTGGTGAA AGTAAAAGAT GCTGAAGATC AGTTGGGTGC
ACGAGTGGGT TACATCGAAC TGGATCTCAA CAGCGGTAAG ATCCTTGAGA GTTTTCGCC
CGAAGAACGT TTTCCAATGA TGAGCACTTT TAAAGTTCTG CTATGTGGCG CCGTATTATC
CCGTGTTGAC GCCGGGCAAG AGCAACTCGG TCGCCGCATA CACTATTCTC AGAATGACTT
GGTTGAGTAC TCACCAGTCA CAGAAAAGCA TCTTACGGAT GGCATGACAG TAAGAGAATT
ATGCAGTGCT GCCATAACCA TGAGTGATAA CACTGCGGCC AACTTACTTC TGACAACGAT
CGGAGGACCG AAGGAGCTAA CCGCTTTTTT GCACAACATG GGGGATCATG TAACTCGCCT
TGATCGTTGG GAACCGGAGC TGAATGAAGC CATACCAAAC GACGAGCGTG ACACCACGAT
GCCTGCAGCA ATGGCAACAA CGTTGCGCAA ACTATTAAC TGGCGAACTAC TTAATCTAGC
TTCCCGGCAA CAATTAATAG ACTGGATGGA GGCGGATAAA GTTGCAGGAC CACTTCTGCG
CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT GGTTTATTGC TGATAAATCT GGAGCCGGTG AGCGTGGGTG
TCGCGGTATC ATTGACGACAC TGGGGCCAGA TGGTAAGCCC TCCCGTATCG TAGTTATCTA
CACGACGGGG AGTCAGGCAA CTATGGATGA ACGAAATAGA CAGATCGCTG AGATAGGTGC
CTCACTGATT AAGCATTGGT AACTGTCAGA CCAAGTTTAC TCATATATAC TTTAGATTGA
TTTAAAACCT CATTTTTAAT TTAAAAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT
GACCAAATC CCTAACGTG AGTTTTCGTT CCACTGAGCG TCAGACCCCG TAGAAAAGAT
CAAAGGATCT TCTTGAGATC CTTTTTTTCT GCGCGTAATC TGCTGCTTGC AAACAAAAAA

ACCACCGCTA CCAGCGGTGG TTTGTTTTGCC GGATCAAGAG CTACCAACTC TTTTTCCGAA
 GGTAAGTGGC TTCAGCAGAG CGCAGATACC AAATACTGTC CTTCTAGTGT AGCCGTAGTT
 AGGCCACCAC TTCAAGAACT CTGTAGCACC GCCTACATAC CTCGCTCTGC TAATCCTGTT
 ACCAGTGGCT GCTGCCAGTG GCGATAAGTC GTGTCTTACC GGGTTGGACT CAAGACGATA
 GTTACCGGAT AAGGCGCAGC GGTCGGGCTG AACGGGGGGT TCGTGCACAC AGCCCAGCTT
 GGAGCGAACG ACCTACACCG AACTGAGATA CCTACAGCGT GAGCTATGAG AAAGCGCCAC
 GCTTCCCGAA GGGAGAAAGG CGGACAGGTA TCCGGTAAGC GGCAGGGTCG GAACAGGAGA
 GCGCACGAGG GAGCTTCCAG GGGGAAACGC CTGGTATCTT TATAGTCCTG TCGGGTTTTCG
 CCACCTCTGA CTTGAGCGTC GATTTTTGTG ATGCTCGTCA GGGGGGCGGA GCCTATGGAA
 AAACGCCAGC AACCGGGCCT TTTTACGGTT CCTGGCCTTT TGCTGGCCTT TTGCTCACAT
 GTTCTTTCCT GCGTTATCCC CTGATTCTGT GGATAACCGT ATTACCGCCT TTGAGTGAGC
 TGATACCGCT CGCCGCAGCC GAACGACCGA GCGCAGCGAG TCAGTGAGCG AGGAAGCGGA
 AGAGCGCCTG ATGCGGTATT TTCTCCTTAC GCATCTGTGC GGTATTTTAC ACCGCATAAA
 TTCCGACACC ATCGAATGGT GCAAAACCTT TCGCGGTATG GCATGATAGC GCCCGGAAGA
 GAGTCAATTC AGGGTGGTGA ATGTGAAACC AGTAACGTTA TACGATGTGC CAGAGTATGC
 CGGTGTCTCT TATCAGACCG TTCCCGCGT GGTGAACCAG GCCAGCCACG TTTCTGCGAA
 AACCGGGGAA AAAGTGGAA GCGCGATGGC GGAGCTGAAT TACATTTCCA ACCGCGTGGC
 ACAACAACCTG GCGGGCAAAC AGTCGTTGCT GATTGGCGTT GCCACCTCCA GTCTGGCCCT
 GCACGCGCCG TCGCAAATTG TCGCGGCGAT TAAATCTCGC GCCGATCAAC TGGGTGCCAG
 CGTGGTGGTG TCGATGGTAG AACGAAGCGG CGTCGAAGCC TGTAAGCGG CGGTGCACAA
 TCTTCTCGCG CAACGCGTCA GTGGGCTGAT CATTAACCTAT CCGCTGGATG ACCAGGATGC
 CATTGCTGTG GAAGCTGCCT GACTAATGT TCCGGCGTTA TTTCTTGATG TCTCTGACCA
 GACACCATC AACAGTATTA TTTTCTCCA TGAAGACGGT ACGCGACTGG GCGTGGAGCA
 TCTGGTCGCA TTGGGTCACC AGCAAATCGC GCTGTTAGCG GGCCATTAA GTTCTGTCTC
 GCGCGTCTG CGTCTGGCTG GCTGGCATAA ATATCTCACT CGCAATCAA TTCAGCCGAT
 AGCGGAACGG GAAGGCGACT GGAGTGCCAT GTCCGGTTTT CAACAAACCA TGCAAATGCT
 GAATGAGGGC ATCGTTCCCA CTGCGATGCT GGTTGCCAAC GATCAGATGG CGCTGGGCGC
 AATGCGCGCC ATTACCGAGT CCGGGCTGCG CGTTGGTGCG GATATCTCGG TAGTGGGATA
 CGACGATACC GAAGACAGCT CATGTTATAT CCCGCCGTTA ACCACCATCA AACAGGATTT
 TCGCCTGCTG GGGCAAACCA GCGTGGACCG CTTGCTGCAA CTCTCTCAGG GCCAGGCGGT
 GAAGGGCAAT CAGCTGTTGC CCGTCTCACT GGTGAAAAGA AAAACCACCC TGGCGCCCAA
 TACGCAAACC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC CGATTCAATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT
 TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCCTCATT
 AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG
 GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG ACCATGATTA CGGATTCACT GGCCGTCTGTT
 TTACAACGTC GTGACTGGGA AAACCCTGGC GTTACCCAAC TTAATCGCCT TGCAGCACAT
 CCCCCTTTTCG CCAGCTGGCG TAATAGCGAA GAGGCCCGCA CCGATCGCCC TTCCCAACAG
 TTGCGCAGCC TGAATGGCGA ATGGCGCTTT GCCTGGTTTT CCGCACCAGA AGCGGTGCCG
 GAAAGCTGGC TGGAGTGC GA TCTTCCTGAG GCCGATACTG TCGTCTGCC CTCAAACCTGG
 CAGATGCACG GTTACGATGC GCCCATCTAC ACCAACGTAA CCTATCCCAT TACGGTCAAT
 CCGCCGTTTG TTCCCACGGA GAATCCGACG GGTTGTTACT CGCTCACAT TAATGTTGAT
 GAAAGCTGGC TACAGGAAGG CCAGACGCGA ATTATTTTTG ATGGCGTTGG AATT

