



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA  
CAMPUS UNAM, JURIQUILLA, QRO.

**PAPEL REGULATORIO DE LA REGIÓN 3' NO TRADUCIBLE DE  
LOS RNA MENSAJEROS DE LA ENZIMA DESYODASA TIPO 1:  
EFECTO SOBRE SU TRADUCCIÓN Y ESTABILIDAD**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

PRESENTA

Lic. en Biología. Omar Elind Arroyo Helguera

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Carmen Y. Aceves Velasco

Querétaro

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Metabolismo Energético y en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Carmen Y. Aceves Velasco. Se recibió apoyo parcial de los siguientes proyectos: PAPIIT (UNAM) 224602, UC-MEXUS 02-98. Beca por parte del CONACyT, No 171201 y beca complementaria otorgada por la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (No de cuenta 503001850).**

## DEDICATORIA

### **A MI ESPOSA**

Irene Xochihua Rosas, Irene, sin tu apoyo y amor hubiese sido difícil lograrlo, ¡gracias! por ser mi esposa y compañera en todo este tiempo, recuerda este trabajo es tuyo.

### **A MI HIJO**

Omar Arroyo Xochihua, Marzo, cuando llegaste mi vida dio un giro que me permitió sentir un amor diferente, llenando gran parte de mi vida.

### **A MI HIJA**

Arely E. Arroyo Xochihua, Lely, en ti refleje mi infancia, junto con marzo siempre serán mi orgullo en cualquier parte de mi vida. Espero devolverles el tiempo que les robe.

### **A MIS PADRES Y HERMANOS**

Por motivarme, apoyarme y ser siempre un ejemplo para mi.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco en primer lugar a la Dra. Carmen Aceves Velasco, por recibirme en su laboratorio y por brindarme su apoyo incondicional en el desarrollo de esta investigación.

Agradezco al Dr. Alfonso Varela Echevarria por haberme brindado la oportunidad de colaborar con ellos, por sus enseñanzas, apoyo y confianza que fueron muy importantes para mi formación.

Agradezco a la Dra. Brenda Anguiano Serrano y a la M en C. Carmen Viggiano, por su ayuda en el desarrollo de las distintas técnicas experimentales que realicé en este trabajo y sobre todo el valor de su amistad.

Agradezco a los miembros de mi comité, Dr. Edgar Heimer de la Cotera y al Dr. Ataulfo Martínez Torres. Gracias por enriquecer cada semestre este trabajo.

De igual forma agradezco los comentarios y correcciones realizados a esta tesis por los miembros de jurado, y por su disposición para mejorar este trabajo. Dra. Carmen Aceves Velasco, Dra. Patricia Joseph Bravo, Dra. Maricela Luna Muñoz, Dr. Ataulfo Martínez Torres y Dr. Alfredo Varela Echavarría.

Agradezco el apoyo técnico de: T.L.C. Felipe Ortiz Cornejo, QFB. Guadalupe Delgado, Lic. Ma. Del Pilar Galarza (Biblioteca. INB-UNAM). A Leopoldo González Santos y Elsa Nidya Hernández Ríos por todo el apoyo brindado en la Unidad de Imagen. A Quím. Leonor Casanova Rico y Yolanda Orduña (unidad de enseñanza del INB). A Lourdes Lara Ayala (Videoconferencia).

Agradezco a todos los profesores que participaron en mi formación durante la Maestría en Ciencias (Neurobiología) generación Agosto-2002/Junio-2004.

A mis compañeros de laboratorio con quien siempre fue un placer trabajar, gracias por sus comentarios y aportaciones durante los seminarios, los cuales ayudaron a la realización de un mejor proyecto de tesis.

Por sobre todo, agradezco de manera muy especial a mis padres Rubén y Eulalia. A mis hermanos Edgar, Israel, Orlando y Jazmín. A mis cuñados y cuñadas por su apoyo incondicional.

De manera muy especial a mi cuñado Luis Alberto Xochihua Rosas, quien me apoyó en los meses más difíciles de un estudiante.

A todos lo que de alguna u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo.

# ÍNDICE

	Pág.
<b>RESUMEN</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>ANTECEDENTES</b> .....	2
<b>I.    HORMONAS TIROIDEAS</b> .....	2
A. GLÁNDULA TIROIDES.....	3
B. REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN TIROIDEA.....	4
C. BIOSÍNTESIS Y SECRECIÓN.....	5
D. TRANSPORTE.....	7
E. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.....	7
F. DESYODACIÓN.....	9
<b>II.    DESYODASA TIPO 1</b> .....	10
A. LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN.....	10
B. RNA MENSAJEROS.....	10
C. GEN.....	11
D. REGULACIÓN.....	12
<b>III.    MECANISMOS DE REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL</b> ....	14
A. TIPOS Y FUNCIÓN DE LA COLA POLIA.....	14
<b>IV.    REGIÓN 3`NO TRADUCIBLE DE LOS RNA MENSAJEROS             DE LA D1</b> .....	18
<b>HIPOTESIS</b> .....	21
<b>OBJETIVOS</b> .....	21
<b>I.    OBJETIVO GENERAL</b> .....	21
<b>II.    OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	21
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	22
<b>I.    MATERIALES</b> .....	22
<b>II.    METODOLOGÍAS</b> .....	22
A. CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS.....	22

1. Construcción del vector D1C para la expresión del mRNA corto (1.6 kb). .....	23
2. Construcción del vector D1L para la expresión del mRNA largo (2.1 kb). .....	24
B. CULTIVO CELULAR Y TRANSFECCIÓN.....	24
C. EXTRACCIÓN DE RNA DE LAS CÉLULAS HEK293.....	25
D. ENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA DESYODASA TIPO 1.....	25
E. ENSAYO ENZIMÁTICO PARA $\beta$ -GALACTOSIDASA.....	26
F. RETROTRANSCRIPCIÓN Y AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).....	27
G. ENSAYO DE ESTABILIDAD PARA LOS RNA MENSAJEROS DE LA D1.....	27
H. ANÁLISIS NORTHERN BLOT.....	29
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>I. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN.....</b>	<b>30</b>
<b>II. EFECTO DE LAS SEÑALES POLI-A EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA D1.....</b>	<b>31</b>
A. EFECTO DE LAS SEÑALES POLIA EN LA TRADUCCIÓN.....	31
B. COMPARACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LOS RNA MENSAJEROS DE LA D1.....	33
<b>III. EFECTO DE LA REGIÓN 3'UTR EN LA ESTABILIDAD DE LOS RNA MENSAJEROS DE LA D1.....</b>	<b>36</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>45</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>52</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>53</b>

## RESUMEN

Estudios en el laboratorio mostraron que el gen de la desyodasa tipo 1 (D1), posee en su región 3' no traducible (3'UTR) dos señales de poliadenilación (poliA) separadas por aproximadamente 465pb, dando lugar a un mRNA corto de 1.6kb por el uso de la señal ATATAA en la posición 1612 y un segundo mRNA largo de 2.1kb por el uso de la señal TATAAA en la posición 2069. La expresión del mRNA largo, está asociada a condiciones metabólicas como hipertiroidismo, succión repetida y estimulación  $\beta$ -adrenérgica, mientras que el mRNA corto se expresa en condiciones fisiológicas normales. Diversos estudios han demostrado que las señales poliA participan en la eficiencia de traducción y/o estabilidad de los mRNAs. Este estudio examina el papel de las señales poliA en la regulación de los mRNAs de la D1 mediante estudios de transfección pasajera en células HEK293. Métodos enzimáticos, Northern blot y de RT-PCR fueron utilizados para medir la actividad y expresión de la D1. La vida media ( $t_{1/2}$ ) de los mRNAs se determinó adicionando actinomicina D.

Nuestros resultados indican que la D1 proveniente de el mRNA largo, presento cinco veces más actividad enzimática que la D1 proveniente del mRNA corto. Al analizar los niveles de mRNA no encontramos diferencia significativa pero al comparar la  $t_{1/2}$  de los mRNAs, se encontró que el mRNA largo fue menos estable con una  $t_{1/2}$  de 5.9 h, contrastando con la  $t_{1/2}$  de 14.4 h del mRNA corto. Estos datos aportan evidencia de que la región 3'UTR juega un papel importante regulando la eficiencia de traducción y la estabilidad de los mRNAs de la D1.

## ABSTRACT

Previously we provided evidence that the deiodinase type 1(D1) gene uses two functional poly(A) signals, separated by a distance of 465bp in the 3'UTR. As a result, two forms of D1 transcripts derive from alternative polyadenylation site selection: an ATTAAA signal at position 1612-1617 for the 1.6kb mRNA, and a TATAAA signal at position 2069-2074 for the 2.1kb mRNA. The expression of the 2.1kb mRNA is associated with metabolic conditions such as hyperthyroidism, resuckling and  $\beta$ -adrenergic stimulation, whereas the 1.6kb mRNA is expressed under normal conditions. Diverse studies have shown that poly(A) signals participate in the postranscriptional regulation of mRNAs. In the present study the potential regulatory events involving the 3'UTR of D1 mRNAs were examined by transient transfection in HEK293 cells using the pcDNA-3 vector. Enzymatic activity, Northern Blot and RT-PCR methods were used to analyze D1 expression, and addition of actinomycin D from 0 to 16 hours was used to determine D1 mRNAs half-life. Our results showed that the 2.1 kb mRNA signal exerted translational activation that increased D1 enzymatic activity by five fold compared to the 1.6 kb mRNA signal, although no differences were observed in the relative amounts of mRNA. Stability analysis indicated that the longer D1 mRNA was less stable than the shorter D1 mRNA, with  $t_{1/2}$  values of approximately 5.9 h and 14.4 h, respectively. Together, these data provide evidence that the D1 3'UTR plays an important role in regulating both the translational efficiency and stability of these mRNAs.

## INTRODUCCIÓN

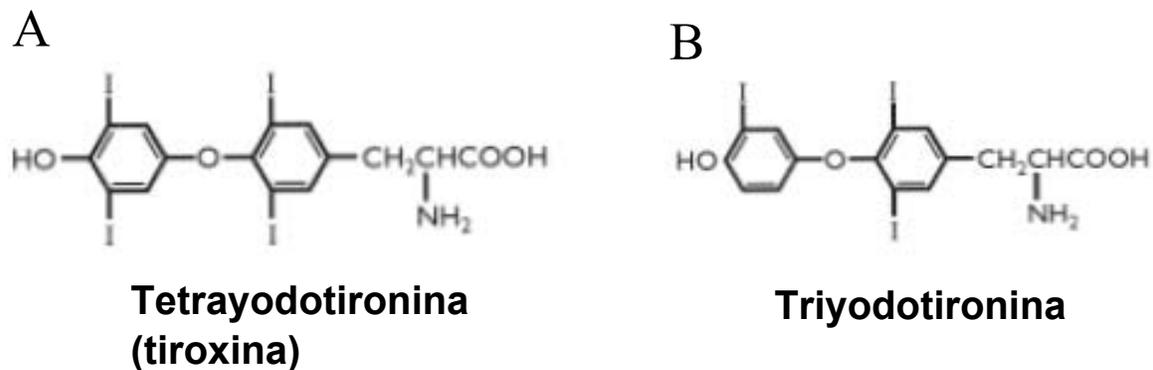
Las hormonas tiroideas (HT) en vertebrados juegan un papel crítico en su diferenciación, crecimiento y metabolismo. Está comprobado que a pesar de que la tiroxina o T4 es la principal hormona sintetizada y secretada por la tiroides, la hormona activa es la triyodotironina (T3), debido a que presenta mayor afinidad a sus receptores. Extratiroidalmente, la generación de la T3 ocurre a través de un mecanismo enzimático órgano-específico, conocido como desyodación, el cual consiste en la remoción de un átomo de yodo de la molécula de T4, por dos enzimas conocidas como desyodasas tipo 1 (D1) y tipo 2 (D2) (Larsen, 1981; Berry et al. 1991; Aceves, 1997). Aunque estas proteínas no han sido purificadas, se conoce por sus mRNAs que pertenecen a la familia de las selenio enzimas (Berry et al. 1991a; Köhrle et al. 1999). Para el caso específico de la D1, en 1991 se describió en el hígado de ratas hipertiroideas un mensajero largo conocido como G-21, el cual contenía en su 3'UTR dos señales de poliadenilación (Berry et al. 1991). Posteriormente en 1997, nuestro grupo describió en glándula mamaria de rata la presencia de un nuevo mRNA, el cual difería en su región 3'UTR por tener sólo una señal de poliadenilación, y por ser 475 pb más corto que el G-21 (Navarro et al. 1997). Además, se demostró que el mensajero largo se expresaba preferencialmente en condiciones de elevada demanda metabólica como son el hipertiroidismo, lactancia intensa o por estimulación beta adrenérgica (Aceves et al. 1999; Aceves y Rojas-Huidobro, 2001).

Estudios realizados en otros transcritos provenientes de genes con múltiples señales de poliadenilación, han demostrado que la 3'UTR juega un importante papel en el control de la eficiencia de traducción y en la estabilidad de sus transcritos (Decker y Parker, 1995). El propósito del presente trabajo, consiste en conocer la participación de la 3'UTR en la estabilidad y eficiencia de traducción de los distintos mRNAs de la D1. Para remarcar la importancia del trabajo y ubicarlo en un contexto fisiológico, se describen en una primera parte aspectos generales de las HT y su desyodación. También se revisa la información disponible sobre los mecanismos involucrados en la regulación de los mRNAs eucarióticos. En una segunda parte se desglosan los objetivos, materiales y métodos. Para culminar en una tercera parte con los resultados, discusión y conclusiones.

## ANTECEDENTES

### I. HORMONAS TIROIDEAS

Las HT son una familia de mensajeros químicos, que contienen yodo en su molécula. Se sabe que en vertebrados las hormonas tiroideas ejercen diversas funciones biológicas, destacando su papel morfogénico durante el desarrollo fetal, el desarrollo del sistema nervioso y en la regulación de numerosos procesos metabólicos en la vida adulta (Aceves, 1999; Bianco et al. 2002; Valverde-R, Aceves y Navarro, 1993).



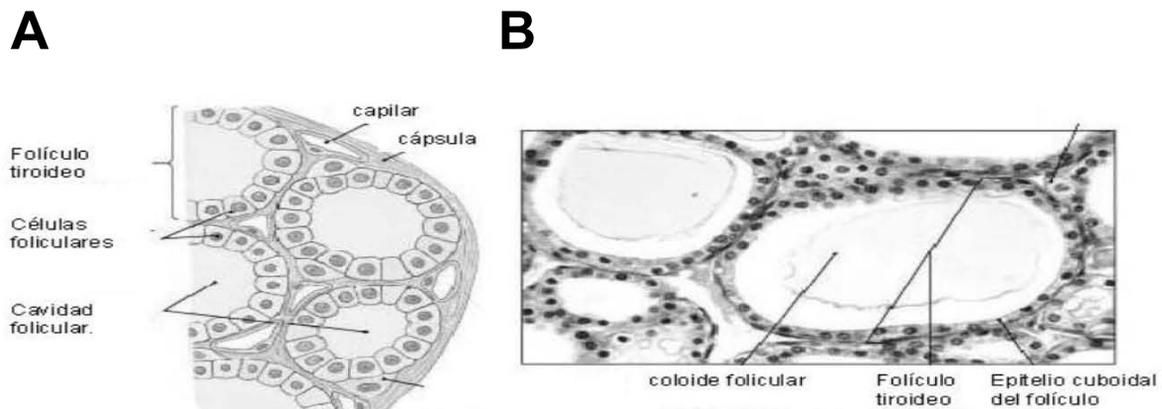
**Figura 1. Estructura química y nomenclatura de las tironinas.** **A**, muestra la tetrayodotironina con los anillos fenilo y tirosilo yodados en los radicales 3, 5, 3' y 5'. **B**, se muestra el anillo fenilo o externo yodado sólo en el radical 3' y el anillo tirosilo o interno yodado en 3 y 5 de la triyodotironina.

Estructuralmente, las HT consisten de dos anillos bencénicos unidos por un puente de oxígeno, donde el anillo interno o tirosilo conserva la cadena de alanina; mientras que el anillo externo o fenilo contiene un grupo hidroxilo en el carbono 4. Los átomos de yodo espacialmente están localizadas en las HT en las posiciones 3,5,3' y 5', aportando uno de 4 átomos de yodo (figura 1). La T4 es sintetizada únicamente en la glándula tiroides (GT), y es secretada al torrente sanguíneo. La T4, presenta una vida media de aproximadamente 7 días y es considerada una prohormona ya que es la precursora de la forma activa, la triyodotironina (T3). Esta última se produce tanto en glándula tiroides como en diferentes tejidos extratiroideos del organismo, a través de la

perdida de un átomo de yodo del anillo fenilo de la T4. La T3 tiene una vida media aproximada de 24 h y es la que ejerce los efectos biológicos de las HT en el organismo. Su efecto se debe a que presenta una mayor afinidad que la T4 a sus receptores nucleares en las células blanco (Valverde-R et al, 1993). Existe otra HT circulante denominada T3 reversa (rT3), la cual se origina principalmente en los tejidos extratiroideos por la perdida de un átomo de yodo del anillo interno de la T4. Esta hormona tiene una vida media de aproximadamente 24 h y no se le conoce actividad metabólica (Aceves, 1997; Bianco et al. 2002).

## A. GLÁNDULA TIROIDES

La GT es un órgano endocrino donde se lleva a cabo la síntesis, almacenamiento y secreción al torrente circulatorio de las HT o tironinas (Figura 2) (Valverde-R et al. 1993).

