

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Evaluación de la función del circuito regulatorio Let-7-LIN28B en
células de cáncer cervical”**

TESIS

Que presenta

M. en C. AIDA MARGARITA ZAMORA CONTRERAS

Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Director de la Tesis: Dr. Luis Marat Alvarez Salas

Ciudad de México.

MARZO 2018

“Evaluación de la función del circuito regulatorio Let-7-LIN28B en células de cáncer cervical”

EL PRESENTE TRABAJO FUE LLEVADO A CABO EN EL LABORATORIO DE TERAPIA GÉNICA DEL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN UNIDAD ZACATENCO, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. LUIS MARAT ÁLVAREZ SALAS, CON LA ASESORÍA DE LA DRA. ROSA MARÍA BERMÚDEZ CRUZ Y EL DR. JAVIER HERNÁNDEZ SÁNCHEZ DEL MISMO DEPARTAMENTO; ASÍ COMO TAMBIÉN DEL DR. NICOLÁS VILLEGAS SEPÚLVEDA DEL DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR, EL DR. FRANCISCO JAVIER CAMACHO ARROYO DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y LA DRA. JULIA TOSCANO GARIBAY DEL HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO. DURANTE EL PERIODO DE REALIZACIÓN SE CONTÓ CON APOYO ECONÓMICO DE LA BECA CONACTY NO. 235674.

A mis padres.

1 INDICE GENERAL

	Página
1 INDICE GENERAL.....	III
2 ÍNDICE DE FIGURAS	V
3 INDICE DE TABLAS	VI
4 RESUMEN	VII
5 SUMMARY.....	IX
6 INTRODUCCIÓN	1
GENERALIDADES SOBRE LOS miRNAs (miRNAs).....	1
BIOGÉNESIS DE MIRNAS	2
FAMILIA LET-7.....	5
REGULACIÓN DE BIOGÉNESIS DE MIRNAS EN LA FAMILIA LET-7.....	7
PROTEÍNA LIN28A	8
PROTEÍNA LIN28B	9
PAPEL REGULADOR DE LIN28 EN LA BIOGÉNESIS DE LET-7	11
RELACIÓN ENTRE MIRNAS Y CÁNCER	14
RELACIÓN ENTRE MIRNAS Y CÁNCER CÉRVICO-UTERINO	15
7 ANTECEDENTES.....	18
8 HIPÓTESIS.....	20
9 OBJETIVOS.....	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
10 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
ESTRATEGIA PARA EVALUAR PRE-LET-7.	22
ESTRATEGIA PARA EVALUAR PROTEÍNAS REGULATORIAS Y BLANCOS DE LET-7.....	23
11 MATERIALES Y MÉTODOS	24
OBTENCIÓN DE EXTRACTOS TOTALES DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS.....	26
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)	26
INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT).....	27
CONSTRUCCIÓN DE VECTOR DE EXPRESIÓN PARALIN28B.....	28
TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CON VECTOR PCR3.1-LIN28B	29
PURIFICACIÓN DE VECTOR PCR-LIN28B A PARTIR DE CULTIVOS BACTERIANOS.....	30
INDUCCIÓN DE EXPRESIÓN DE LIN28B EN BACTERIAS <i>E.COLI</i> BL21 (DE3) COMPETENTES	31
OBTENCIÓN DE RNA PEQUEÑO A PARTIR DE CÉLULAS	32

EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN DE PRE-LET-7 MEDIANTE RT-qPCR	32
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
CORRELACIONES	33
12 RESULTADOS	34
EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PRE-LET-7.....	34
EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS BLANCOS Y PROTEÍNAS REGULADORAS DE LET-7.....	37
CORRELACIONES ENTRE PROTEINAS EVALUADAS Y PRE-LET-7.	39
13 DISCUSIÓN.....	42
14 CONCLUSIONES	48
15 PERSPECTIVAS	50
16 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
17 ANEXOS	59
ESTRUCTURAS SECUNDARIAS PREDICHAS IN SILICO DE LOS PRECURSORES DE LA FAMILIA LET-7.....	59
SECUENCIAS DE OLIGOS DEOXINUCLEOTIDOS PARA PCR	64
PUBLICACIÓN	66

2 ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Biogénesis de miRNAs en mamíferos.....	4
Figura 2. Organización genómica de la familia let-7 en humanos.....	5
Figura 3. Estructura del pre-elemento (pre-E) de precursores de let-7.	7
Figura 4. Estructura general de los homólogos LIN28A y LIN28B.	10
Figura 5. Represión de biogénesis de let-7 mediada por LIN28.....	12
figura 6. Interacción dominios CSD y CCHC12 de proteínas LIN28 y let-7.....	13
Figura 7. Mecanismos regulatorios entre los homólogos LIN28 y let-7 y blancos oncogénicos validados.	17
Figura 8. Expresión de LIN28A y LIN28B en líneas celulares epiteliales derivadas de cáncer cervical.	19
Figura 9. Estrategia experimental para evaluar niveles endógenos de expresión de pre-let-7..	22
Figura 10. Estrategia experimental para evaluar niveles endógenos de expresión de algunas proteínas regulatorias y blancos de <i>let-7</i>	23
Figura 11. Estrategia para la construcción del vector de expresión pCR3.1-Lin28B.....	29
Figura 12. Niveles de expresión de precursores de let-7.	35
Figura 13. Agrupamiento de pre-let-7 y líneas celulares de acuerdo al nivel de expresión.	36
Figura 14. Niveles de expresión de proteínas regulatorias y blancos de let-7.....	38
Figura 15. Correlación lineal entre precursores de let-7 y los blancos oncogénicos validados LIN28B, RAS y C-MYC.	40
Figura 16. Correlación lineal entre precursores de let-7 y TUT2.....	41
Figura 17. Modelo de interacción entre pre-let-7 con pre-E cortos y largos y los homólogos LIN28.....	46
Figura 18. perspectivas. Mecanismos a evaluar.	51

3 INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Líneas Celulares Utilizadas.	24
Tabla 2. Medios de Cultivo para Líneas Celulares Utilizadas.	25
Tabla 3. Anticuerpos para Inmunoblots.	28
Tabla 4. Organización genómica de los precursores let-7 evaluados.	34
Tabla 5. Alineamiento de secuencias de precursores de let-7 humano reacomodando las secuencias de pre-elemento.	45

4 RESUMEN

Los miRNAs (miRNAs) de la familia let-7 se encuentran frecuentemente desregulados en procesos carcinogénicos, incluidos el cáncer cervical. Las proteínas homólogas LIN28 regulan la biogénesis de let-7 al interactuar en secuencias conservadas dentro de la estructura de los precursores pre-miRNA. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que algunos let-7 pueden escapar a la regulación por LIN28. El objetivo de este proyecto fue evaluar los niveles de expresión de ocho miembros de la familia let-7 de humanos y algunas proteínas blanco, así como también LIN28B en un panel de líneas de cáncer cervical con diferente grado de malignidad y contenido de virus de papiloma humano (VPH). La concentración de los precursores de let-7 se analizó mediante RTqPCR y el contenido de las proteínas analizadas mediante inmunodetección. Herramientas *in silico* fueron utilizadas para correlacionar la expresión de precursores y proteínas así como también para analizar las estructuras de los precursores.

Se encontró que la proteína LIN28B se expresa en casi todas las líneas celulares analizadas, mayoritariamente en líneas celulares tumorales. Altos niveles de pre-let-7c/f-1 y pre-miR-98 fueron observados en casi todos los tipos celulares utilizados sin encontrar relación con el grado de malignidad o el grado de expresión de LIN28B. Los precursores pre-let-7g/i se expresaron principalmente en líneas celulares tumorales, pre-let-7e/a-3 no se encontraron expresados significativamente en ninguna línea y pre-let-7a-2 se encontró indistintamente expresado. La proteína LIN28B mostró correlación positiva con los precursores pre-let-7i/g/f-1 y pre-miR-98 en líneas celulares tumorales, sugiriendo un escape a la regulación. Un alineamiento de secuencias y análisis de estructuras de pre-let-7 mostró una estructuración alterna en la región del pre-elemento (pre-E) relacionada a la longitud del mismo que podría generar interacciones diferenciales entre LIN28B y los diferentes precursores de let-7. Así, un pre-E corto podría escapar a la regulación de LIN28B. En contraste, un pre-E largo se correlacionó con los precursores que fueron encontrados en mayor concentración. Así, las diferencias observadas en los diferentes

niveles de pre-let-7 en líneas celulares de cáncer cervical pueden ser el resultado de una estructuración alterna del pre-E que afecta la interacción con LIN28B y por lo tanto en una regulación diferencial de let-7.

5 SUMMARY

The let-7 miRNAs (miRNAs) are frequently dysregulated in carcinogenic processes, including cervical cancer. LIN28 proteins regulate let-7 biogenesis by binding to conserved sequences within the pre-miRNA structure. Nevertheless, recent research has shown that some let-7 miRNAs may escape LIN28 regulation. The objective of this project was to correlate pre-let-7 miRNAs and LIN28B levels in cervical cell lines with different malignancy and HPV content. The concentration of eight human pre-let-7 miRNAs was determined by RTqPCR. LIN28B and other let-7 targets were analyzed by immunoblot. *In silico* tools were used to correlate pre-let-7 and LIN28B expression and to analyze pre-let-7 sequences and structures. Lin28B protein was detected in all tested cell lines although it was more expressed in tumor cell lines. High levels of pre-let-7c/f-1 and pre-miR-98 were present in almost all cell lines regardless malignancy and LIN28B expression. Pre-let-7g/i were mainly expressed in tumor cell lines, pre-let-7e and pre-let-7-a3 were absent in all cell lines and pre-let-7a-2 showed indistinct expression. LIN28B showed positive correlation with pre-let-7i/g/f-1 and pre-miR-98 in tumor cell lines, suggesting escape from regulation. A sequence alignment and analysis of pre-let-7 miRNAs showed distinctive structural features within the pre-E region that may influence the ideal pre-let-7 structuring for LIN28B interaction. Short pre-E-stems were present in pre-let-7 that may escape LIN28B regulation, but long pre-E stems were mostly associated with high-level pre-let-7 miRNAs. In conclusion, the observed differences of pre-let-7 levels in cervical cell lines may be the result of alternative pre-E structuring affecting interaction with LIN28B thus resulting in differential regulation for let-7.

6 INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES SOBRE LOS miRNAs (miRNAs)

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas de RNA no codificante de aproximadamente 21nt que suprimen la traducción de sus transcritos blanco, mediante la hibridación parcial con la región 3'-UTR a través de la secuencia semilla que son 6 a 8 bases localizadas hacia el extremo 5' del miRNA (40,42). Los miRNAs están codificados dentro del genoma de plantas y animales ya sea como genes individuales o en grupos (*clusters*) que se expresan a través de sus propios promotores o como pasajeros de otros transcritos dentro de los intrones (6,2). Los genes de miRNAs agrupados pueden o no estar relacionados entre sí, al igual que los genes de miRNAs relacionados pueden o no encontrarse en *clusters*. (2).

Los miRNAs fueron descubiertos por primera vez en *Caenorhabditis elegans* al describir un mecanismo de regulación del desarrollo del estado larvario a un organismo adulto. Se encontró que los productos de los genes *lin-4* y *let-7* son miRNAs que regulan a sus blancos al aparearse con la región 3'-UTR del transcrito evitando la traducción del mismo (2). Además de su papel en la regulación del desarrollo de un organismo, también se ha encontrado que participan en la regulación de otros procesos que mantienen el metabolismo y la homeostasis celular como diferenciación celular, proliferación, ciclo celular, apoptosis y también se han encontrado varios involucrados en el proceso de tumorigénesis (6).

Los miRNAs pueden transcribirse mediante la enzima RNA polimerasa II (2) o RNA polimerasa III (3,20). Los miRNAs tienen diferentes patrones de expresión. Algunos se expresan de manera tejido-específica, otros se expresan en etapas del desarrollo embrionario o en células de algún linaje celular específico (2).

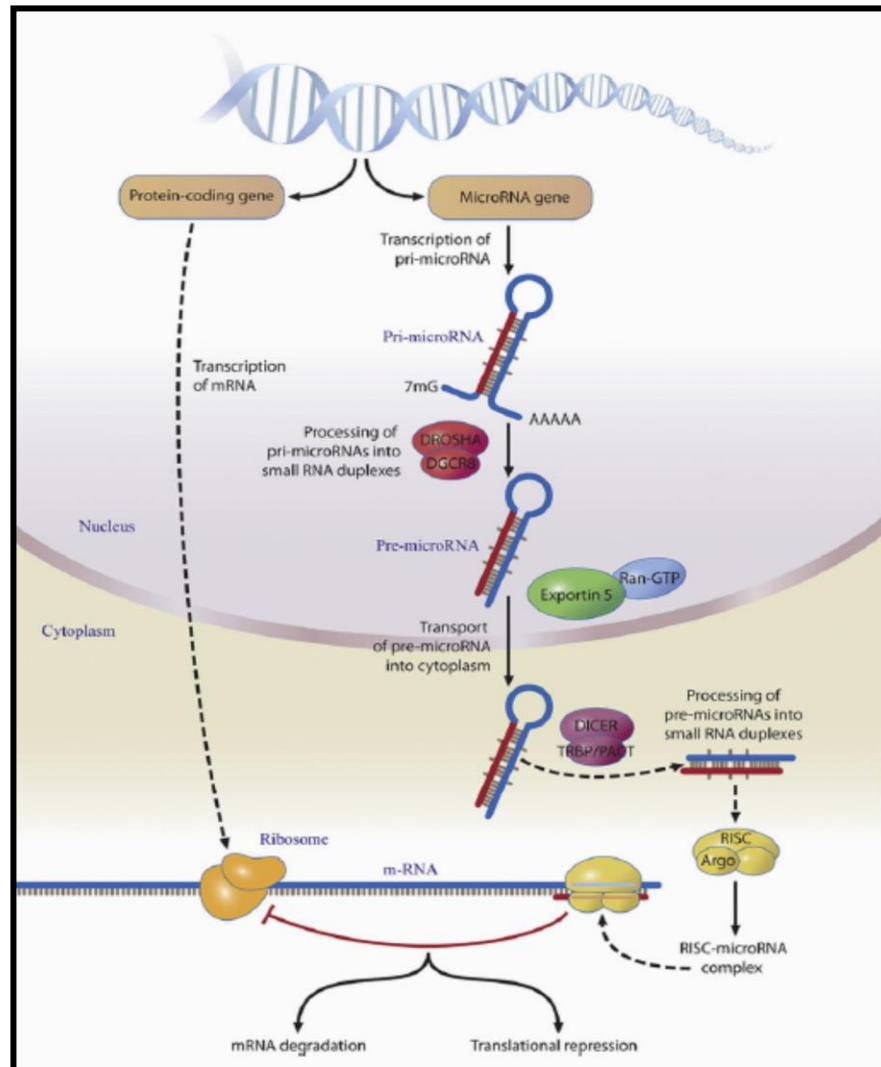
BIOGÉNESIS DE miRNAS

La ruta canónica de la biogénesis de los miRNAs es un proceso altamente regulado (ver Figura 1), que comienza con un transcrito primario (pri-miRNA) que contiene modificaciones postranscripcionales propias de los mRNA (Caperuza en el 5' y cola de poliA en el extremo 3') (3,20). El pri-miRNA adopta una estructura de tallo-burbuja debido a un apareamiento de bases interno. Esta estructura permite que el pri-miRNA sea procesado dentro del núcleo por el *Microprocesador*, que es un complejo proteínico compuesto por DGCR8 (PASHA) que reconoce la estructura de doble cadena flanqueada por cadena sencilla propia de la horquilla del transcrito primario y por la RNAsa tipo III DROSHA la cual digiere la doble cadena en la base del tallo liberando la horquilla de aproximadamente 70 bases. Generalmente, el corte de DROSHA deja 2 bases sin aparear en el extremo 3'. La molécula resultante se denomina miRNA precursor (pre-miRNA) y es exportada hacia el citoplasma a través del sistema Exportina 5/Ran-GTP (15,89,38,13,17,35). Ahí, una segunda RNAsa tipo III, DICER, escinde la burbuja de la horquilla realizando un corte cercano a la base de la burbuja dejando una doble cadena de aproximadamente 21 pares de bases. El corte deja dos bases no apareadas en el extremo 3', por lo que ahora la doble cadena tiene dos nucleótidos sin aparear en ambos extremos 3' (2,38).

La molécula de doble cadena de aproximadamente 21nt de longitud está compuesta por el miRNA (una cadena), que es la molécula funcional y el miRNA*, que corresponde a la secuencia complementaria de la primera cadena. El miRNA que se encontraba en la cadena 5' del pre-miRNA se denomina 5p y el que se encontraba en la cadena 3' se denomina 3p (18). Una de las dos cadenas del miRNA interactúa con el complejo de silenciamiento inducido por RNA (*RNA-Induced Silencing Complex*, o RISC por sus siglas en inglés) compuesto por TRPB, DICER y ARGONAUTA 2 (AGO2) en humanos (10). El miRNA sirve de guía al RISC mediante el apareamiento de bases con el mRNA blanco y silencia su expresión (29). El complejo apareado aparentemente tiene una vida más corta que el miRNA activo de cadena sencilla (2).

No se tiene claro cuál de las dos hebras es la que se incorpora al complejo RISC; al parecer se trata de la que tenga con menor complementariedad en el apareamiento con su extremo 5', siendo para la helicasa más fácil separarlas por este extremo. Por otra parte, la región 5' del miRNA usualmente es la que contribuye más a la actividad de unión específica a sus blancos (6). El complejo proteico RISC reconoce secuencias en el mRNA blanco que se aparean de manera perfecta o casi perfecta con los miRNAs de cadena sencilla recién incorporados al complejo.

La interacción entre el miRNA y el transcrito blanco se da usualmente en la secuencia semilla localizada cerca del extremo 5' del miRNA. Esta secuencia es muy conservada y un cambio ligero puede modificar el espectro de blancos que reconoce el miRNA (6). Los sitios de reconocimiento en el mRNA blanco por el miRNA se encuentran principalmente en la región 3'UTR e incluyen las cajas K, Brd y GY así como en algunos elementos ricos en AU. Al contrario de genes que presentan regiones 3'UTR's más cortas, también se ha encontrado que genes con regiones 3'UTR más largas presentan mayor densidad de sitios de unión de miRNAs. Los primeros se relacionan principalmente con procesos de modulación del desarrollo y los últimos con funciones celulares básicas (6). El nivel de complementariedad en el apareamiento depende del mecanismo por el cual se realiza el silenciamiento del transcrito blanco. El silenciamiento se basa en la interrupción del mensaje post-transcripcional ya sea porque el apareamiento del miRNA con el mRNA blanco es completo y éste último es degradado, o bien porque cuando el apareamiento entre miRNA-mRNA no es perfecto, el silenciamiento se da por interrupción del proceso de traducción (2). Si se realiza corte del mensajero, éste se lleva a cabo a la altura de la mitad del miRNA. Una vez cortado el mRNA, el miRNA en el complejo RISC se re-utiliza para reconocer y destruir otros transcritos blancos (2).



Modificado de Sand, Micheal., et.al., Journal of Dermatological Science, 2009 (64).

FIGURA 1. BIOGÉNESIS DE miRNAS EN MAMÍFEROS.

Los miRNAs se transcriben a partir del gen que los codifica en el genoma. Sufren un procesamiento en el núcleo que deja una estructura de tallo-burbuja de aproximadamente 70b. Posteriormente, se exportan al citoplasma donde se escinde la burbuja dejando una doble cadena de aproximadamente 21pb. Una de las dos cadenas es utilizada por el complejo de silenciamiento RISC para buscar complementariedad total o parcial con una secuencia de un mRNA blanco y evitar su expresión.