PGEX4T1-p45hAUF1

ACGTTATCGA CTGCACGGTG CACCAATGCT TCTGGCGTCA GGCAGCCATC GGAAGCTGTG
 GTATGGCTGT GCAGGTCGTA AATCACTGCA TAATTCGTGT CGCTCAAGGC GCACTCCCGT
 TCTGGATAAT GTTTTTTGCG CCGACATCAT AACGGTTCTG GCAAATATTC TGAAATGAGC
 TGTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT GTGAGCGGAT AACAAATTTCA
 CACAGGAAAC AGTATTCATG **TCCCCTATAC TAGGTTATTG GAAAATTAAG GGCCTTGTGC**

AACCCACTCG ACTTCTTTTG GAATATCTTG AAGAAAAATA TGAAGAGCAT TTGTATGAGC
GCGATGAAGG TGATAAATGG CGAAACAAAA AGTTTGAATT GGGTTTGGAG TTTCCCAATC
TTCCTTATTA TATTGATGGT GATGTTAAAT TAACACAGTC TATGGCCATC ATACGTTATA
TAGCTGACAA GCACAACATG TTGGGTGGTT GTCCAAAAGA GCGTGCAGAG ATTTCAATGC
TTGAAGGAGC GGTTTTGGAT ATTAGATACG GTGTTTCGAG AATTGCATAT AGTAAAGACT
TTGAAACTCT CAAAGTTGAT TTTCTTAGCA AGCTACCTGA AATGCTGAAA ATGTTCTGAAG
ATCGTTTATG TCATAAAACA TATTTAAATG GTGATCATGT AACCCATCCT GACTTCATGT
TGTATGACGC TCTTGATGTT GTTTTATACA TGGACCCAAT GTGCCTGGAT GCGTTCCCAA
AATTAGTTTG TTTTAAAAAA CGTATTGAAG CTATCCCACA AATTGATAAG TACTTGAAAT
CCAGCAAGTA TATAGCATGG CCTTTCAGG GCTGGCAAGC CACGTTTGGT GGTGGCGACC
ATCCTCCAAA ATCGGATCTG GTTCCGCGTG GATCCCCGGA ATTCAGCACT ATGTCGGAGG
AGCAGTTCGG CGGGGACGGG GCGGCGGCAG CGGCAACGGC GGCGGTAGGC GGCTCGGCGG
GCGAGCAGGA GGGAGCCATG GTGGCGGCGA CACAGGGGGC AGCGGCGGCG GCGGGAAGCG
GAGCCGGGAC CGGGGGCGGA ACCGCGTCTG GAGGCACCGA AGGGGGCAGC GCCGAGTCGG
AGGGGGCGAA GATTGACGCC AGTAAGAAGC AGGAGGATGA AGGCCATTCA AACTCCTCCC
CACGACACTC TGAAGCAGCG ACGGCACAGC GGGAAGAATG GAAAATGTTT ATAGGAGGCC
TTAGCTGGGA CACTACAAAG AAAGATCTGA AGGACTACTT TTCCAAATTT GGTGAAGTTG
TAGACTGCAC TCTGAAGTTA GATCCTATCA CAGGGCGATC AAGGGGTTTT GGCTTTGTGC
TATTTAAAGA ATCGGAGAGT GTAGATAAGG TCATGGATCA AAAAGAACAT AAATTGAATG
GGAAGGTGAT TGATCCTAAA AGGGCCAAAG CCATGAAAAC AAAAGAGCCG GTTAAAAAAA
TTTTTGTGG TGGCCTTTCT CCAGATACAC CTGAAGAGAA AATAAGGGAG TACTTTGGTG
GTTTTGGTGA GGTGGAATCC ATAGAGCTCC CCATGGACAA CAAGACCAAT AAGAGGCGTG
GGTCTGCTT TATTACCTTT AAGGAAGAAG AACCAGTGAA GAAGATAATG GAAAAGAAAT
ACCACAATGT TGGTCTTAGT AAATGTGAAA TAAAAGTAGC CATGTCTGAAG GAACAATATC
AGCAACAGCA ACAGTGGGGA TCTAGAGGAG GATTTGCAGG AAGAGCTCGT GGAAGAGGTG
GTGGCCCCAG TCAAAACTGG AACCAGGGAT ATAGTAACTA TTGGAATCAA GGCTATGGCA
ACTATGGATA TAACAGCCAA GGTACGGTG GTTATGGAGG ATATGACTAC ACTGGTTACA
ACAATACTA TGGATATGGT GATTATAGCA ACCAGCAGAG TGGTTATGGG AAGGTATCCA
GGCGAGGTGG TCATCAAAAT AGCTACAAAC CATACTAAGG ATCTTATTAA AGCAGAACTT
GTTTATTGCA GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA
AGCATTTTTT TCACTGCATT CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA
TGTCGTGATC ATGTCTGGTC GACTCGAGCG GCCGCATCGT GACTGACTGA CGATCTGCCT
CGCGCGTTTT GGTGATGACG GTGAAAACCT CTGACACATG CAGCTCCCGG AGACGGTCAC
AGCTTGTCTG TAAGCGGATG CCGGGAGCAG ACAAGCCCGT CAGGGCGCGT CAGCGGGTGT
TGGCGGGTGT CGGGGCGCAG CCATGACCCA GTCACGTAGC GATAGCGGAG TGTATAAATC
TTGAAGACGA AAGGGCCTCG TGATACGCCCT ATTTTTATAG GTTAATGTCA TGATAATAAT
GGTTTCTTAG ACGTCAGGTG GCACTTTTCG GGGAAATGTG CGCGGAACCC CTATTTGTTT
ATTTTTCTAA ATACATTCAA ATATGTATCC GTCATGAGA CAATAACCC TATAAATGCT
TCAATAATAT TGAAAAGGA AGAGTATGAG TATTCAACAT TTCCGTGTCT CCCTTATTC
CTTTTTTGCG GCATTTTGCC TTCCTGTTTT TGCTCACCCA GAAACGCTGG TGAAAGTAAA
AGATGCTGAA GATCAGTTGG GTGCACGAGT GGGTTACATC GAACTGGATC TCAACAGCGG
TAAGATCCTT GAGAGTTTTT GCCCCGAAGA ACGTTTTCCA ATGATGAGCA CTTTTAAAGT
TCTGCTATGT GCGCGGGTAT TATCCCGTGT TGACGCCGGG CAAGAGCAAC TCGGTCGCCG
CATACACTAT TCTCAGAATG ACTTGTTTGA GTACTACCA GTCACAGAAA AGCATCTTAC
GGATGGCATG ACAGTAAGAG AATTATGCAG TGCTGCCATA ACCATGAGTG ATAACACTGC
GGCCAACTTA CTTCTGACAA CGATCGGAGG ACCGAAGGAG CTAACCGCTT TTTTGCACAA
CATGGGGGAT CATGTAACTC GCCTTGATCG TTGGGAACCG GAGCTGAATG AAGCCATACC
AAACGACGAG CGTGACACCA CGATGCCTGC AGCAATGGCA ACAACGTTGC GCAAACTATT
AACTGGCGAA CTACTTACTC TAGCTTCCCG GCAACAATTA ATAGACTGGA TGGAGGCGGA
TAAAGTTGCA GGACCACTTC TGCGCTCGGC CTTCCGGCT GGCTGGTTTA TTGCTGATAA
ATCTGGAGCC GGTGAGCGTG GGTCTCGCGG TATCATTGCA GCACTGGGGC CAGATGGTAA
GCCCTCCCGT ATCGTAGTTA TCTACACGAC GGGGAGTCAG GCAACTATGG ATGAACGAAA