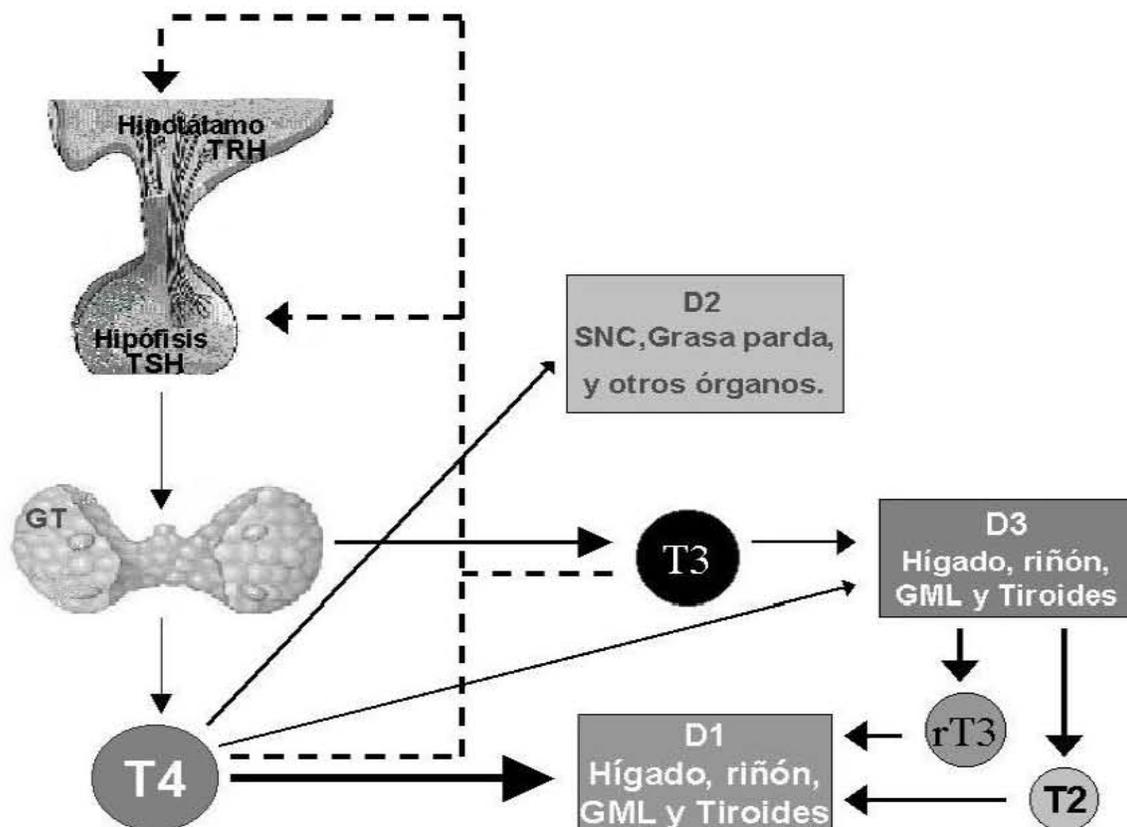


**Figura 2. Glándula Tiroides.** A, Representación esquemática de la organización de la glándula. B, Corte histológico, donde se muestran los folículos tiroideos. Tomado de Martini F, 1998.

La unidad estructural y básica de la GT, es el folículo tiroideo. Esta unidad funcional de la glándula, se conforma por una monocapa de células epiteliales denominadas tirocitos, las cuales rodean un espacio extracelular denominado lumen folicular que contiene un coloide rico en proteínas, el cual puede almacenar grandes cantidades de HT. Este coloide tiroideo está formado principalmente por la glicoproteína tiroglobulina (TgB), proteína de 660 Kd, que contiene en su estructura a las hormonas tiroideas. En este coloide se lleva a cabo el almacenamiento de las

tironinas, lo que permite que sea la única glándula endocrina que almacena extraglandularmente su producto de secreción (Ekholm y Bjorkman, 1990).

Durante la etapa fetal, la GT es la primera glándula en desarrollarse y, desde el segundo tercio de la gestación, es capaz de sintetizar y secretar tironinas a la circulación. Después del tercer trimestre de gestación, la producción de tironinas está regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa que involucra al eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (eje HHT) (Figura 3) y mecanismos intrínsecos de autorregulación de la propia glándula, en los que participa el yodo (Aceves, 1997; Greenberg, Czernochov y Reba, 1990).



**Figura 3. Eje hipotálamo-Hipófisis-Tiroides (HHT).** Se muestran los principales componentes del eje HHT, las hormonas que participan en la síntesis y liberación de HT en la GT. La conversión de T4 a T3 de manera órgano-específica. TRH, hormona liberadora de tirotrópina; TSH, hormona estimulante de la tiroides; T4, tetrayodotironina; T3, triyodotironina; GML, glándula mamaria lactante; rT3, triyodotironina reversa; D1,D2 y D3, enzimas desyodasas tipo 1, 2 y 3 respectivamente.

## B. REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN TIROIDEA

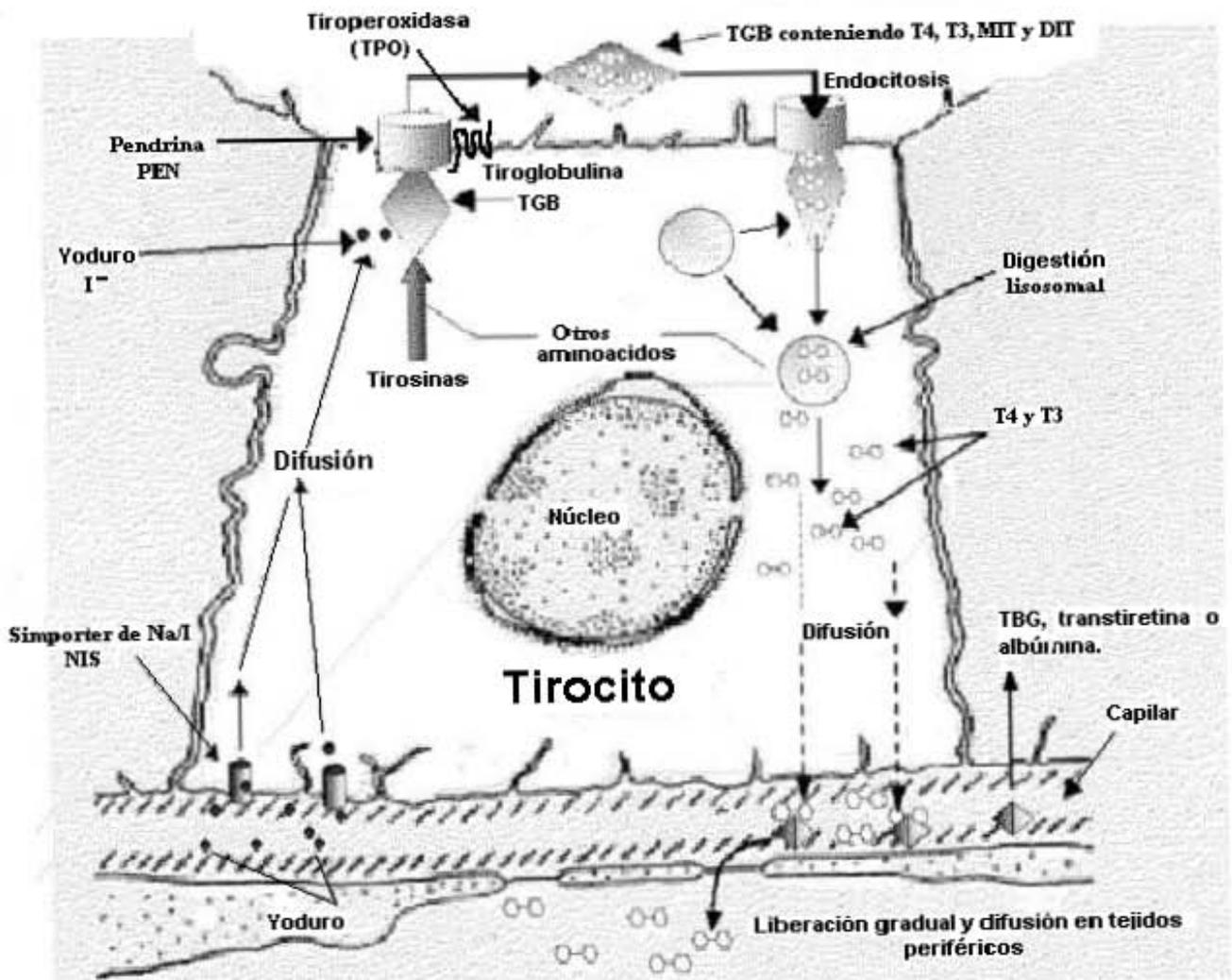
En el hipotálamo se inicia la cascada de señales nerviosas y endocrinas específicas; primero, las neuronas hipotalámicas del núcleo paraventricular, sintetizan y liberan al sistema hipofisiario el tripéptido tiro liberina u hormona liberadora de tiro tropina (TRH). Este péptido interactúa con receptores específicos a nivel de las células de la hipófisis denominadas tiro tropos, y controla de esta manera la síntesis y secreción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) (Valverde-R et al. 1993). Una vez que se libera la TSH, estimula a la tiroides por medio de receptores de membrana en el tirocito, los que promueven la expresión de genes responsivos a hormonas tiroideas, incluyendo el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  (NIS), la TgB, y la peroxidasa (TPO). Estas proteínas estimulan y promueven principalmente la captura de yodo, la síntesis y liberación de las tironinas y el mecanismo de desyodación extratiroidal de la T4 y la T3. Posteriormente, el asa de regulación se cierra cuando las tironinas secretadas ejercen un control negativo sobre el hipotálamo y la hipófisis, inhibiendo respectivamente la secreción de TRH y TSH, inhibiendo por lo tanto la síntesis y secreción de HT en glándula tiroides (Figura 3) (Aceves, 1997; Wilson, Foster, Kronenberg y Larsen, 1998; Yen, 2001).

## D. BIOSÍNTESIS Y SECRECIÓN

La síntesis y secreción de las HT es un proceso secuencial que se lleva a cabo dentro del folículo de la GT. De manera que las tironinas son el resultado de la unión de dos aminoácidos de tirosina modificados. Éstas tienen la peculiaridad de ser los únicos mensajeros químicos naturales cuyas moléculas contienen yodo (Yen, 2001).

La incorporación de yodo a la matriz proteica es un proceso conocido como organificación (figura 4) que comienza al ingresar yodo proveniente de la dieta al organismo. La captura y transporte de yoduro en el tirocito se lleva a cabo por el simporte de sodio-yodo (NIS) dependiente de ATP el yoduro es capturado y oxidado por la tiroperoxidasa (TPO) en presencia de peróxido de hidrógeno e incorporado a los residuos de tirosina, dentro de la TGB. Además, por un mecanismo enzimático no bien

analizado todavía, los residuos de monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT) son acoplados para formar la T4 y T3. Posteriormente la TGB conteniendo MIT, DIT, T4 y T3 es almacenada como un polipéptido extracelular en el coloide, el cual está dentro de las células foliculares de la tiroides. Cuando el tirocito es estimulado por la TSH, la TGB almacenada es internalizada al citoplasma por medio de fagolisosomas donde la TGB es proteolizada liberando T4 y T3 a la circulación. Por otro lado, el yodo pegado a los residuos MIT y DIT es reciclado dentro del tirocito mediante su remoción por la deshalogenasa tiroidea. (Yen, 2001).



**Figura 4. Biosíntesis, almacenamiento y secreción de HT en el tirocito.** Se muestra la captación del yoduro por el NIS, el yoduro se difunde y organifica en la TGB por la TPO, la TGB pasa al lumen y es internalizada y proteolizada liberando las HT las cuales se difunden por el torrente sanguíneo. **TGB**, tiroglobulina. **TPO**, tiroperoxidasa. **NIS**, transportador de Na/I. HT, hormonas tiroideas.

## E. TRANSPORTE

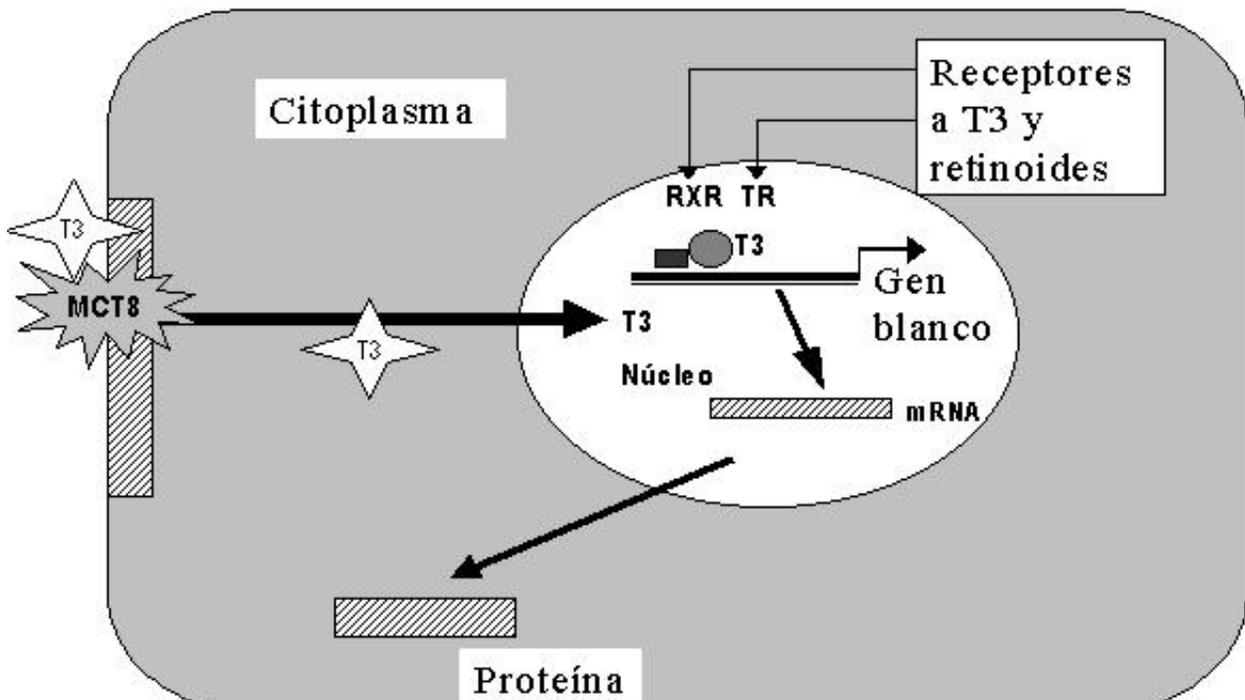
Las hormonas tiroideas son de naturaleza hidrofóbica, una vez sintetizadas y secretadas de la GT al torrente circulatorio, requieren de proteínas transportadoras para llegar a los órganos blanco. La principal proteína transportadora de tironinas es una glicoproteína de 54 Kd, denominada globulina transportadora de tiroxina o TBG la cual se encuentra sólo en mamíferos y transporta del 70 al 80% de la T4 sistémica. Otra proteína transportadora de tironinas, es la transtiretina (TTR) la cual es la segunda proteína de mayor afinidad a tironinas, se encuentra en todos los vertebrados y une con alta afinidad una molécula de T4. Sin embargo, ante elevadas concentraciones de T4 circulante, esta proteína puede unir otra T4 pero con menos afinidad. Otra proteína que contribuye al transporte de las tironinas en el torrente circulatorio es la albúmina, tiene menor afinidad a las tironinas circulantes y transporta de un 10 a un 20% de las hormonas tiroideas (Köhrle, 1999; Robbins, 1996; Valverde-R et al. 1993).

## F. MECANISMO DE ACCIÓN

Una vez que las tironinas llegan a su órgano blanco, son internalizadas a la región citoplasmática por transportadores de membrana, de la familia de los transportadores de carboxilatos. Para el caso específico de las hormonas tiroideas, se ha identificado una proteína transportadora denominada monocarboxilato 8 (MCT8), la cual tiene 12 dominios transmembranales y es específica para el transporte de hormonas tiroideas al citoplasma (Friesema et al. 2003; Lafreniere, Carrel y Willard, 1994).

Una vez internalizadas, las hormonas tiroideas se unen a sus receptores de alta afinidad en el núcleo. Posteriormente, este complejo se une a elementos responsivos a hormonas tiroideas (TRE) en el DNA de las células blanco del organismo, y promueven la expresión de diferentes genes (Figura 5) (Ritchie et al. 2003; Wilson et al. 1998).

Los receptores a hormonas tiroideas (TR) son miembros de una familia de receptores nucleares entre los que se encuentran los receptores a esteroides, ácido retinoico y vitamina D (Harvey y Williams, 2002).



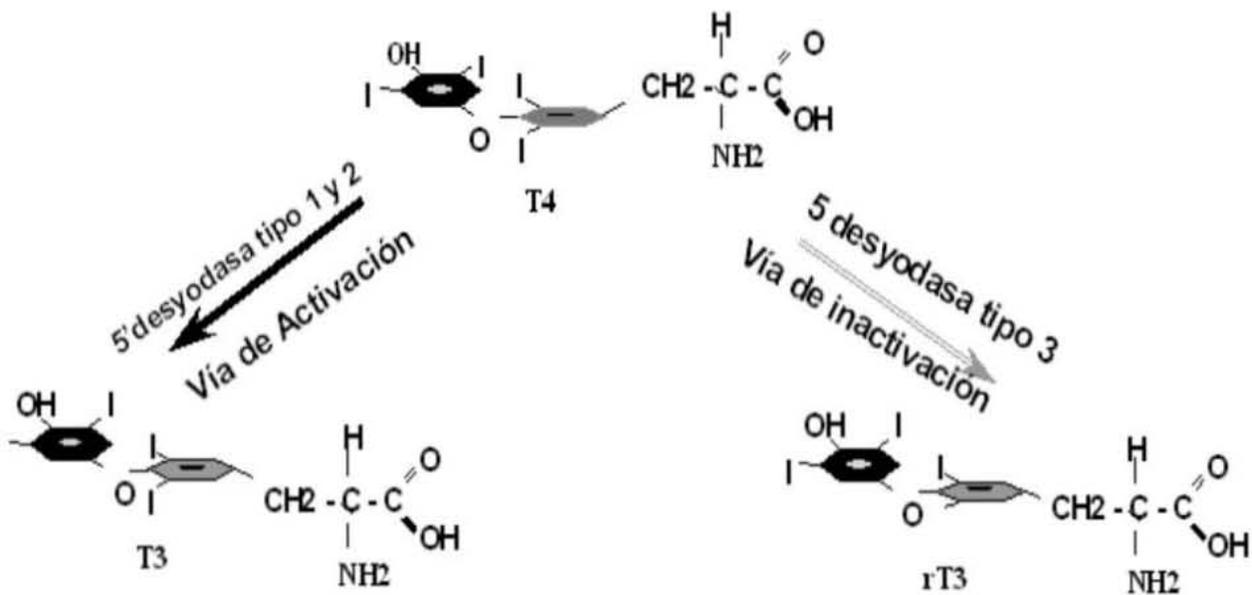
**Figura 5. Modelo general del mecanismo de acción de las HT en las células blanco.** La MCT8 internaliza al citoplasma a la T3 que ingresa al núcleo y se une a receptores a tiroideas, los cuales están en sitios responsivos a tiroideas en la región promotora de diversos genes.

Se han clasificado hasta el momento dos tipos de receptores tiroideos: los alfa ( $TR\alpha$ ) y los beta ( $TR\beta$ ). Cada uno de ellos proviene de un gen específico. Sin embargo, cada uno de estos genes da lugar por lo menos a dos formas diferentes de receptor. Los mRNAs de  $TR\alpha1$  y  $TR\alpha2$  son producto del gen THRA, y difieren por procesamiento alternativo de sus exones en la región 3', resultando en distintos dominios C-terminales. De la misma forma, los RNA mensajeros de  $TR\beta1$  y  $TR\beta2$  son transcritos del gen TRB y son generados por el uso de promotores separados y por procesamiento alternativo en la región 5', resultando dos distintas proteínas con su región N-terminal diferente (Williams, 2000).