FAMILIA LET-7

Uno de los miRNAs más estudiados, *lethal-7* (*let-7*) pertenece a un grupo de miRNAs muy conservado dentro de varias especies. Como ya se mencionó, se describió por primera vez en *C. elegans* en donde se encontró que es complementario al transcrito de los genes lin-










CROMOSOMA	CLUSTER	ORGANIZACIÓN GENÓMICA
11	<i>mirR-100, let-7a-2</i>	
22	<i>let-7a-3, miR-4763, let-7b</i>	
21	<i>miR-99a, let-7c</i>	
19	<i>miR-99b, let-7e, miR-125a</i>	
9	<i>let-7a-1, let-7f-1, let-7d</i>	
3	<i>let-7g</i>	
12	<i>let-7i</i>	
X	<i>let-7f-2, miR-98</i>	
10	<i>miR-202</i>	

FIGURA 2. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE LA FAMILIA *let-7* EN HUMANOS.

La familia de miRNAs de *let-7* en humanos consta de 13 elementos distribuidos en nueve diferentes cromosomas. Algunos se encuentran agrupados con otros miRNAs de la misma familia o de familias no relacionadas (95).

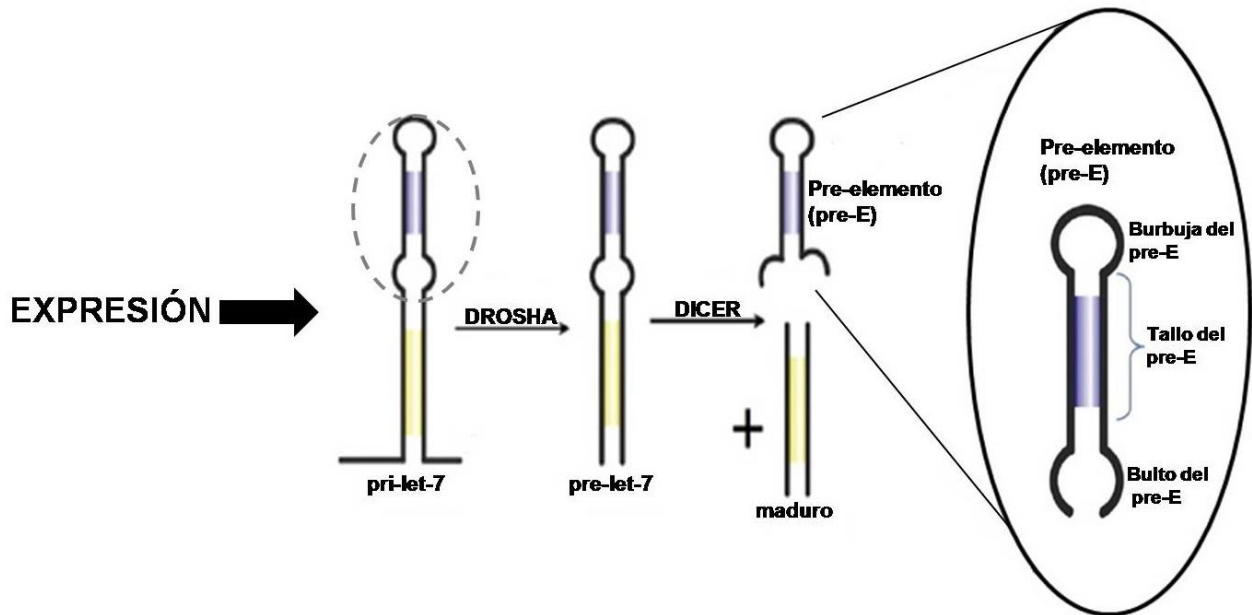
14, *lin-28*, *lin-41*, *lin-42*, *daf-12* y *let-60/RAS*, el cual son de suma importancia en el proceso desarrollo del nematodo (60,33). En humanos existen hasta 13 diferentes variantes de *let-7*: *let-7a-1*, *let-7a-2*, *let-7a-3*, *let-7b*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7e*, *let-7f-1*, *let-7f-2*, *let-7g*, *let-7i*, *miR-98* and *miR-202*, distribuidos en 9 diferentes *loci* cromosomales (32). La región semilla (5'-

GAGGUAG-3') es idéntica en todas las versiones de let-7 humano, excepto en miR202, donde la última G cambia por U y esta se encuentra en la cadena 3p (Figura 2). De esta forma, se asume que todos los miembros tienen como blanco a los mismos transcritos (88).

Se han encontrado varios oncogenes y genes reguladores como blancos de let-7, incluido RAS (33), HMGA2 (91), Ciclina D1/2/3 and Ciclina A (65), IL6 (31), c-MYC (63), DICER1 (73), LIN28A y LIN28B (24). Los blancos de let-7 están involucrados en diferentes procesos celulares como proliferación, pluripotencia, control del ciclo celular e inflamación. Por lo tanto, se considera a la familia let-7 como supresores de tumor.

La regulación de la transcripción de la familia let-7 no se encuentra bien estudiada. Existen análisis genómicos, específicamente del sitio de regulación de la transcripción del policistrón let-7a-1/f-1/d que sugieren que pueden estar regulado por proteínas "Forkhead" como FOXP4 y FOXP2 (16). Otro estudio sugiere que este mismo transcrito puede estar regulado por su proteína blanco MYC ya que se encontraron secuencias E-box 2 y E-box 3 sugiriendo que MYC puede inhibir o activar su expresión (82).

Tanto el pri-let-7 como pre-let-7 adquieren la típica estructura de horquilla donde el extremo 5' (5p) se aparea con el extremo 3' (3p) formando un tallo con amplia complementariedad. Ambos extremos se conectan por una región de burbuja (*loop*) terminal de longitud y estructuración variable dentro de los miembros de la familia let-7 (Ver Figura 3). Esta región se denomina pre-elemento (pre-E) y sirve de plataforma para reclutar diferentes proteínas con dominios de unión a RNA, tales como LIN28A/LIN28B, KHSRP (también conocida como KSRP), hnRNPA1 y TRIM25 (24,49,53,62,74,76,52). En humanos sólo tres miembros de la familia let-7 (let-7a-2, let-7c and let-7e) se producen mediante la ruta canónica de biogénesis de miRNAs, y se les denomina como Grupo I. El resto de los let-7 sufren un procesamiento adicional ya que sólo tienen un nucleótido no apareado en el extremo 3' y se les conoce como Grupo II. Esta diferencia aparentemente está relacionada a una zona no apareada dentro del tallo que forma un bulto (*bulge*) que modifica el acomodo del *Microprocesador* teniendo como resultado que realice el corte una base después del sitio blanco (26).



Modificado de Nam Y. Et.al. (2011) (52).

FIGURA 3. ESTRUCTURA DEL PRE-ELEMENTO (pre-E) DE PRECURSORES DE LET-7.

El pre-elemento (pre-E) de un precursor de miRNA es la parte de la horquilla que sobra después del corte de la enzima DICER. Consta de tres partes básicas: el bulto del pre-E, el tallo del pre-E y la burbuja del pre-E. En el caso de la familia let-7, dos secuencias conservadas que se encuentran en la burbuja y en el bulto son las que permiten la interacción con las proteínas reguladoras LIN28. La longitud del tallo es variable en todos los miembros de la familia let-7.

REGULACIÓN DE BIOGÉNESIS DE miRNAS EN LA FAMILIA LET-7

El mecanismo de biogénesis de miRNAs es susceptible de regulación en sus diferentes etapas. Se sabe que es posible regular el proceso de biogénesis post-transcripcionalmente mediante factores trans-actantes (76,79). La regulación es tejido-específica y sucede en diferentes etapas del desarrollo (76). El mecanismo de regulación postranscripcional que existe entre la proteína LIN28 y los miRNAs de la familia let-7 es un ejemplo bien caracterizado de una doble retro-regulación negativa (79).

PROTEÍNA LIN28A

LIN28 es una proteína descrita originalmente en *C. elegans* que se encuentra en el citoplasma y es codificada por un gen del mismo nombre. Dicha proteína contiene un dominio *Cold Shock* (CSD) y dos dominios de dedos de zinc (ZNF) de tipo retroviral (CCHC) que son estructuras que se encuentran en proteínas que tienen la capacidad de unirse a ácidos nucleicos (50).

En humanos existen dos homólogos de LIN28 (LIN28A y LIN28B) que conservan su dominio CSD y un par de dominios CCHC (24). Aunque LIN28A ha sido localizada principalmente en el citoplasma y en cuerpos de procesamiento (*P bodies*) (24), en el caso de LIN28B también se ha demostrado que puede translocarse al núcleo de manera dependiente al ciclo celular durante las fases S y G2 (19). Las LIN28A y LIN28B humanas son proteínas codificadas por genes distintos. LIN28A se encuentra en el cromosoma 1 y LIN28B en el cromosoma 6 (94). Un análisis filogenético sugirió que tanto LIN28A como LIN28B de vertebrados provienen de un mismo gen ancestral que en algún momento se duplicó (19). Ambos homólogos se encuentran altamente conservados en muchas especies, incluyendo los motivos de unión a RNA, lo que sugiere un papel fisiológico de importancia (59, 94). Se ha observado que los homólogos LIN28A/LIN28B y los miRNAs let-7 presentan funciones opuestas en el desarrollo y progresión a cáncer y su expresión es inversamente correlacionada en tejido normal y canceroso (78,68).

En mamíferos, se encontró que LIN28A se expresa en células madre embrionarias, en células somáticas progenitoras y en etapas tempranas de la embriogénesis pero su expresión disminuye durante las etapas tardías del desarrollo embrionario (12,24,59,92,78). También se expresa en diferentes etapas de la maduración de células embrionarias de músculo, células neuronales y epiteliales y células embrionarias de carcinoma pero su expresión se suprime en la mayoría de los tejidos en edad adulta, excepto en tejido esquelético y músculo cardíaco (59).

Al igual que let-7, LIN28A fue descrita por primera vez en *C. elegans* (27), donde participa en el desarrollo embrionario y es regulado por el miRNA lin-4, homólogo de miR-125 en humanos (94). El aumento o disminución de LIN28A regula la sucesión adecuada y temporal de las etapas del desarrollo del nematodo (50).

El gen de LIN28A en humanos mide 3461pb y la región codificante abarca de la posición 76 a la 702. El resto constituye la región 3'UTR (51). Hasta el momento se ha comprobado que LIN28A puede ser regulado por miembros de las familias de miRNAs let-7, miR-125, miR-30 y miR-9 (51,92)

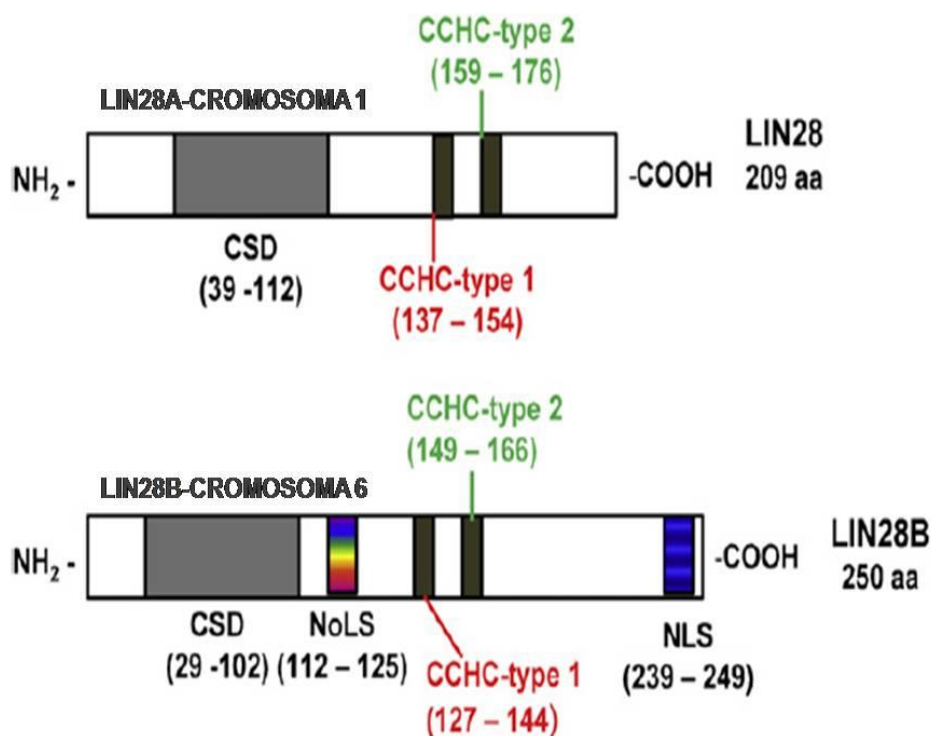
Por otra parte, se ha demostrado experimentalmente que LIN28A es un factor, que conjuntamente con OCT4, SOX2 y NANOG, se puede utilizar para inducir células somáticas humanas para reprogramarse y volver a un estado no diferenciado, teniendo un fenotipo similar al de células madre pluripotenciales. Sin embargo, la participación de LIN28A en este proceso no es clara ya que se ha demostrado que no es absolutamente requerido para la etapa inicial de reprogramación hacia un estado no diferenciado, ni para el mantenimiento estable de las células reprogramadas, aunque puede influenciar la frecuencia de reprogramación de las células (90) e incrementar la eficiencia de obtención de células madre pluripotenciales inducidas en combinación con OCT4, SOX2 y NANOG (12).

PROTEÍNA LIN28B

LIN28B fue identificado al realizar ensayos de microarreglos para detectar genes expresados diferencialmente entre muestras normales de hígado y hepatocarcinoma de humano. Se encontró que tiene un patrón de expresión distinto en diversos tejidos humanos y que se expresa de manera elevada en algunos tejidos normales provenientes de testículo, hígado de feto y placenta, así como también en tumores hepáticos y líneas celulares derivadas de hepatocarcinoma (19), aunque también se ha reportado sobre-expresado en leucemia mieloide crónica, cáncer de mama, de pulmón y en algunos casos de cáncer cervical (41,77). La sobre-expresión de LIN28B en líneas celulares de carcinoma hepático (HCC) y de adenocarcinoma mamario (MCF-7) induce un incremento en la proliferación

celular. Lo anterior sugiere que LIN28B podría tener diferentes efectos en la proliferación de células tumorales (19).

El gen de *lin28b* mide 5504pb, la región codificante se encuentra entre las posiciones 204 a 956 y el resto corresponde a la región 3'UTR (94) por lo que, al igual que su homólogo LIN28A, es susceptible de ser regulada postranscripcionalmente por miRNAs. Se encontró que en el 3'UTR existen elementos de reconocimiento para miRNAs, particularmente let-7b, y que éste inhibe significativamente su expresión (19). Considerando la similitud que existe entre todos los miembros de la familia let-7, se ha sugerido que LIN28B sea un blanco del resto de los let-7. Liang y colaboradores reportaron que LIN28B es un blanco de miR-125b y sus estudios también los realizaron en células derivadas de hepatocarcinoma humano (41).



Modificado Zhou, J. et.al. 2013. (93).

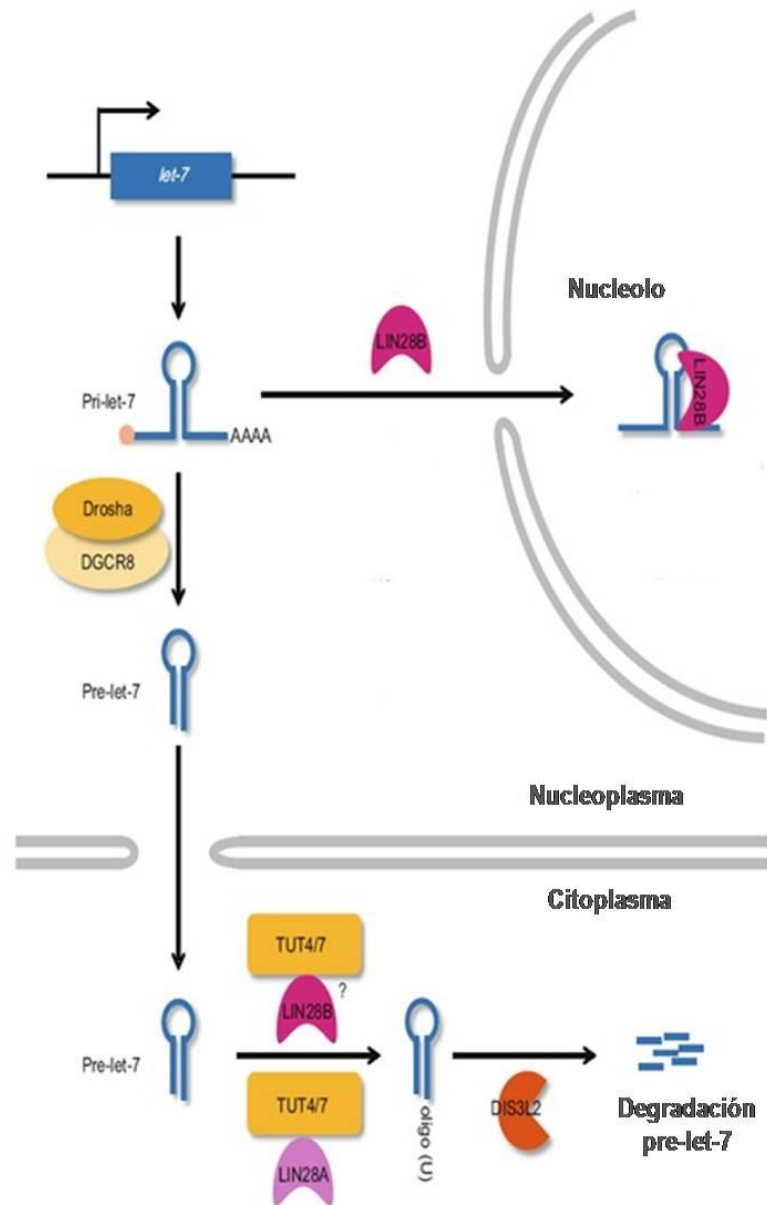
FIGURA 4. ESTRUCTURA GENERAL DE LOS HOMÓLOGOS LIN28A Y LIN28B.

Las proteínas LIN28A y LIN28B están codificadas por genes diferentes. En humanos esos genes se encuentran en los cromosomas 1 y 6 respectivamente. Ambas proteínas tienen un dominio CSD (*Cold Shock Domain*) y dos dominios de dedos de zinc de tipo retroviral (CCHC) que les permiten interactuar con ácidos nucleicos. Adicionalmente, LIN28B cuenta

con señales de relocalización nuclear (NLS) y nucleolar (NoLS) que sugieren que su interacción con los precursores let-7 sucede en este organelo.

PAPEL REGULADOR DE LIN28 EN LA BIOGÉNESIS DE LET-7

La relación funcional entre LIN28A/LIN28B y let-7 se ha estudiado ampliamente (80). Ambas proteínas regulan negativamente a let-7 a través de sus dominios de unión a RNA: el dominio CSD hacia el extremo amino terminal y los dos dominios CCHC hacia el extremo carboxilo terminal. LIN28A y LIN28B interactúan con los precursores de let-7 en el pre-E, impidiendo la interacción y procesamiento de DICER en el citoplasma y DROSHA en el núcleo (72). Cuando LIN28A no se encuentra expresado en la célula, la familia de uridil-transferasas TUT2, TUT4 o TUT7 mono-uridilan a los precursores de let-7 en el extremo 3' para dejar a la molécula con 2 bases de cadena sencilla en dicho extremo, y así permitir que DICER la reconozca y siga procesándola hasta su maduración (26). Alternativamente, si LIN28A se expresa en la célula, interactúa con pre-let-7 y recluta TUT4 o TUT7 para adicionar alrededor de 14 residuos de uracilo al extremo 3' (21,25), resultando en la degradación del precursor mediante la exonucleasa 3'-5' DIS3L2 (8). Por otro lado, LIN28B contiene señales de localización nuclear y nucleolar lo que sugiere que podría regular a let-7 dentro del núcleo (4). Aun cuando LIN28B tiene identidad del 70% con LIN28A, contienen la misma secuencia de dominios CSD y CCHC12 lo que hipotéticamente les permite interactuar de la misma forma con let-7 (52,25,46). Se ha sugerido que LIN28B podría bloquear la biogénesis de let-7 también en el citoplasma utilizando el mismo sistema de TUT4 y DIS3L2 que LIN28A aunque el sistema de translocación aún no está descrito (47) (Ver Figura 5).