TAGACAGATC GCTGAGATAG GTGCCTCACT GATTAAGCAT TGGTAACTGT CAGACCAAGT
TTACTCATAT ATACTTTAGA TTGATTTAAA ACTTCATTTT TAATTTAAAA GGATCTAGGT
GAAGATCCTT TTTGATAATC TCATGACCAA AATCCCTTAA CGTGAGTTTT CGTTCCACTG
AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTGA GATCCTTTTT TTCTGCGCGT
AATCTGCTGC TTGCAAACAA AAAAACCACC GCTACCAGCG GTGGTTTTGT TGCCGGATCA
AGAGCTACCA ACTCTTTTTTC CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC AGAGCGCAGA TACCAAATAC
TGTCCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG AACTCTGTAG CACCGCCTAC
ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTTACCAGT GGCTGCTGCC AGTGGCGATA AGTCGTGTCT
TACCGGGTTG GACTCAAGAC GATAGTTACC GGATAAGGCG CAGCGGTCGG GCTGAACGGG
GGGTTCGTGC ACACAGCCCA GCTTGGAGCG AACGACCTAC ACCGAAGTGA GATACCTACA
GCGTGAGCTA TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA AAGGCGGACA GGTATCCGGT
AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT CCAGGGGGAA ACGCCTGGTA
TCTTTATAGT CCTGTCGGGT TTCGCCACCT CTGACTTGAG CGTCGATTTT TGTGATGCTC
GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT GGAAAAACGC CAGCAACGCG GCCTTTTTAC GGTTCCCTGGC
CTTTTGCTGG CCTTTTGCTC ACATGTTCTT TCCTGCGTTA TCCCCTGATT CTGTGGATAA
CCGTATTACC GCCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCGC AGCCGAACGA CCGAGCGCAG
CGAGTCAGTG AGCGAGGAAG CGGAAGAGCG CTTGATGCGG TATTTTCTCC TTACGCATCT
GTGCGGTATT TCACACCGCA TAAATTCCGA CACCATCGAA TGGTGAAAAA CCTTTCGCGG
TATGGCATGA TAGCGCCCGG AAGAGAGTCA ATTCAGGGTG GTGAATGTGA AACCAGTAAC
GTTATACGAT GTCGCAGAGT ATGCCGGTGT CTCTTATCAG ACCGTTTCCC GCGTGGTGAA
CCAGGCCAGC CACGTTTCTG CGAAAACGCG GGAAAAAGTG GAAGCGGCGA TGGCGGAGCT
GAATTACATT CCCAACCGCG TGGCACAACA ACTGGCGGGC AAACAGTCGT TGCTGATTGG
CGTTGCCACC TCCAGTCTGG CCCTGCACGC GCCGTCGCAA ATTGTGCGCG CGATTAAATC
TCGCGCCGAT CAACTGGGTG CCAGCGTGGT GGTGTCGATG GTAGAACGAA GCGGCGTCGA
AGCCTGTAAA GCGGCGGTGC ACAATCTTCT CGCGCAACGC GTCAGTGGGC TGATCATTAA
CTATCCGCTG GATGACCAGG ATGCCATTGC TGTGGAAGCT GCCTGCACTA ATGTTCCGGC
GTTATTTCTT GATGTCTCTG ACCAGACACC CATCAACAGT ATTATTTTCT CCCATGAAGA
CGGTACGCGA CTGGGCGTGG AGCATCTGGT CGCATTGGGT CACCAGCAAA TCGCGCTGTT
AGCGGGCCCA TTAAGTTCTG TCTCGGCGCG TCTGCGTCTG GCTGGCTGGC ATAAATATCT
CACTCGCAAT CAAATTCAGC CGATAGCGGA ACGGGAAGGC GACTGGAGTG CCATGTCCGG
TTTTCAACAA ACCATGCAAA TGCTGAATGA GGGCATCGTT CCCACTGCGA TGCTGGTTGC
CAACGATCAG ATGGCGCTGG CGCAATGCGG CGCCATTACC GAGTCCGGGC TGCGCGTTGG
TGCGGATATC TCGGTAGTGG GATACGACGA TACCGAAGAC AGCTCATGTT ATATCCCGCC
GTTAACCACC ATCAAACAGG ATTTTCGCTT GCTGGGGCAA ACCAGCGTGG ACCGCTTGCT
GCAACTCTCT CAGGGCCAGG CGGTGAAGGG CAATCAGCTG TTGCCCGTCT CACTGGTGAA
AAGAAAAACC ACCCTGGCGC CCAATACGCA AACCGCCTCT CCCCGCGCGT TGGCCGATTC
ATTAATGCAG CTGGCACGAC AGGTTTCCCG ACTGGAAAGC GGGCAGTGAG CGCAACGCAA
TTAATGTGAG TTAGCTCACT CATTAGGCAC CCCAGGCTTT AACTTTATG CTTCCGGCTC
GTATGTTGTG TGGAATTGTG AGCGGATAAC AATTTACAC AGGAAACAGC TATGACCATG
ATTACGGATT CACTGGCCGT CGTTTTACAA CGTCGTGACT GGGAAAACC TGCGGTTACC
CAACTTAATC GCCTTGACGC ACATCCCCCT TTCGCCAGCT GGCCTAATAG CGAAGAGGCC
CGCACCGATC GCCCTTCCCA ACAGTTGCGC AGCCTGAATG GCGAATGGCG CTTTGCTGG
TTTCCGGCAC CAGAAGCGGT GCCGGAAAGC TGGCTGGAGT GCGATCTTCC TGAGGCCGAT
ACTGTCGTCG TCCCCTCAA CTGGCAGATG CACGGTTACG ATGCGCCCAT CTACACCAAC
GTAACCTATC CCATTACGGT CAATCCGCCG TTTGTTCCCA CGGAGAATCC GACGGGTTGT
TACTCGCTCA CATTTAATGT TGATGAAAGC TGGCTACAG AAGGCCAGAC GCGAATTATT
TTTGATGGCG TTGGAATT