## G. DESYODACIÓN

La glándula tiroides sintetiza y secreta al torrente circulatorio el 100% de la T4 y dependiendo de la especie, entre el 5 y el 25 % de la T3. A nivel órgano-específico es necesario la conversión de la prohormona T4 a T3, Esta conversión de T4 a T3, se lleva a cabo a través de un mecanismo enzimático de desyodación extratiroideo y órgano-específico que consiste en la remoción de un átomo de yodo de la molécula de T4. Se han propuesto dos vías de desyodación: la primera vía es de activación o también llamada 5´desyodación (5´D), ya que se desyoda el anillo fenólico o externo de la T4, dando lugar a la T3 (figura 6). La segunda vía, considerada de inactivación o 5 desyodación (5D), consiste en la desyodación del anillo tirosilo o interno de la T4, transformándola en triyodotironina reversa (rT3), la cual no tiene actividad metabólica conocida (figura 6)(Aceves, 1997; Wilson et al. 1998).

Esta biotransformación es realizada por la familia de desyodasas, las cuales están presentes en diferentes proporciones en los distintos tejidos y órganos (Aceves, 1997; Bianco et al. 2002).



**Figura 6. vía de desyodación de hormonas tiroideas.** Se muestra la conversión de T4 a T3 y de rT3 por la desyodación del anillo externo y la conversión de T4 en rT3 por la desyodación del anillo interno.

El estudio de las desyodasas es reciente y hasta la fecha las proteínas involucradas no se han purificado. Sin embargo, ya sea por medios bioquímicos o por las secuencias de sus mRNAs, se conocen tres tipos enzimáticos; en la vía de activación participan la desyodasa tipo I (D1) y la tipo II (D2); mientras que en la vía de inactivación participa sólo la tipo III (D3). Estas enzimas son codificadas por diferentes genes; todas ellas contienen en su sitio activo el aminoácido modificado selenocisteína, y requieren un cofactor donador de grupos tioles (Aceves, 1997; Berry et al. 1991b; Berry et al. 1992).

## II. DESYODASA TIPO 1 (D1)

### A. LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN.

La D1, que es en la que nos enfocaremos en este proyecto, se encuentra principalmente en tejidos como: hígado, riñón, tiroides y en menor cantidad, en la hipófisis, la glándula mamaria lactante y la grasa blanca. Es una enzima de desyodación rápida, ya que actúa en minutos, removiendo el yodo tanto del anillo interno como del externo de la tironina, dependiendo del pH celular. También es susceptible de ser inhibida por el propiltiouracilo (PTU) y la tioglucosa áurica (TGA) (Aceves, 1997; Bianco et al. 2002).

### B. RNA MENSAJEROS

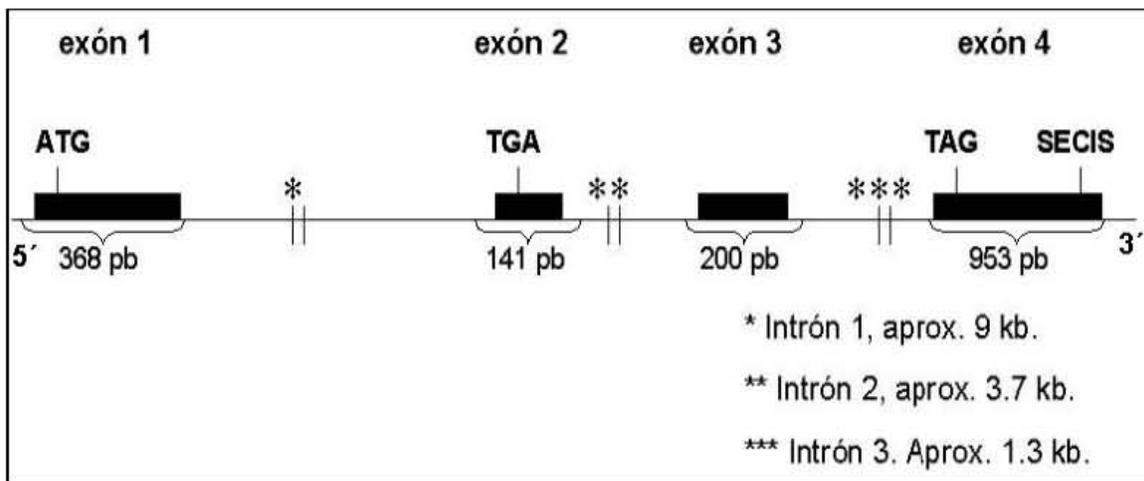
En 1991 se caracterizó un mRNA de 2.1 Kb para la D1 en rata hipertiroidea el cual fue denominado G21, que codifica para una proteína de 29 Kda (Berry et al., 1991). La figura 8, representa las regiones funcionales reportadas para su cDNA, la región codificante comprende del nucleótido (nt) 7 al 780, el codón que codifica para el aminoácido Se-Cys se encuentra en los nt 343-345 y corresponde al codón **UGA**, este codón normalmente es leído por la RNA polimerasa tipo II como una señal de paro de la transcripción. Sin embargo, debido a que en la región 3'UTR presenta un doblez o bucle al que se le ha denominado secuencia de inserción para Se-cys (**SECIS**), el codón **UGA** es leído como codón de inserción del aminoácido Se-Cys en la proteína de la D1 y no como un codón de paro; esta secuencia se encuentra localizada entre los nt

1515 a 1600. La región 3'UTR del mRNA de la D1, también presenta dos sitios de poliadenilación (poliA) [nt 1612 a 1617(AUUAAA) y en nt 2069 a 2074 (UAUAAA)](Figura 8) al igual que dos motivos ricos en adeninas y uracilos (AUUUA) denominados motivos ARE, en los nt 1961 a 1965 y en nt 1973 a 1978, 100 nt corriente arriba de la segunda señal poliA (Berry et al. 1991a y b).

Posteriormente, nuestro grupo caracterizó un segundo mRNA en glándula mamaria lactante de rata, idéntico en su región codificante al G-21, pero 465 nucleótidos más corto en su región 3'UTR y solamente con la primera señal poliA (Navarro et al. 1997).

### C. GEN

El gen de la D1 se ha identificado en ratón (Maia et al. 1995) y en humano (Toyoda et al. 1995), y consiste de 4 exones (figura 7). El exón 1 contiene el codón ATG. El exón 2, contiene el codón TAG que codifica para Se-cys y el exón 4 contiene el codón de término TAG, la región SECIS y la señal de poliadenilación ATTAAA. El sitio de inicio de la transcripción está aproximadamente a los 25 nt corriente arriba del iniciador de la transcripción (Maia, Berry, Sabbag y Harneyet, 1995).



**Figura 7. Representación del gen de la 5'D1 en ratón (dio1).** Las cajas negras corresponden a los exones. También se muestra el codón de inicio, ATG; la región señal para Se-cys, TGA; el codón de término, TAG; así como la secuencia SECIS (tomado de Maia et al. 1995).

## D. REGULACIÓN

La expresión de la D1 bajo distintas condiciones fisiológicas está sujeta a regulación por múltiples factores y por un número variado de sustancias. Por ejemplo, las HT incrementan el mRNA de la D1 en ratas, ratones y humanos. Este incremento se debe a la presencia de dos elementos responsivos a hormonas tiroideas (TREs) en la región 5' promotora del gen de la D1. El ácido retinóico (AR), es reconocido también por los TREs, incrementando la expresión del gen de la D1. Otros factores como glucocorticoides, noradrenalina, esteroides gonadales, hormona del crecimiento, AMP cíclico, TSH y citocinas regulan la expresión del mRNA de la D1. Sin embargo, los mecanismos por los cuales ejercen dichos efectos no están bien descritos (Bianco et al. 2002; García-Solís y Aceves, 2001).

G21	GCTGAG <b>ATGG</b>	GGCTGTCCCA	GCTATGGCTG	TGGCTGAAGC	GGCTTGTGAT	ATTCCTGCAG	GTAGCCTTGG	70
G21	AGGTGGCTAC	GGGCAAGGTG	CTAATGACAC	TGTTCCAGAG	GAGAGTCAAG	CAGAACATCC	TGGCCATGGG	140
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	CCAAAAGACC	GGAATGACCA	GGAATCCCGG	ATTCGCCCTT	CACAACTGGG	TCCCCACCTT	TTCAGCATCC	210
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	CAGTACTTCT	GGTTCGTCCT	GAAGGTCCGC	TGGCAGAGAC	TGGAAGACAG	GGCTGAGTAT	GGGGGGCTGG	280
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	CCCCCAACTG	CACCGTGGTC	CGCCTCTCAG	GACAGAAGTG	CAACGTCTGG	GATTTCATTC	AAGGCAGCAG	350
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	ACCCCTGGTG	TTGAACTTCG	GCAGCTGCAC	<u>CTG</u> ACCTTCA	TTTCTTCTCA	AATTTGACCA	GTTCAAGAGA	420
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	CTCGTAGACG	ACTTTGCCTC	CACAGCTGAC	TTCTCATCA	TTTACATTGA	AGAAGTCCAC	GCCACAGATG	490
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	GATGGGCTTT	TAAGAACAAC	GTGGACATCA	GGCAGCACCG	AAGCCTCCAG	GACCGCTGC	GGGCAGCACA	560
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	TCTGCTGCTG	GCCAGGAGCC	CCCAGTGTCC	TGTGGTGGTG	GACACAATGC	AGAACCAGAG	CAGCCAGCTC	630
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	TATGCAGCTC	TGCCTGAGAG	GCTCTATGTG	ATACAGGAAG	GCAGGATCTG	CTACAAGGGT	AAACCTGGCC	700
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	CTTGGAACTA	CAATCTGAG	GAAGTCCGAG	CTGTTCTGGA	AAAGCTTTGC	ATCCCACCTG	GACACATGCC	770
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	TCAGT <b>CTAG</b>	GGGGCCAGCA	GGAAGTCCC	CCAAGCTTGG	TACTCCTCCC	CACCAAGTACA	GATGTCTTT	840
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	AGCTTTGACC	TTCGTTCCCA	GATCAATTAC	TAGCTCAGAT	TTTTCTGATC	TGAACAAATA	ACTACCCGGG	910
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	AGGCAATTC	GTTCCAGCA	CCAACACAGC	ACAAATGTT	ACAACCAGAG	ATAAAGCAAT	ACCGAGCTGT	980
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	TAGCAAAAGT	AAGTGTGCAG	CTTTGCACCA	CTCCCACAGG	CGGAGACCAA	TCCAGTGTGT	GCCCCCTCTG	1050
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	GTGGAAGGGT	ACTCATGCTT	GGTTGGCTGA	CTTCTGAAGT	GTAGTGACTC	ATGATGATGA	CGTCAAAAGC	1120
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	TCAATCCATT	TGCCCAAGTT	TGCCACTCAT	AGAATCAGTT	GTTTAGTACC	AAGCGACAGG	CAGGCGTATT	1190
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	TCTACTTGTA	GGAACCAAAG	ACATTGAAAA	CAGTTTTCTG	GCCCTAAGAT	TGAAATCCGT	TAATATTGTT	1260
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	GGTGATAGGT	GTTTCCATGG	CAACCTATAA	TCTAATTCTG	CTCCCTCTAC	CATCTTTGAA	TAGATTGCAG	1330
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	AGAAATCTGG	CTCTCTGGTA	CTGACACAAA	AGCTTTATAA	CTTTAACTAA	ACCAAATCAC	AGGCGCCAGC	1400
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	AAAAGCTGCC	ATTCCCTGC	TGTAACTCTG	TTCCACTGGC	GCCCAGTCTC	TTACTGGTCT	TTCATGTTAG	1470
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	ATGGCTTTGG	ACTGACGGGT	AGCCATGGGT	TCATCTGTCA	<u>TG</u> CTGCTC	<u>TTTT</u> TATATT	<u>TG</u> TTTATGAT	1540
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	<u>GGT</u> CACAGTG	<u>TAA</u> AGTTCAC	<u>AC</u> AGCTGTGA	<u>CT</u> TGATTTTT	<u>AAAA</u> ATGTCG	<u>GG</u> AAGATGCA	<u>GCA</u> AGCTAAC	1610
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	<i><b>GAT</b></i> AAAAATC	CGTCAGGCTA	TTTTTGAATG	GCTCCGGTGT	GATCCTTACA	ATTTCCTTTC	TGACTTGTGT	1680
M.G.	-----AT	-CGTCACAC-	-CACAC--AA	AAAA	-----	-----	-----	
G21	ATGTGGGCCT	GCTCTGCCGT	CTTTTCCGAT	AGCCACAGTG	TAATGTAATC	AGCTAAGGCA	TCGTTTGCCCT	1750
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	GGAGGGACCC	CGTCCTGGAG	GAAGAAGCTC	GTATGTGGCA	CGCATCCAAC	ATGTTGTCCT	GTGAAGTGTT	1820
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	GTGGAAGGGA	CGTGGCTGTT	CACGTCACAG	CAAAGCACCT	TTAGGGGTGA	TGCGTGAATG	GACCTGGGGA	1890
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	GCATTCTCCA	GGCATCCAAA	CAGTTCCTCC	TTGCTCTGCC	TTAGGGCTAC	ACCCAATACT	GTAACATTGC	1960
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	<b>ATTTA</b> FGTAT	GG <b>ATTTA</b> GGT	GAGTCAGGAT	CTAGCTATAA	AGTCGAGAGT	GGCTGTGAAC	TTACAATCTT	2030
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
G21	CAGACTCAGA	GTAGCTGGGA	TTCCAGGTCT	GTCCCCCTAT	<b>ATA</b> AAAAATG	CTTTTGACCT	CTTGAAAAAAA	2100
M.G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

**Figura 8. Comparación de los cDNAs de rata, provenientes de la 5'D1 hepática ( G21) y de la glándula mamaria lactante (MG-D1).** Se compara la secuencia obtenida para el cDNA de mama con la secuencia del G-21 (Berry et al, 1991a). Las bases idénticas se indican con un guión. En negritas se muestran el codón de inicio: ATG (nt 7 a 10); el de término TAG (nt 778 a 780). El codón que codifica para la Se-cys: TGA (nt 382-384) se muestra en negrillas y subrayado. La región SECIS (nt 1515 a 1600) se muestran en letras subrayadas. Las dos señales de poliadenilación (nt 1612 a 1617 y 2079 a 2075) se muestran en letras cursivas y negritas. Los recuadros indican los elementos ricos en adeninas y timinas (ARE) (Modificado de Navarro et al. 1997).

### III. MECANISMOS DE REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL.

La expresión proteica en eucariontes está regulada por una gran variedad de mecanismos. Algunos de ellos han sido dilucidados en sistemas bacterianos y se han encontrado mecanismos similares de regulación en células eucariotas. La mayoría de las células de organismos pluricelulares regulan su expresión génica a varios niveles. A nivel post-transcripcional: el procesamiento del mRNA mediante la adición del CAP en el extremo 5', la adición de la cola de poliA en el extremo 3', corte y empalme de intrones, participación de la región 3'UTR en la estabilidad y eficiencia de traducción de los mRNAs y finalmente la degradación de las proteínas resultantes (Alberts et al. 2002; Atwater, Wisdom y Verma, 1990; Gretchen, Viraldi y Milkarek, 1997). Dado que los objetivos de este trabajo se suscriben al análisis de la participación de las señales poliA del mensajero de la D1, a continuación se revisa únicamente la información referente a las señales poliA y su participación en la regulación de los mRNAs eucarióticos.

#### A. TIPOS Y FUNCIÓN DE LA COLA POLI(A).

La cola de poliA junto con el Cap 5' parece tener varias funciones: 1) permite la exportación del mRNA maduro del núcleo al citoplasma, 2) influye en la estabilidad del transcrito en el citoplasma, 3) participa en su traducción y 4) sirve como una señal de reconocimiento para los ribosomas. Esta última función determina si el mRNA está intacto antes de consumir energía y precursores para su traducción. Se ha establecido que el tipo de señal poliA presente en la 3'UTR, está en relación directa con la longitud de la cola de adenilatos la cual va a determinar la estabilidad y eficiencia de traducción del mRNA (MacDonald y Redondo, 2002; Tanguay y Gallie, 1996; Wahle y Keller, 1992).

La tabla 1, muestra diversas señales de poliadenilación descritas en mRNAs eucariotas (Zarudnaya, Potyahaylo, Kolomiets y Hovorun, 2002). Estas señales de poliadenilación representan una señal de término, indica el final de la transcripción a la RNA polimerasa tipo II, permitiendo la adición de una cola de adenilatos por la polimerasa poliA (PAP) (MacDonald y Redondo 2002; Zarudnaya et al. 2002).

<b>Tabla 1. Señales de poliadenilación de 244 pre-mRNAs estudiados.</b>		
<b>Tipo de elemento</b>	<b>Elemento (Señal poliA)</b>	<b>Porcentaje de pre-mRNAs con el elemento (%).</b>
I	AAUAAA	69
II	AUUAAA	14
III	NAUAAA	09
	ANUAAA	
	AAUANA	
IV	AAUAAA	02
	AUAAAA	
	AAUAAN	
V	Sustitución de cualquiera de las bases en AAUAAA	03
VI	Otras además de I-V	03

*+ Base de datos de señales de poliadenilación humana, reportada en Zarudnaya et al., 2002.*

La secuencia AAUAAA se presenta en el 69% de los mensajeros por lo que se le considera una señal consenso (Zarudnaya et al., 2002). Fitzgerald y Shenk (1981) removieron esta secuencia y mostraron que esta delección impedía la poliadenilación en el gen del antígeno T, cuando el virus SV40 mutante era introducido a células en cultivo. Cole y Santangelo (1983) mostraron que la expresión del gen de la timidina quinasa al que se le había retirado su secuencia de poliadenilación, podía restaurarse si se le insertaba un fragmento de ADN que contenía la secuencia AAUAAA. Otros estudios han analizado el efecto de cambiar o sustituir sólo un nucleótido en esta secuencia. Por ejemplo, Higgs et al. (1983) encontraron en el gen de  $\alpha$ -2-globina aislado de pacientes con  $\alpha$ -thalassemia, un punto de mutación que cambia la secuencia de AAUAAA por AAUAAG, disminuyendo la transcripción del gen  $\alpha$ -2-globina tanto en las células sanguíneas de estos pacientes como en células Hela trasfectadas con genes aislados.