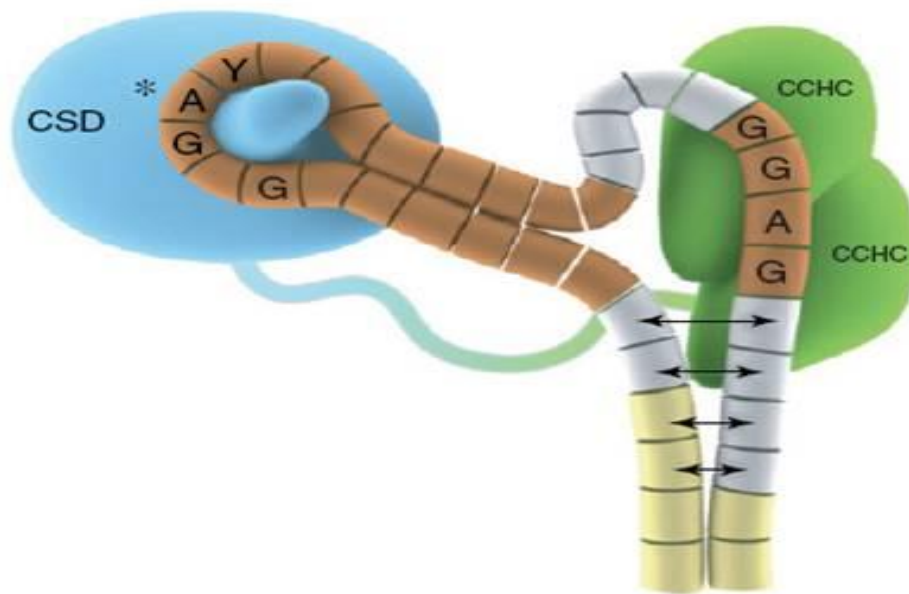


Modificado de Lee, Hosuk., et al., Protein & Cell, 2016. (36).

FIGURA 5. REPRESIÓN DE BIOGÉNESIS DE LET-7 MEDIADA POR LIN28

La biogénesis de los let-7 es similar al resto de los miRNAs. Sin embargo, es regulado a través de secuencias consenso del pre-E por las proteínas LIN28A en el citoplasma y LIN28B en el núcleo. Se sabe que las uridil-transferasas TUT4 y TUT7 participan en un mecanismo de degradación de los precursores let-7 cuando se co-expresan con LIN28A pero no se sabe a ciencia cierta si el mecanismo se repite al co-expresarse con LIN28B.

Varios estudios han detallado las bases de la interacción molecular entre LIN28A y algunos precursores de la familia let-7. Los dominios CSD y CCHC12 de LIN28A interactúan específicamente con dos secuencias conservadas dentro del pre-E. La estructura ideal del pre-E para interactuar correctamente con LIN28A, contiene la secuencia 5'-NGNGAY-3' que interactúa con el dominio CSD y la secuencia 5'-NGNNG-3' que interactúa con los dominios CCHC12. Ambas secuencias se encuentran separadas por un espaciador de longitud variable que forma una estructura similar a un tallo, denominado tallo del pre-E (pre-E-stem) (52,25,46). Este modelo postula que la burbuja del pre-E rodea una protrusión del CSD de LIN28 permitiendo un contacto extenso con el RNA blanco (52) (Ver Figura 6).



Nam Y. Et.al. (2011) (52).

FIGURA 6. INTERACCIÓN DOMINIOS CSD Y CCHC12 DE PROTEÍNAS LIN28 Y LET-7.

Modelo de la interacción entre el dominio CSD con una secuencia conservada en el tallo del pre-E y los dominios CCHC con otra secuencia en el bulbo del pre-E.

Finalmente, Chang y colaboradores, encontraron que c-MYC funciona como un factor de transcripción para la expresión de LIN28B ya que se une a su promotor y favorece su sobre-expresión (9).

RELACIÓN ENTRE miRNAS Y CÁNCER

Hasta principios del año 2018 se habían identificado 2603 miRNAs humanos (95). Sin embargo, mediante estudios computacionales y experimentales se ha encontrado que miles de genes codificantes podrían ser regulados por miRNAs. Así, los miRNAs son considerados como reguladores maestros de importantes procesos celulares (28).

Los miRNAs que participan en el desarrollo de algún tipo de cáncer se denominan miRNAs oncogénicos (oncomiRs por sus siglas en inglés) (11,30). Se ha encontrado que más de la mitad de los miRNAs relacionados con algún proceso canceroso se encuentran localizados en una región del genoma susceptible a fenómenos como acortamientos, amplicones, metilaciones o translocaciones (7,22). La desregulación de la expresión de estos miRNAs modifica a su vez la expresión de sus genes blanco que normalmente están involucrados en procesos celulares como apoptosis, proliferación, ciclo celular, migración/invasión o angiogénesis, diferenciación y en general mecanismos que son alterados cuando se está desarrollando un proceso carcinogénico (7,28,30).

Se ha encontrado que de manera global, los miRNAs se encuentran sub-expresados en un proceso carcinogénico (22). Por otro lado, los miRNAs que favorecen la apoptosis y limitan la proliferación celular son considerados como supresores de tumor. Entre éstos se encuentra la familia de let-7 que regulan negativamente a los oncogenes RAS, MYC y HMGA2 entre otros blancos en humanos (33,39,63). Se sabe que en cáncer de pulmón, la desregulación de RAS tiene un efecto oncogénico, por lo que la función de let-7 en su regulación es clave para controlar su expresión (30). Varios estudios han demostrado que miRNAs considerados supresores de tumores se encuentran sub-expresados en muestras tumorales como son el caso de miR-143, miR-145 y let-7 (22).

RELACIÓN ENTRE miRNAS Y CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

La infección con virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH) se ha asociado con el desarrollo de cáncer cervical (23). Aunque la mayoría de las veces la infección de VPH es eliminada de manera espontánea por individuos inmuno-competentes, una pequeña fracción de mujeres infectadas desarrollan cáncer cervical (54). Por lo tanto, está claro que factores adicionales además de la infección viral *per sé* contribuyen a la transformación de las células cervicales.

Análisis genómicos de tumores de origen cervical y de líneas celulares indican que una expresión aberrante de los miRNAs podría contribuir a la transformación celular (61). Múltiples miRNAs presentan expresión alterada en células con cáncer cérvico-uterino (CaCu) que tienen el virus de papiloma humano (VPH) en comparación con células con CaCu pero negativas a VPH o en tejidos normales del cérvix (28).

Los VPH contribuyen al proceso tumorigénico con la expresión de dos proteínas virales, E6 y E7 las cuales interfieren con el ciclo celular al alterar la expresión de la proteína supresora de tumores p53 y retinoblastoma (Rb) respectivamente. Sin embargo, hay evidencia que sugiere que la infección por VPH por sí sola es insuficiente para producir cáncer (57). Lui y colaboradores encontraron en un comparativo entre 6 líneas celulares de cáncer cérvico-uterino y muestras de tejido cervical normales que 6 miRNAs presentaban una expresión significativamente diferencial entre los dos grupos celulares. Entre dichos miRNAs se encontró que *let-7b* y *let-7c*, pertenecientes a la familia let-7, que se expresan con mucha mayor abundancia en los tejidos cervicales normales en comparación con las líneas celulares de cáncer cervical (47).

Viswanathan, S. y colaboradores encontraron mediante un análisis de microarreglos que LIN28A y LIN28B se encuentran expresados de manera anormal en 3.2% de los casos (de un total de 527) en varios tipos de líneas celulares cancerosas humanas de diversos orígenes como células germinales y hepatocarcinomas. También encontraron mediante

microarreglos de tejidos tumorales e inmunohistoquímica que LIN28A se encuentra sobre-expresado en diversos tipos de tumor incluyendo cáncer de color, cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer cervical. Esta sobre-expresión está relacionada con la represión de miRNAs de la familia de *let-7* y la expresión de sus transcritos blanco. Al inhibir la expresión de LIN28B en células K562 de leucemia mielógena aguda y en células provenientes de adenocarcinoma pulmonar mediante un RNA de interferencia, se restauraron los niveles de los miRNAs de la familia de *let-7*, disminuyeron niveles de C-MYC (blanco de *let-7*), disminuyó la capacidad proliferativa y hubo cambios morfológicos que sugieren un cambio hacia diferenciación celular. También se encontró que la sobre-expresión de LIN28/LIN28B se daba en tumores en estado avanzado de desarrollo y no en etapas tempranas (77). Sin embargo, aún no se ha descrito un mecanismo que explique porque LIN28A se sobre-expresa y que está relacionado con que el fenotipo tumoral sea más agresivo que en los casos en donde no se encuentra sobreexpresión. Sugieren también que podría tratarse de amplificaciones y translocaciones del sitio donde se encuentran sus genes, el mecanismo aún no ha sido dilucidado.

Adicionalmente, se ha observado que varios miembros de la familia *let-7* aparecen diferencialmente regulados en diferentes tipos de cáncer (4). En cáncer cérvico-uterino *let-7* maduros se observan sobre-expresados en relación a células normales (47,37). Aun cuando LIN28A y LIN28B podrían ejercer un nivel de represión diferencial en los precursores de *let-7* (24,52,46), los datos actuales sugieren que la interacción con los precursores *let-7* depende de su interacción con el pre-E de dichos miRNAs (46,66). No está claro si dicha diferencia podría estar relacionada con cambios regulatorios en la célula que pueda desencadenar procesos cancerosos. La Figura 7 muestra de manera general los mecanismos básicos hasta ahora descritos que relacionan el circuito de regulación entre los homólogos de LIN28 y *let-7* y sus repercusiones en el metabolismo celular.

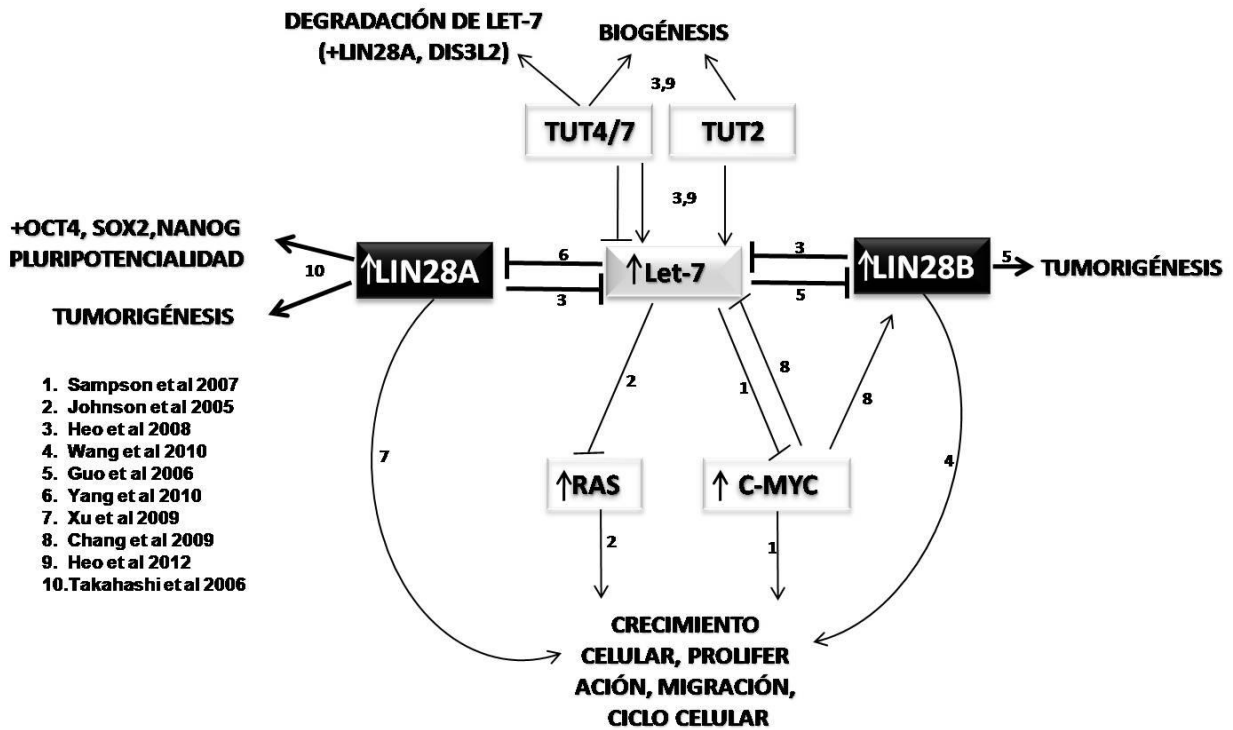


FIGURA 7. MECANISMOS REGULATORIOS ENTRE LOS HOMÓLOGOS LIN28 Y LET-7 Y BLANCOS ONCOGÉNICOS VALIDADOS.

Se sabe que los miRNAs de la familia let-7 tienen entre otros blancos a los mRNA de las proteínas oncogénicas RAS, C-MYC, LIN28A y LIN28B. Así mismo, estas dos últimas lo regulan negativamente en su biogénesis. Las proteínas TUT2/4/7 regula positivamente la biogénesis de los miRNAs de let-7 del grupo II, a los cuales les falta un nucleótido en el extremo 3' para poder ser procesados por DICER. Por otro lado, sin TUT4/7 se co-expresan con LIN28A, uridilan en exceso al precursor de let-7 para favorecer su degradación mediante la nucleasa DIS3L2 (63,33,24,81,19,87,86,9,26,71).

7 ANTECEDENTES

En un trabajo anterior, se probaron los efectos de la transfección de algunos pre-miRNAs supresores de tumor (pre-let7a, pre-mir-143, pre-mir-125a y pre-mir-34c-3p) en diversos procesos celulares fundamentales en líneas celulares epiteliales derivadas de piel o tejido cervical con diferente contenido de VPH y grado de malignidad (45). La transfección del supresor de tumor let-7a no causó ningún efecto en el ciclo celular ni en la proliferación de la línea celular SiHa (derivada de cáncer cervical, con contenido de VPH tipo 16), contrario a lo que se observó al transfectar los otros miRNAs supresores de tumor.

Lo anterior derivó en la evaluación de las proteínas reguladoras de la biogénesis de let-7, LIN28A y LIN28B mediante inmunodetección en un panel de líneas celulares epiteliales derivadas de cérvix y tumores cervicales (98). LIN28A no se encontró expresado significativamente en ninguna de las líneas celulares evaluadas (Figura 8A). Sin embargo, LIN28B se encontró diferencialmente expresado entre líneas celulares tumorales e inmortales como se observa en la Figura 8B encontrándose mayormente expresada en líneas celulares tumorales. Por lo anterior, se decidió continuar con la evaluación del circuito regulatorio entre LIN28B y let-7 en líneas celulares derivadas de tejido y tumores cervicales.

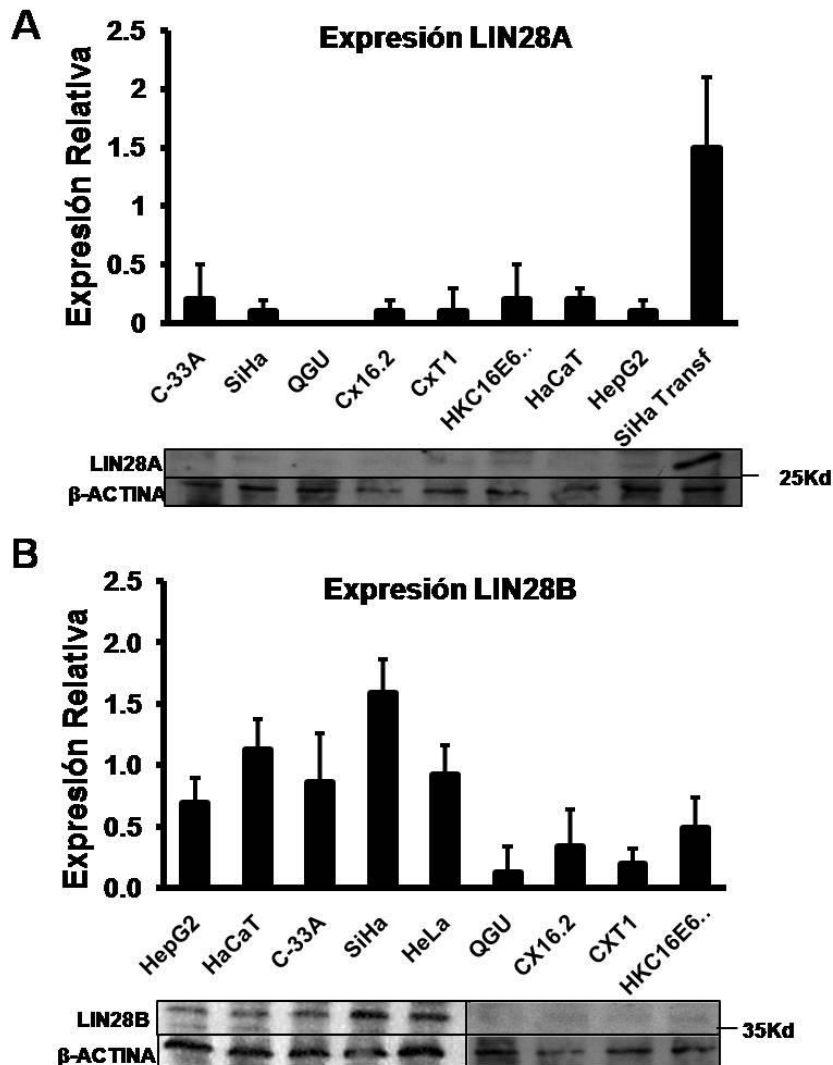


FIGURA 8. EXPRESIÓN DE LIN28A Y LIN28B EN LÍNEAS CELULARES EPITELIALES DERIVADAS DE CÁNCER CERVICAL.

A) Panel Superior. Expresión de la proteína LIN28A con respecto a β -ACTINA en extractos totales de proteína de líneas celulares tumorales C-33A (VPH negativa), SiHa y QG-U; líneas celulares inmortales Cx16.2(VPH-16), CxT1 (VPH-16) y HKC16E6E7II (VPH-16); queratinocitos inmortales HaCaT (VPH negativa) y la línea celular derivada de hepatocarcinoma HepG2 como control positivo de LIN28B. La líneas celular SiHa se transfectó con un plásmido de expresión que contenía el gen de LIN28A humano para usarse como control positivo (SiHa Transf.). Las barras representan la desviación estándar de al menos tres repeticiones biológicas independientes. B) Panel Inferior. Expresión de la proteína LIN28B con respecto a β -ACTINA en extractos total de proteína del mismo grupo de líneas celulares que el panel superior y adicionalmente HeLa (VPH-18). Las barras representan la desviación estándar de al menos tres repeticiones biológicas independientes. Se incluye en ambas secciones una inmunodetección representativa de la expresión de los homólogos LIN28 en las líneas celulares evaluadas.

8 HIPÓTESIS

La función de la familia let-7 está regulada negativamente por la expresión de LIN28 mediante la interacción directa entre los miRNAs y las proteínas LIN28. La ausencia de expresión de LIN28A y la expresión diferencial de LIN28B en líneas celulares inmortales y tumorigénicas cervicales sugiere que LIN28B debería ser responsable por la inhibición de la función de los miRNAs let-7 en este tipo celular.