PGEX4T1-p37rAUF1

ACGTTATCGA CTGCACGGTG CACCAATGCT TCTGGCGTCA GGCAGCCATC GGAAGCTGTG
GTATGGCTGT GCAGGTCGTA AATCACTGCA TAATTCGTGT CGCTCAAGGC GCACTCCCGT
TCTGGATAAT GTTTTTTGCG CCGACATCAT AACGGTCTG GCAAATATTC TGAAATGAGC
TGTTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT GTGAGCGGAT AACAAATTTCA
CACAGGAAAC AGTATTCATG TCCCCTATAC TAGGTTATTG GAAAATTAAG GGCCTTGTGC
AACCCACTCG ACTTCTTTTG GAATATCTTG AAGAAAAATA TGAAGAGCAT TTGTATGAGC
GCGATGAAGG TGATAAATGG CGAAACAAAA AGTTTGAATT GGGTTTGGAG TTTCCCAATC
TTCCTTATTA TATTGATGGT GATGTTAAAT TAACACAGTC TATGGCCATC ATACGTTATA
TAGCTGACAA GCACAACATG TTGGGTGGTT GTCCAAAAGA GCGTGCAGAG ATTTCAATGC
TTGAAGGAGC GGTTTTGGAT ATTAGATACG GTGTTTCGAG AATTGCATAT AGTAAAGACT
TTGAAACTCT CAAAGTTGAT TTTCTTAGCA AGCTACCTGA AATGCTGAAA ATGTTCGAAG
ATCGTTTATG TCATAAAACA TATTTAAATG GTGATCATGT AACCCATCCT GACTTCATGT
TGTATGACGC TCTTGATGTT GTTTTATACA TGGACCCAAT GTGCCTGGAT GCGTTCCCAA
AATTAGTTTG TTTTAAAAA CGTATTGAAG CTATCCCACA AATTGATAAG TACTTGAAAT
CCAGCAAGTA TATAGCATGG CCTTTCAGG GCTGGCAAGC CACGTTTGGT GGTGGCGACC
ATCCTCCAAA ATCGGATCTG GTTCCGCGTG GATCCCCGGA ATTCAGCACT ATGTCCGGAGG
AGCAGTTCGG AGGGGACGGG GCGGCGGCGG CGGCAACGGC GCGGGTAGGC GGCTCGGCGG
GCGAGCAGGA GGGAGCCATG GTGGCGGCGG CGCAGGGGGC AGCGGCGGCG GCGGGAAGCG
GGAGCGGCGG CGGCTCTGCG GCCGGAGGCA CCGAAGGAGG CAGCACCGAG GCAGAGGGAG
CGAAGATCGA CGCCAGTAAG AATGAGGAGG ATGAAGGGAA AATGTTTATA GGAGGCCTTA
GCTGGGACAC CACAAAGAAA GACCTGAAGG ACTACTTTTC CAAATTTGGG GATGTTGTAG
ACTGCACTCT GAAGTTAGAT CCTATCACAG GCGCATCAAG GGGTTTTGGC TTTGTGCTAT
TTAAAGAGTC GGAGAGTGTA GATAAGGTCA TGGATCAGAA AGAACATAAA TTGAATGGGA
AAGTCATTGA TCCTAAAAGG GCCAAAGCCA TGAAAACAAA AGAGCCCGTC AAAAAAATTT
TTGTTGGTGG CCTTCTCCA GACACACCTG AAGAAAAAAT AAGAGAGTAC TTTGGTGGTT
TTGGTGAGGT TGAATCCATA GAGCTGCCTA TGGACAACAA GACCAATAAG AGGCGTGGGT
TCTGTTTCAT TACCTTTAAG GAAGAGGAAC CAGTGAAGAA GATAATGGAG AAGAAATACC
ACAATGTTGG TCTTAGTAAA TGTGAAATAA AAGTAGCCAT GTCGAAGGAG CAGTATCAGC
AGCAGCAGCA GTGGGGATCT AGAGGAGGGT TTGCAGGAAG AGCTCGCGGA AGAGGCGGTG
ATCAGCAGAG TGGTTATGGG AAAGTATCCA GACGAGGTGG TCATCAAAAAT AGCTACAAAC
CATACTAAGG ATCTTATTAA AGCAGAACTT GTTTATTGCA GCTTATAATG GTTACAAATA
AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTT TCACTGCATT CTAGTTGTGG
TTTGTCCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA TGTCTG GTCG ACTCGAGCGG CCGCATCGTG
ACTGACTGAC GATCTGCCTC GCGCGTTTCG GTGATGACGG TGAAAACCTC TGACACATGC
AGCTCCCGGA GACGGTCACA GCTTGCTGTG AAGCGGATGC CGGGAGCAGA CAAGCCCGTC
AGGGCGCGTC AGCGGGTGTT GGCGGGTGTC GGGGCGCAGC CATGACCCAG TCACGTAGCG
ATAGCGGAGT GTATAATTCT TGAAGACGAA AGGGCCTCGT GATACGCCTA TTTTATAGG
TTAATGTCAT GATAATAATG GTTCTTAGA CGTCAGGTGG CACTTTTCGG GGAAATGTGC
GCGGAACCC TATTTGTTTA TTTTCTAAA TACATTCAA TATGTATCCG CTCATGAGAC
AATAACCCTG ATAAATGCTT CAATAATATT GAAAAAGGAA GAGTATGAGT ATTCAACATT
TCCGTGTCGC CCTTATTCCC TTTTTTGCGG CATTTTGCC TCCCTGTTTT GCTCACCCAG
AAACGCTGGT GAAAGTAAAA GATGCTGAAG ATCAGTTGGG TGCACGAGTG GGTTACATCG
AACTGGATCT CAACAGCGGT AAGATCCTTG AGAGTTTTCG CCCCGAAGAA CGTTTTCCAA
TGATGAGCAC TTTTAAAGTT CTGCTATGTG GCGCGGTATT ATCCCGTGTT GACGCCGGGC
AAGAGCAACT CGGTCGCCGC ATACACTATT CTCAGAATGA CTTGGTTGAG TACTCACCAG
TCACAGAAAA GCATCTTACG GATGGCATGA CAGTAAGAGA ATTATGCAGT GCTGCCATAA
CCATGAGTGA TAACACTGCG GCCAACTTAC TTCTGACAAAC GATCGGAGGA CCGAAGGAGC
TAACCGCTTT TTTGCACAAC ATGGGGGATC ATGTAACCTG CCTTGATCGT TGGGAACCGG