Otras 4 mutaciones realizadas en la secuencia consenso, inhibían la poliadenilación a excepción de la AUUAAA que no sólo permitía la poliadenilación, sino que aumentaba la velocidad de su transcripción pero disminuía la vida media de su

mensajero, lo que permitió conocer que esta secuencia se encuentra aproximadamente en el otro 14% de los mensajeros. Además, en ciertos mRNAs la región 3'UTR no contiene la secuencia consenso, sin embargo se presenta más de un sitio de poliadenilación (Manley, 1988; MacDonald y Redondo, 2002).

Wahle y Keller (1992) han descrito que la mayoría de los mensajeros que no tienen la secuencia consenso, presentan múltiples sitios de poliadenilación y que su uso alternativo participa en la regulación de la expresión de la proteína.

En este contexto, se conoce que el precursor del mRNA de la proteína amiloide puede usar varios sitios de poliadenilación, expresando más eficientemente el mRNA de mayor longitud, aunque su degradación es más rápida (Desauvage, Kruys, Marnix, Huez y Octave, 1992). Particularmente el gen de la vasopresina en condiciones normales transcribe un mRNA corto, pero en condiciones de estrés osmótico (pérdida de agua por hemorragias), expresa un mRNA de mayor tamaño, el cual presenta una mayor eficiencia de traducción y una mayor degradación, en contraste con el mRNA corto que es más estable, pero menos eficiente en su transcripción (Carrazana, Pasioka y Majzoub, 1988).

De la misma forma el gen de la enzima superóxido dismutasa CuZn, también genera dos mRNAs que varían en el tamaño de su región 3' UTR. En dicho estudio se hicieron construcciones que permitieron la formación de diferentes mRNAs, y al expresarlos en células *cos1* traducían preferentemente el mRNA más largo, aunque su degradación era más rápida que su respectivo mRNA corto (Kilk, Laan y Torp, 1995).

Recientemente se identificaron dos transcritos provenientes del uso alternativo de las señales poliA del gen que codifica para el receptor opioide  $\kappa$  (KOR) de ratón. Este gen genera un mRNA corto con una señal poliA (AAUAUA) y un mRNA largo con dos señales poliA (AAUAUA y AAUAAA); la segunda señal corresponde a la señal consenso. La región 3'UTR de ambos mRNAs, mostraron diferencias en su eficiencia de traducción y estabilidad. Los mRNAs del KOR, que usan la segunda señal poliA (consenso), presentan una mayor eficiencia de copiado y son más estables que los que usan la primera señal poliA (Hu, Bi, Loh y Wei, 2002).

Un caso diferente es el del gen *hap* que induce apoptosis, se expresa en todos los tejidos y genera tres mRNAs de diferente tamaño que varían en su región 3'UTR,

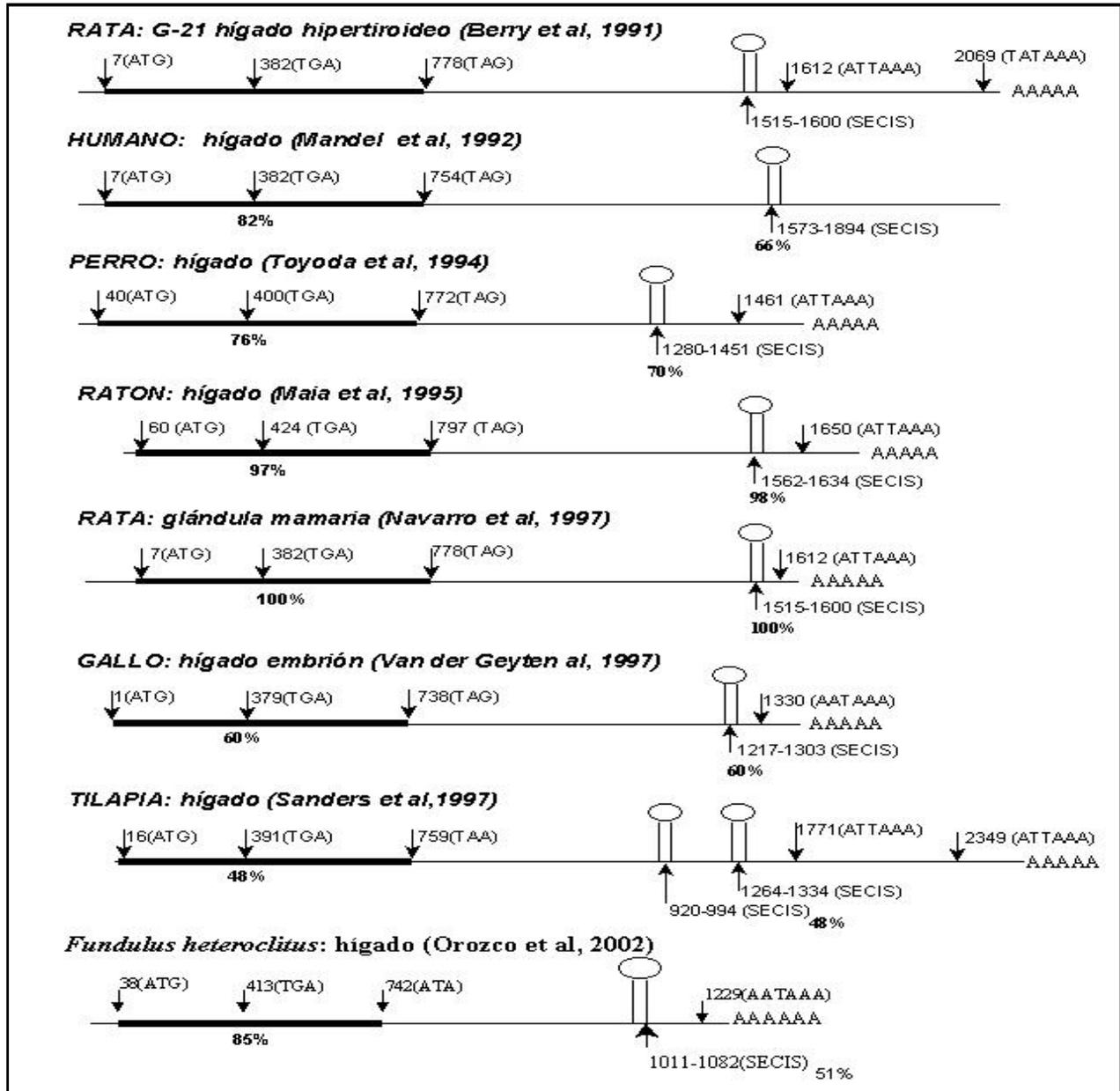
debido a que presentan tres señales de poliadenilación. Si bien estas señales son idénticas a la consenso (AATAAA), los mRNAs de menor tamaño presentan menor eficiencia de transcripción que el mRNA largo. Sin embargo, ninguno de los mensajeros presenta diferencias en cuanto a su estabilidad (Qu, Qi y Qi, 2002).

El mecanismo por el cual la 3'UTR regula la expresión de los mRNAs no es claro. Se ha descrito que la longitud de la 3'UTR y la cola poliA tienen influencia sobre la expresión y estabilidad de los mRNAs eucarióticos. Al respecto se han propuesto dos modelos; el primero establece que el tipo de señal poliA presente en la región 3'UTR, determina la longitud de la cola de adenilatos (Tanguay y Gallie, 1996). La cola es reconocida por proteínas de unión a la cola poliA (PABP1) las cuales interactúan con el factor de traducción eIF4G, formando un puente con la proteína de unión al CAP (eIF4E) en la región 5' del mRNA (Wells, Hillner, Vale y Sachs, 1998). El mRNA se circulariza estimulando el ensamble del complejo de inicio de la traducción en la región 5'CAP, y se incrementa así la traducción (Otero et al. 1999; Shim y Karin, 2002; Tanguay y Gallie, 1996). El segundo modelo establece que un incremento en la longitud de la cola poliA no siempre resulta en un aumento de la traducción, debido a que realmente las proteínas que reconocen secuencias en la 3'UTR son las que favorecen el inicio de la traducción, manteniendo a la unidad ribosomal 40S en el mRNA. Esta asociación le permite a la maquinaria ribosomal iniciar la traducción de manera eficaz en el mismo mRNA, a diferencia de un ribosoma que se ha disociado ya del mRNA (Tanguay y Gallie, 1996).

Hasta este momento los antecedentes mencionados indican que la localización y tipo de señal poliA presente en cada mRNA al igual que de las proteínas que las reconocen, son clave para determinar en cada mRNA, su estabilidad o una eficiencia de traducción característica.

#### IV. REGIÓN 3' NO TRADUCIBLE DE LOS RNA MENSAJEROS DE LA D1.

Para el caso específico de las desyodasas, a partir de 1991 se tienen los cDNAs de las tres enzimas en rata. Todas pertenecen a la familia de las selenio enzimas, las cuales contienen en su región 3'UTR la secuencia SECIS de inserción del aminoácido selenocisteína. La figura 9, muestra los cDNAs descritos para la D1 en diferentes especies.



**Figura 9.** Esquema representativo de los mRNAs descritos para la enzima desyodasa tipo 1 en diferentes especies.

Inicialmente se describió el G-21 en hígado de rata hipertiroidea, que contiene en su región 3'UTR dos señales de poliadenilación (Berry et al. 1991). Posteriormente se describieron mRNAs hepáticos para la D1 en perro (Toyoda *et al.* 1994), ratón (Maia et al.1992) y humano (Mandel et al. 1992). Los mRNAs de perro y ratón son semejantes entre un 76 y 86%, con respecto al G-21, y ambos contienen la primera señal de poliadenilación alrededor del sitio 1600 pb corriente abajo. Además, estos dos mRNAs son 450 pb más pequeños que el G-21 de rata en la región 3'UTR, y no contienen la segunda señal de poliadenilación en su región 3'UTR (Berry et al.1991).

En el pez tilapia, el mensajero de la D1 presenta una identidad de 48% con respecto al G-21, además posee dos sitios SECIS y dos señales poliA (ver Figura 9) siendo características distintivas de este pez (Sanders et al. 1997). El mensajero descrito para el pez *Fundulus heteroclitus* presenta un 85% de identidad con respecto al G-21 y sólo presenta un sitio SECIS (Orozco et al. 2002). El mensajero encontrado en el hígado de embrión de gallo tiene un 60% de parecido con el G-21 de rata, y sólo presenta una señal de poliadenilación (Van Der Geyten et al. 1997). Es importante señalar que todos los mensajeros reportados hasta la fecha con excepción del G-21 de rata, provienen de organismos eutiroides.

En nuestro laboratorio se describió la presencia de un nuevo mRNA para la D1, presente en la glándula mamaria de rata lactante, idéntico en su región codificante al G-21, pero más corto en su región 3'UTR y con sólo la primera señal de poliadenilación. Cabe destacar que ninguna de las señales corresponde a la señal consenso AAUAAA (Navarro et al. 1997).

Aunque fisiológicamente no se conoce el significado de estos hallazgos, estudios realizados en nuestro laboratorio, han mostrado que en condiciones de elevada demanda energética: como son los estados hipertiroideos, lactancia intensa o con estimulación beta adrenérgica, diversos órganos de la rata (hígado, corazón, y glándula mamaria lactante) expresan primordialmente el mensajero largo de la enzima D1(Aceves et al. 1999; Aceves y Rojas-Huidobro 2001; Navarro et al.1997). Es decir, parece que el mensajero largo de la D1 (G-21) se expresa sólo en forma aguda y como respuesta a elevadas demandas metabólicas.

Aunado a lo anterior, se han encontrado motivos ARE entre las señales poliA de mRNAs con múltiples señales poliA. Estos motivos se han encontrado principalmente en mRNAs de vida media corta y algunos codifican para proto-oncoproteínas, factores de transcripción, citocinas, interleucinas, etc. Estos motivos ARE se han considerado como señales desestabilizadoras que provocan el reconocimiento de los mRNAs por exonucleasas específicas y son rápidamente degradados. Esto ha permitido sugerir que estos elementos se encuentran sólo en mRNAs que requieren ser regulados puntualmente en etapas críticas del organismo (Chen y Shyu, 1994; Ming, Kaiser y Moroni, 1998; Ross, 1995; Shim y Karin, 2002; Wickens et al. 1997). En el caso específico de los mRNAs de la D1, sólo el mRNA largo presenta dos motivos ARE entre las dos señales poliA. Esto apoya nuestros hallazgos de que el mRNA largo sólo se detecta en condiciones de elevada demanda metabólica.

## **HIPÓTESIS**

El mensajero largo representa un transcrito de alta eficiencia de copiado, que permite proveer a la célula de mayor cantidad de enzima D1, y por lo tanto de mayor cantidad local de T3 para mantener su elevado metabolismo. Específicamente se propone que, este mensajero de 2069 pb con dos señales de poliadenilación, tendrá una tasa mayor de traducción y, quizás, una vida media más corta que su correspondiente mensajero corto.

## **OBJETIVOS**

### **I. OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar en un sistema *in vitro*, las características funcionales de los dos mRNAs que codifican para la D1.

### **II. OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Construir y caracterizar los plásmidos que contengan los cDNAs corto y largo de la D1 de rata.
- Mediante la transfección de vectores de expresión en células HEK293, analizar la tasa de traducción midiendo la actividad desyodativa generada y la vida media de los dos mRNAs de la D1.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

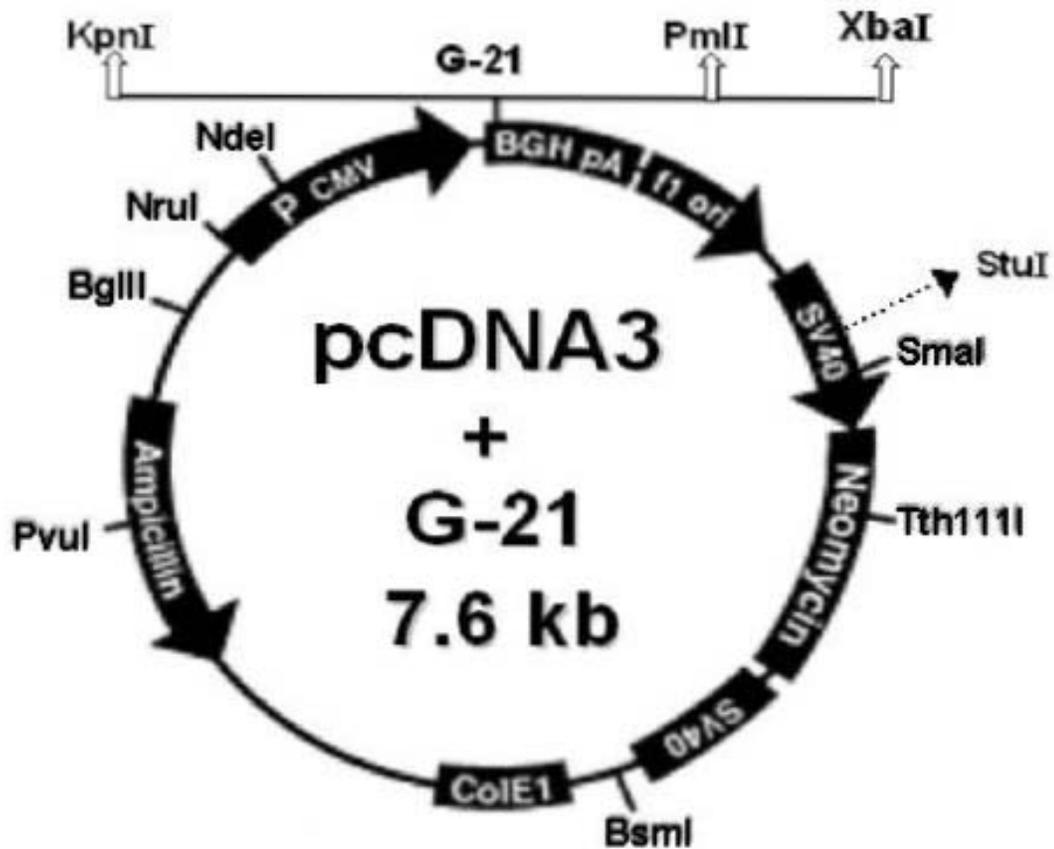
### **I. MATERIALES**

La [<sup>125</sup>I] triyodotironina reversa [(<sup>125</sup>I)rT3], se adquirió en New England Nuclear (Boston, MA). La no radiactiva de Henning Co. (Berlin, Alemania). El Ditiotreitól (DTT) fue de Calbiochem (La Jolla, CA). El reactivo de Bradford fue de BIO-RAD Laboratories (Hércules, CA). El suero fetal bovino (SFB), la solución de tripsina-EDTA (0.05% de tripsina, 0.4g/L EDTA 4Na), la solución de antibióticos penicilina/estreptomina, el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) alto en glucosa fueron de GIBCO BRL (Grand Island, NY). Las cajas de cultivo fueron de Corning (Corning, NY). El antibiótico Actinomicina D y el paquete de detección de la actividad del gen reportero beta-galactosidasa fue de SIGMA-ALDRICH (Saint Louis, Missouri). El agente de Transfección FuGENE 6 fue de Roche (Indianápolis, IN) y la enzima de restricción *Bbr*PI ó *Pma*CI fue de Roche (Mannheim, Germany). Las enzimas *Xba*I, *Sma*I, *Stu*I, el fragmento largo de la DNA polimerasa I (Klenow), la SuperScript II Transcriptasa Reversa fueron de Invitrogen life technologies (Carlsbad, CA). La Amplificasa DNA polimerasa fue de BIOTECNOLOGÍAS UNIVERSITARIAS (México, DF). El reactivo TRizol fue de GIBCO BRL(Grand Island, NY). El resto de los reactivos fueron de alta pureza todos son disponibles comercialmente.

### **II. METODOLOGÍAS**

#### **A. CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS.**

Utilizamos el plásmido pcDNA3 de 5.5 kb de peso molecular, el cual posee el promotor de la transcripción del citomegalovirus (pCMV) (Figura 10) para su expresión en células Humanas de Riñón Embriónico (HEK293). A este plásmido se le insertó el cDNA que codifica para la D1 (G-21) en los sitios *Kpn*I y *Xba*I, quedando de un peso molecular de 7.6 kb, denominado pcDNA3-G21.



**Figura 10. Mapa del plásmido pcDNA3-G21.** Indica la clonación del G-21 en sitios *KpnI* y *XbaI*, al igual que las secuencias internas del plásmido con sus sitios de restricción.

1. Construcción del vector D1C para la expresión del mRNA corto (1.6 kb).

A partir del pcDNA3-G21, se construyó el plásmido con el cDNA que codifica para el mRNA de 1.6 kb de la D1. La digestión del pcDNA3-G21 con *PmlI* y *StuI* cortan delante de la primera señal de poliadenilación (1745 pb) y dentro del plásmido (4098 pb) respectivamente. Con esta digestión se cortó por un lado, la segunda señal poliA del G21 y, por el otro, se eliminó la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGHpA) interna del plásmido (4098pb). El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 1%; la banda de interés se cortó y purificó (CONCERT™ Rapid Gel Extraction System). Posteriormente se ligó y la construcción

se transformó en células competentes de *E. coli* (XL-blue). Esta construcción la denominamos D1C de un peso de 6 kb.