Entonces la presencia de miRNAs let-7 en entornos celulares que contienen LIN28B sugiere un mecanismo de escape de la inhibición por LIN28B que al alterarse podría resultar en el desarrollo de un tumor.

9 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el funcionamiento del circuito regulatorio entre Lin28B y let-7 en células derivadas de cáncer cervical.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer los niveles endógenos de expresión de LIN28B en líneas celulares tumorigénicas y no tumorigénicas, derivadas de cáncer cervical y VPH+.
- Establecer los niveles endógenos de expresión de proteínas relacionadas a la expresión de LIN28B (MYC).
- Establecer los niveles endógenos de expresión de algunos blancos oncogénicos de let-7 (MYC, RAS, LIN28B).
- Establecer los niveles endógenos de expresión de proteínas reguladoras de biogénesis de let-7 (LIN28B, TUT2).
- Establecer correlaciones entre la expresión de los elementos evaluados del circuito regulatorio LIN28B-let-7 y su relación al nivel de malignidad en células derivadas de cáncer cervical.

10 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

ESTRATEGIA PARA EVALUAR PRE-LET-7.

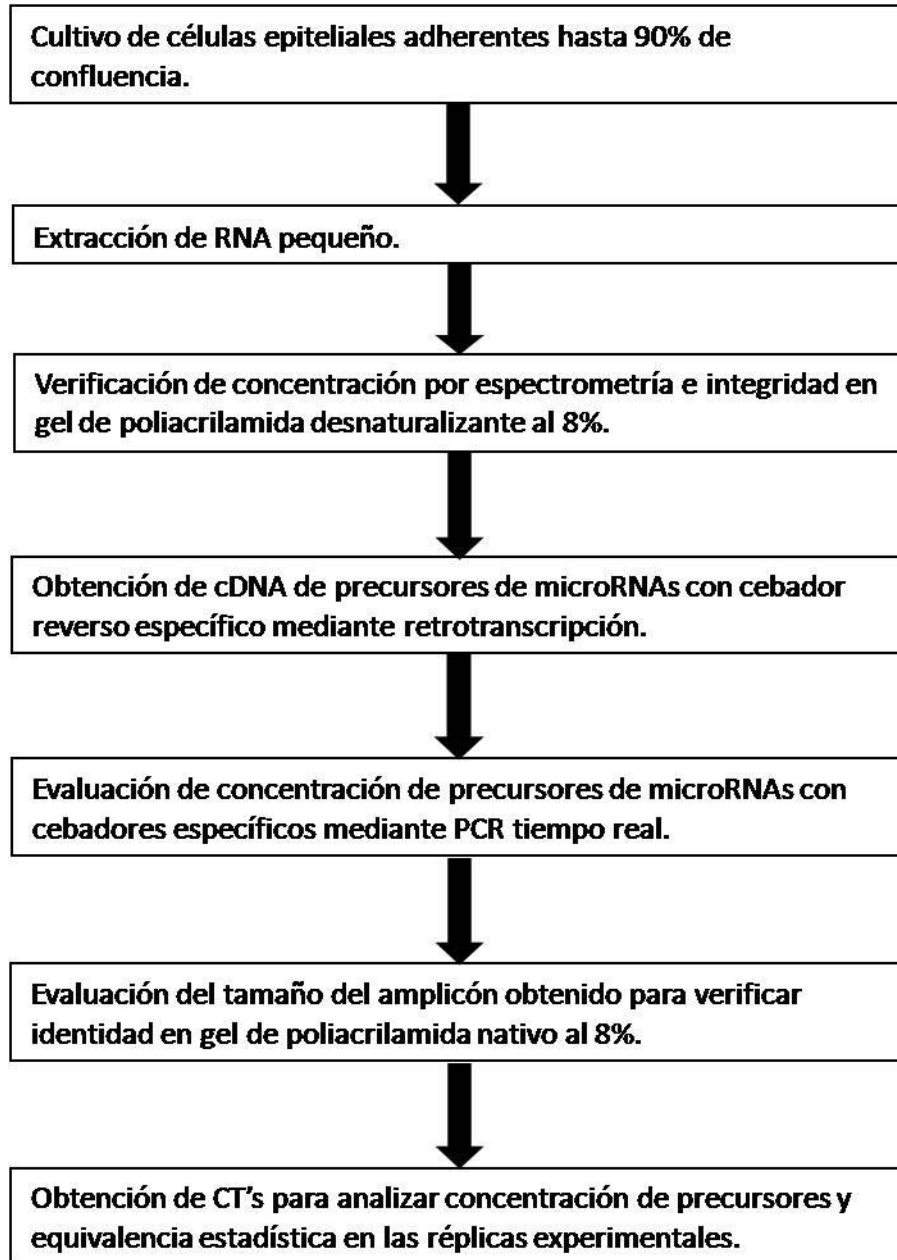


FIGURA 9. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA EVALUAR NIVELES ENDÓGENOS DE EXPRESIÓN DE PRE-LET-7.

ESTRATEGIA PARA EVALUAR PROTEÍNAS REGULATORIAS Y BLANCOS DE LET-7.

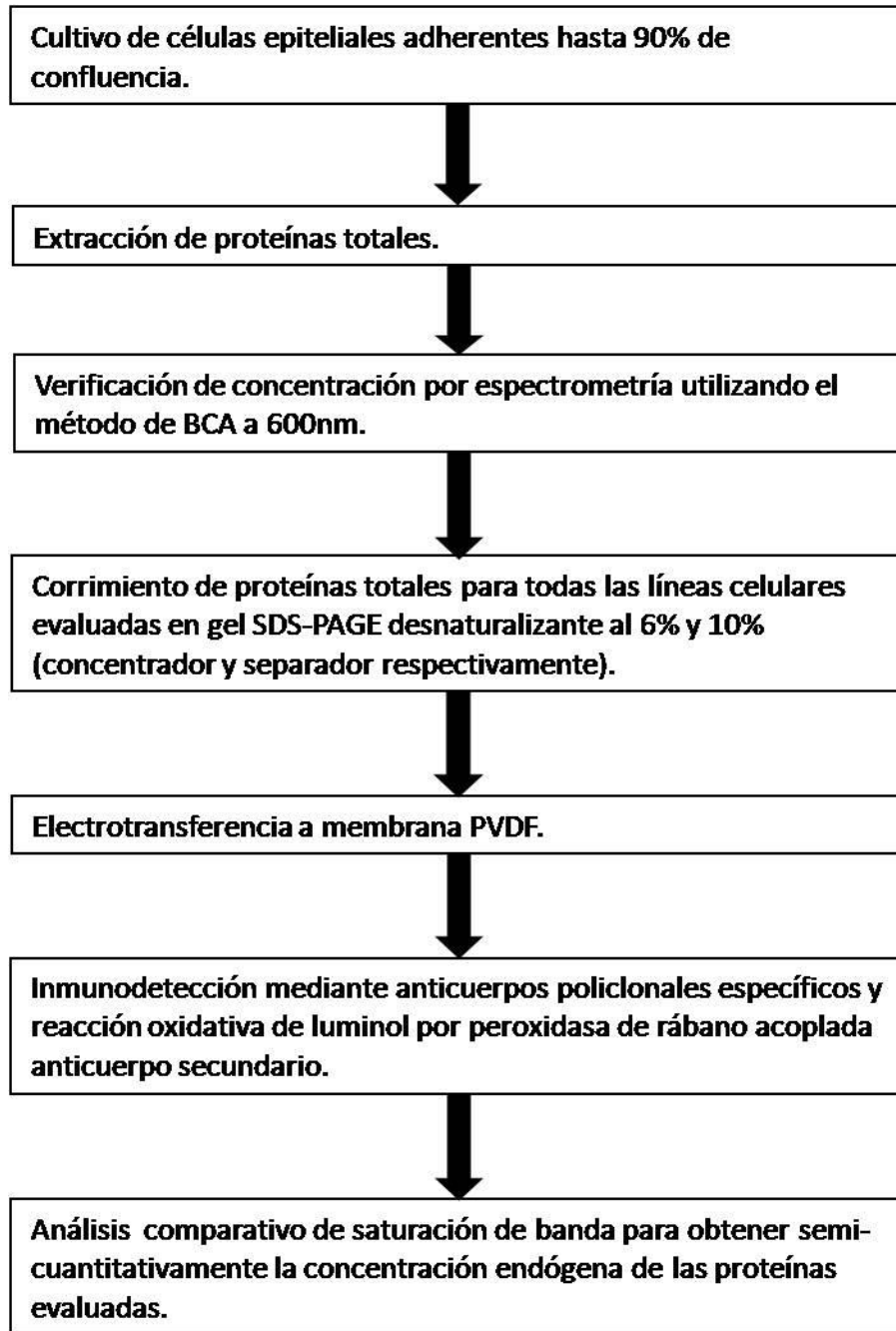


FIGURA 10. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA EVALUAR NIVELES ENDÓGENOS DE EXPRESIÓN DE ALGUNAS PROTEÍNAS REGULATORIAS Y BLANCOS DE *LET-7*.

11 MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVO DE CÉLULAS

El cultivo de las diferentes líneas celulares utilizadas en este estudio (Tabla 1) se realizó en cajas de 100 mm. Se utilizaron diferentes medios de cultivo de acuerdo al tipo de línea celular (Tabla 2) y en su caso fueron suplementados con 5% de Suero Fetal Bovino y antibióticos (Penicilina/Estreptomicina 100µg/ml y Gentamicina 0.01mg/ml). En todos los casos fueron incubadas en cámara de CO₂ al 5% a 37°C con cambio de medio cada tercer día hasta que alcanzaron el 90% de confluencia.

TABLA 1. LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS.

	Origen	Contenido VPH	Tumorigénica	Diferenciada	Otras Características
Hep G2^a	Hígado	No	No	Sí	Hepatocarcinoma
C-33 A^b	Cérvix	No	Sí	Sí	Adenocarcinoma
HeLa^c	Cérvix	18	Sí	Sí	Carcinoma
SiHa^d	Cérvix	16	Sí	Sí	Células escamosas de carcinoma G2
Ca Ski^e	Cérvix	16	Sí	Sí	Células escamosas de carcinoma obtenidas de metástasis en intestino delgado
QG-H⁽⁶⁷⁾	Cérvix	16	Sí	Sí	Carcinoma
QG-U⁽⁶⁷⁾	Cervix	16	Sí	Sí	Carcinoma

	Origen	Contenido VPH	Tumorigénica	Diferenciada	Otras Características
CX16-2 ⁽⁸³⁾	Cérvix	16	No	No	Células cervicales normales obtenidas a partir de histerectomía por leiomiomas e inmortalizadas con VPH-16
CXT-1 ⁽⁸⁴⁾	Cérvix	16	No	No	Línea celular derivada de un carcinoma cervical
HKC16E5E7II ⁽¹⁾	Epidermis de prepucio	16	No	No	Queratinocitos de prepucio normal inmortalizados con E6 y E7 de VPH-16
HaCaT ⁽⁴⁾	Epidermis	No	No	Sí	Queratinocitos inmortalizados espontáneamente de epidermis aledaña a un tatuaje

a) ATCC® CRL-11997™/b) ATCC HTB-31™/c) ATCC® CCL-2™/d) ATCC® HTB-35™/e) ATCC® CRL-1550™)

TABLA 2. MEDIOS DE CULTIVO PARA LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS.

LÍNEA CELULAR	MEDIO DE CULTIVO	SUERO FETAL BOVINO al 5%	ANTIBIÓTICOS
HepG2	RPMI ^a	Sí	Sí
C-33A	DMEM ^b	Sí	Sí
HeLa	DMEM	Sí	Sí
SiHa	DMEM	Sí	Sí
Ca Ski	DMEM	Sí	Sí
QG-H	DMEM	Sí	Sí
QG-U	DMEM	Sí	Sí
CX16-2	Defined K-SFM ^c	No	Sí
CXT-1	Defined K-SFM	No	Sí
HKC16-2	Defined K-SFM	No	Sí
HaCaT	DMEM/F12 ^d	Sí	Sí

^a**RPMI:** Advanced RPMI 1640 Reduced Serum Medium 1X 12633 de GIBCO, Invitrogen.

^b**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose 1X 11995 de GIBCO, Invitrogen.

^c**Defined K-SFM:** Keratinocyte Serum Free Medium 10785 de GIBCO, Invitrogen; suplementado con factor de crecimiento (10784) del mismo fabricante.

^d**DMEM /F12:** Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 11330 de GIBCO, Invitrogen.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS TOTALES DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS

Después de que los cultivos celulares alcanzaron confluencia del 70-80%, se retiró el medio de las cajas y se lavaron dos veces con PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X estéril y posteriormente se les adicionó 0.5ml de buffer RIPA (Tris -HCl pH 7.4 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Deoxicolato de Sodio 0.5%, Triton X-100 o NP40 1%, AEBSF 1mM, Tableta coctel inhibidor de proteasas Complete™, de Roche (1 /50mL)), se incubaron en hielo por 1 min (para el caso de los queratinocitos fue necesario incubarlos hasta 5 min.). A continuación las células se levantaron de la caja con una espátula estéril, se resuspendieron por bombeo con una micropipeta y se transfirió el líquido resultante a un microtubo de 1.5mL. Los extractos se hicieron pasar por una jeringa con aguja de calibre 18x38mm para terminar de romper las membranas plasmáticas, posteriormente por una aguja de menor calibre para deshacer los complejos de DNA-Histonas, tres veces en cada caso. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 12,000g por 5 min. y se recuperó el sobrenadante con la fracción proteica soluble de las células, la cual fue cuantificada con el Kit Pierce BCA Protein Assay Kit # 23227 de ThermoScientific de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

Para preparar el gel se utilizó acrilamida-bisacrilamida (relación 29:1 p/p); un gel concentrador al 6% en buffer Tris-HCl-SDS (Tris 125mM pH 6.8, SDS 0.1%), y un gel separador al 10% en buffer Tris-HCl-SDS (Tris 375mM pH 8.8, SDS 0.1%). Se utilizaron 100µg de extractos totales de proteínas a los cuales se les agregó buffer de carga Laemmli 5x (Tris 125mM pH 6.8, SDS 4%, Glicerol 20%, Azul de Bromofenol 0.004%, β-mercaptoetanol 10%) debido a la dificultad de cargar mucho volumen en los pozos de las cámaras de electroforesis disponibles; se dejaron en ebullición por 5 minutos y posteriormente se colocaron en hielo al menos 3 minutos para eliminar cualquier estructura secundaria que pueda interferir con la movilidad electroforética y se cargaron inmediatamente después en el gel. Las muestras se corrieron a 100 V. por

aproximadamente 1h 40min o hasta que el marcador de 10KDa hubiera alcanzado 5cm de migración en el gel separador. La electroforesis se realizó en buffer de corrida Tris-Glicina-SDS (Tris 25mM pH 8.3, Glicina 192mM, SDS 0.1%). Los geles fueron transferidos a membranas de PVDF en buffer de transferencia Tris-Glicina-Metanol (Tris 25mM pH 8.3, Glicina 192mM, Metanol 15%) a 2.5A en dos o tres pulsos de 7 minutos cada uno (dependiendo del tamaño de la proteína a evaluar) utilizando el equipo TurboBlot de marca BioRAD.

INMUNODETECCIÓN (*WESTERN BLOT*)

Las membranas transferidas fueron bloqueadas 1 h con solución de bloqueo 10% (PBS Tween 20 al 0.1%, leche en polvo descremada al 10%). Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario respectivo por toda la noche a 4°C, en agitación suave, dentro de bolsas herméticas en un volumen no mayor a 3mL, asegurándose de cubrir completamente la membrana. Las membranas se lavaron tres veces con 5mL de solución PBS Tween 20 al 0.1%, en agitación media por 15 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario respectivo por 2h a temperatura ambiente en agitación suave dentro de bolsas herméticas en un volumen no mayor a 3mL. Nuevamente, se realizaron 3 lavados con 5mL de solución PBS Tween 20 al 0.1%, de 15 minutos cada uno, asegurándose de cubrir completamente la membrana. Las concentraciones de anticuerpos primario y secundario para cada proteína analizada se muestran en la Tabla 3. El revelado de las membranas se realizó utilizando el kit de quimioluminiscencia Luminata de Merck-Millipore y analizado en el equipo C-Digit 3600 (LI-COR Biotechnology, Lincoln NE).

TABLA 3. ANTICUERPOS PARA INMUNOBLOTS.

(En todos los casos se utilizaron anticuerpos de marca Santa Cruz Biotechnology).

Proteína	Anticuerpo Primario		Anticuerpo Secundario		Peso (kD)
	ID	Concentración	ID	Concentración	
LIN28B	LIN28B (F-21): sc-130802	1:100	Goat-anti- Rabbit IgG- HRP sc-2004	1:1000	28
K-RAS	pan RAS (FL- 189): sc-14022	1:1000	Goat-anti- Rabbit IgG- HRP sc-2004	1:1000	21
c-MYC	cMYC (9E10): sc-40	1:100	Anti-Mouse	1:1000	67
β -ACTINA	ACTIN (I-19): sc-1616	1:1000	Donkey anti- goat IgG-HRP sc-2020	1:2000	43
TUTasa2	PAPD4 (N-15): sc-168897	1:250	Donkey anti- goat IgG-HRP sc-2020	1:1000	56

CONSTRUCCIÓN DE VECTOR DE EXPRESIÓN PARALIN28B

La construcción del vector de expresión pCR3.1-Lin28B se hizo a partir de la construcción pCMV6-XL4-Lin28B (plásmido pCMV6-XL4 de la empresa OriGene, el cual contenía 2,977 pares de bases del mRNA del gen *lin28b* humano, incluyendo la región codificante completa). El gen *lin28b* fue liberado con las enzimas de restricción NotI-XbaI produciendo un fragmento de 2,240 pares de bases que fue clonado en el vector de expresión pCR3.1 (Invitrogen). La clonación fue verificada por análisis de restricción y secuenciación (Figura 10).

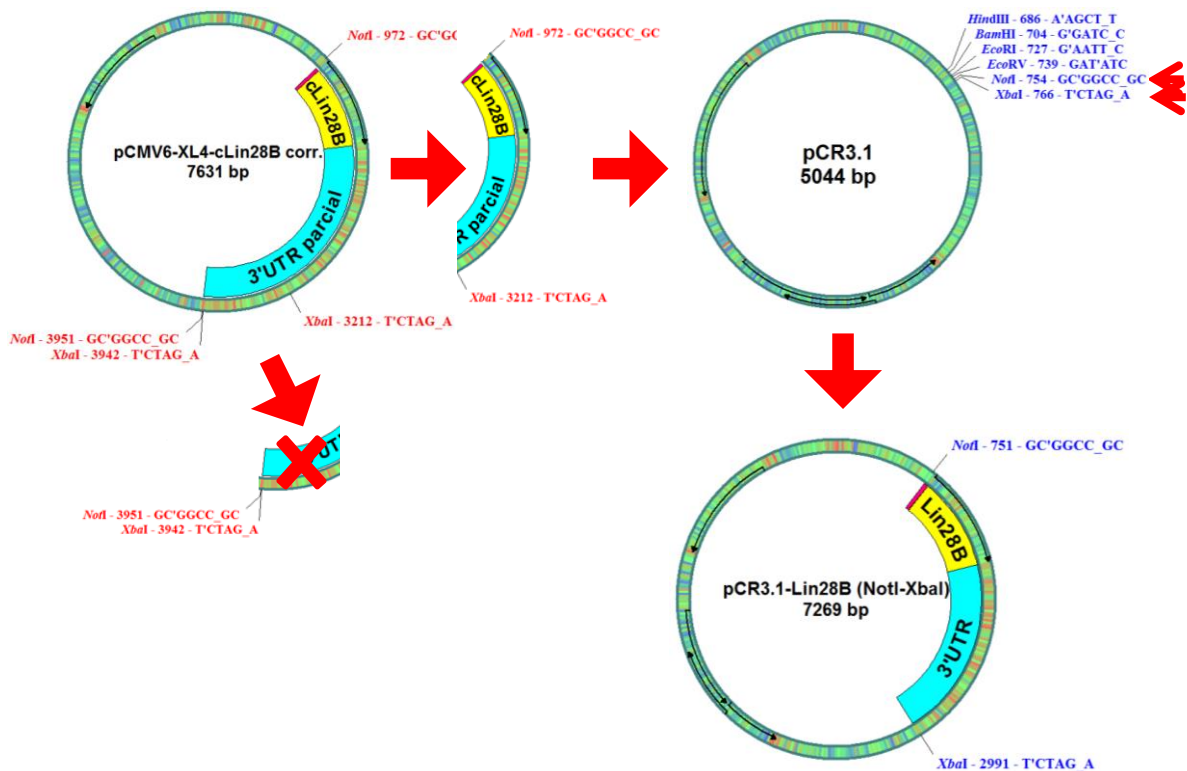


FIGURA 11. ESTRATEGIA PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pCR3.1-LIN28B.