AGCTGAATGA AGCCATACCA AACGACGAGC GTGACACCAC GATGCCTGCA GCAATGGCAA
CAACGTTGCG CAAACTATTA ACTGGCGAAC TACTTACTCT AGCTTCCCGG CAACAATTAA
TAGACTGGAT GGAGGCGGAT AAAGTTGCAG GACCACTTCT GCGCTCGGCC CTTCCGGCTG
GCTGGTTTAT TGCTGATAAA TCTGGAGCCG GTGAGCGTGG GTCTCGCGGT ATCATTGCAG
CACTGGGGCC AGATGGTAAG CCCTCCCCTA TCGTAGTTAT CTACACGACG GGGAGTCAGG
CAACTATGGA TGAACGAAAT AGACAGATCG CTGAGATAGG TGCCTCACTG ATTAAGCATT
GGTAACTGTC AGACCAAGTT TACTCATATA TACTTTAGAT TGATTTAAAA CTTCATTTTT
AATTTAAAAAG GATCTAGGTG AAGATCCTTT TTGATAATCT CATGACCAAA ATCCCTTAAC
GTGAGTTTTT GTTCCACTGA GCGTCAGACC CCGTAGAAAA GATCAAAGGA TCTTCTTGAG
ATCCTTTTTTT TCTGCGCGTA ATCTGCTGCT TGCAAACAAA AAAACCACCG CTACCAGCGG
TGGTTTGTTT GCCGGATCAA GAGCTACCAA CTCTTTTTCC GAAGGTAAC TGGCTTCAGCA
GAGCGCAGAT ACCAAATACT GTCCTTCTAG GTAGCCGTA GTTAGGCCAC CACTTCAAGA
ACTCTGTAGC ACCGCCTACA TACCTCGCTC TGCTAATCCT GTTACCAGTG GCTGCTGCCA
GTGGCGATAA GTCGTGTCTT ACCGGGTGG ACTCAAGACG ATAGTTACCG GATAAGGCGC
AGCGGTCCGG CTGAACGGGG GGTTCGTGCA CACAGCCCAG CTTGGAGCGA ACGACCTACA
CCGAAC TGAG ATACCTACAG CGTGAGCTAT GAGAAAGCGC CACGCTTCCC GAAGGGAGAA
AGGCGGACAG GTATCCGGTA AGCGGCAGGG TCGGAACAGG AGAGCGCACG AGGGAGCTTC
CAGGGGGAAA CGCTGGTAT CTTTATAGTC CTGTCCGGTT TCGCCACCTC TGACTTGAGC
GTCGATTTTT GTGATGCTCG TCAGGGGGGC GGAGCCTATG GAAAAACGCC AGCAACGCGG
CCTTTTTACG GTTCCCTGGCC TTTTGCTGGC CTTTTGCTCA CATGTTCTTT CCTGCGTTAT
CCCCTGATTC TGTGGATAAC CGTATTACCG CTTTTGAGTG AGCTGATACC GCTCGCCGCA
GCCGAACGAC CGAGCGCAGC GAGTCAGTGA GCGAGGAAGC GGAAGAGCGC CTGATGCGGT
ATTTTCTCCT TACGCATCTG TGCGGTATTT CACACC GCAT AAATTCCGAC ACCATCGAAT
GGTGCAAAAC CTTTCGCGGT ATGGCATGAT AGCGCCCGGA AGAGAGTCAA TTCAGGGTGG
TGAATGTGAA ACCAGTAACG TTATACGATG TCGCAGAGTA TGCCGGTGTG TCTTATCAGA
CCGTTTCCCG CGTGGTGAAC CAGGCCAGCC ACGTTTCTGC GAAAACGCGG GAAAAAGTGG
AAGCGGCGAT GCGGAGCTG AATTACATTC CCAACC GCGT GGCACAACAA CTGGCGGGCA
AACAGTCGTT GCTGATTGGC GTTGCCACCT CCAGTCTGGC CCTGCACGCG CCGTCGCAA
TTGTGCGCGC GATTAAATCT CGCGCCGATC AACTGGGTGC CAGCGTGGTG GTGTGATGG
TAGAACGAAG CGGCGT CGAA GCCTGTAAAG CGGCGGTGCA CAATCTTCTC GCGCAACGCG
TCAGTGGGCT GATCATTAAAC TATCCGCTGG ATGACCAGGA TGCCATTGCT GTGGAAGCTG
CCTGCACTAA TGTTCGGCG TTATTTCTTG ATGTCTCTGA CCAGACACCC ATCAACAGTA
TTATTTTCTC CCATGAAGAC GGTACGCGAC TGGGCGTGGA GCATCTGGTC GCATTGGGTC
ACCAGCAAAT CGCGCTGTTA GCGGGCCCAT TAAGTTCTGT CTCGGCGCGT CTGCGTCTGG
CTGGCTGGCA TAAATATCTC ACTCGCAATC AAATTCAGCC GATAGCGGAA CGGGAAGGCG
ACTGGAGTGC CATGTCCGGT TTTCAACAAA CCATGCAAAT GCTGAATGAG GGCATCGTTC
CCACTGCGAT GCTGGTTGCC AACGATCAGA TGGCGCTGGG CGCAATGCGC GCCATTACCG
AGTCCGGGCT GCGCGTTGGT GCGGATATCT CGGTAGTGGG ATACGACGAT ACCGAAGACA
GCTCATGTTA TATCCCGCCG TTAACCACCA TCAAACAGGA TTTTCGCCTG CTGGGGCAA
CCAGCGTGGA CCGCTTGCTG CAACTCTCTC AGGGCCAGGC GGTGAAGGGC AATCAGCTGT
TGCCCGTCTC ACTGGTGAAA AGAAAAACCA CCCTGGCGCC CAATACGCAA ACCGCCTCTC
CCCGCGCGTT GGCCGATTCA TTAATGCAGC TGGCACGACA GGTTTCCCGA CTGGAAAGCG
GGCAGTGAGC GCAACGCAAT TAATGTGAGT TAGCTCACTC ATTAGGCACC CCAGGCTTTA
CACTTTATGC TTCCGGCTCG TATGTTGTGT GGAATTGTGA GCGGATAACA ATTTACACACA
GGAAACAGCT ATGACCATGA TTACGGATTC ACTGGCCGTC GTTTTACAAC GTCGTGACTG
GGAAAACCTT GCGT TACC AACTTAATCG CTTGCGAGCA CATCCCCTT TCGCCAGCTG
GCGTAATAGC GAAGAGGCC GCACCGATCG CCCTTCCCAA CAGTTGCGCA GCCTGAATGG
CGAATGGCGC TTTGCCTGGT TTCCGGCACC AGAAGCGGTG CCGGAAAGCT GGCTGGAGTG
CGATCTTCTT GAGGCCGATA CTGTGCTCGT CCCCTCAAAC TGCCAGATGC ACGGTTACGA
TGCGCCCATC TACACCAACG TAACCTATCC CATTACGGTC AATCCGCGT TTGTTCCAC
GGAGAATCCG ACGGGTTGTT ACTCGCTCAC ATTTAATGTT GATGAAAGCT GGCTACAGGA
AGGCCAGACG CGAATTATTT TTGATGGCGT TGAATT

ANEXO II

ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

Secuencias de AUF1 obtenidas por PCR, utilizando como templado el ADNc de células PC12 (P26AUF1, p26A C28 y p26D C4) y las secuencias completas de AUF1 clonadas en el vector pSG5HA (C1,C2, C3 y C4) alineadas contra la secuencia reportada de p45rAUF1 y p37rAUF1. Para los alineamientos se utilizo el programa ClustalW.

Regiones destacadas en el texto:

GCC : Texto en rojo destacando el contenido de G y C en los exones 1 y 2.

----- : Texto resaltado en amarillo representa la región de tamaño variable ausente en los productos de PCR.

GATC : Texto resaltado en Gris representa los exones 2 y 7.

p37rAUF1	ATG TCGGAGGAGCAGTT CGGAGGGG ACGGGGCGGC GGCGGCGGCAACGGCGGCGGTAGGC	60
p45rAUF1	ATG TCGGAGGAGCAGTT CGGAGGGG ACGGGGCGGC GGCGGCGGCAACGGCGGCGGTAGGC	60
P26AUF	ATG TCGGAGGAGCAGTT CGGAGGGG ACGGGGCGGC GGCGGCGGCAACGGCGGCGGTAGG	59
P26D C4	ATG TCGGAGGAGCAGTT CGGAGGGG ACGGGGCGGC GGCGGCGGCAACGGCGGCGGTAGG	59
P26A C28	ATG TCGGAGGAGCAGTT CGGAGGGG ACGGGGCGGC GGCGGCGGCAACGGCGGCGGTAGG	59
C1	ATG TCGGAGGAGCAGTT CGGAGGGG ACGGGGCGGC GCC-----	38
C2	ATG TCGGAGGAGCAGTT CGGAGGGG ACGGGGCGGC GGCGGCGGCAACGGCGGCGG-----	54
C3	ATG TCGGAGGAGCAGTT CGGAGGGG ACGGGGCGGC GGCGGCGGCAACGGCGGCGGTAGG	59
C4	ATG TCGGAGGAGCAGTT CGGAGG-----	23

p37rAUF1	GGCTCGGCGGGCGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGCGCGAGGGGGCAGCGGCGGGC	120
p45rAUF1	GGCTCGGCGGGCGAGCAGGAGGGAGCCATGGTGGCGGCGCGAGGGGGCAGCGGCGGGC	120
P26AUF	-----	59
P26D C4	-----	59
P26A C28	-----	59
C1	-----	38
C2	-----	54
C3	-----	59
C4	-----	23

p37rAUF1	GCGGGAAGCGGGAGCGGGCGGGCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAG	180
p45rAUF1	GCGGGAAGCGGGAGCGGGCGGGCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAG	180
P26AUF	-----AGGCAGCACCGAG	72
P26D C4	-----AGGCAGCACCGAG	72
P26A C28	-----AGGCAGCACCGAG	72
C1	-----GCGGGCTCTGCGGCCGGAGGCACCGAAGGAGGCAGCACCGAG	80
C2	-----	54
C3	-----AGGCAGCACCGAG	72
C4	-----	23