## 2. Construcción del vector D1L para la expresión del mRNA largo (2.1kb).

Para la construcción D1L con el cDNA que codifica para el mRNA largo de la D1, a partir del pcDNA3-G21, se incubó con *Xba*I y *Stu*I que cortan en 2184pb del G-21 y dentro del plásmido (4098pb), respectivamente. En un gel de agarosa al 2% se corrió el producto de digestión y la banda indicada se cortó y purificó (Rapid Gel Extraction System. CONCERT™). Posteriormente se ligó y la construcción se transformó en células competentes XL-blue. Esta construcción será referida en el texto como D1L y tiene un peso de 6.4 kb.

Para corroborar el tamaño de las construcciones, se realizaron mini preparaciones (MP) de cada una de las construcciones (D1C y D1L) (CONCERT™ Rapid Gel Extraction System). Cada MP se digirió con *Sma*I, que realiza dos cortes, el primero dentro del cDNA de la D1 (960 pb) y el segundo en la parte interna del vector (3259 pb). Se corrió un gel de agarosa al 1% para verificar los tamaños de las bandas en cada construcción y se realizó una maxipreparación de cada construcción (GenElute™ Plasmid Maxiprep Kit).

## B. CULTIVO CELULAR Y TRANSFECCIÓN.

Las células Humanas de Riñón Embrionario (HEK293) se cultivaron en monocapa y se crecieron en medio DMEM suplementado con 10% de FBS conteniendo 100 U/mL de penicilina y 100µg/ml de estreptomina. Las células se incubaron a 37°C, en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>. Para los experimentos las células se sembraron en cajas de 35 x 10mm a una densidad de 3X10<sup>5</sup> células/caja un día antes de la transfección. Cuando las células alcanzaron una preconfluencia del 60-70%, se transfectó un total de 1.2µg de DNA. Para determinar la eficiencia de transfección de los vectores, 1µg/µl de cada plásmido; pcDNA3-G21, D1C o D1L se cotransfectó con 200ng/µl del plásmido que codifica para β-galactosidasa. El DNA fue mezclado con 3µl del reactivo de

transfección FuGene 6 en 96 $\mu$ L de DMEM. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante dos horas antes de la adición a las células preconfluentes. Las células se incubaron a 37°C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, a diferentes tiempos especificados en cada pie de figura de los experimentos en la sección de resultados.

#### C. EXTRACCIÓN DE RNA DE LAS CÉLULAS HEK293.

A 24 horas post-transfección se retiró el medio de las células HEK293 por aspiración. Para los ensayos de proteína, se aspiró el medio DMEM y las células se lavaron dos veces con un amortiguador rico en fosfatos (PBS), posteriormente se adicionaron 200 $\mu$ L del amortiguador de lisis 5x (250mM HEPES pH 7.5, 25 mM CHAPS). En cada pozo de cultivo, las células se rasparon y se colectaron en tubos Eppendorf y se congelaron en hielo seco para su almacenamiento a -70°C. Para la extracción de RNA, se aspiró el medio DMEM y las células se lavaron con el amortiguador PBS, se adicionó 1mL del reactivo TRIzol (Invitrogen) y la extracción del RNA total se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### D. ENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA DESYODASA TIPO 1

Se utilizó la técnica de liberación de radioyodo (Aceves y Valverde, 1989), que consiste en lo siguiente: En tubos de ensayo se colocaron 50 $\mu$ l de la mezcla radioactiva que contiene 2nM de <sup>125</sup>I-rT3 (alrededor de 50,000 cpm. a.e. 1200mCi/mg)) más rT3 no marcada para completar una concentración final de sustrato de 0.5 $\mu$ M de rT3, y 5 mM de ditioneitol (DTT) como cofactor y 50 $\mu$ l del homogenizado celular correspondiente (100  $\mu$ g de proteína). Los tubos se incubaron 3 horas a 37°C. La reacción se detuvo al adicionar 50 $\mu$ l de una solución de paro que contiene suero bovino normal al 50% y 10 mM de propiltiuracilo (PTU) y 300 $\mu$ l de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Se mezcló la reacción en vortex y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos. El sobrenadante se resolvió por cromatografía en una columna de intercambio catiónico Dowex W-50 X2, previamente equilibrada con ácido acético (Ac) al 10% . El <sup>125</sup>I liberado se cuantificó en un contador gamma Packard modelo cobra II. La actividad enzimática se determinó

midiendo la cantidad de yodo radiactivo liberado, respecto a la cantidad total de sustrato por miligramo de proteína por hora (actividad específica). En todos los ensayos se incluyeron dos pares de tubos sin proteínas, con los cuales se calculó el porcentaje de yodo liberado no-específico. La concentración de proteínas se midió por el método Bradford (ensayo de proteína de Bio-Rad, Bio.Rad laboratories, Inc., Richmond, CA). Los resultados se expresaron como actividad relativa de la D1 normalizada con la actividad de  $\beta$ -galactosidasa (D1/ $\beta$ -gal).

#### E. ENSAYO ENZIMÁTICO PARA $\beta$ -GALACTOSIDASA.

Este ensayo se realizó para normalizar la eficiencia de transfección en cada experimento. 100 $\mu$ g de la proteína del lisado celular, 10 $\mu$ L del amortiguador de lisis 2x, y 50 $\mu$ L del amortiguador 2x [ 200mM buffer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.3, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 1.33 mg/ml o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG)]. Se incubaron a 37°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo con 150 $\mu$ l de la solución de paro (1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) y el producto se leyó en el Elisa Microplate Reader Mod. 3550-UV de Bio-Rad a una densidad óptica de 420 nm. Las unidades fueron determinadas como nmol de o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopyranoside (1nmol/ml=0.0045  $-A_{420}$ ) hidrolisada/(min x mg proteína).

#### F. RETROTRANSCRIPCIÓN Y AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).

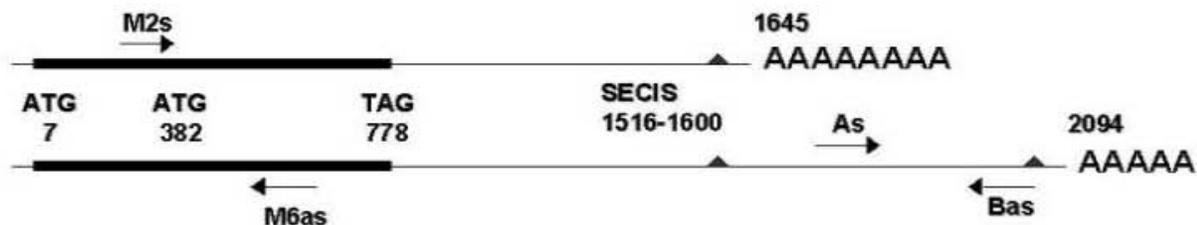
La retrotranscripción se realizó con 1 $\mu$ g del RNA total extraído, cuya concentración se determinó por absorbancia espectrofotométrica a 260 nm en el espectrofotómetro Beckman DU 650. Al RNA se le añadió el oligo d(T) y se incubó durante 5 minutos a 45°C, posteriormente se agregó el amortiguador con MgCl<sub>2</sub> 10x, la mezcla de desoxinucleótidos 10 nM, y la enzima Superscript transcriptasa reversa y se incubó durante 1 hora a 37°C, seguido de 5 minutos a 95°C. El DNA complementario (cDNA) obtenido se congeló a -20°C. Los mRNAs de la D1 se coamplificaron simultáneamente mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (ver figura

11A; oligos M2s y M6as para el mRNA corto; As y Bas para el mRNA largo) con el mRNA que codifica para la enzima Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (ver figura 11B; GAs y GAAs). En la figura 11 se muestra la secuencia de los oligos, la región de amplificación, el tamaño del amplicón para el mensajero corto y largo de la D1, GAPDH y c-myc. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador icycler Bio-Rad bajo las siguientes condiciones: 30 ciclos para los mRNAs de la D1 y para GAPDH. Cada ciclo a una temperatura de punto de fusión de 94°C x 45s, de alineación a 54.5°C x 45 s, y de extensión a 72°C x 1 min. Como control en cada reacción, se colocó una muestra de RNA con los oligos apropiados, pero sin la transcriptasa reversa. El mensajero de c-myc se amplificó utilizando los oligos Mycs y Mycas (ver figura 11B) mediante el procedimiento descrito por Grand et al. (2002). Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio para su visualización. El tamaño de las bandas fueron confirmadas con una escalera de DNA conocida (1 kb DNA ladder; Gibco-GRL). Después se le tomó una fotografía Polaroid usando un Scanner Hewlett Packard Jet 11CX, y la señal fue analizada usando el programa NIH-Image. Los valores fueron normalizados por los niveles de mRNA de GAPDH detectada en cada muestra por densitometría (D1C-D1L/GAPDH).

#### G. ENSAYO DE ESTABILIDAD PARA LOS RNA MENSAJEROS DE LA D1.

Se sembró  $3 \times 10^5$  células/pozo en cajas de cultivo de seis pozos, cuando alcanzaron el 60-70 % de confluencia, se cotransfectaron  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  de los plásmidos D1L o D1C siempre con  $200 \text{ng}/\mu\text{l}$  del pRSV- $\beta\text{gal}$ . Veinticuatro horas después de la transfección las células, se trataron con un inhibidor de la polimerasa tipo II, actinomicina D (act-D) a dos concentraciones ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  o  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Las células se colectaron a las 0,4,8,12 y 16h. Se extrajo el RNA total como se describió anteriormente, y los RNAs de D1L y D1C fueron analizados por RT-PCR.

**A**



Oligo	Tamaño	Localización	Secuencia	propósito	Banda esperada
M2s	20 nt	377-398	GCACCTGATCTTCATTTCTT	PCR	250 pb
M6as	18 nt	810-827	CTGGCTGCTCTGGTTCTG	PCR	
As	20 nt	1693-1712	CTGCCGTCTTTCCGATAGC	PCR	125 pb
Bas	20 nt	1809-1829	CCCTTCCACAACACTTGACA	PCR	

**B**

Oligo	Tamaño	Secuencia	propósito	Banda esperada
GAs	26 nt	TGAAGGTCGGTGTCAACAGATTTGGC	PCR	521 pb
GAas	24 nt	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC	PCR	
Mycs	20 nt	AGAGAAGCTGGCCTCCTACC	PCR	2116 pb
Mycas	20 nt	AGCTTTTGCTCCTCTGCTTG	PCR	

**Figura 11. Oligos utilizados para RT-PCR.** **A**, Representación esquemática de los mRNAs de la enzima D1. También se presenta la dirección y posición de los oligos usados. Se ilustra la posición exacta, longitud, secuencia y longitud predicha del amplicón. **B**, Se muestran las características de los oligos usados para la amplificación de los mRNAs de GAPDH y c-myc. **PCR**, reacción en cadena de la polimerasa.

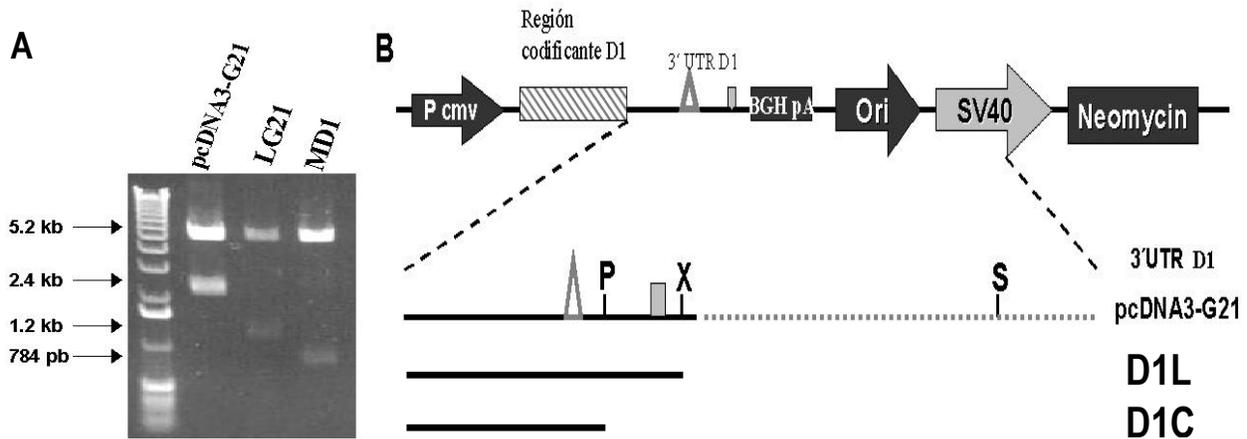
## H. ANÁLISIS NORTHERN BLOT.

Del RNA total utilizado para el RT-PCR, 10µg se corrieron en un gel desnaturalizante de agarosa al 1% y formaldehído 2.2 M. Se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con la sonda de cDNA D1 marcada con ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)deoxy-CTP (Amershan, Biosciences) durante toda la noche a 42°C. Posteriormente se lavó dos veces durante dos minutos agitando fuertemente con SSC 0.1x y SDS 0.1%. La membrana se dejó exponiendo en una pantalla sensible a fósforo durante 24 horas a temperatura ambiente y la señal fue detectada usando un STORM y cuantificada con el software ImageQuant (Molecular Dynamics).

## RESULTADOS

### I. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN

Con el propósito de tener diferentes vectores de expresión con las diferentes señales poliA del mensajero corto y largo, se utilizó el plásmido **pcDNA3-G21**. Este plásmido contiene el cDNA que codifica para el mRNA largo de la D1, con tres señales de poliA (las dos de la D1 y la señal consenso del plásmido). A este plásmido se le realizaron cortes enzimáticos específicos para generar los otros transcritos: El primero, contiene el cDNA del mRNA largo sólo con sus dos señales poliA denominado **D1L**. El segundo, contiene el cDNA del mRNA corto con una señal poliA de nominado **D1C**.

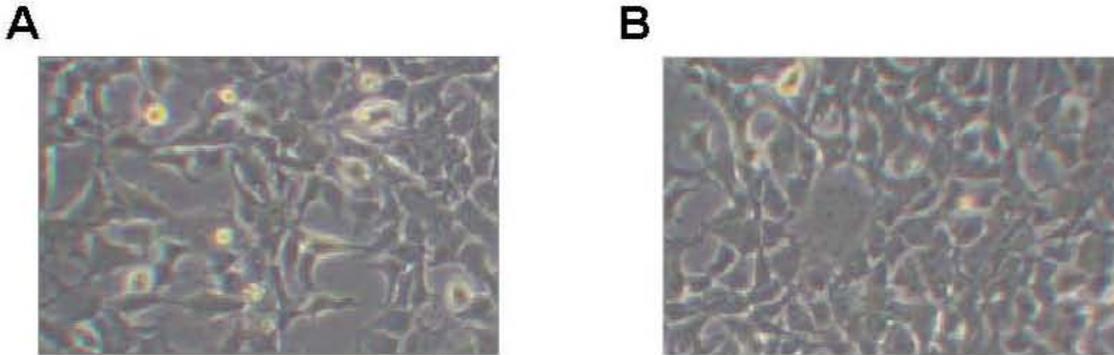


**Figura 12. Construcción de los plásmidos.** **A**, Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, muestra el tamaño de las construcciones finales digeridas con *Sma*I. **B**, Mapa de los vectores construidos y sitios de restricción.  $\Delta$ , Primera señal de poliadenilación;  $\blacksquare$ , segunda señal de poliadenilación; línea sólida negra, región 3'UTR de la D1; Línea punteada gris, secuencia interna del vector; P, *Pml*I; X, *Xma*I; S, *Stu*I.

## II. EFECTO DE LAS SEÑALES POLIA EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA D1.

### Cultivo celular.

La figura 13A, muestra una fotografía de las células 293HEK a un 70% de confluencia y la figura 12B, las células totalmente confluentes.

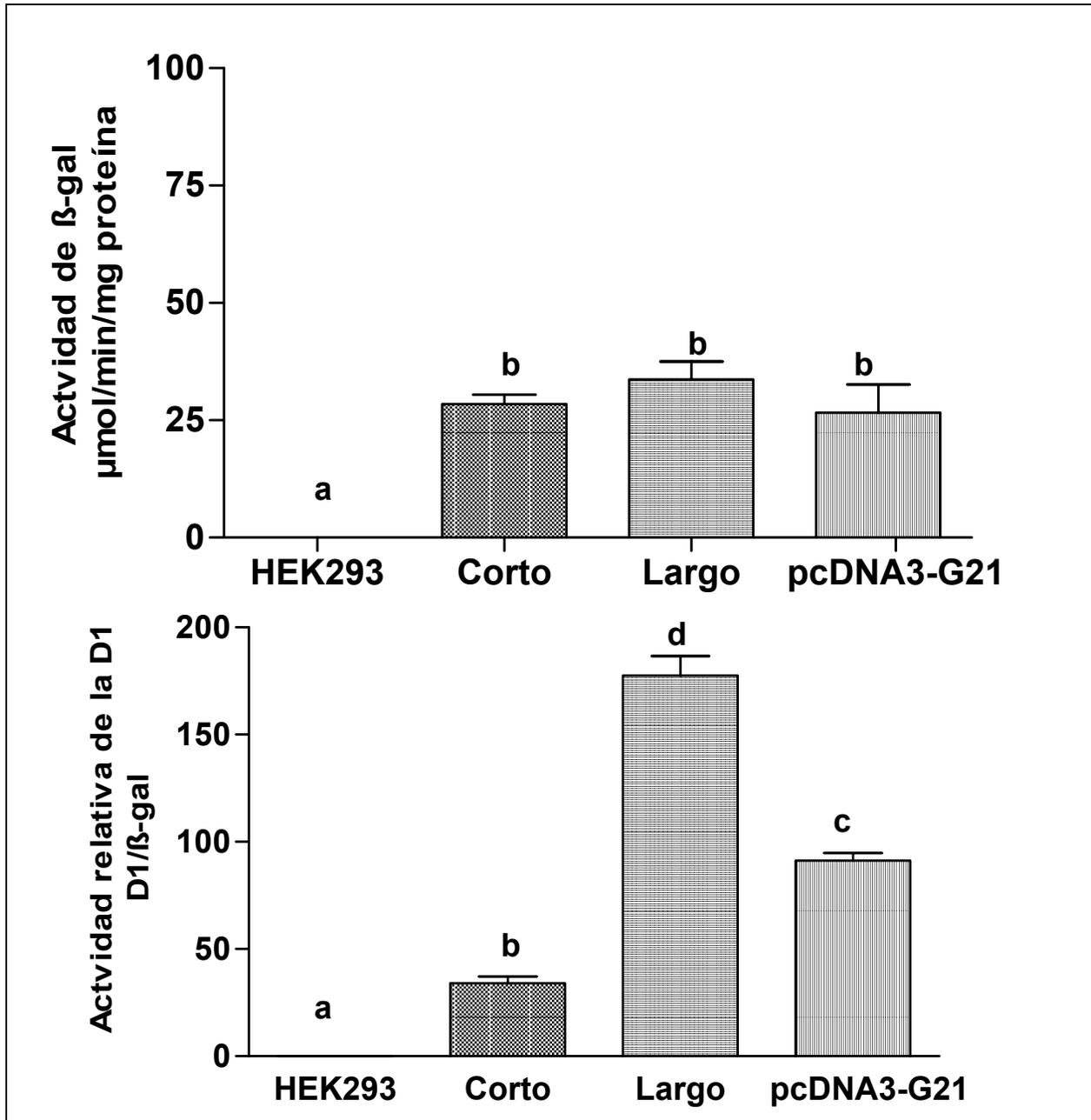


**Figura 13. Fotografías de las células HEK293 en diferentes estados de confluencia mantenidas en cultivo.** Ambas líneas celulares se inocularon con  $3 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron en DMEM adicionado con 10% SFB, 100 U/MI penicilina y 100 µg/mL estreptomycin. Incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda, 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>. **A**, 70% de confluencia a una densidad de  $6 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> y **B**, 90-95% de confluencia a una densidad de  $9.8 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>.