El fragmento NotI-XbaI de pCMV6-XL4-cLin28B se ligó en el plásmido de expresión de eucariotes pCR3.1 digerido con las mismas enzimas utilizando la Ligasa T4 de Invitrogen incubando con Buffer T4 1X de Invitrogen y durante 1h a 37°C en proporción 6:1 (inserto:plásmido). La nueva construcción se nombró pCR3.1-Lin28B.

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CON VECTOR pCR3.1-LIN28B

Para propagar la nueva construcción, se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5 α (F $^-$ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK $^-$, mK $^+$) *phoA supE44* λ^- *thi-1 gyrA96 relA1*) de acuerdo al siguiente protocolo: en un microtubo de 1.5mL se mezclaron 50 μ L de bacterias *E. coli* DH5 α competentes (preparadas con CaCl $_2$ 0.1M y Glicerol estéril) y una cantidad adecuada de la construcción pCR3.1-Lin28B (para este caso el volumen necesario para 1 μ g). La mezcla se incubó 30 min. en hielo, posteriormente se sometió a un choque térmico de 42°C por 2 minutos y finalmente 3 minutos en hielo. A la mezcla se le añadió 1mL de medio líquido SOC (Medio SOB, Glucosa 20mM) y se colocó

en agitación entre 1h y 1.5h a 37°C a aproximadamente 200 rpm. Posteriormente se centrifugó a 12,000x g por 1 minuto y se retiraron 950µL del medio sobrenadante. El botón de células se re-suspendió en el sobrenadante restante y se espatuló en cajas Petri con medio LB sólido suplementado con ampicilina 200µg/mL. El cultivo se incubó entre 16-18hr a 37°C. De las colonias que crecieron, se inocularon en 3mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina 200µg/mL. Los cultivos se incubaron por 16-18 hr a 37°C y aproximadamente 200 rpm.

PURIFICACIÓN DE VECTOR pCR-LIN28B A PARTIR DE CULTIVOS BACTERIANOS

Después de terminar el tiempo de incubación del medio líquido, el cultivo se centrifugó a 12000 g por 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Se adicionaron 300µL de buffer de resuspensión P1 (50M Tris-Cl, pH 8.0, 10mM EDTA, 100µg/mL RNase A) y se mezcló con vórtex hasta homogeneidad, posteriormente se añadieron 300µL de buffer de lisis P2 (200mM NaOH, 1% SDS (w/v)), se mezcló suavemente por inversión para evitar dañar el ADN genómico y disminuir la contaminación por fragmentos rotos y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Después se añadieron 300µL de buffer de neutralización P3 (3.0M Acetato de Potasio, pH 5.5), se mezcló suavemente por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. La mezcla se centrifugó a 12000xg por 5 minutos y el sobrenadante líquido se transfirió a un microtubo de 1.5mL nuevo, cuidando de no transferir precipitado blanco al nuevo tubo. Se adicionaron 750µL de etanol absoluto pre-enfriado y 150µL de acetato de sodio 7.5M a -20°C se dejó precipitando a -20°C al menos 2 horas (para mejores resultados se puede dejar hasta el siguiente día) y se centrifugó a 12000xg por 45 minutos. El sobrenadante se eliminó y se añadieron 500µL de etanol al 70% frío para lavar el botón de ADN con la ayuda de mezclador vórtex. Se volvió a centrifugar a 12000xg por 10 minutos y el sobrenadante se decantó. Se dejó secar completamente el centrifugado de ADN y se le adicionaron 100µL de H₂O libre de nucleasas. El ADN se dejó al menos una hora almacenado a 4°C para que se disolviera libremente y evitar dañar su estructura.

INDUCCIÓN DE EXPRESIÓN DE LIN28B EN BACTERIAS *E. COLI* BL21 (DE3) COMPETENTES

Una vez que la construcción fue purificada, fue transformada en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) (B⁻ *ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB⁺]_{K-12}(λ^S) competentes con el fin de producir proteína LIN28B recombinante y utilizarla como control positivo. La construcción pCR3.1-Lin28B fue transformada en las bacterias utilizando el mismo protocolo que para *E. coli* DH5α. Una vez que se obtuvieron cultivos en agar LB con ampicilina 200μg/mL, se tomó una azada de una de las clonas y se sembró en 3mL de medio LB líquido que contenía ampicilina 200μg/mL entre 16 a 18h a 37°C, en agitación a 150 rpm. Posteriormente, los 3mL se vaciaron a 30mL de medio LB con ampicilina 200μg/mL y se dejaron a 37°C en agitación a 150 rpm durante 1h. Al término de este tiempo se añadió IPTG al medio y se permitió la inducción durante 1.5h a 28°C en agitación a 150rpm. El medio se vació en un tubo cónico de 50mL estéril y se centrifugó a 2,200x g por 30 minutos. Se descartó el sobrenadante y el centrifugado de células se mantuvo en hielo a partir de este momento. Para lisar las bacterias se utilizó un buffer de lisis para bacterias, adicionando 0.5mL directamente sobre la biomasa, se mezcló con la ayuda de una micropunta. Se utilizó un sonicador para lisar los cuerpos de inclusión. Para cuantificar los extractos totales de proteína se utilizó el Kit Pierce *BCA Protein Assay Kit* # 23227 de Thermo Scientific de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El lisado se mantuvo a -20°C hasta su uso. Cabe mencionar que debido a que el gen *lin28b* no se encontraba fusionado a algún péptido de purificación fue necesario utilizar un control negativo, en este caso, bacterias transformadas con la construcción sin inserto, para descartar interacciones secundarias con el anticuerpo. La proteína obtenida con esta metodología se utilizó como control de migración para identificar la proteína LIN28B endógena obtenida de extractos celulares.*

OBTENCIÓN DE RNA PEQUEÑO A PARTIR DE CÉLULAS

Las líneas celulares utilizadas fueron cultivadas de la misma forma que para la obtención de extractos proteínicos. El RNA menor a 200 nt se aisló utilizando un kit comercial Axygen de acuerdo a las instrucciones proporcionadas. El RNA obtenido fue cuantificado utilizando el equipo Nanodrop 2000 de ThermoScientific y se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 19:1, 8%, desnaturizante (Urea 8M, TAE 1x, pH 8.0). Una vez que se comprobó su integridad y concentración, el RNA se mantuvo en agua libre de nucleasas a -20°C hasta su uso.

EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN DE PRE-LET-7 MEDIANTE RT-qPCR

A partir del RNA obtenido, se realizaron retrotranscripciones utilizando la enzima Superscript III (Invitrogen) a 45°C, 30 minutos y después 95°C, 10 minutos para desactivar la enzima. Posteriormente el ADN complementario se usó para realizar PCR cuantitativa en un termociclador RotorGene 3000 (Corbett Research Pty Ltd) utilizando el kit comercial Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Como control de carga se utilizó el gen de RNA ribosomal 5s (45). La siguiente tabla muestra las condiciones de reacción y las secuencias de cebadores específicos utilizados de acuerdo a la literatura (32). (Ver las secuencias en Anexos).

La expresión de precursores se analizó mediante el método de Δ CT usando la expresión del RNA 5s como estándar (44).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las lecturas de CT (ciclo en el que se observa una elevación de la señal de aparición de amplicón por encima del límite mínimo de detección del equipo) de al menos tres repeticiones biológicas de cada pre-let-7 y cada línea celular evaluados se analizaron utilizando la herramienta estadística ANOVA en el programa Minitab 15 para estimar si las réplicas biológicas fueron estadísticamente significativas. Un valor de $P < 0.05$ se consideró significativo. Se utilizó el método de $2^{(-\Delta CT)}$ (44) de para analizar la expresión de precursores de let-7 relativa al RNA ribosomal 5s. La comparación del tipo de línea celular vs. $2^{(-\Delta CT)}$ se analizó por *bootstrap* usando el método de distancia euclidiano y 1000 iteraciones para obtener agrupamientos de acuerdo al nivel de expresión de precursores. Las líneas celulares no se agruparon por este método sino por nivel de malignidad (96).

CORRELACIONES

Utilizando el programa Excel (Microsoft), se usaron los datos de promedio de $2^{(-\Delta CT)}$ de los precursores y promedios de expresión relativa de las proteínas evaluadas para obtener correlaciones lineales y buscar tendencias de comportamiento. Se obtuvo el valor del coeficiente de correlación R mediante una regresión lineal, el cual se tomó como indicativo de factibilidad de la correlación evaluada.

12 RESULTADOS

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PRE-LET-7.

Para analizar los niveles de expresión de varios precursores de let-7, se obtuvo RNA pequeño (menor a 200 nt) de varias líneas celulares tumorales (LCT) con diferente contenido de VPH (SiHa, CaSki, QGH, QGU y HeLa) y líneas celulares inmortales (LCI) (Cx16.2, CxT1 y HKc16E6/E7II). Se utilizaron las líneas celulares C-33A y HaCaT como controles negativos de VPH respectivamente. Un total de ocho precursores de let-7 se analizaron (pre-let-7a-2, pre-let-7a-3, pre-let-7c, pre-let-7e, pre-let-7f-1, pre-let-7g, pre-let-7i and pre-miR-98) como lo indica la Tabla 4, considerando un miRNA let-7 de cada locus. Pre-miR-202 no se tomó en cuenta para este estudio puesto que la organización del precursor es considerablemente diferente a la del resto de los miembros de la familia.

TABLA 4. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE LOS PRECURSORES LET-7 EVALUADOS.

Let-7 Evaluado	Locus	Organización Genómica (Cluster)
hsa-let-7a-2	11	mir-100, let-7a-2
hsa-let-7a-3	22	let-7a-3 , mir-4763, let-7b
hsa-let-7c	21	mir-99a, let-7c
hsa-let-7e	19	mir-99b, let-7e , mir-125a
hsa-let-7f-1	9	let-7a-1, let-7f-1 , let-7d
hsa-let-7g	3	let-7g
hsa-let-7i	12	let-7i
hsa-miR-98	X	let-7f-2, miR-98

Se asumió que el control transcripcional era el mismo para los miRNAs let-7 incluidos en cada *cluster* ya que son expresados como policistrones a partir de un mismo promotor (56). La expresión de cada pre-let-7 se normalizó de manera independiente utilizando como control de carga el rRNA 5s. Se encontró que pre-let-7a-3 y pre-let-7-e tenían una concentración apenas perceptible dentro de todas las líneas celulares evaluadas. Por otro

lado, pre-let-7i presentó mayores niveles en líneas celulares tumorales en comparación con las líneas celulares inmortales. Pre-let-7a-2 y pre-let-7g mostraron niveles diferenciales de expresión en todas las líneas celulares sin tener una relación aparente con el estatus tumoral de las células. Sin embargo, pre-let-7c, pre-let-7f-1 y pre-mir-98 mostraron niveles significativamente altos de expresión en todas las líneas celulares, teniendo pre-let-7f-1 y pre-miR-98 los niveles más altos (Figura 12).

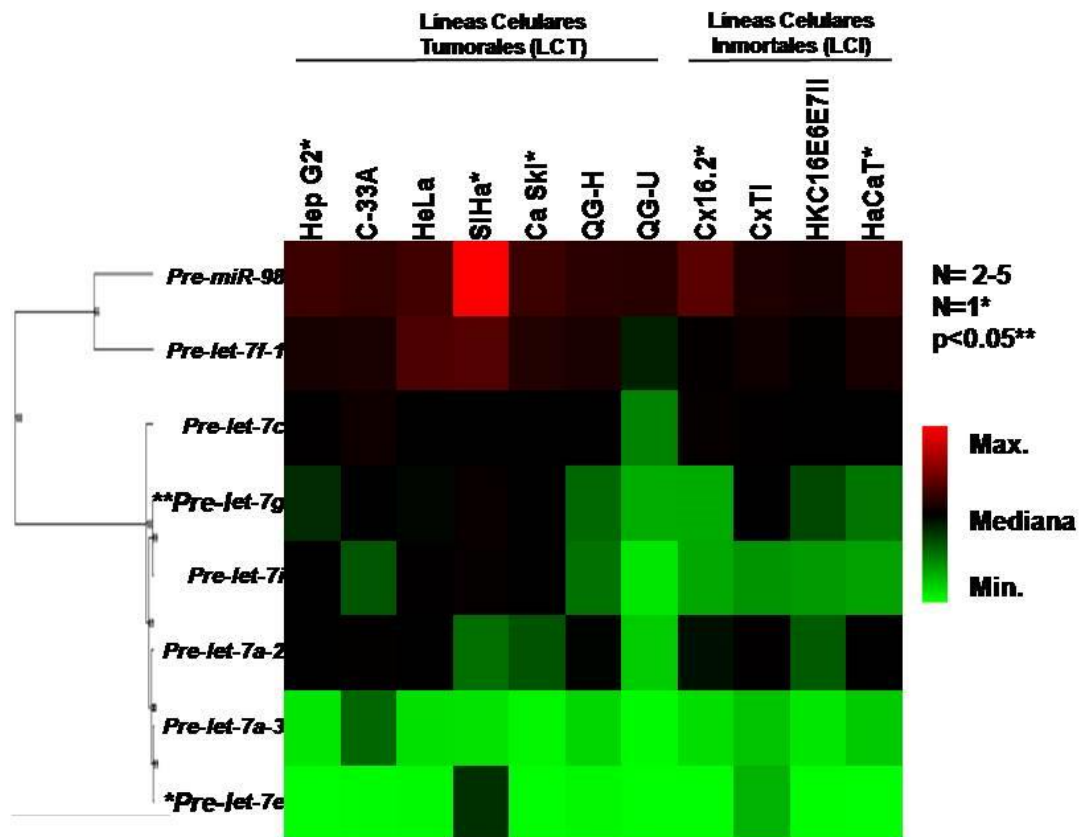


FIGURA 12. NIVELES DE EXPRESIÓN DE PRECURSORES DE LET-7.

Niveles de expresión de los precursores let-7 (pre-let-7) en líneas celulares tumorales (LCT) e inmortales (LCI). Se muestra un mapa de calor en donde las celdas en color representan el promedio de valores $2^{-\Delta CT}$ para los precursores let-7 pre-let-7a-2, pre-let-7a-3, pre-let-7c, pre-let-7e, pre-let-7f-1, pre-let-7g, pre-let-7i and pre-miR-98 (normalizados contra la expresión del rRNA 5s) en las líneas VPH positivas LCT (SiHa, QG-H, QG-U y HeLa); en las LCI (Cx16.2, CxT1 and HKc16E6/E7-II) y en las líneas VPH negativas (C-33A and HaCaT). La línea celular derivada de hepatocarcinoma HepG2 se utilizó como control positivo de expresión de LIN28B. . Rojo indica la expresión más alta, negro representa la mediana y verde la expresión más baja con una N de entre 2 y 5 repeticiones biológicas en la mayoría de los casos. El patrón de

expresión para los pre-let-7 se realizó de acuerdo al agrupamiento jerárquico obtenido en el sitio de internet <http://HEATMAP/heatmap.html>. El patrón de agrupamiento de las líneas celulares se realizó de acuerdo a su estatus de malignidad.

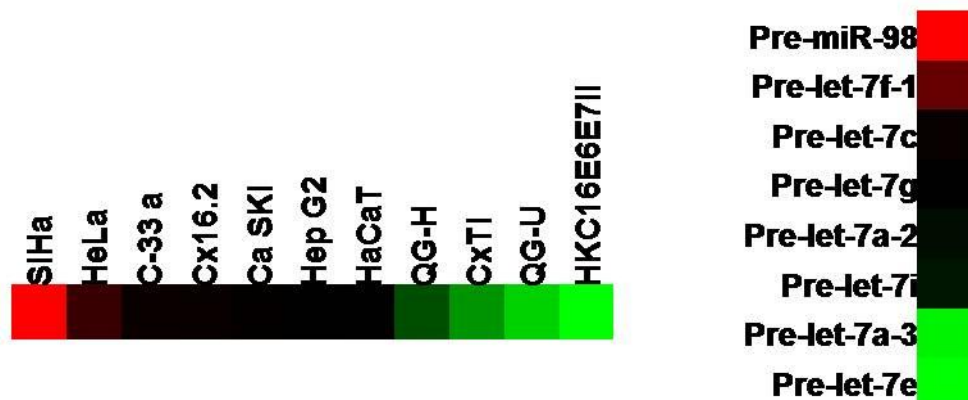


FIGURA 13. AGRUPAMIENTO DE PRE-LET-7 Y LÍNEAS CELULARES DE ACUERDO AL NIVEL DE EXPRESIÓN.

Se realizó una sumatoria de los valores promedio de $2^{-\Delta CT}$ por línea celular y por precursor evaluado. La LCT SiHa resultó ser la línea que expresa la mayor cantidad de precursores let-7 y HKC16E6E7II la que menos expresa. Por otro lado, pre-miR-98 resultó ser el precursor con mayor presencia en las líneas celulares evaluadas y pre-let-7e el menos concentrado.

Asumiendo que todos los miRNAs de la familia let-7 funcionan como supresores de tumor (70,69), se esperaba que el contenido general de ellos fuera menor en células tumorales que en células inmortales. Sin embargo, al sumar los valores de promedios de $2^{-\Delta CT}$ se encontró que el contenido de precursores de let-7 en las líneas celulares QGH, QGU (derivadas de cáncer cérvico-uterino, que contienen VPH 16) y CxT1 y HKC16E6/E7-II (inmortales, que contienen VPH 16) fue mucho menor sin importar su estatus de malignidad y el número de copias de VPH. Más aún, los valores de pre-let-7f-1 y pre-miR-98 se encontraron relativamente altos en todas las líneas celulares evaluadas (Figura 13). Las líneas celulares SiHa, HeLa y C-33A que expresan LIN28B mostraron niveles elevados de algunos precursores de let-7 sin importar el contenido de VPH (Figura 13). Estos resultados sugieren que al menos para algunos precursores de let-7 (pre-let-7f-1 and pre-miR-98) el número de copias de VPH o el nivel de transformación celular no son un factor que altere sus niveles.

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS BLANCOS Y PROTEÍNAS REGULADORAS DE LET-7.