p37rAUF1 GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAA GG----- 227
p45rAUF1 GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAA GGCCATTCAAAC TCC 240
P26AUF GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAA GGCCATTCAAAC TCC 132
P26D C4 GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAA GG----- 119
P26A C28 GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAA GGCCATTCAAAC TCC 132
C1 GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAA GGCCATTCAAAC TCC 140
C2 ----- CATTCAAAC TCC 66
C3 GCAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAA GGCCATTCAAAC TCC 132
C4 -CAGAGGGAGCGAAGATCGACGCCAGTAAGAATGAGGAGGATGAA GGCCATTCAAAC TCC 82

p37rAUF1 -----GAAAATGTTTATAGGA 243
p45rAUF1 TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGGCACAGCGGGAAGAATGAAAATGTTTATAGGA 300
P26AUF TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGGCACAGCGGGAAGAATGAAAATGTTTATAGGA 192
P26D C4 -----GAAAATGTTTATAGGA 135
P26A C28 TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGGCACAGCGGGAAGAATGAAAATGTTTATAGGA 192
C1 TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGGCACAGCGGGAAGAATGAAAATGTTTATAGGA 200
C2 TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGGCACAGCGGGAAGAATGAAAATGTTTATAGGA 126
C3 TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGGCACAGCGGGAAGAATGAAAATGTTTATAGGA 192
C4 TCCCCACGACACACTGAAGCAGCGACGGGCACAGCGGGAAGAATGAAAATGTTTATAGGA 142

p37rAUF1 GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGAT 303
p45rAUF1 GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGAC 360
P26AUF GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGAC 252
P26D C4 GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGAC 195
P26A C28 GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGAC 252
C1 GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAAGGACTACTTTTCCGAATTTGGGGAC 260
C2 GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGAC 286
C3 GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGAC 252
C4 GGCCTTAGCTGGGACACCACAAAGAAAGACCTGAAAGGACTACTTTTCCAAATTTGGGGAC 202

p37rAUF1 GTTGTAAGTGCCTCTGAAAGTTAGATCCTATCACAGGGGCATCAAGGGGTTTTGGCTTT 363
p45rAUF1 GTTGTAAGTGCCTCTGAAAGTTAGATCCTATCACAGGGGCATCAAGGGGTTTTGGCTTT 420
P26AUF GTTGTAAGTGCCTCTGAAAGTTAGATCCTATCACAGGGGCATCAAGGGGTTTTGGCTTT 312
P26D C4 GTTGTAAGTGCCTCTGAAAGTTAGATCCTATCACAGGGGCATCAAGGGGTTTTGGCTTT 255
P26A C28 GTTGTAAGTGCCTCTGAAAGTTAGATCCTATCACAGGGGCATCAAGGGGTTTTGGCTTT 312
C1 GTTGTAAGTGCCTCGGAAAGTTAGATCCTATCACAGGGGCATCAAGGGGTTTTGGCTTT 320
C2 GTTGTAAGTGCCTCGGAAAGTTAGATCCTATCACAGGGGCATCAAGGGGTTTTGGCTTT 346
C3 GTTGTAAGTGCCTCTGAAAGTTAGATCCTATCACAGGGGCATCAAGGGGTTTTGGCTTT 312
C4 GTTGTAAGTGCCTCTGAAAGTTAGATCCTATCACAGGGGCATCAAGGGGTTTTGGCTTT 262

p37rAUF1 GTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGT CATGGATCAGAAAGAACATAAATTG 423
p45rAUF1 GTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGT CATGGATCAGAAAGAACATAAATTG 480
P26AUF1 GTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGT CATGGATCAGAAAGAACATAAATTG 372
P26D C4 GTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGT CATGGATCAGAAAGAACATAAATTG 315
P26A C28 GTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGT CATGGATCAGAAAGAACATAAATTG 372
C1 GTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGT CATGGATCAGAAAGAACATAAATTG 380
C2 GTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGT CATGGATCAGAAAGAACATAAATTG 406
C3 GTGCTATTTAAAGAGTCGGAGAGTGTAGATAAGGT CATGGATCAGAAAGAACATAAATTG 372
C4 GTGCTATTTAAAGAGTCGGGGAGTGTAGATAAGGT CATGGATCAGAAAGAACATAAATTG 322

p37rAUF1 AATGGGAAAGTCATTGATCC TAAAA GGGCCAAAGC CATGAAAACA AAAGAGCCCGTCAA 483
p45rAUF1 AATGGGAAAGTCATTGATCC TAAAA GGGCCAAAGC CATGAAAACA AAAGAGCCCGTCAA 540
P26AUF AATGGGAAAGTCATTGATCC TAAAA GGGCCAAAGC CATGAAAACA AAAGAGCCCGTCAA 432
P26D C4 AATGGGAAAGTCATTGATCC TAAAA GGGCCAAAGC CATGAAAACA AAAGAGCCCGTCAA 375
P26A C28 AATGGGAAAGTCATTGATCC TAAAA GGGCCAAAGC CATGAAAACA AAAGAGCCCGTCAA 432
C1 AATGGGAAAGTCATTGATCC TAAAA GGGCCAAAGC CATGAAAACA AAAGAGCCCGTCAA 440
C2 AATGGGAAAGTCATC GATCC TAAAA GGGCCAAAGC CATGAAAACA AAAGAGCCCGTCAA 466
C3 AATGGGAAAGTCATTGATCC TAAAA GGGCCAAAGC CATGAAAACA AAAGAGCCCGTCAA 432
C4 AATGGGAAAGTCATTGATCC TAAAA GGGCCAAAGC CATGAAAACA AAAGAGCCCGTCAA 382

p37rAUF1 AAAATT TTTGTTGGT GGCCT TTCTC CAGACACACC TGAAGAAAAATAAGAGAGTACTTT 543
p45rAUF1 AAAATT TTTGTTGGT GGCCT TTCTC CAGACACACC TGAAGAAAAATAAGAGAGTACTTT 600
P26AUF AAAATT TTTGTTGGT GGCCT TTCTC CAGACACACC TGAAGAAAAATAAGAGAGTACTTT 492
P26D C4 AAAATT TTTGTTGGT GGCCT TTCTC CAGACACACC TGAAGAAAAATAAGAGAGTACTTT 435
P26A C28 AAAATT TTTGTTGGT GGCCT TTCTC CAGACACACC TGAAGAAAAATAAGAGAGTACTTT 492
C1 AAAATT TTTGTTGGT GGCCT TTCTC CAGACACACC TGAAGAAAAATAAGAGAGTACTTT 500
C2 AAAATT TTTGTTGGT GGCCT TTCTC CAGACACACC TGAAGAAAAATAAGAGAGTACTTT 526
C3 AAAATT TTTGTTGGT GGCCT TTCTC CAGACACACC TGAAGAAAAATAAGAGAGTACTTT 492
C4 AAAATT TTTGTTGGT GGCCT TTCTC CAGACACACC TGAAGAAAAATAAGAGAGTACTTT 442

p37rAUF1 GGTGGT TTTGGTGAGGTTGAATCCA TAGAGCTGCC TATGGACAACAAGACCAAT AAGAGG 603
p45rAUF1 GGTGGT TTTGGTGAGGTTGAATCCA TAGAGCTGCC TATGGACAACAAGACCAAT AAGAGG 660
P26AUF GGTGGT TTTGGTGAGGTTGAATCCA TAGAGCTGCC TATGGACAACAAGACCAAT AAGAGG 552
P26D C4 GGTGGT TTTGGTGAGGTTGAATCCA TAGAGCTGCC TATGGACAACAAGACCAAT AAGAGG 495
P26A C28 GGTGGT TTTGGTGAGGTTGAATCCA TAGAGCTGCC TATGGACAACAAGACCAAT AAGAGG 552
C1 GGTGGT TTTGGTGAGGTTGAATCCA TAGAGCTGCC TATGGACAACAAGACCAAT AAGAGG 560
C2 GGTGGT TTTGGTGAGGTTGAATCCA TAGAGCTGCC TATGGACAACAAGACCAAT AAGAGG 586
C3 GGTGGT TTTGGTGAGGTTGAATCCA TAGAGCTGCC TATGGACAACAAGACCAAT AAGAGG 552
C4 GGTGGT TTTGGTGAGGTTGAATCCA TAGAGCTGCC TATGGACAACAAGACCAAT AAGAGG 502