### A. EFECTO DE LAS SEÑALES POLIA EN LA TRADUCCIÓN.

Con la finalidad de analizar el efecto de las señales poliA en la traducción, se midió la actividad enzimática de la D1 normalizada con la actividad de  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal). De manera que se co-transfectaron los siguientes vectores; pcDNA3-G21 o D1C o D1L junto con el plásmido pRSV- $\beta$ gal para normalizar la eficiencia de transfección y como control negativo las células sin transfectar. La Fig. 14, muestra que las células sin transfectar no expresan actividad desyodativa ni de  $\beta$ -galactosidasa. Al analizar la actividad de  $\beta$ -gal no encontramos diferencia significativa entre los diferentes ensayos. Sin embargo, al analizar la actividad desyodativa se encontró que el vector que expresa el mensajero largo (D1L), presenta la actividad desyodativa más alta ( $177.6 \pm 15.45$ ) (n=3). Es decir, 5 veces más actividad D1 que la proveniente del

mensajero corto y dos veces más que la del pcDNA3-G21 que tiene la señal consenso (ver tabla2). Estos resultados sugieren que los mRNAs con la 3'UTR con dos señales poliA, presentan una mayor eficiencia de copiado.



**Figura 14. Actividad enzimática de  $\beta$ -gal y desyodasa de los diferentes plásmidos.** **A**, actividad enzimática de  $\beta$ -gal 24 h post-transfección, los valores representan la media  $\pm$  D.E. (n=3). Superíndices con letras semejantes, indican grupos estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ). **B**, actividad relativa de la D1 normalizada con la actividad  $\beta$ -gal, los valores representan la media + D.E. (n=3). Diferentes superíndices significan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) utilizando la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis; y la diferencia entre grupos se determinó por la prueba U de Mann-Whitney.

**Tabla 2.** Efecto de las señales poliA sobre la actividad enzimática de la D1 en células HEK293.

<b>Vector expresado en células HEK293.</b>	<b>Actividad enzimática de la D1 (D1/<math>\beta</math>-gal)</b>
HEK293 sin transfectar	0.01800 $\pm$ 0.004443
D1C	34.11 $\pm$ 5.518
D1L	177.6 $\pm$ 15.45
pcDNA3-G21	91.30 $\pm$ 6.016

Las células HEK293 fueron co-transfectadas con los vectores de expresión D1C o D1L o pcDNA3-G21 siempre con el pRSV- $\beta$ gal. 24h post-transfección las células fueron colectadas y analizadas como se describe en la figura 13. Los valores obtenidos de actividad desyodativa fueron relativamente normalizados a la actividad  $\beta$ -gal. Los valores indican que la 3'UTR modificó la actividad desyodativa significativamente ( $p < 0.05$ ) 24 h post-transfección. Los datos están expresados como la media  $\pm$  D.E de los valores obtenidos de tres experimentos por duplicado. Los datos se analizaron utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

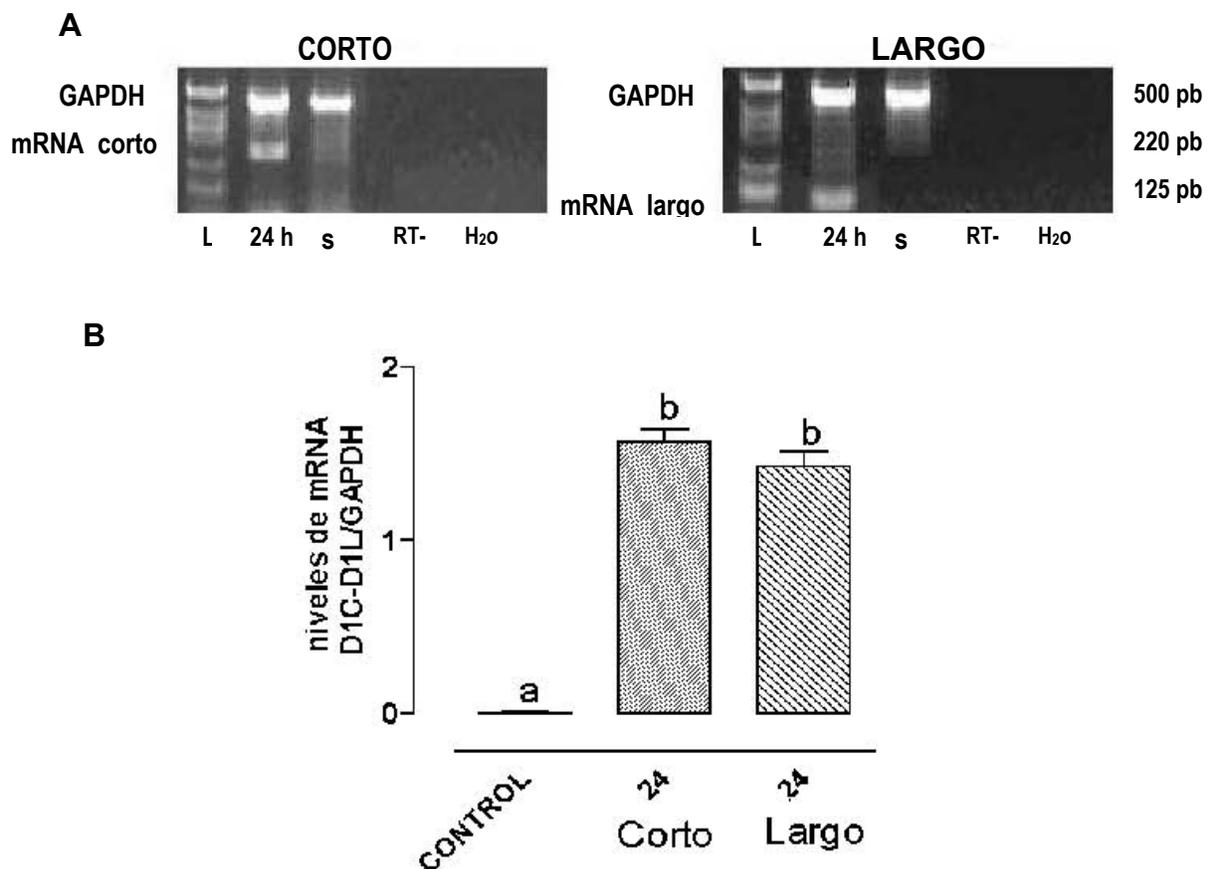
## B. COMPARACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LOS RNA MENSAJEROS DE LA D1.

El aumento en actividad enzimática de la D1, podría deberse a dos causas principalmente: un aumento en la cantidad de mRNA o bien a una mayor eficiencia de copiado a nivel ribosomal. Para probar estas posibilidades analizamos por RT-PCR semicuantitativo la expresión de los distintos mRNAs de la D1 provenientes de los distintos vectores de expresión (MD1 y LG21), así como también el tamaño de los mRNAs por Northern blot.

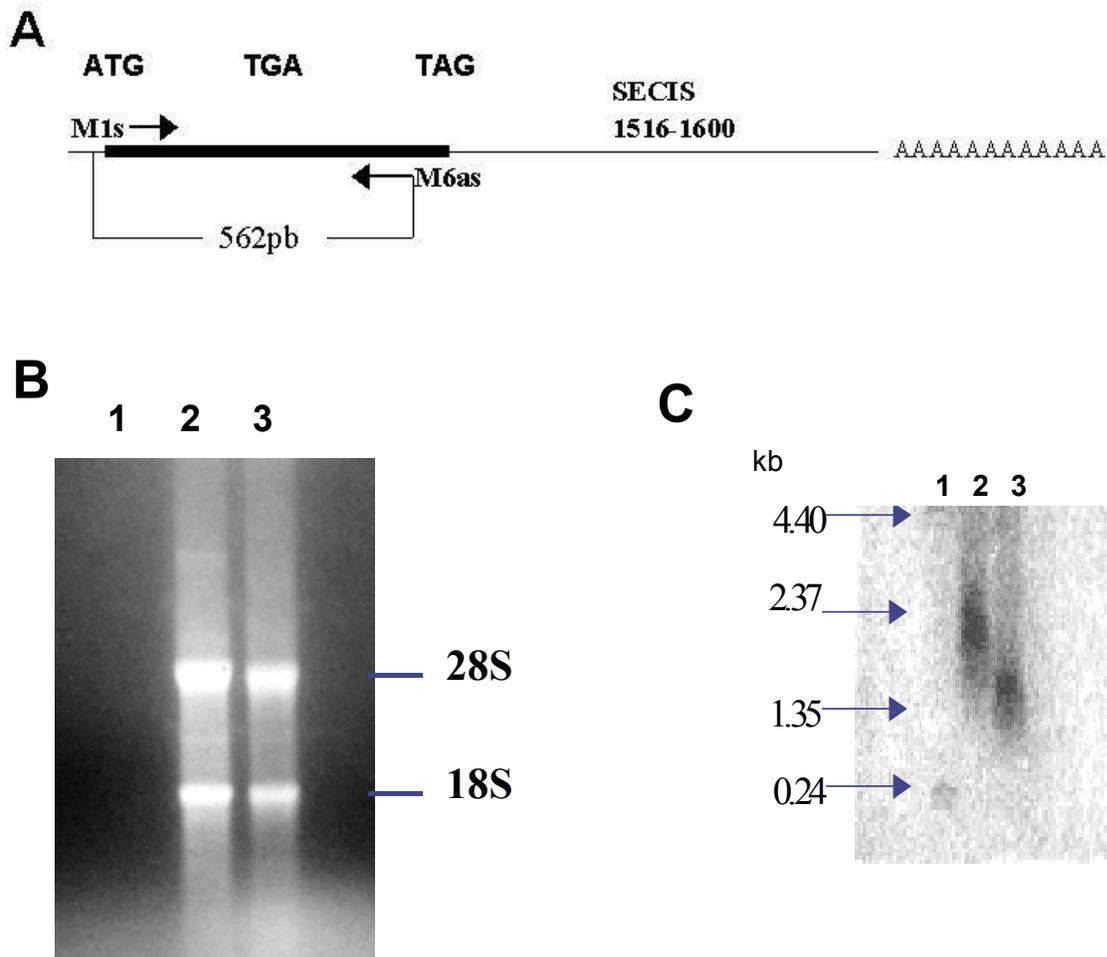
La cantidad de RNA total para cada transcrito de la D1 fue normalizado con los niveles de los mRNAs de la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La Figura 15A, muestra una foto representativa de los productos del RT-PCR de la amplificación de los dos mRNAs de la D1 y GAPDH. Estos experimentos se repitieron tres veces con RNAs independientes. El gel teñido con bromuro de etidio confirmó los tamaños esperados para cada amplicón. El análisis densitométrico mostró que ambos plásmidos generaron la misma cantidad de RNA (Figura 15B).

Dado las diferencias en la actividad enzimática entre el mRNA corto y largo, aunado al hallazgo de que no hubo diferencias en los niveles de RNA, fue necesario confirmar que el vector D1L produce solamente el mRNA largo y no ambos (corto y

largo). La figura 16, muestra el tamaño de los mRNAs de la D1 por análisis Northern blot, utilizando la sonda cD1 de 562 pb obtenida por PCR utilizando los oligos M1s y M6as cuyas secuencias, y posiciones, respecto al G21 se muestran en la figura 16. Los resultados del análisis muestran que la sonda híbrida con una banda de alrededor de 2.1 Kb en el RNA largo, mientras que para el RNA corto híbrida con una banda de aproximadamente 1.6 Kb (Figura 16). Estos datos sugieren que la diferencia en la actividad enzimática entre los mRNAs de la D1, se debe a una activación a nivel traduccional y confirma que el vector D1L sólo produce el mRNA largo de la D1.



**Figura 15. Análisis del efecto de las señales poliA en la expresión de los mRNAs de la D1.** Para la reacción de RT se utilizó oligo d(T) y 1 µg de RNA total. **A**, gel representativo teñido con bromuro de etidio indicando los productos del PCR, utilizando los oligos específicos para cada mRNA de la D1. L, marcados de peso molecular. 24h post-transfección con los vectores de expresión. S, sin transfectar. RT-, con todos los reactivos sin transcriptasa reversa. H<sub>2</sub>O, todos los reactivos con agua sin RT. **B**, Análisis densitométrico. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



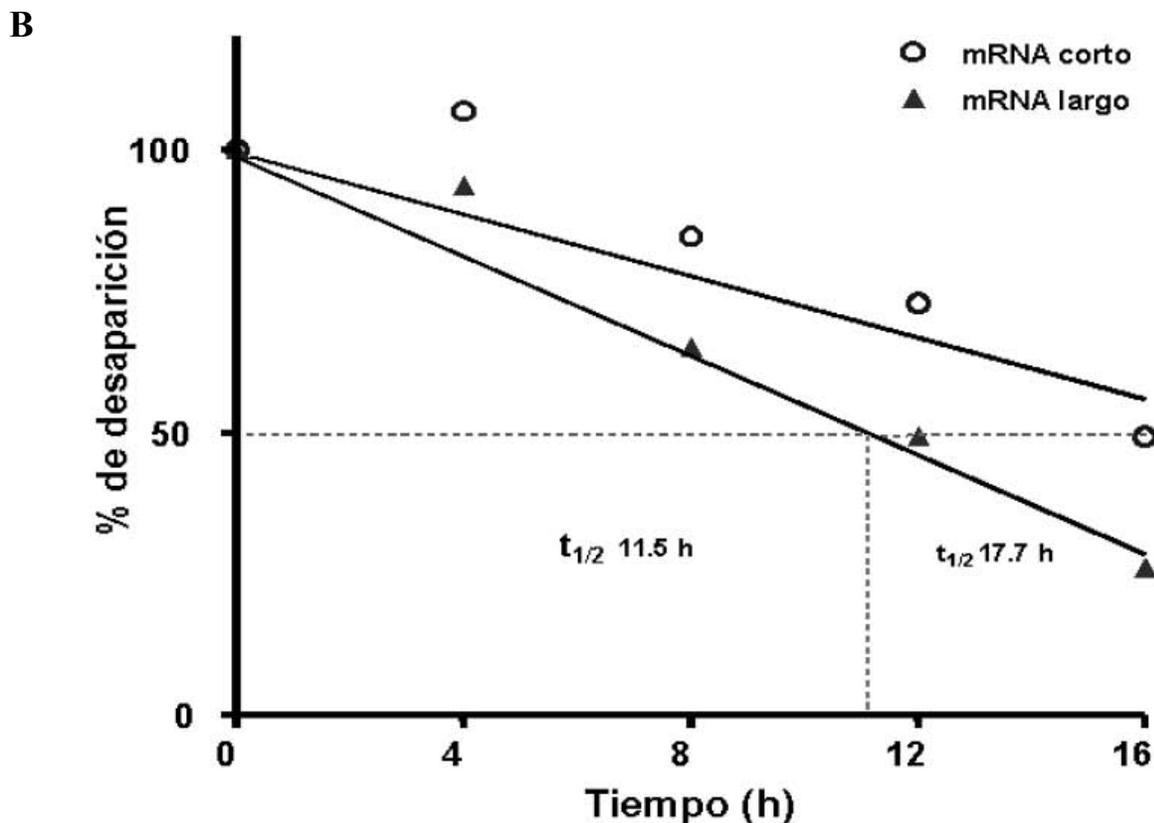
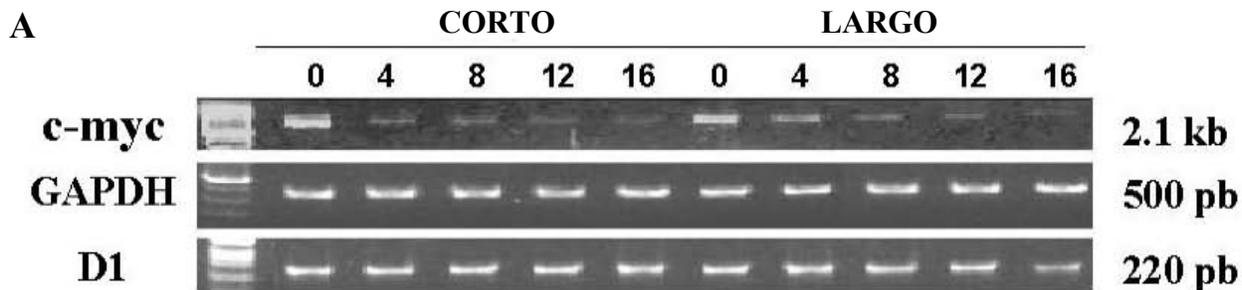
**Figura 16. Análisis tipo Northern Blot de los mRNAs que codifican para la D1.** Se muestra la hibridación de 10/μg/carril de RNA total, extraído 24h después de co-transfectar con LG21 y MD1: (carril 1) escalera de RNA; (carril 2) RNA total proveniente de las células transfectadas con D1L (largo); (carril 3) RNA total proveniente de las células transfectadas con D1C (corto). **A**, mapa de localización de los oligos utilizados para la sonda cD1. **B**, gel desnaturalizante teñido con bromuro de etidio, mostrando la integridad de las muestras de RNA. **C**, autorradiografía de la hibridación con la sonda  $^{32}\text{P}$  cD1, mostrando bandas esperadas de 2.1 y 1.6 Kb.