Mediante inmunodetección se evaluaron los blancos validados de let-7 c-MYC y RAS, los cuales son considerados oncogenes (55,34) y las proteínas reguladoras de biogénesis LIN28B y TUT2 (19,26). Se utilizó la proteína β -ACTINA como control de carga. En general se observó mayor nivel de expresión de c-MYC y RAS en líneas celulares tumorales que en líneas celulares inmortales (excepto en la línea celular HaCaT), aun en presencia de los precursores pre-let-7f-1 y pre-miR-98, los cuales contienen la misma región semilla que el resto de los miembros de la familia let-7, específica para ambos oncogenes (Figura 14). Adicionalmente, se usaron los mismos extractos proteicos para evaluar las proteínas LIN28B, la cual es también blanco de let-7 pero a la par participa en la regulación de la biogénesis de let-7 y TUT2, que monouridila a los pre-let-7 del grupo II para que puedan continuar con su biogénesis. TUT2 se expresa significativamente en la mayoría de líneas celulares con VPH 16. Considerando lo anterior, se realizaron correlaciones lineales entre los datos de expresión de los precursores individuales y las proteínas evaluadas en líneas celulares tumorales e inmortales.

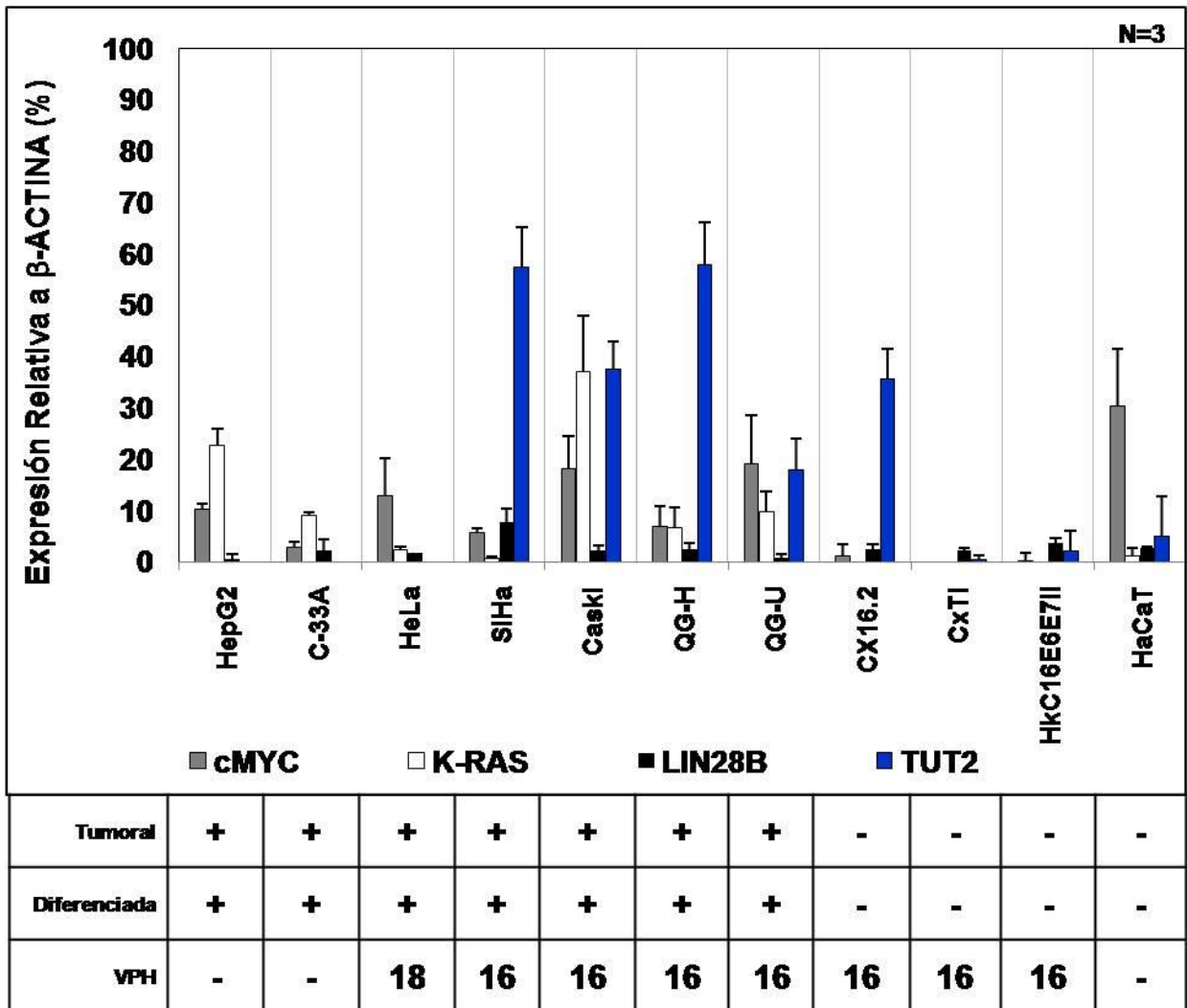


FIGURA 14. NIVELES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS REGULADORAS Y BLANCOS DE LET-7.

Se muestran los niveles de expresión de proteínas involucradas en el circuito regulatorio de let-7 y LIN28B mediante inmunodetección en relación a la expresión de la proteína β -ACTINA. Aun cuando ya se había evaluado LIN28B, se repitió la evaluación en los mismos extractos proteínicos que el resto. Se encontró cierta expresión de LIN28B (barras negras) y en mayor medida en la línea celular tumoral SiHa. C-MYC (p67) se encontró mayormente expresado en LCT y en HaCaT (barras grises). K-RAS (p21) se encontró expresado de igual forma en LTC aunque muy poco en SiHa (barras blancas). Así mismo se evaluó TUT2 y se encontró principalmente en LCT con contenido de VPH16 y en CX16.2 que aunque es VPH16 positiva, se considera línea inmortal (barras azules).

CORRELACIONES ENTRE PROTEINAS EVALUADAS Y PRE-LET-7.

LIN28B muestra una correlación positiva cercana a un valor de R de 1 en líneas celulares tumorales al correlacionarse con la expresión de algunos precursores de let-7 (pre-let-7e, pre-let-7i, pre-let-7g, pre-let-7f-1 y pre-miR-98). Por otro lado algunos otros mostraron un valor de R muy bajo y negativo en este mismo tipo de células (pre-let-7a-3, pre-let-7a-2 y pre-let-7c). La correlación entre LIN28B y la expresión de los precursores evaluados en líneas celulares inmortales fue negativa en más de 0.5 de valor de R, excepto pre-let-7i que mostró un ligero valor R positivo. Lo anterior sugiere que en líneas celulares tumorales se puede presentar la co-expresión de algunos precursores de let-7 y LIN28B aun cuando ambos participan en un circuito de regulación negativo. Por otro lado, al realizar la misma correlación entre la expresión de los precursores let-7 y los blancos RAS y C-MYC, en casi todos los casos se obtuvieron valores de R menores a 0.5 negativos o positivos, excepto para pre-let-7f1 en donde se observaron valores de R positivos cercanos a 1 en líneas celulares inmortales. La Figura 15 muestra un gráfico con los valores R así como un modelo que resume la participación de todos los elementos evaluados en la expresión y regulación de let-7. MYC es un factor de transcripción que puede activar la expresión de LIN28B y al transcrito del grupo let-7a-1/f-1/d al mismo tiempo podría inhibir la expresión de este último (16, 82). Los MRNA de RAS, c-MYC y LIN28B son blancos oncogénicos validados de let-7. Sin embargo, aunque las correlaciones no muestran tendencias, en la Figura 14 se muestra que existe expresión de estas proteínas principalmente en las LCT aun en presencia de algunos precursores, específicamente pre-miR-98 y en menor medida pre-let-7f-1 (ver Figura 12).

El mismo tratamiento se realizó para correlacionar la expresión de precursores de let-7 y la proteína TUT2 que mono-uridila a los pre-let-7 del grupo II. La Figura 16 muestra los valores de R de esta correlación entre los pre-let-7 evaluados y TUT2. Se observan algunas correlaciones positivas entre la proteína y algunos pre-let-7 del grupo II como pre-let-7i, pre-

let-7g, pre-miR-98 en células tumorales y pre-miR-98 en líneas celulares inmortalas. Estos resultados no muestran una tendencia aparente.

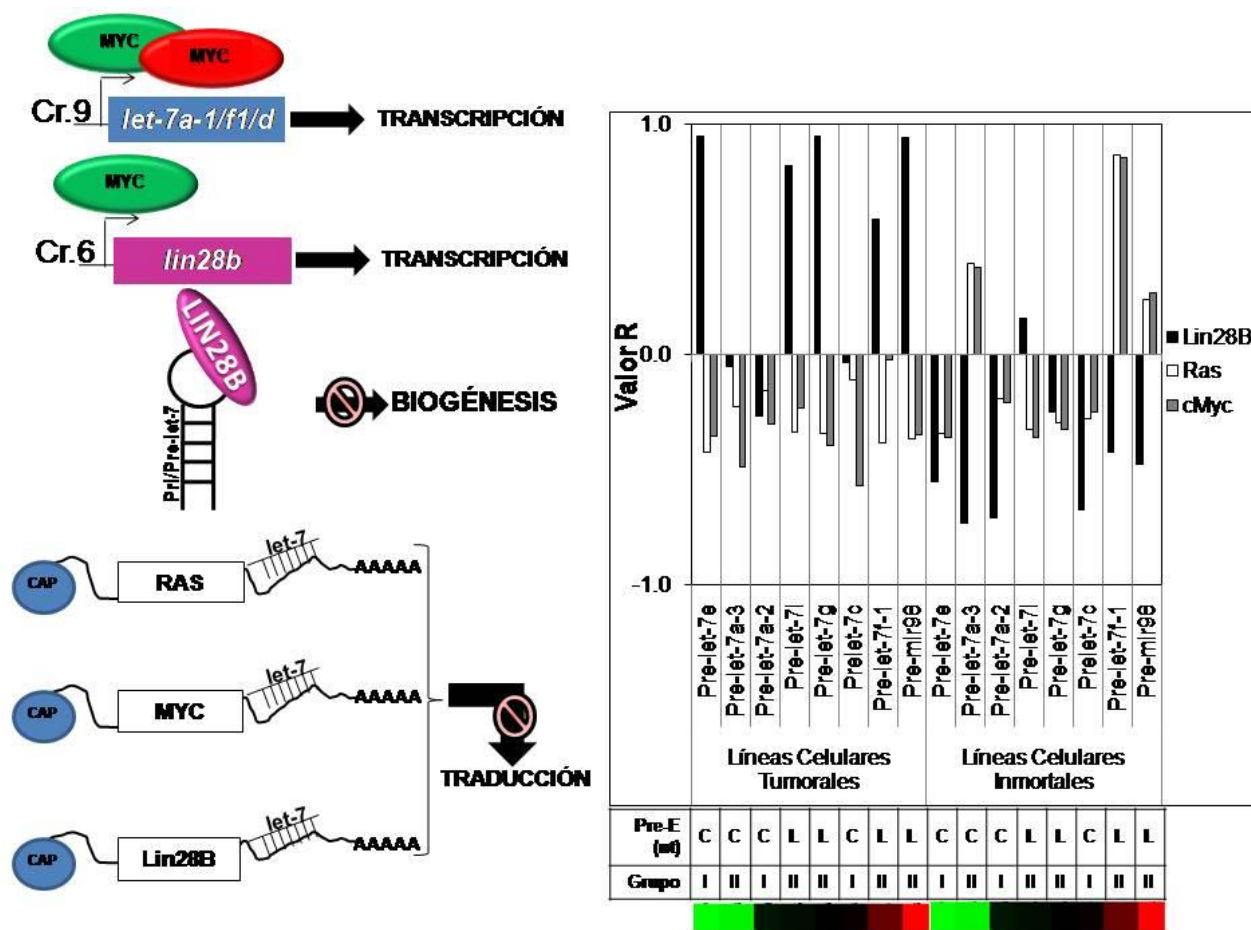


FIGURA 15. CORRELACIÓN LINEAL ENTRE PRECURSORES DE LET-7 Y LOS BLANCOS ONCOGÉNICOS VALIDADOS LIN28B, RAS Y C-MYC.

Se realizó una correlación lineal entre los valores de $2^{-\Delta CT}$ y expresión proteínica de los blancos de let-7. Aunque es claro que existe expresión de proteínas blanco en líneas celulares donde hay presencia de precursores de let-7, en general, las correlaciones entre let-7 y RAS y c-MYC no indican una tendencia aparente aunque sería necesario analizar cada caso. En cambio la correlación entre LIN28B y los precursores de let-7 muestra una clara tendencia hacia un comportamiento diferencial entre LCT y LCI, teniendo valores de R cercanos a 1 al correlacionarse en su mayoría con precursores con un pre-elemento largo (pre-let-7i, pre-let-7g, pre-let-7f-1y pre-miR-98) en líneas celulares tumorales. El modelo muestra la participación de las proteínas evaluadas en el circuito regulatorio de let-7.

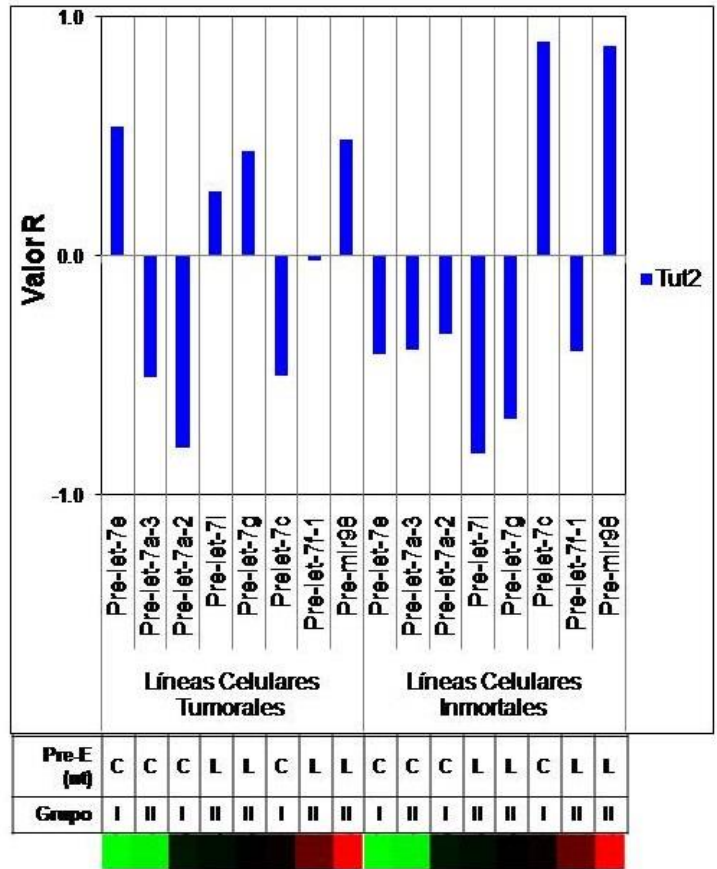
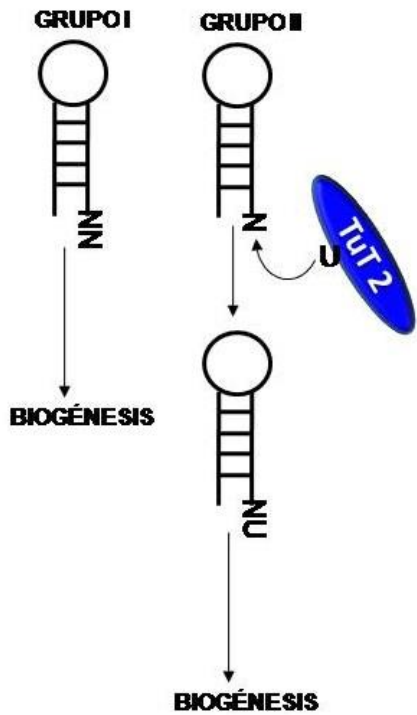


FIGURA 16. CORRELACIÓN LINEAL ENTRE PRECURSORES DE LET-7 Y TUT2.

Se realizó una correlación lineal entre los valores de $2^{(-\Delta CT)}$ y expresión proteínica de TUT2. No se observó ninguna relación lineal aparente entre la expresión de esta proteína y el grupo al que pertenecen los precusores evaluados, la longitud del tallo del pre-E o el grado de malignidad de las células. El modelo muestra la participación de las proteínas evaluadas en el circuito regulatorio de let-7.

13 DISCUSIÓN

En este estudio, se analizaron los niveles de expresión de los pre-miRNAs let-7 humanos y la proteína LIN28B en varias líneas celulares de cáncer cérvico-uterino con diferente malignidad y contenido de VPH. Se observó un nivel pre-let-7 diferencial entre líneas celulares tumorales e inmortales, donde la concentración global de precursores let-7 aumentó en líneas tumorales. Es difícil llegar a un acuerdo absoluto sobre los niveles de expresión de let-7 en el cáncer cérvico-uterino, probablemente debido a la variabilidad de las muestras y las condiciones experimentales utilizadas. Un estudio previo que comparaba los transcriptomas de miRNA del tejido cervical normal y las líneas de células tumorales mediante secuenciación y de *Northern blot* encontró baja expresión en las líneas celulares de cáncer cervical de miRNAs maduros de let-7-a, let-7b, let-7c y let-7d. En contraste, let-7e, let-7f, let-7g y let-7i aparecieron diferencialmente expresados en ambos tipos de células, independientemente de su malignidad (47). Otro estudio que utilizó un método de análisis de una matriz de diversos miRNAs maduros mediante RT-qPCR y que comparó muestras clínicas de tejidos normales y tumorales mostró que las células tumorales expresaban let-7e, let-7i y let-7g. Let-7d y let-7b mostraron un patrón de expresión indistinto en tejido normal y tumoral (37).

Ninguno de los estudios anteriores mencionó cuál era el nivel de expresión LIN28A / LIN28B dentro de sus muestras. Sin embargo, la expresión diferencial entre las versiones de let-7 parece independiente del estado de malignidad de la célula, aunque probablemente se vincule a mecanismos reguladores dependientes de la secuencia o de cambios estructurales. Se han descrito dos polimorfismos potencialmente funcionales dentro de los promotores de la familia let-7 de humanos: rs10877887 a -286 pb del sitio de inicio de la transcripción de let-7i en el cromosoma 12 y rs13293512 a -8496 pb del sitio de inicio de la transcripción del clúster let-7a-1 / let-7f-1 / let-7d en el cromosoma 9 (85). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles let-7d y let-7f-1 entre tejidos de carcinoma de células escamosas cervicales y tejidos normales adyacentes y ninguna asociación correlacionó rs13293512 con niveles de let-7a en tejidos tumorales y

adyacentes. Sólo rs10877887 mostró un nivel más bajo de let-7i en los tejidos tumorales, pero no en los tejidos normales adyacentes (43). En nuestro análisis de RT-qPCR, los niveles pre-let-7f-1 fueron generalmente más altos que los niveles pre-let-7i en todas las líneas celulares probadas, sugiriendo que las variaciones observadas reflejan el procesamiento diferencial en lugar de la expresión diferencial (Figura 12).

Se realizó un alineamiento de secuencia de todos los 12 precursores de let-7 humano con respecto a los cuatro dominios distintivos pre-E: los conocidos sitios CSD (localizado en la burbuja del pre-E) y CCHC12 (localizado en el bulto del pre-E), un solo dominio 5' del tallo del pre-E localizado previamente al CSD y un dominio complementario del extremo 3' del tallo del pre-E localizado entre la burbuja del pre-E y el bulto del pre-E (Tabla 5). Estos dominios complementarios permiten la formación de un tallo en el pre-E que puede facilitar la interacción con el CSD de LIN28A (y probablemente LIN28B) a través de la secuencia de acoplamiento 5'-NGNGAY-3' encontrada dentro de la burbuja del pre-E (52). Los precursores de let-7a-2, let-7e, let-7c, let-7a-3, let-7f-2 y let-7a-1 (que tienen un tallo del pre-E de menos de 30nt), carecen de la región 5' del tallo, rica en G. Por el contrario, los precursores de let-7b, let-7d, let-7f-1, let-7i, let-7g y miR-98 (con un tallo del pre-E de más de 30nt) contienen tanto el dominio 5' como 3'. (Tabla 5). Un análisis estructural bidimensional *in silico* de los 12 precursores de let-7 mostró que en la región del pre-E el emparejamiento de residuos G con residuos U y C dentro de la región rica en C permite la formación de una burbuja más amplia que el formado por pre-E de los precursores de let-7 de tallo corto (Ver estructuras en Anexos). Así, los tallos de la región pre-E de let-7 cortos forman una estructura con un bucle más pequeño y menos accesible para la vinculación LIN28. Otro informe mostró que hsa-pre-let-7a-3 y mmu-pre-let-7c-2, ambos con tallo del pre-E corto no interactuaron de la misma manera con LIN28A / LIN28B que el resto del precursores let-7 (75).