p37rAUF1 CGTGGG TTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAA GAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAG 663
p45rAUF1 CGTGGG TTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAA GAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAG 720
P26AUF CGTGGG TTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAA GAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAG 612
P26D C4 CGTGGG TTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAA GAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAG 555
P26A C28 CGTGGG TTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAA GAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAG 612
C1 CGTGGG TTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAA GAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAG 620
C2 CGTGGG TTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAA GAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAG 646
C3 CGTGGG TTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAA GAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAG 612
C4 CGTGGG TTCTGTTTCATTACCTTTAAGGAA GAGGAACCAGTGAAGAAGATAATGGAGAAG 562

p37rAUF1 AAATACCACAATGTT GGTCT TAGTAAATGT GAAAT AAAAGTAGCCATGTC GAAGGAGCAG 723
p45rAUF1 AAATACCACAATGTT GGTCT TAGTAAATGT GAAAT AAAAGTAGCCATGTC GAAGGAGCAG 780
P26AUF AAATACCACAATGTT GGTCT TAGTAAATGT GAAAT AAAAGTAGCCATGTC GAAGGAGCAG 672
P26D C4 AAATACCACAATGTT GGTCT TAGTAAATGT GAAAT AAAAGTAGCCATGTC GAAGGAGCAG 615
P26A C28 AAATACCACAATGTT GGTCT TAGTAAATGT GAAAT AAAAGTAGCCATGTC GAAGGAGCAG 672
C1 AAATACCACAATGTT GGTCT TAGTAAATGT GAAAT AAAAGTAGCCATGTC GAAGGAGCAG 680
C2 AAATACCACAATGTT GGTCT TAGTAAATGT GAAAT AAAAGTAGCCATGTC GAAGGAGCAG 706
C3 AAATACCACAATGTT GGTCT TAGTAAATGT GAAAT AAAAGTAGCCATGTC GAAGGAGCAG 672
C4 AAATACCACAATGTT GGTCT TAGTAAATGT GAAAT AAAAGTAGCCATGTC GAAGGAGCAG 622

p37rAUF1 TATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA 783
p45rAUF1 TATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA 840
P26AUF TATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA 732
P26D C4 TATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA 675
P26A C28 TATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA 732
C1 TATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA 740
C2 TATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA 766
C3 TATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA 732
C4 TATCAGCAGCAGCAGCAGTGGGGATCTAGAGGAGGGTTTGCAGGAAGAGCTCGCGGAAGA 682

p37rAUF1 GGCGGTG----- 790
p45rAUF1 GGCGGTG**GGCCCAGTCAAAA**CTGGAACCAGGGATA TAGTA ACTTAT TGGAA CCAAGGCTA T 900
P26AUF GGCGGTG----- 739
P26D C4 GGCGGTG----- 682
P26A C28 GGCGGTG**GGCCCAGTCAAAA**CTGGAACCAGGGATA TAGTA ACTTAT TGGAA CCAAGGCTA T 792
C1 GGCGGTG----- 747
C2 GGCGGTG----- 773
C3 GGCGGTG----- 739
C4 GGCGGTG----- 689

p37rAUF1 ----- 790
 p45rAUF1 **GGCAGCTATGGATATAACAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAGGATATGACTTACACTGGT** 960
 P26AUF ----- 739
 P26D C4 ----- 682
 P26A C28 **GGCAGCTATGGATATAACAGCCAAGGGTACGGTGGTTATGGAGGATATGACTTACACTGGT** 852
 C1 ----- 747
 C2 ----- 773
 C3 ----- 739
 C4 ----- 689

p37rAUF1 -----ATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTA 816
 p45rAUF1 **TACAACAGCTACTATGGATATGGTGACTATAGCAA**ATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTA 1020
 P26AUF -----ATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTA 765
 P26D C4 -----ATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTA 708
 P26A C28 **TACAACAGCTACTATGGATATGGTGACTATAGCAA**ATCAGCAGAGTGGTTATGGGAAAGTA 912
 C1 -----ATCAGCAGAGCGGTTATGGGAAAGTA 773
 C2 -----ATCAGCAGAGCGGTTATGGGAAAGTA 799
 C3 -----ATCAGCAGAGCGGTTATGGGAAAGTA 765
 C4 -----ATCAGCAGAGCGGTTATGGGAAAGTA 715

p37rAUF1 TCCAGACGAGGTGGT CATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA 858
 p45rAUF1 TCCAGACGAGGTGGT CATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA 1062
 P26AUF TCCAGACGAGGTGGT CATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA 807
 P26D C4 TCCAGACGAGGTGGT CATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA 750
 P26A C28 TCCAGACGAGGTGGT CATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA 954
 C1 TCCAGACGAGGTGGT CATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA 815
 C2 TCCAGACGAGGTGGT CATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA 841
 C3 TCCAGACGAGGTGGT CATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA 807
 C4 TCCAGACGAGGTGGT CATCAAAATAGCTACAAACCATACTAA 757

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. DeMaria CT, Brewer G. *AUF1 binding affinity to A+U rich elements correlates with rapid mRNA degradation*. The journal of biological chemistry. 1996 May 24;271(21):12179-84
2. DeMaria CT, Sun Y, Long L, Wagner BJ, Brewer G. *Structural determinants in AUF1 required for high affinity binding to A+U rich elements*. The Journal of Biological Chemistry. 1997 Oct 31;272(44):27635-43
3. Wilson GM, Brewer G. *The search for trans-acting factors controlling messenger RNA decay*. Progress in acid nucleic research and molecular biology. 1999;62:257-91
4. Blaxall BC, Pende A, Wu SC, Port JD. *Correlation between intrinsic mRNA stability and the affinity of AUF1 (hnRNP D) and HuR for A+U rich mRNAs*. Molecular and cellular biochemistry. 2002 Mar;232(1-2):1-11
5. Burns C, Blaxall, Lori D, Dwyer-Nield, Alison K, Bauer, Teresa J, Bohlmeier, Alvin M, Malkinson y J. David Port. *Differential expression and localization of the mRNA Binding proteins, AU-rich element mRNA binding protein (AUF1) and Hu antigen R (HuR), in neoplastic lung tissue*. Mol Carcinog. 2000 Jun;28(2):76-83
6. Ines Raineri, Daniel Wegmueller, Brigitte Gross, Ulrich Certa y Christoph Moroni. *Roles of AUF1 isoforms, HuR, BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference*. Nucleic Acids Res. 2004 Feb 19;32(4):1279-88. Print 2004
7. Ashish Lal, Krystyna Mazan-Mamczarz, Tomoko Kawai, Xiaoling Yang, Jennifer L Martindale y Myriam Gorospe. *Current versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs*. EMBO J. 2004 Aug 4;23(15):3092-102. Epub 2004 Jul 15.
8. Briata P, Ilengo Corte G, Moroni C, Rosenfeld MG, Chen CY, Gherzi R. *The wnt/B-catenin -> Pitx2 pathway controls the turnover of Pitx2 and other unstable mRNAs*. Mol Cell. 2003 Nov; 12(5):1201-11.
9. Roberto Gherzi, Michele Trabucchi, Marco Ponassi, Tina Ruggiero, Giorgio Corte, Christoph Moroni, Ching-Yi Chen, Khalid S. Khabar, Jens S. Andersen, Paola Briata. *The RNA-Binding Protein KSRP Promotes Decay of B-catenin mRNA and Is Inactivated by PI3K-AKT Signaling*. PLoS Biol. 2006 Dec;5(1):e5.
10. Tina Ruggiero, Michele Trabucchi, Marco Ponassi, Giorgio Corte, Ching-Yi Chen, Latifa al-Haj, Khalid SA Khabar, Paola Briata y Roberto Gherzi. *Identification of a set of KSRP target transcripts upregulated by PI3K-AKT signaling*. BMC Mol Biol. 2007 Apr 16;8:28.
11. He C, Schneider R. *14-3-3 sigma is a p37 auf1-binding protein that facilitates AUF1 transport and AU-rich mRNA decay*. EMBO J. 2006 Aug 23;25(16):3823-31.
12. 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 journal. 1998 Mar 2;17(5):1371-1384