### III. EFECTO DE LA REGIÓN 3'UTR EN LA ESTABILIDAD DE LOS RNA MENSAJEROS DE LA D1.

Los resultados presentados hasta aquí indican una discrepancia en la producción de proteína medida como actividad enzimática de la D1 y en los niveles de mRNA detectado en ambos vectores. Esto podría explicarse porque el mRNA largo que contiene dos señales poliA active más eficientemente la traducción o, que el mRNA corto con una señal poliA sea degradado más rápido.

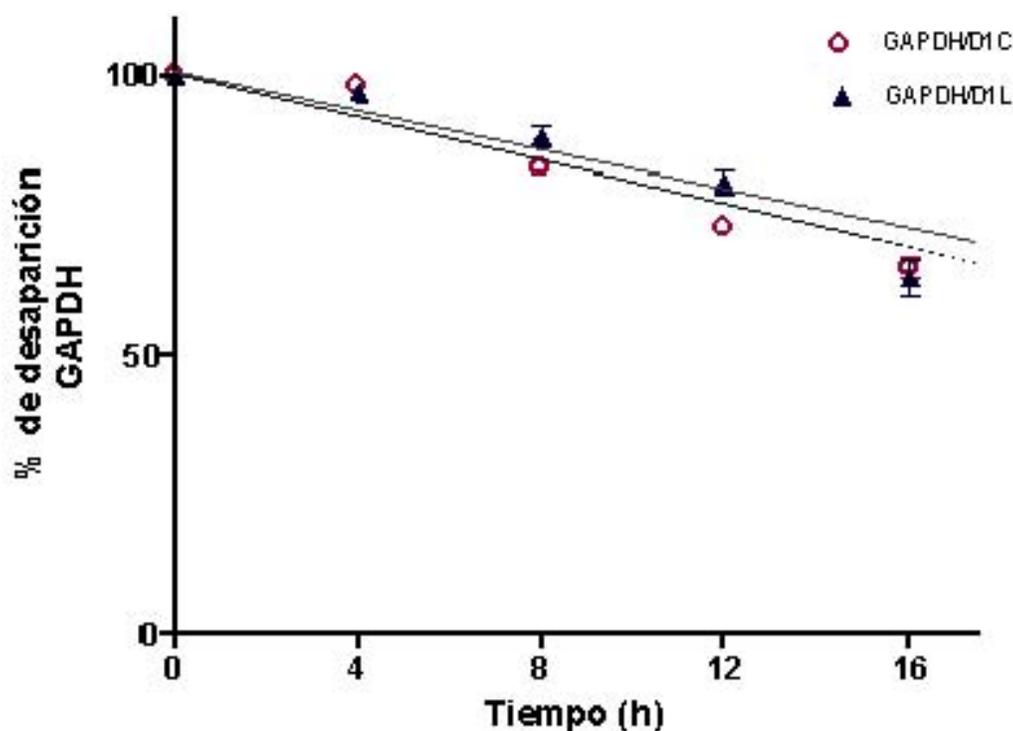
Para dilucidar estas posibilidades analizamos la vida media ( $t_{1/2}$ ) de ambos mensajeros utilizando actinomicina D (Act-D), para detener la transcripción y cuantificar la tasa de desaparición de los mensajeros. Como control positivo utilizamos el mRNA de la proteína c-myc cuya vida media es de 40 minutos (Dani et al. 1984). El porcentaje de desaparición de los mRNAs después del tratamiento con Act-D, se determinó al trazar una escala logarítmica contra los intervalos de tiempo que se muestran en la Fig. 15B (la cantidad de amplicón presente al tiempo 0 fue tomada como el 100%).

En un primer ensayo se usó la dosis de 5 $\mu$ g/mL encontrando que los mRNAs provenientes de las construcciones D1C y D1L, tienen una  $t_{1/2}$  de 11.5 h y 17.7 h respectivamente (Fig. 17). Estos datos concuerdan con la  $t_{1/2}$  reportada para el mRNA de la D1 en células tiroideas FRTL-5 con la misma dosis de Act-D (Toyoda *et al.*, 1992). Sin embargo, al analizar la expresión de c-myc encontramos amplificación de su transcrito, incluso después de las 12h de aplicada la Act-D y su  $t_{1/2}$  calculada resultaba mayor a la reportada en la literatura (Fig. 17B). Estos datos nos indicaban que el bloqueo de la transcripción no fue total.

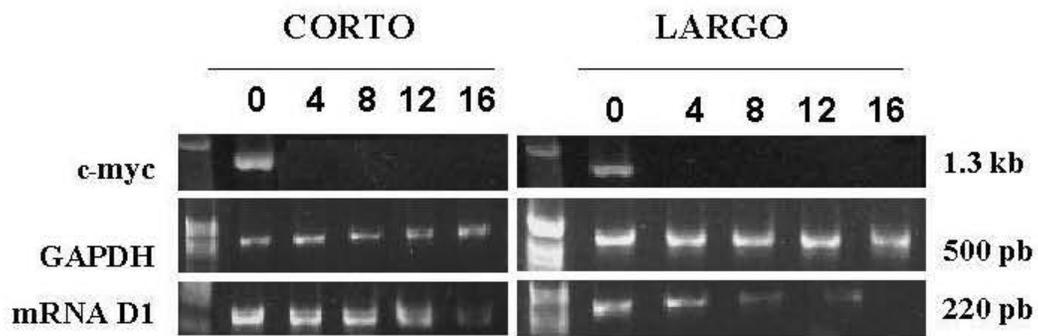
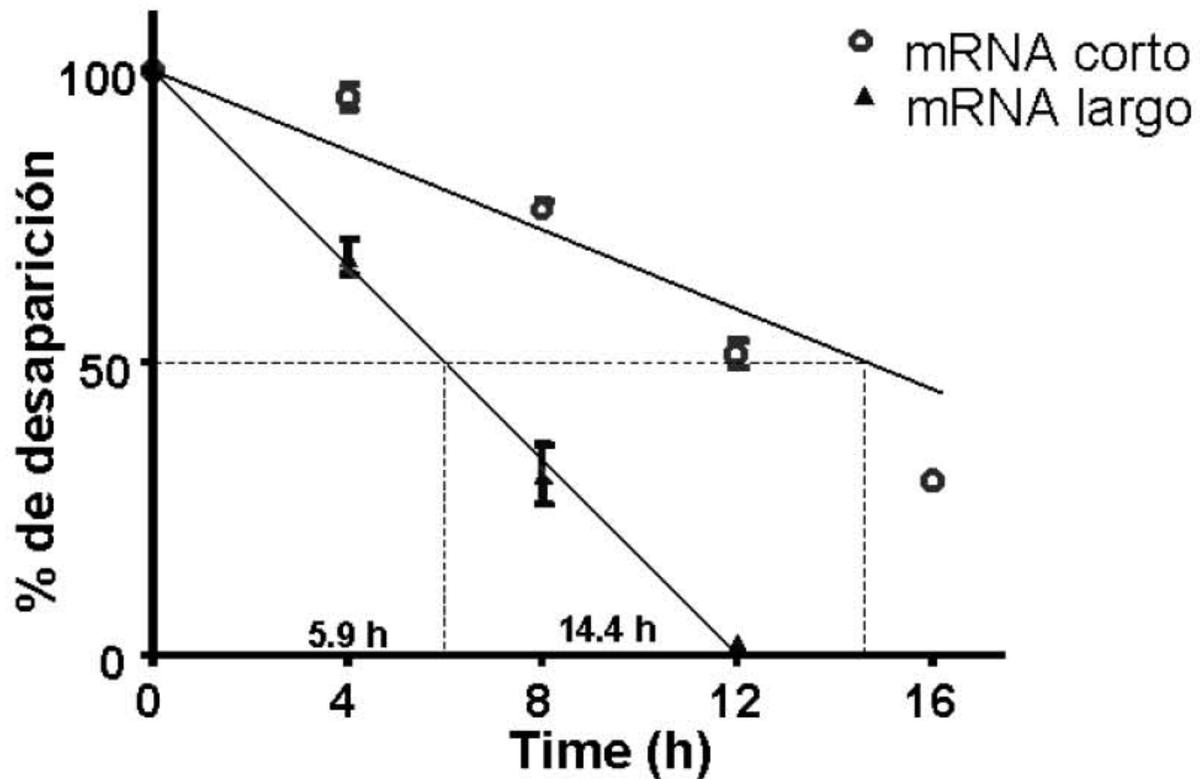


**Figura 17. Efecto de la región 3'UTR sobre la estabilidad de los mRNA de la D1.** Los vectores D1C y D1L fueron co-transfectados con pRSV- $\beta$ gal dentro de las células 293-HEK. 24 h post-transfección fueron tratadas con 5 $\mu$ g/mL de Act-D a diferentes puntos de tiempo (0, 4, 8, 12 y 16 h). Se colectaron las células y se extrajo el RNA total, 1 $\mu$ g del RNA total se utilizó para evaluar por RT-PCR semicuantitativo, los niveles de desaparición de los mRNAs de la D1. **A**, se muestra un gel representativo teñido con bromuro de etidio indicando los productos del PCR de los mRNAs de la D1, así como los mRNAs de c-myc y GAPDH como controles internos. **B**, Representación gráfica de la estabilidad de cada mRNA de la D1, determinada por exploración densitométrica. La desaparición de los mRNAs está trazada como la función logarítmica del porcentaje del remanente de los mRNAs, después de la adición de Act-D. La variación en la cantidad de RNA aplicado, fue normalizado a la cantidad del RNA de GAPDH. Cada punto representa los valores promedios calculados de dos experimentos independientes.

En un segundo experimento aumentamos la concentración de Act-D a 10 $\mu$ g/mL. Al determinar la vida media de los mRNAs de la D1, encontramos que la  $t_{1/2}$  fue de 5.9 h para el mensajero largo y de 14.4 h para el corto (Fig. 19C). Al analizar nuestro control de inhibición de la transcripción, no se detectó el mRNA de c-myc a partir de las 4h (Fig. 19B). En contraste el transcrito de la GAPDH no modifico su concentración en los tiempos analizados. Esto es de esperarse pues este RNA tiene una vida media mayor a 24 horas. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que el mRNA de la D1 que usa la segunda señal poliA, es significativamente menos estable que el que usa la primera señal poliA. Todo esto indica que las discrepancias en la actividad enzimática no se deben a diferencias en la estabilidad de los mRNAs.



**Figura 18. Desaparición de los mRNAs de GAPDH en células transfectadas con D1C y D1L.** A, la gráfica muestra los datos estadísticos de la estabilidad de los mRNA de GAPDH en dos experimentos independientes por duplicado, y con muestras independientes de RNA. La vida media calculada para los mRNAs de GAPDH fue mayor a 24 h en ambos cultivos transfectados con D1C y D1L. +, diferencia no significativa ( $P < 0.05$ ).

**A****B**

**Figura 19. Efecto de la región 3'UTR sobre la estabilidad de los mRNA de la D1.** Los vectores D1C y D1L fueron co-transfectados con pRSV-*βgal* dentro de las células HEK293. 24 h post-transfección fueron tratadas con 10 $\mu$ g/mL de Act-D a diferentes tiempos (0, 4, 8, 12 y 16 h). **A**, gel representativo teñido con bromuro de etidio indicando los productos del PCR de los mRNAs de la D1, así como los mRNAs de c-myc y GAPDH como controles internos. **B**, gráfica que indica la estabilidad de cada mRNA de la D1 en dos experimentos independientes por duplicado y con muestras de RNA diferentes.

## DISCUSION

Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que en rata la D1 es codificada por al menos dos diferentes mRNAs. Ambos mensajeros son idénticos en su región codificante y difieren solamente en su región 3'UTR. El mensajero corto de 1.6 kb contiene una señal poliA (AUUAAA) mientras que el largo de 2.1 kb presenta dos (AUUAAA y UAUAAA) (Berry et al. 1991; Navarro et al. 1997). En los diferentes tejidos hasta ahora analizados el mensajero corto está presente en condiciones basales, mientras que el largo se expresa sólo en situaciones catabólicas o de gran demanda metabólica. Así, en el hígado se expresa el largo sólo en condiciones de hipertiroidismo (Aceves et al. 1999). En la glándula mamaria y el corazón, el mensajero largo se expresa después de una lactancia intensa o asociado a la estimulación noradrenérgica (Aceves y Rojas-Huidobro 2001). Estos hallazgos nos permitieron sugerir que la expresión diferencial de los mRNAs de la D1 representan un mecanismo de regulación del aporte local de tironinas.

En el presente trabajo, demostramos que ambos mensajeros son funcionales, que su tasa de síntesis parece ser similar, pero que difieren significativamente en su vida media y probablemente en su eficiencia de traducción. Dado que la única diferencia entre los mensajeros es la 3'UTR, en este trabajo se sugiere que la señal poliA presente en el mensajero largo le confiere una mayor eficiencia de traducción pero también una menor estabilidad. Esta idea está apoyada por una gran cantidad de estudios relacionados con región la 3'UTR que han establecido que esta región juega un importante papel en la regulación de los mRNAs eucarióticos participando de manera crucial en la poliadenilación, eficiencia de traducción y estabilidad (Conne et al. 2000; Edwalds-Gilbert et al. 1997). Así, por ejemplo, la proteína amiloide es expresada por dos transcritos de diferente longitud y con diferentes señales poliA en su 3'UTR, siendo el mRNA largo el que presenta una mayor eficiencia de traducción (DeSauvage et al. 1992). Igualmente, Kilk et al. (1995) mostraron que la longitud del mRNA regula la cantidad de la superóxido dismutasa CuZn humana, al producir tres veces más enzima el mRNA largo que el mRNA corto. Recientemente, se describió que el gen del receptor opioide  $\kappa$  de ratón (KOR) expresa dos mRNAs; uno con una señal poliA (AAUAUA) de

1.6 kb y un segundo mRNA con dos (AAUAUA y AAUAAA) de 3.8 kb. Este último tiene una mayor eficiencia de traducción y mas estabilidad (Hu et al. 2002).

Al analizar el papel de las señales poliA de los mRNAs de la D1 y su efecto en la eficiencia de traducción, nuestros resultados mostraron que el mRNA largo de 2.1 kb que utiliza la segunda señal poliA (UAUAAA), produce aproximadamente 5 veces más actividad enzimática, que el mRNA corto (1.6 kb). El tamaño de los mRNAs de la D1 expresados por los plásmidos D1L y D1L fueron analizados por Northern blot confirmando la presencia de un solo transcrito en cada transfección. Posteriormente, al analizar por RT-PCR semicuantitativo la cantidad de mRNA generado por la transfección de uno u otro vector, encontramos que ambos mensajeros se sintetizan con la misma eficiencia. Por lo tanto, la producción de cinco veces más actividad enzimática por el mensajero largo, nos sugiere que la región 3'UTR con dos señales poliA, está incrementando su estabilidad o bien su eficiencia de traducción.

Para responder la pregunta de estabilidad, se analizó la vida media de ambos mensajeros. Toyoda et al. (1992) reportó que la vida media del mRNA de D1 en células tiroideas FRTL-5, fue aproximadamente de 16 h. Al utilizar la misma concentración de Act-D en nuestros estudios (5 ug/ml), encontramos una vida media similar con la del mRNA corto (16 h) y una vida media de 11.5 h para el mRNA largo. Sin embargo, al analizar el mRNA de c-myc, el cual tiene una  $t_{1/2}$  de entre 15 y 40 minutos (Dani et al. 1984), detectamos su presencia incluso después de 12 horas de tratamiento indicando que la dosis de Act-D usada no fue suficiente para inhibir totalmente la trascrición.. Repetimos dichos experimentos aumentando la dosis a 10µg/ml y obtuvimos una completa desaparición del mRNA c-myc, a las 4 horas. A esta concentración la  $t_{1/2}$  del mensajero corto fue de 14.4 h y del largo de 5.9 h.

Aunque nuestros resultados no definen específicamente qué elementos de la región 3'UTR afectan la estabilidad de los RNAs, se conoce que algunas secuencias son determinantes. Por ejemplo, secuencias con motivos AUUUA denominados elementos ricos en adeninas y uracilos (ARE) se han identificado como elementos desestabilizantes. Estos ARE se han detectado en una variedad de mRNAs de vida media corta, incluyendo a los que codifican para algunas proto-oncoproteínas, factores

de transcripción nucleares, citocinas, interleucinas, etc. Se ha sugerido que los ARE tienen un papel crítico en la regulación de la expresión de genes durante el crecimiento celular y diferenciación de muchos tipos celulares (Chen y Shyu, 1994; Ming, Kaiser y Moroni, 1998; Ross, 1995; Shim y Karin, 2002; Wickens et al. 1997). Para el caso específico de la D1, se encontraron dos motivos AUUUA presentes sólo en la región 3'UTR del mRNA largo. Se ubican a 100 nt aproximadamente corriente arriba de la segunda señal poliA (1961-1965, 1973-1977 nt). La presencia de estos motivos podría explicar la baja estabilidad del mRNA largo. En apoyo a lo anterior, diversos estudios han mostrado que la inserción de residuos de G y C o sustituyendo U/A dentro de estos motivos AUUUA, se acompaña de un aumento en la estabilidad de los mRNAs (Wickens et al. 1997). Por ejemplo, la mutación en una base del motivo AUUUA por GUUUA, produce la sobreexpresión del mRNA del gen del receptor a glucocorticoides humano  $\beta$ . Esta mutación y la correspondiente sobreexpresión del receptor se ha asociado a casos crónicos de artritis reumatoide (Derijk et al. 2001). En resumen nuestros datos mostraron que el mRNA largo presenta una menor estabilidad y una mayor eficiencia de copiado que el mRNA corto. Estos datos indican una estrecha y precisa regulación de la expresión de la D1 a nivel celular y, sugiere que la síntesis del mensajero largo representa un mecanismo de emergencia regulado y transitorio, que le permite a la célula asegurar un rápido suplemento local de T3.

## **CONCLUSIONES.**

Nuestros resultados mostraron que:

- 1) Las dos señales de poliadenilación de los mRNAs de la D1 son funcionales.
- 2) Ambos mensajeros se sintetizan con la misma eficiencia.
- 3) El mRNA largo se acompaña de cinco veces más actividad específica que el mRNA corto, sugiriendo una mayor eficiencia de traducción.
- 4) El mRNA largo tiene una vida media más corta (5.9 h) que el mRNA corto (14.4 h), indicando una menor estabilidad.

Estos resultados sugieren la participación de la 3'UTR en la regulación de la expresión y vida media de los mRNAs de la D1.