Por otra parte, la estructura predicha de pre-let-7a-3 mostró que el sitio de acoplamiento de CSD está completamente emparejado con la región rica en citosinas, lo que puede explicar en parte el escape de la interacción con LIN28A reportado en dicho estudio (75). La estructura predicha de otros pre-let-7's con tallos del pre-E cortos como pre-let-7c y pre-let-

7a-2 mostraron un sitio de acoplamiento CSD más accesible con emparejamientos débiles que permitirían cierta interacción con LIN28A y LIN28B, lo que también explica los resultados obtenidos en este trabajo, donde observamos una expresión media de dichos precursores. Por lo tanto, los precursores let-7 que contienen tallos del pre-E largos, pueden tener una interacción más fuerte con LIN28B porque la burbuja del pre-E es más ancha, lo que permite una unión más estable con el dominio CSD de LIN28 y posiblemente una velocidad de procesamiento en la biogénesis más lenta que promovería la acumulación en la célula y adicionalmente podría permitir la degradación mediada por alguna enzima uridiltransferasa. Los precursores de let-7 con pre-E cortos tendrían una interacción más débil con LIN28B y podrían procesarse rápidamente en un miRNA maduro o incluso pasar por alto la interacción con la proteína LIN28B (Figura 17).

Un estudio que mostró que en la interacción molecular entre LIN28A y let-7, aparentemente LIN28A se acopla primero con la secuencia 5'-NGNGAY-3' dentro del tallo del pre-E, reorganiza la estructura del precursor y luego interactúa con los sitios CCHC12 (48). Por lo tanto, un tallo del pre-E corto podría obstaculizar de manera efectiva el acoplamiento inicial al estrechar la burbuja del pre-E resultando en una configuración menos estable. Estudios adicionales también proporcionan datos de afinidad entre los precursores let-7 y LIN28A, utilizando principalmente pre-let-7g (con un tallo de pre-E largo). Bajo condiciones de interacción similares, pre-let-7f-1, pre-let-7d y pre-let-7g (de tallos de pre-E largos) tienen mayor afinidad por LIN28A que otros precursores con pre-E cortos (let-7a-1, let-7a-2, let-7c y let-7f-2) (14,53). Un reporte donde se analiza de manera bioinformática la interacción recientemente concluyó que la estructura de la pre-E es más importante para el reconocimiento LIN28A que la secuencia (66), aunque la relevancia de la longitud y secuencia del tallo del pre-E de los precursores de let-7 para la interacción con LIN28B no se ha abordado experimentalmente. Análisis adicionales en los niveles maduros de los miRNAs let-7 permitirán la correlación funcional con el estado pre-let-7.

TABLA 5. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE PRECURSORES DE LET-7 HUMANO REACOMODANDO LAS SECUENCIAS DE PRE-ELEMENTO.

	5P TALLO	PRE-ELEMENTO			3P TALLO	
	SECUENCIA SEMILLA	5' pre-E TALLO	Pre-E BURBUJA	3' pre-E TALLO	pre-E BULTO	
Pre-let-7a-2	GGUUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU		UAGAAUAC	AUCAA	GGGAGAU	AACUGUACAGCCUCCUAGCUUUCCU
Pre-let-7e	GGCUGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUUGA		GGAGGA	CACCCA	AGGAGA	UCACUAUACGGCCUCCUAGCUUUCCC
Pre-let-7c	GGUUGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU		UAGAGUUA	CACCCU	GGGAGUU	AACUGUACAACCUUCUAGCUUUCCU
Pre-let-7a-3	GGGUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU		UGGGGCUCU	GCCCCUCU	AUGGGAU	AACUAUACAAUCUACUGUCUUUCCU
Pre-let-7f-2	GGAUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	U	UAGGGUCAU	ACCCCAUCU	UGGAGAU	AACUAUACAGUCUACUGUCUUUCCC
Pre-let-7a-1	GGAUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	U	UAGGGUCAC	ACCCACCACU	GGGAGAU	AACUAUACAAUCUACUGUCUUUCCU
Pre-let-7b	GGGUGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	UCAGGGC	AGUGAUGUU	GCCCCUC	GGAAGAU	AACUAUACAACCUACUGCCUCCCUG
Pre-let-7d	GGAAGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	UUAGGGC	AGGGAUUUU	GCCCCACA	AGGAGGU	AACUAUACGACCUGCUGCCUUUCUU
Pre-let-7f-1	GAGUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUGU	GGGGU	AGUGAUUUU	ACCCUGUUC	AGGAG	AUAACUAUACAACUUAUUGCCUCCC
Pre-let-7i	GGCUGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU	GGUCGGU	UGUGACAUU	GCCCCCUG	UGGAGAU	AACUGCGCAAGCUACUGCCUUGCUA
Pre-let-7g	GGCUGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	UGAGGGUC	UAUGAUACC	ACCCGGUAC	AGGAGAU	AACUGUACAGGCCACUGCCUUGCCA
Pre-miR-98	GGGUGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUUG	UGGGGU	AGGGAUUUU	AGCCCCAAU	AGAAGA	UAACUAUACAACUACUACUUUCCC
Consenso			NGNGAY		NGNNG	

Las secuencias se alinearon utilizando CLUSTALW y posteriormente se re-acomodaron de forma relativa al pre-elemento (pre-E). Cada secuencia está dividida en tres secciones, el tallo del extremo 5' (5P) que incluye a la región semilla (subrayada), el pre-elemento (pre-E) y el tallo del extremo 3' (3P). El pre-E fue dividido posteriormente en cuatro sub-secciones: la región rica en G que corresponde al extremo 5' del tallo del pre-E, el sitio sugerido de unión al CSD (sombreado en gris) localizado en la burbuja del pre-elemento, la región rica en C que se encuentra en extremo 3' del tallo del pre-elemento y el bulto del pre-E en donde se localiza la región de interacción con los dominios ZNF12 (sombreada en gris). Las bases complementarias en el tallo del pre-E de acuerdo a la predicción de estructura secundaria se encuentran en negritas. Algunas secuencias están cortadas del lado 5' y/o 3' para mostrar únicamente los dominios de interés. Ver las estructuras predichas en los Anexos.

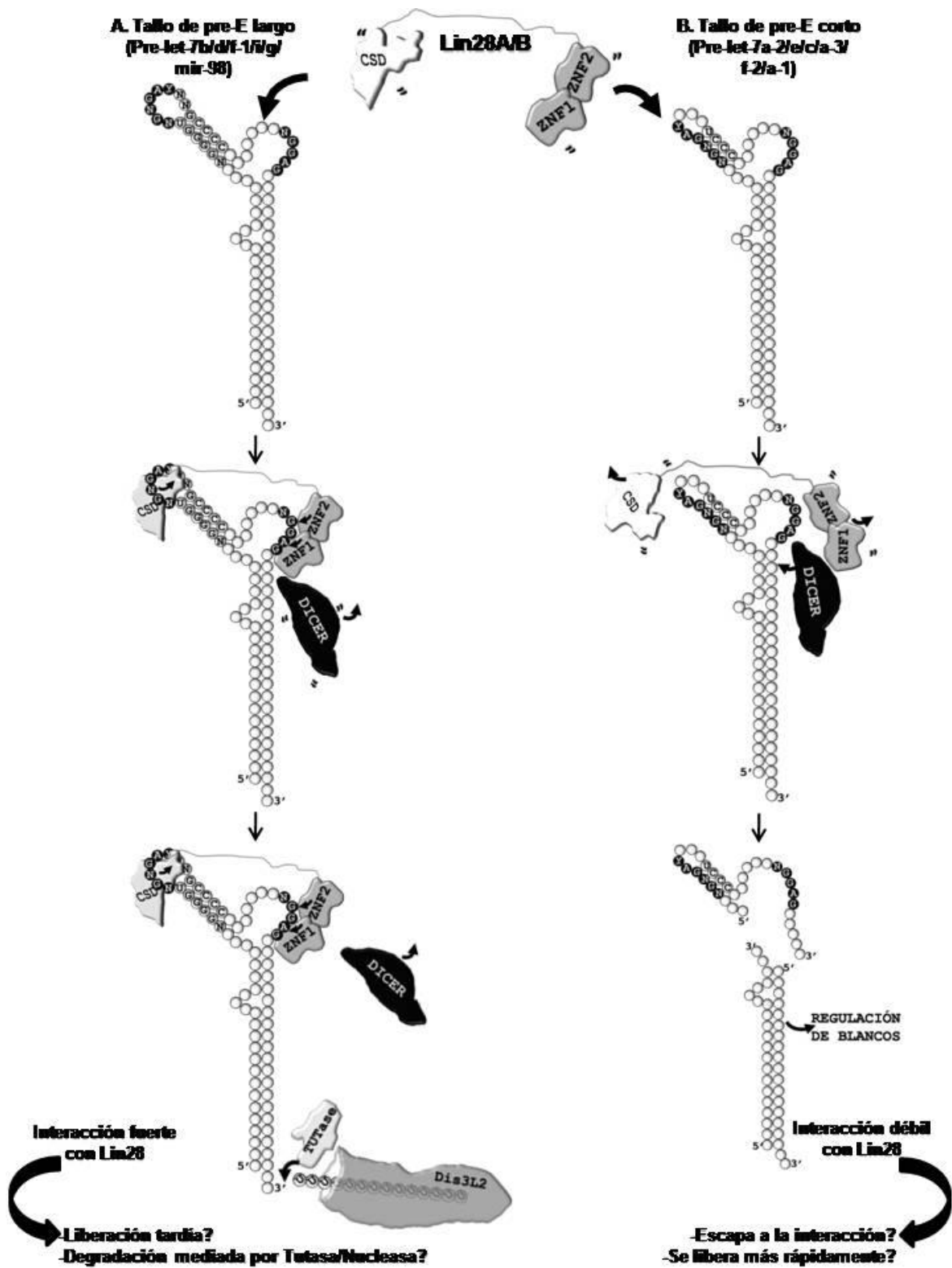


FIGURA 17. MODELO DE INTERACCIÓN ENTRE LOS PRE-E CORTOS Y LARGOS PRE-LET-7 CON LOS HOMÓLOGOS LIN28.

Este modelo propone que las diferencias en la longitud del tallo del pre-E de los precursores de let-7 tiene un impacto en su interacción con las proteínas LIN28. Los precursores con tallos del pre-E cortos no toman la estructura que se ha reportado como ideal para interactuar con LIN28 por lo que podría escapar a su regulación y continuar con su biogénesis y regular a sus blancos. Por otro lado los tallos de pre-E largos, adquieren la estructura ideal para interactuar con los homólogos reguladores LIN28 y de esta forma podrían retrasar su procesamiento hacia miRNAs maduros o incluso ser degradados.

14 CONCLUSIONES

LET-7

- Hay una expresión diferencial de los 8 pre-let-7 evaluados entre líneas tumorigénicas e inmortales.
- Las líneas tumorigénicas presentan mayor expresión en general de pre-let-7, exceptuando QG-H y QG-U.
- Pre-let-7f-1 y pre-miR-98 se observan sobre-expresados en todas las líneas celulares evaluadas. La expresión de pre-miR-98 es la más elevada de los let-7 analizados.
- Pre-let-7c tienen una expresión media en todas las líneas excepto en QG-U que es baja.
- Pre-let-7g y pre-let-7i tienen una expresión diferencial y se observan mayormente expresados en líneas tumorigénicas.
- Pre-let-7a-2 presenta una expresión más indistinta entre líneas tumorales e inmortales.
- Pre-let-7a-3 y pre-let-7e presentan expresión baja en todas las líneas evaluadas.

LIN28A, LIN28B, CMYC, RAS, TUTasa 2

- Lin28A no se expresa de manera significativa en las líneas celulares evaluadas.
- Lin28B presenta una cierta expresión en todas las líneas celulares evaluadas, siendo más elevada en líneas celulares tumorigénicas.
- C-MYC y RAS se expresan principalmente en líneas tumorigénicas, aunque se observa una expresión importante de c-MYC en HaCaT (queratinocitos inmortales).
- TUTasa 2 se expresa principalmente en SiHa, CasKi, QG-H, QG-U y Cx16.2 que aunque tienen diferente grado de malignidad, contienen VPH-16.

CORRELACIONES

- Lin28B se co-expresa con pre-let-7e / i / g / f1 y pre-miR98 que son pre-let-7 con un pre-elemento largo excepto pre-let-7e en líneas tumorales.
- En algunas líneas tumorales como HepG2, CasKi y QG-U se observa co-expresión de algunos pre-let-7 (f1, miR98) con sus blancos RAS y c-MYC; así como también en la línea inmortal HaCaT.
- No se observa correlación entre la expresión de la uridil-transferasa TUTasa 2 y el grupo II de let-7 posiblemente porque pueden existir otras transferasas como la TUTasa 4 y 7 que realizan la misma función de monouridilación.
- No se observa correlación entre el patrón de expresión de pre-let-7 y el contenido de VPH en las células.

CONCLUSIÓN GENERAL

- SE ENCONTRÓ QUE LOS PRECURSORES DE MIRNAS DE LA FAMILIA LET-7 TIENE ESTRUCTURACIÓN DIFERENCIAL EN EL DOMINIO DEL PRE-E. DICHA ESTRUCTURA PODRÍA INTERFERIR EN LA INTERACCIÓN ENTRE LIN28 Y PRE-LET-7. LOS MIRNAS DE LA FAMILIA LET-7 NO SON REGULADOS DE LA MISMA FORMA POR LIN28B, PRESUMIBLEMENTE DEBIDO A LAS DIFERENCIAS EN LA ESTRUCTURA DEL PRECURSOR.

15 PERSPECTIVAS

Se sugiere investigar los siguientes aspectos para determinar el por qué de las diferencias observadas con respecto a resultados reportados en estudios anteriores:

- Evaluar la relación entre la longitud del tallo del pre-E y la afinidad a LIN28.
- Determinar si existe una regulación a nivel transcripcional para la expresión de los miRNAs evaluados.
- Determinar si los precursores poco expresados (pre-let-7a-3/e) están regulados negativamente durante su expresión.
- Determinar si los precursores con una expresión media o diferencial (pre-let-7a-2/c/i/g) tienen una regulación diferencial entre los distintos tipos de células evaluadas ya sea por el nivel de malignidad o por su contenido de VPH o incluso tipo de célula.
- Determinar si existe sobre-expresión de los precursores encontrados en todas las líneas celulares (pre-let-7f-1, pre-miR-98).
- Determinar si existen polimorfismos en los sitios de regulación o de codificación de los miRNAs evaluados.
- Determinar si existen mutaciones en la proteína LIN28 o en las estructuras de los precursores esporádicas o inherentes al tipo de células, malignidad o contenido de VPH que modifiquen la afinidad entre los precursores y la proteína.
- Determinar si existen mutaciones dentro de la región semilla de los miRNAs evaluados o el sitio blanco de los MRNA regulados que sean esporádicas o inherentes al tipo de células, malignidad o contenido de VPH que modifiquen la expresión de las proteínas blanco.
- Determinar si existen pseudogenes o lncRNA que funcionen como esponjas que atrapen a los miRNAs let-7 que logren terminar su biogénesis y que eviten que estos regulen a sus proteínas blanco.
- Determinar si existe una relación real entre el contenido de VPH tipo 16 en las células evaluadas y con la sobre-expresión de TUT2 en las células que lo contienen y su efecto en la biogénesis del Grupo II de miRNAs let-7.

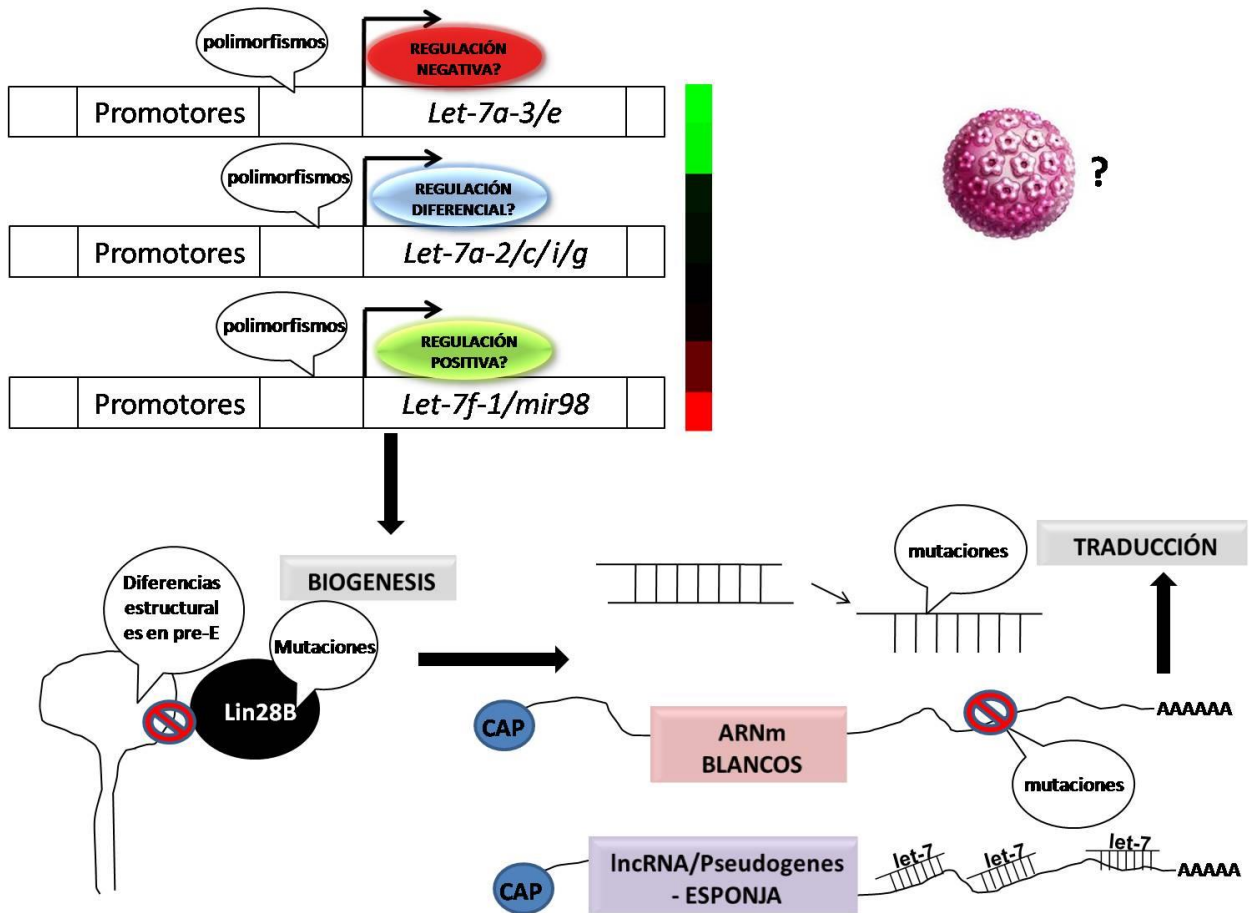


FIGURA 18. PERSPECTIVAS. MECANISMOS A EVALUAR.