13. Nakamura T., Hamada F., Ishidat T., Anai K., Kawahara K., Toyoshima K., Akiyama T. *Axin, inhibitor of the Wnt signalling pathway interacts with beta-catenin, GSK3beta and APC and reduces the beta-catenin level.* Genes to Cells 1998 Jun; 3(6):395-403
14. Hedgepeth C. M., Deardorff M. A., Rankin K., Klein P. S. *Regulation of glycogen synthase kinase-3beta and downstream Wnt signaling by Axin.* Molecular and Cellular Biology 1999 Oct; 19(10):7147-7157
15. Behrens J., J.P. Kries, M. Kuelh, L. Bruhn, D. Wedlich, R. Grossched and W. Birchmeier. *Funcional interaction of B-catenin with the transcription factor Lef-1.* Nature 1996 382:638-642
16. Molenaar M., M van de Wetering, M. O. Osterwegel, J. Roose, O. Destree and H. Clevers. *XTcf-3 transcription factormediates B-catenin induced axis formation in Xenopus embryos.* Cell 1996 86:391-399
17. Morin P.J., A. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein and K. Kinzler. *Activation of B-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in B-catenin or APC.* Science 1997 275:1787-1790
18. Clarke A.R. *Wnt signaling in the mouse intestine.* Oncogene 2006 Dec 4 ;25(57):7512-7521
19. Pinto D., Gregorieff A., Begthel H., Clevers H. *Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium.* Genes & Development 2003 Jul 15;17(14): 1709-1713
20. Kuhnert F., Davis C.R., Wang H.T., Chu P., Lee M., Yuan J. Nusse R., Kuo C.J. *Essential requeriment for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1.* PNAS USA. 2004 Jan 06:101(1):266-271
21. Renou J.P., Bierie B., Miyoshi K., Cui Y., Djiane J., Reichenstein M., Shani M., Hennighausen L. *Identification of genes differentially expressed in mouse epithelium transformed by an activated b-catenin.* Oncogene 2003 Jul 17;22(29):4594-4610
22. Polakis P. *Wnt signaling and cancer.* Genes & Development 2000 Aug 1;14(15):1837-1851
23. Brantjes H., Barker N., van Es J., Clevers H. TCF. *Lady Justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signaling.* Biological chemistry 2002 Feb;383(2):255-261
24. Lin S.Y., Xia W., Wang J.C., Kwong K.Y., Spohn B., Wen Y., Pestel R.G., Hung M.C. *Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in Cyclin D1 expression and cancer progression.* PNAS USA 2000 Apr 11;97(8):4262-4266
25. Chen C.Y., Gherzi R., Ong S.E., Chan E.L. Raijmakers R., Pruijn G.J., Stoecklin G., Moroni C., Mann M., Karim M. *AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs.* Cell 2001 Nov 16;107(4):451-464
26. Haile S., Estevez A.M., Clayton C. *A role for the exosome in the in vivo degradation of unstable mRNAs.* RNA 2003 Dec; 9(12):1491-1501

27. Zang W., Wagner B.J., Ehrenman K., Schaefer A.W., DeMaria C.T., Crater D., DeHaven K., Long L., Brewer G. *Purification, characterization and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1*. Mol Cell Biol 1993 Dec ;13(12):7652-7665
28. Wagner B.J., Long L., Rao P.N., Pettenati M.J., Brewer G. *Localization and physical mapping of genes encoding the A+U-rich element RNA-binding protein AUF1 to human chromosomes 4 and X*. Genomics. 1996 Jun 1;34(2):219-222
29. Wagner B.J., DeMaria C.T., Sun Y., Wilson G.M., 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
30. Laroia G., Schneider R.J. Alternate exon insertion controls selective ubiquitination and degradation of different AUF1 protein isoforms. Nucleic Acids Research 2002 Jul 15;30(14):3052-3058
31. Suzuki M., Iijima M., Nishimura A., Tomozoe Y., Kamei D., Yamada M. *Two separate regions essential for nuclear import of the hnRNP D nucleocytoplasmic shuttling sequence*. FEBS J. 2005 Aug;272(15):3975-3987
32. Sarkar B., Lu J.Y., Schneider R.J. *Nuclear import and export functions in different isoforms of the AUF1/heterogeneous nuclear ribonucleoprotein protein family*. J. Biol Chem Jun 6;278(23): 20700-20707
33. Arao Y., Kuriyama R., Kayama F. and Kato S. *A nuclear matrix-associated factor, SAF-B, interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D*. Arch Biochem Biophys. 2000 Aug 15; 380(2):228-236.
34. Wilson G.M., Lu J., Sutphen K., Suarez Y., Sinha S., Brewer B., Villanueva-Feliciano E.C., Ysla R.M., Charles S., Brewer G. *Phosphorylation of p40AUF1 regulates binding to A + U-rich mRNA-destabilizing elements and protein-induced changes in ribonucleoprotein structure*. J. Biol. Chem. 2003 Aug 29;278(35):33039-33048
35. Wilson G.M., Sutphen K., Chuang Ky., Brewer G. *Folding of A+U rich elements modulates AUF1 binding. Potential roles in regulation of mRNA turnover*. J. Biol. Chem. 2001 Mar 23;276(12):8095-8704
36. Wilson G.M., Sun Y., Sellers J., Lu H., Penkar N., Dillard G., Brewer G. *Regulation of AUF1 expression via conserved alternatively spliced elements in the 3' untranslated region*. Mol. Cell. Biol. 1999 Jun ;19(6):4056-4064
37. Agarwal R.K. and Perl A. *PCR amplification of highly GC-rich template after denaturation by NaOH*. Nucleic Acids Research 1993 ;21(22):5283-5284
38. Musso M, Bocciardi R, Parodi S, Ravazzolo R, Ceccherini I. *Betaine, Dimethyl Sulfoxide, and 7-Deaza-dGTP, a Powerful Mixture for Amplification of GC-Rich DNA Sequences*. J Mol Diagn 2006;8:544-550
39. Chakravarti D, Mailander P. *Formation of Template-Switching Artifacts by Linear Amplification*. J Biomol Tech 2008;19:184-188

40. Patel R, Lin C, Laney M, Kurn N, Rose S, Ullman EF. *Formation of chimeric DNA primer extension products by template switching onto an annealed downstream oligonucleotide*. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:2969-2974
41. Odelberg SJ, Weiss RB, Hata A, White R. *Template-switching during DNA synthesis by Thermos aquaticus DNA polymerase I*. Nucleic Acids Res 1995;23:2049-2057