## PERSPECTIVAS

Una de las principales preguntas que surge de este estudio, es determinar el papel de los motivos ARE en la regulación de los mRNAs de la D1. Utilizando como modelo de estudio transfecciones en cultivos celulares, sería posible abordar de manera puntual esta interrogante. Al respecto, se ha descrito que estos motivos no siempre son funcionales, como es el caso de los mRNAs del gen *hap*, los cuales tienen 5 motivos ARE en su región 3'UTR, que no afectan la estabilidad de sus mRNAs (Qu et al. 2002). Esto amplía la posibilidad de que otras regiones en la 3'UTR de los mRNAs de la D1 como las señales poliA, o estructuras secundarias en forma de aro podrían estar participando en la estabilidad de estos mRNAs. Otro aspecto interesante de abordar, sería ver qué está sucediendo a nivel transcripcional, es decir, que está determinando la expresión de uno u otro mRNA de la D1. Sabemos que en el gen de la D1 humana, se han descrito dos complejos TRE-RARE, que son elementos responsivos a HT y ácido retinoico (AR). Sería atractivo analizar si el uso alternativo de estos complejos, determina la expresión de uno u otro mRNA. Al respecto se sabe que en condiciones normales la T3, TSH, catecolaminas, carbohidratos etc., estimulan la expresión de la D1. En contraste en líneas celulares tumorales, se pierde su respuesta a T3 y catecolaminas, adquiriendo sensibilidad solo a retinoides (García-Solís et al. 2002). En este mismo orden de ideas, estudios puntuales en la región promotora del receptor opioide  $\kappa$ , demostraron que al administrar específicamente AR se suprime la expresión de los transcritos que usan la segunda señal poliA en células P19 (Hu et al. 2002). El uso de sistemas *in vitro* en líneas celulares inmortalizadas nos permitiría continuar con esta línea de investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Aceves C y Valverde-R C. 1989. Type I 5' monodeiodinase activity in lactating mammary gland. *Endocrinology*. **124**,2818-2820.
- ❖ Aceves C, Pineda O, Ramírez-C I, Navarro L y Valverde-R C. 1999. Mammary type I deiodinase is dependent on the suckling stimulus. Differential role of norepinephrine and prolactin. *Endocrinology*. **140**,2948-2950.
- ❖ Aceves C y Rojas-Huidobro R. 2001. Effect of suckling and adrenergic stimulation on peripheral deiodination in lactating rats: Differential Expression of Type 1 Deiodinase mRNA Forms. *Journal Endocrinology*. **171**,533-540.
- ❖ Alberts B, Alexander J, Julian L, Martin R, Keith R y Peter W. 2002. Molecular biology of the cell. Edit Gs Garland Science Taylor y Francis Group. Fourth Edition. pp. 299-353.
- ❖ Atwater JA, Wisdom R y Verma I.M. 1990. Regulated mRNA stability. *Ann. Rev. Genet.* **24**,519-541.
- ❖ Beaudoin E, Freier S, Wyatt JR, Claverie JM y Gautheret D. 2000. Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res.* **10**,1001-10.
- ❖ Bernstein P y Ross J. 1989. Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability. *Trends Biochem Sci.* **14**,373-377.
- ❖ Berry MJ, Banu L y Larsen PR. 1991a. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature*. **349**,438-440.
- ❖ Berry MJ, Banu L, Chen Y, Mandel SJ, Kieffer JD y Larsen PR. 1991b. Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type 1 deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature*. **353**,273-276.
- ❖ Berry MJ, Maia AL, Kieffer JD, Harney JW, Banu L, y Larsen PR. 1992. Substitution of cysteine for selenocysteine in type I iodothyronine deiodinase reduces the catalytic efficiency of the protein but enhances its translation. *Endocrinology*. **131**,1848-1852.
- ❖ Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ y Larsen PR. 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Annu. Rev. Endocrine*. **23**,38-89.
- ❖ Carrazana EJ, Pasiaka KB y Majzoub JA. 1988. The vasopressin mRNA poly(A) tract is unusually long and increases during stimulation of vasopressin gene expression in vivo. *Mol Cell Biol.* **8**,2267-2274.

- ❖ Cole CN y Santangelo GM. 1983. Analysis in cos1 cells of processing and polyadenylation signals by using derivatives of the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene. *Mol. Cell. Biol.* **3**,267-279.
- ❖ Colgan DF y Manley JL. 1997. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes and Development. Rev.* **11**,2755-2766.
- ❖ Conne B, Stutz A y Vassalli JD. 2000. The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology?. *Nat Med.* **6**,637-641.
- ❖ Chen CY y Shyu AB. 1994. Selective degradation of early-response-gene mRNAs: Functional analyses of sequence features of the AU-rich elements. *Molecular and Cellular Biology.* **14**,8471-8482.
- ❖ Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Rajmakers R, Prujin G, Stoecklin GG, Moroni C, Mann M y Karin M. 2001. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell.* **107**,451-464.
- ❖ Dani C, Blanchard JM, Piechaczyk M, El Sabouty S, Marty L y Jeanteur P. 1984. Extreme instability of myc mRNA in normal and transformed human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81**,7046-50.
- ❖ DeSavage F, kruys V, Marnix O, Huez G y Octave JN. 1992. Alternative polyadenylation of the amyloid protein precursor mRNA regulates translation. *EMBO J.* **11**,3099-3109.
- ❖ Decker CJ y Parker R. 1995. Diversity of cytoplasmic functions for the 3' untranslated region of eukaryotic transcripts. *Curr Opin Cell Biol.* **7**,386-392.
- ❖ Derijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vregdenhil E, Cidlowski J, de Kloet ER, Emery O, Sternberg EM y Detera-Wadleigh SD. 2001. A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* **28**,2383-2388.
- ❖ Edwalds-Gilbert G, Prescott J y Falck-pedersen E. 1993. 3'UTR processing efficiency plays a primary role in generating termination-competent RNA polymerase II elongation complexes. *Mol Cell Biol.* **13**,3472-3480.
- ❖ Edwalds-Gilbert G, Veraldi KL y Milcarek C. 1997. Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end?. *Nucleic Acids Research.* **25**,2547-2561.
- ❖ Ekholm R y Bjorkman U. 1990. Structural and functional integration of the thyroid gland In: The thyroid gland. Edit Monte Greer Press. Ltd NY, pp 37-82.
- ❖ Fitzgerald M y Shenk T. 1981. Regulation of mRNA Stability. *Cell.* **24**,251-260.

- ❖ Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP y Visser TJ. 2003. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem.* **278**,40128-40135.
- ❖ García-Solís P y Aceves C. 2001. 5'Deiodinase in two breast cancer cell lines: effect of triiodothyronine, isoproterenol and retinoids. *Mol Cell Endocrinol.* **201**,25-31.
- ❖ Grand CL, Han H, Munoz RM, Weitman S, Von Hoff DD, Hurley LH y Bearss DJ. 2002. The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth *in vivo*. *Mol Cancer Ther.* **1**,565-573.
- ❖ Greenberg AH, Czernichov P y Reba RC. 1990. Observations on maturation of thyroid function in early fetal life. *J. Clin. Invest.* **1970**,49-51.
- ❖ Harvey CB y Williams GR. 2002. Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid* **12**,441-446.
- ❖ Higgs DR, Goodbourn SE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ y Prodfoot NJ. 1983. Alpha-thalassemia caused by a polyadenylation signal mutation. *Nature.* **306**,398-400.
- ❖ Hu X, Bi J, Loh HH y Wei LN. 2002. Regulation of mouse kappa opioid receptor gene expression by different 3'-untranslated regions and the effect of retinoic acid. *Mol Pharmacol.* **62**,881-887.
- ❖ Jenny A y Keller W. 1995. Cloning of cDNAs encoding the 160 kDa subunit of the bovine cleavage and polyadenylation specificity factor. *Nucleic Acids Res.* **23**,2629-2635.
- ❖ Kohrle J. 1999. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol Cell Endocrinol.* **151**,103-119.
- ❖ Kilk A, Laan M y Torp A. 1995. Human CuZn superoxide dismutase enzymatic activity in cells is regulated by the length of the mRNA. *Federation of European Biochemical Societies.* **362**,323-327.
- ❖ Lafreniere RG, Carrel L y Willard HF. 1994. A novel transmembrane transporter encoded by the XPCT gene in Xq13.2. *Hum. Mol. Genet.* **3**,1133-1139.
- ❖ Liu H, Rodgers ND, Jiao X y Kiledjian M. 2002. The scavenger mRNA decapping enzyme, DcpS, is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J.* **21**,4699-4708.

- ❖ MacDonald CC, Wilusz J y Shenk T. 1994. The 64-kilodalton subunit of the cstF polyadenylation factor binds to pre-mRNAs downstream of the cleavage site and influences cleavage site location. *Molecular and Cellular Biology*. **14**,6647-6654.
- ❖ MacDonald CC y Redondo José-Luis. 2002. Reexamining the polyadenylation signal: were we wrong about AAUAAA?. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **190**,1-8.
- ❖ Maia AL, Berry ML, Sabbag R, Harney JH y Larsen PR. 1995. Structural and functional differences in the Dio 1 gene in mice with inherited type I deiodinase deficiency. *Mol. Endocrinol.* **9**,969-980.
- ❖ Makeyev AV y Liebhaber SA. 2002. The poly(C)-binding proteins: A multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA*. **8**,265-278.
- ❖ Mandel SJ, Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW, Warne RL y Larsen PR. 1992. Cloning and *in vitro* expression of the human selenoprotein, type iodothyronine deiodinase. *Journal of Clinical Endocrinology and metabolism*. **75**,1133-1139.
- ❖ Manley JL. 1988. Polyadenylation of mRNA precursors. *Biophys Biochem Acta*. **950**,1-12.
- ❖ Martini F. 1998. The endocrine system. In: *Fundamentals of Anatomy y Physiology*. 4<sup>th</sup> edition. Ed: Prentice Hall. US. pp 609-613, 1037-1058.
- ❖ Mckeown M. 1992. Alternative mRNA splicing. *Ann. Rev. Cell Biol.* **8**,133-155.
- ❖ Ming XF, Kaiser M y Moroni C. 1998. C-Jun N-terminal kinase is involved in AUUUA-mediated interleukin-3 mRNA turnover in mast cells. *EMBO J.* **17**, 6039-6048.
- ❖ Mitchell P, Petfalski E, Shevchenko A, Mann M y Tollervey D. 1997. The exosome: A conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'-5' exoribonucleasas. *Cell*. **91**,457-466.
- ❖ Morales J, Russell JE y Liebhaber SA. 1997. Destabilization of human alpha-globin mRNA by translation anti-termination is controlled during erythroid differentiation and is paralleled by phased shortening of the poly(A) tail. *J. Biol. Chem.* **272**, 6607-6613.
- ❖ Murthy KG y Manley JL. 1992. Characterization of the multisubunit cleavage-polyadenylation specificity factor from calf thymus. *J Biol Chem.* **267**,14804-14811.
- ❖ Murthy KG y Manley JL. 1995. The 160-kD subunit of human cleavage-polyadenylation specificity factor coordinates pre-mRNA 3'-end formation. *Genes Dev.* **9**,2672-2683.

- ❖ Navarro L, Landa A, Valverde-R. C y Aceves C. 1997. Mammary 5' deiodinase type I is encoded by a short messenger. *Endocrinology*. **138**,4248-4254.
- ❖ Otero LJ, Ashe MP y Sachs AB. 1999. The yeast poly(A) binding protein Pab1p stimulates in vitro poly(A)-dependent and cap-dependent translation by distinct mechanism. *EMBO J*. **18**,3153-3163.
- ❖ Orozco A, Villalobos P, Jeziorski MC y Valverde-R C. 2002. The liver of *Fundulus heteroclitus* expresses deiodinase type 1 mRNA. *General and Comparative Endocrinology*. **130**,70-77.
- ❖ Proudfoot N y O'Sullivan Justin. 2002. Polyadenylation: A tail of two complexes. *Current Biology. Dispatch*. **12**,R855-R875.
- ❖ Qu X, Qi Y y Qi B. 2002. Generation of multiple mRNA transcripts from the novel human apoptosis-inducing gene *hap* by alternative polyadenylation utilization and the translational activation function of 3'untranslated region. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **400**,233-244.
- ❖ Ross J. 1995. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol. Rev*. **59**,423-450.
- ❖ Ritchie JW, Shi YB, Hayashi Y, Baird FE, Muchekeh RW, Christie GR y Taylor PM. 2003. A role for thyroid hormone transporters in transcriptional regulation by thyroid hormone receptors. *Molecular Endocrinology*. Púb. en prensa.
- ❖ Robbins J. 1996. Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding In Werner and Inbar the Thyroid. Edt Braverman LE. Utiger RD, Lippincot-Raven Pub. 7<sup>th</sup> edition. Cap 6. pp 96-110.
- ❖ Sachs A. 1990. The role of poly(A) in the translation and stability of mRNA. *Curr Opin Cell Biol*. **2**,1092-1098.
- ❖ Sanders JP, Van Der Geyten S, Kaptein E, Darras VM, Kuhn ER, Leonard JL y Visser TJ. 1997. Characterization of a propylthiouracil-insensitive type I iodothyronine deiodinase. *Endocrinology*. **138**,5136-5160.
- ❖ Shim J y Karin M. 2002. The control of mRNA stability in response to extracellular stimuli. *Mol Cells*. **14**,323-331.
- ❖ Shyu AB, Belasco JG y Greenberg ME. 1991. Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes y Dev*. **5**,221-231.
- ❖ St. Germain DL y Galton VA. 1997. The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid*. **7**,655-668. Review.

- ❖ Takagaki Y, Ryner LC y Manley JL. 1988. Separation and characterization of a poly(A) polymerase and a cleavage/specificity factor required for pre-mRNA polyadenylation. *Cell Press Cell*. **52**,731-742.
- ❖ Takagaki Y y Manley JL. 2000. Complex protein interactions within the human polyadenylation machinery identify a novel component. *Mol Cellr Biol*. **20**,1515-1525.
- ❖ Tanguay RL y Gallie DR.1996. Translational efficiency is regulated by the length of the 3' untranslated region. *Molecular and Cellular Biology*. **16**,146-156.
- ❖ Toyoda N, Nishikawa M, Mori Y, Gondou A, Ogawa Y, Yonemoto T, Yoshimura M, Masaki H y Inada M.1992. Thyrotropin and triiodothyronine regulate iodothyronine 5'-deiodinase messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 rat thyroid cells. *Endocrinology*. **131**,389-94.
- ❖ Toyoda N, Harney JW, Berry MJ y Larsen PR. 1994. Identification of critical amino acids for 3,5,3'-triiodothyronine deionidation by human type I deiodinase based on comparative functional-structural analyses of the human, dog, and rat enzymes. *J.Biol. Chem*. **269**,20329-20334.
- ❖ Toyoda N, Berry MJ, Harney JW y Larsen PR. 1995. Topological analysis of the integral membrane protein, type 1 iodothyronine deiodinase (D1). *J Biol Chem*. **270**,12310-12318
- ❖ Valverde-R C y Aceves C. 1989. Circulating thyronines and peripheral monodeiodination in lactating rats. *Endocrinology*: **24**,1340-1344.
- ❖ Valverde-RC, Aceves C y Navarro LA. 1993. Hormonas a la medida y para toda ocasión. *Ciencia y Desarrollo*. **111**,23-33.
- ❖ Van Der Geyten S, Sanders JP, Kaptein E, Darras VM, Kuhn ER, Leonard JL y Visser TJ. 1997. Expression of chicken hepatic type I and type III iodothyronine deiodinases during embryonic development. *Endocrinology*. **138**,5144-5152.
- ❖ Wahle E y Keller W. 1992. The Biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Ann. Rev. Biochem*. **61**,418-440.
- ❖ Wang Z. y Kiledjian M. 2001. Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell*. **107**,751-762.
- ❖ Wang Z, Jiao X, Carr-Schmid A y Kiledjian M. 2002. The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**,12663-12668.
- ❖ Wells SE, Hillner PE, Vale RD y Sachs AB. 1998. Circularization of mRNA by eukariotyc translation initiation factors. *Mol. Cell*. **2**,135-140.

- ❖ Wickens M, Anderson P y Jackson RJ. 1997. Life and death in the cytoplasm: messages from the 3' end. *Curr Opin Genet Dev.* **7**,220-32.
- ❖ Williams GR. 2000. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol.* **20**,8329-8342.
- ❖ Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM y Larsen PR. 1998. Williams textbook of endocrinology. Edt. W.B. Saunders Company. 9<sup>th</sup> Edition. Seccion 3. CAPII. pp 404-405.
- ❖ Wilson T y Treisman R. 1988. Removal of poly (A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3'AU-rich sequences. *Nature.* **336**,396-399.
- ❖ Yen PM. 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone. *Physiol. Rev.* **81**,1097-1142.
- ❖ Zarudnaya MI, Potyahaylo AL, Kolomiets IM y Hovorun DM. 2002. Auxiliary elements of mammalian pre-mRNAs polyadenylation signals. *Biopolimery I kletka*, **18**, 500-517.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura química y nomenclatura de las tironinas	2
Figura 2.	Glándula Tiroides	3
Figura 3.	Eje hipotálamo-Hipófisis-Tiroides (HHT)	4
Figura 4.	Biosíntesis, almacenamiento y secreción de HT en el tirocito	6
Figura 5.	Modelo general del mecanismo de acción de las HT en las células blanco	8
Figura 6.	vía de desyodación de hormonas tiroideas.	9
Figura 7.	Representación del gen de la 5'D1 en ratón (Dio1).	11
Figura 8.	Comparación de los cDNAs de rata, provenientes de la 5'D1 hepática ( G21) y de la glándula mamaria lactante (MG-D1).	13
Figura 9.	Esquema representativo de los mRNAs descritos para la enzima desyodasa tipo 1 en diferentes especies	18
Figura 10.	Mapa del plásmido pcDNA3-G21	23
Figura 11.	Nucleótidos utilizados para RT-PCR	28
Figura 12.	Construcción de los plásmidos	30
Figura 13.	Fotografías de las células HEK293 en diferentes estados de confluencia mantenidas en cultivo.	32
Figura 14.	Actividad enzimática de $\beta$ -galactosidasa y desyodasa de los diferentes plásmidos	32
Figura 15.	Análisis del efecto de las señales poliA en la expresión de los mRNAs de la D1	34
Figura 16	Análisis tipo Northern Blot de los mRNAs que codifican para la D1	35
Figura 17	Efecto de la región 3'UTR sobre la estabilidad de los mRNA de la D1	37
Figura 18	Desaparición de los mRNAs de GAPDH en células transfectadas con D1C y D1L	38

Figura 19	Efecto de la región 3'UTR sobre la estabilidad de los mRNA de la D1	39
Figura 20	Se ilustran las proteínas que reconocen diferentes señales de poliadenilación	55

## **ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1	Señales de poliadenilación de 244 pre-mRNAs estudiados	15
Tabla 2	Efecto de la región 3'UTR sobre la actividad enzimática De la D1 en células HEK293	33