El modelo agrupa las diferentes variables que podrían estar evitando que los miRNAs de la familia *let-7* expresados puedan disminuir la expresión de sus genes blanco y que podrían favorecer la transformación a un fenotipo tumoral en células epiteliales derivadas de cáncer cervical.

16 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez-Salas LM, et.al. (1999) Growth inhibition of cervical tumor cells by antisense oligodeoxynucleotides directed to the human papillomavirus type 16 E6 gene. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 9, 441-50.
2. Bartel DP. (2004) MiRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-97.
3. Bracht J, et.al. (2004) Trans-splicing and polyadenylation of let-7 miRNA primary transcripts. *RNA* 10, 1586-94.
4. Boukamp P, et.al. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J.Cell Biol.* 106, 761-71.
5. Boyerinas B, et.al. (2010) The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr.Relat Cancer.* 17, F19-F36.
6. Cai, Y., et.al. (2009) A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 7 (4), 147-154.
7. Calin, G., et.al. (2003) Human miRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *PNAS* 101 (9), 2999-3004.
8. Chang HM, et.al. (2013) A role for the Perlman syndrome exonuclease Dis3l2 in the Lin28-let-7 pathway. *Nature* 497, 244-248.
9. Chang, Tsung-Cheng, et.al. (2009) Lin-28B transactivation is necessary for Myc-mediated let-7 repression and proliferation. *PNAS* 106, 3384-3389.
10. Chendrimada TP, et.al. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for miRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740-744.
11. Cho, William. (2007) OncomiRs: the discovery and progress of miRNAs in cancers. *Molecular Cancer* 6:60.
12. Darr, H., et.al. (2009) Genetic Analysis of the Role of the Reprogramming Gene LIN-28 in Human Embryonic. *Stem Cells* 27, 352-362.
13. Denli AM, et.al. (2004) Processing of primary miRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432, 231-235.

-
14. Desjardins A, et.al. (2012) Importance of the NCp7-like domain in the recognition of pre-let-7g by the pluripotency factor Lin28. *NAR* 40, 1767-1777.
 15. Elsebet, L., et.al. (2004) Nuclear Export of MiRNA Precursors. *Science* 303, 95-98.
 16. Gaeta, Xavier., et.al. (2016) Defining Transcriptional Regulatory Mechanisms for Primary let-7 miRNAs. *PLoS ONE* 12(1).
 17. Gregory RI, et.al. (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of miRNAs. *Nature* 4, 235-240.
 18. Griffiths-Jones, Sam, et.al. (2006) miRBase: miRNA sequences, targets and gene nomenclature. *NAR* 34, 140-144.
 19. Guo, Y., et.al. (2006) Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. *Gene* 384, 51-61.
 20. Ha M, (.2014) Regulation of miRNA biogenesis. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 15, 509-524.
 21. Hagan JP, et.al. (2009) Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 16, 1021-1025.
 22. Hammond, Scott M. (2006) MiRNAs as oncogenes. *Current Opinion in Genetics & Development* 16, 4-9.
 23. Hellner K, et.al. (2011) Human papillomaviruses as therapeutic targets in human cancer. *J.Clin.Oncol.* 29, 1785-1794.
 24. Heo, I., et.al. (2008) Lin28 Mediates the Terminal Uridylation of let-7 Precursor MiRNA. *Molecular Cell* 32, 276-284.
 25. Heo, I., et.al. (2009) TUT4 in Concert with Lin28 Suppresses MiRNA Biogenesis through Pre-MiRNA Uridylation. *Molecular Cell* 138, 696-708.
 26. Heo I, et.al. (2012) Mono-uridylation of pre-miRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 miRNAs. *Cell.* 151, 521-532.
 27. Horvitz HR, et.al. (1980) Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 96, 4354.
 28. Hu, X., et.al. (2010) A MiRNA Expression Signature for Cervical Cancer Prognosis. *Cancer Research* 70 (4), 1441-1448.
 29. Hutvagner G, et.al. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science.* 293, 834-838.

-
30. Hwang, H-W. et.al. (2006) MiRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *BJCancer* 94(6), 776-780.
 31. Iliopoulos D, et.al. (2009) An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MiRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell*. 139, 693-706.
 32. Jiang J, et.al. (2005) Real-time expresión profiling of miRNA precursors in human cancer cell lines. *NAR*. 33, 5394-5403.
 33. Johnson SM et al. (2005) RAS is regulated by the let-7 miRNA family. *Cell*. 120, 635-47.
 34. Keane M, et.al. (2013) MYCN/LIN28B/Let-7/HMGA2 pathway implicated by meta-analysis of GWAS in suppression of post-natal proliferation thereby potentially contributing to aging. *Mech.Ageing Dev*. 134, 346-348.
 35. Landthaler M, et.al. (2004) The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr.Biol*. 14, 2162-7.
 36. Lee, Housuk et.al. (2016) Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein & Cell*. 7(2): 100-113.
 37. Lee JW et. al.(2008) Altered MiRNA expresión in cervical carcinomas. *Clin.Cancer Res*. 14, 2535-2542.
 38. Lee Y et al. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates miRNA processing. *Nature*. 425, 415-409.
 39. Lee, Yong Sun, et.al. (2007) The tumor suppressor miRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes & Dev*. 21, 1025-1030.
 40. Lewis BP, et.al. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are miRNA targets. *Cell*. 120, 15-20.
 41. Liang, Linhui, et.al. (2010) MiRNA-125b Suppressed human liver cancer cell proliferation and metastasis by directly targeting oncogene *LIN28B*. *Hepatology* 52 (5), 1731-1740.
 42. Lim LP, et.al. (2005) Microarray analysis shows that some miRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769-773.
 43. Liu J, et.al. (2018) Association between genetic polymorphisms in the promoters of let-7 and risk of cervical squamous cell carcinoma. *Gene*. 642, 256-260.

-
44. Livak KJ, et.al. (2001) Analysis of relative gene expresi3n data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25, 402-408.
 45. Lopez JA, et.al. Differential effects of miR-34c-3p and miR-34c-5p on SiHa cells proliferation apoptosis, migration and invasion. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 409, 513-9.
 46. Loughlin FE, et.al. (2011) Structural basis of pre-let-7 miRNA recognition by the zinc knuckles of pluripotency factor Lin28. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 19, 84-89.
 47. Lui WO, et.al. (2007) Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res.* 67, 6031-6043.
 48. Mayr F, et.al. (2013) Mechanisms of Lin28-mediated miRNA and mRNA regulation- -a structural and functional perspective. *Int.J.Mol.Sci.* 14, 16532-16553.
 49. Michlewski G, et.al. (2010) Antagonistic role of hnRNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 17, 1011-1008.
 50. Moss, E., et.al. (1997) The Cold Shock Domain Protein LIN-28 Controls Developmental Timing in *C. elegans* and Is Regulated by the *lin-4* RNA. *Cell* 88, 637-646.
 51. Moss, Eric G., et.al. (2003) Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and miRNA complementary sites. *Developmental Biology* 258, 432-442.
 52. Nam Y, et.al. (2011). Molecular basis for interaction of let-7 miRNAs with Lin28. *Cell.* 147, 1080-1091.
 53. Newman MA, et.al. (2008) Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated miRNA processing. *RNA* 14, 1539-1549.
 54. Nobbenhuis MA, et.al. (2001) Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet.* 358, 1782-1783.
 55. Oh JS, et.al. (2010) Lin28-let7 modulates radiosensitivity of human cancer cells with activation of K-Ras. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 76, 5-8.
 56. Pasquinelli AE, et al. (2000) Conservation of the sequence and temporal expresi3n of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 408, 86-89.

-
57. Pereira, P., et.al. (2010) MiRNA Expresión Variability in Human Cervical Tissues. *PlosOne* 5 (7), 12.
 58. Piskounova, Elena, et.al. (2008) Determinants of miRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28. *Journal of Biological Chemistry* 283, 21310-21314.
 59. Poleskaya, A., et.al. (2007) Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. *Genes* 21, 1125-1138.
 60. Reinhart BJ, et.al. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403, 901-906.
 61. Reshmi G, et.al. (2008) Beyond HPV: oncomirs as new players in cervical cancer. *FEBS Lett.* 582, 4113-4116.
 62. Rybak A, et.al. (2008) A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat.Cell Biol.* 10, 987-993.
 63. Sampson VB, et.al. (2007) MiRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* 67, 9762-9770.
 64. Sand, Micheal, et.al. (2009) MiRNAs and the skin: Tiny players in the body's largest organ. *Journal of Dermatological Science* 53, 169-175.
 65. Schultz J, et.al. MiRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth. *Cell Res.* 18, 549-57.
 66. Sharma C, et.al. (2017) Molecular Dynamics Simulations for Deciphering the Structural Basis of Recognition of Pre-let-7 miRNAs by LIN28. *Biochemistry.* 56, 723-735.
 67. Shirasawa H, et.al. (1987) Integration and transcription of human papillomavirus type 16 and 18 sequences in cell lines derived from cervical carcinomas. *J.Gen.Virol.* 68, 583-591.
 68. Shyh-Chang N, et.al. (2013) Lin28: primal regulator of growth and metabolism in stem cells. *Cell Stem Cell.* 12, 395-406.
 69. Su JL, et.al.(2012) Function and regulation of let-7 family miRNAs. *MiRNA.* 1, 34-39.
 70. Sun X, et.al. (2016) The insights of Let-7 miRNAs in oncogenesis and stem cell potency. *J.Cell Mol.Med.* 20, 1779-1788.

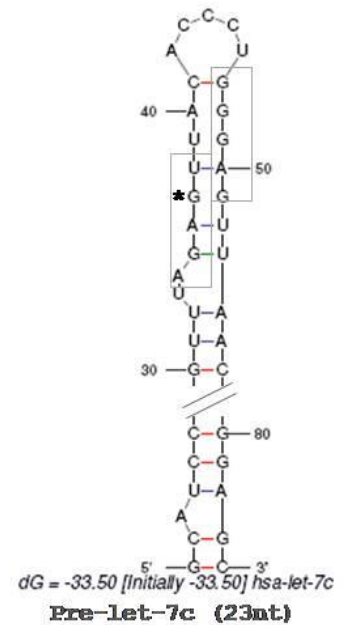
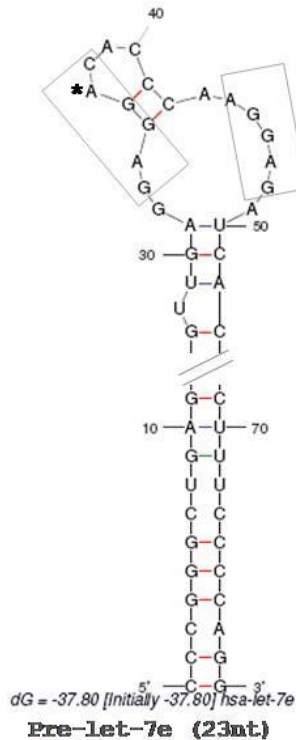
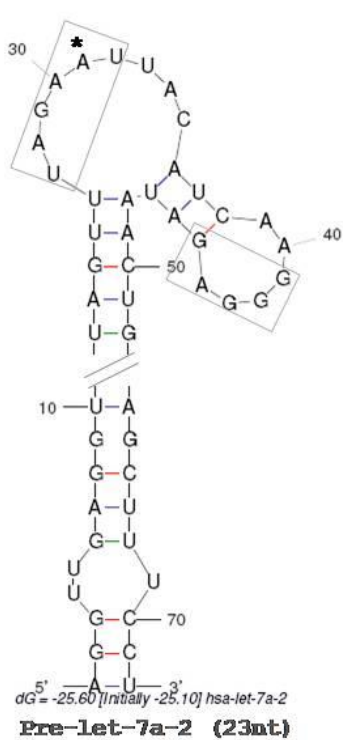
-
71. Takahashi, K., et.al. (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663-676.
 72. Thornton JE, et.al. (2012) Lin28-mediated control of let-7 miRNA expression by alternative TUTases Zcchc11 (TUT4) and Zcchc6 (TUT7). *RNA*. 18, 1875-1885.
 73. Tokumaru S, et.al. (2008) Let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis*. 29, 2073-2077.
 74. Trabucchi M, et.al. (2009) The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of miRNAs. *Nature*. 459, 1010-1014.
 75. Triboulet R, et.al. (2015) A Single Let-7 MiRNA Bypasses LIN28-Mediated Repression. *Cell Reports*. 13, 260-266.
 76. Viswanathan SR, et.al. (2008) Selective blockade of miRNA processing by Lin28. *Science*. 320, 97-100.
 77. Viswanathan, S.R., et.al. (2009) Lin28 Enhances Tumorigenesis and is Associated with Advanced Human Malignancies. *Nature Genetics* 41(7); 843-848.
 78. Viswanathan SR et al. (2009) Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nature Genetics*. 41, 843-8.
 79. Viswanathan, S.R., et.al. (2010) Lin28: A MiRNA Regulator with a Macro Role. *Cell* 140, 445-449.
 80. Wang T, et.al. (2015) Aberrant regulation of the LIN28A/LIN28B and let-7 loop in human malignant tumors and its effects on the hallmarks of cancer. *Molecular Cancer*. 14, 125-138.
 81. Wang, Yun-Chu, et.al. (2010) Lin-28B expression promotes transformation and invasion in human hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 31:9, 1516-1522.
 82. Wang, Zifeng, et.al. (2011) MYC Protein Inhibits Transcription of the MiRNA Cluster MC-let-7a-1-let-7d via Noncanonical E-box. *Journal of Biological Chemistry* 286(46): 39703-39714.
 83. Woodworth CD, et.al. (1988) Characterization of normal human exocervical epithelial cells immortalized in vitro by papillomavirus types 16 and 18 DNA. *Cancer Research*. 48, 4620-4628.
 84. Woodworth CD, et.al. (1995) Interleukin 1 alpha and tumor necrosis factor alpha stimulate autocrine amphiregulin expression and proliferation of human

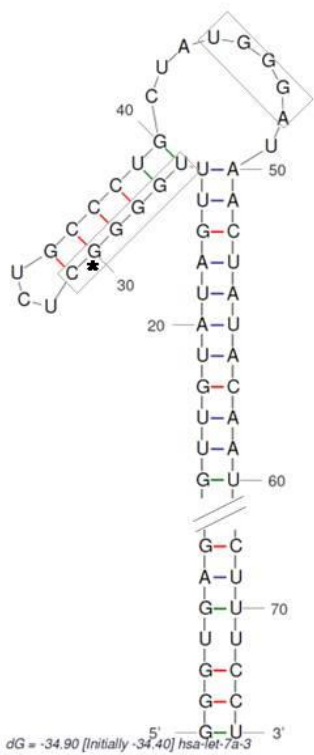
-
- papillomavirus-immortalized and carcinoma-derived cervical epithelial cells. PNAS. 92, 2840-2844.
85. Xie K, et.al. (2013) A potentially functional polymorphism in the promoter region of let-7 family is associated with survival of hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiology*. 37, 998-1002.
 86. Xu, Bingsen, et.al. (2009) Lin28 modulates cell growth and associates with a subset of cell cycle regulator mRNAs in mouse embryonic stem cells. *RNA* 15, 357-361.
 87. Yang, Xiaojun, et.al. (2010) Double-Negative Feedback Loop between Reprogramming Factor LIN28 and miRNA let-7 Regulates Aldehyde Dehydrogenase 1-Positive Cancer Stem Cells. *Cancer Research* 70(22), 9463-9472.
 88. Yang X, et.al. (2012) An anti-let-7 sponge decoys and decays endogenous let-7 functions. *Cell Cycle*. 11, 3097-3108.
 89. Yi, R., et.al. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-miRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 17, 3011-3016.
 90. Yu, J., et.al. (2007) Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* 318, 1917-1920.
 91. Yu F et al. (2007) Let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*. 131, 1109-23.
 92. Zhong, Xiaomin, et.al. (2010) Identification of miRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells. *JBC*.
 93. Zhou, Jianbiao, et.al. (2013) LIN28/LIN28B: An emerging oncogenic driver in cancer stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45, 973-978.
 94. www.ncbi.nlm.nih.gov
 95. www.mirbase.org
 96. www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HEATMAP/heatmap.html
 97. <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>
 98. Zamora-Contreras, Aida Margarita (2011) Evaluación de la expresión de la proteína LIN28 en células epiteliales positivas a VPH. Tesis de Maestría.

17 ANEXOS

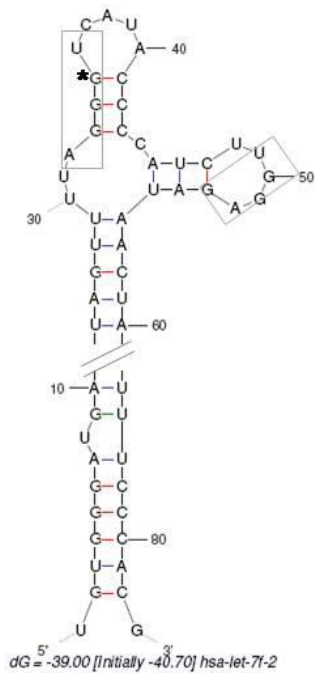
ESTRUCTURAS SECUNDARIAS PREDICHAS IN SILICO DE LOS PRECURSORES DE LA FAMILIA LET-7

Las estructuras secundarias se obtuvieron en la aplicación en línea Mfold (97). Se muestran los precursores acomodados de acuerdo a la longitud del pre-E de manera ascendente. Así mismo se muestra la estructura más estable de acuerdo al valor de dG. Los recuadros señalan los sitios sugeridos para interacción con el dominio CSD (en la burbuja del pre-E) y con los CCHC12 (en el bulto del pre-E) considerando la secuencia consenso para cada uno. El asterisco muestra la purina central de la secuencia de unión al CSD sugerida. Las estructuras fueron recortadas en la parte central del tallo.

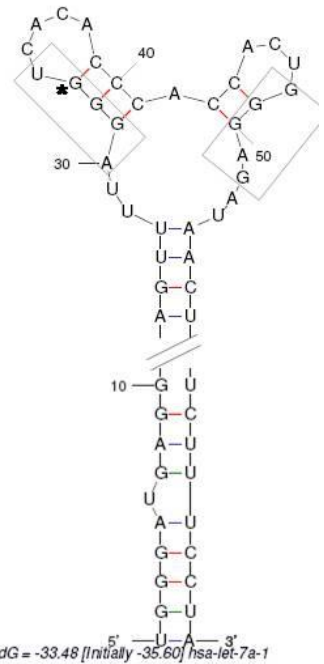




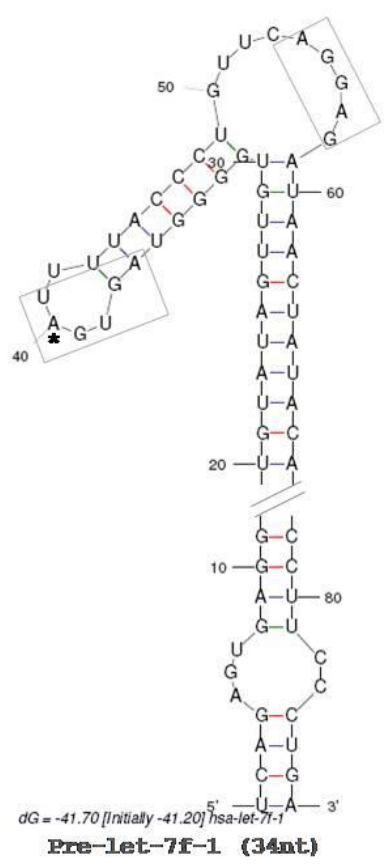
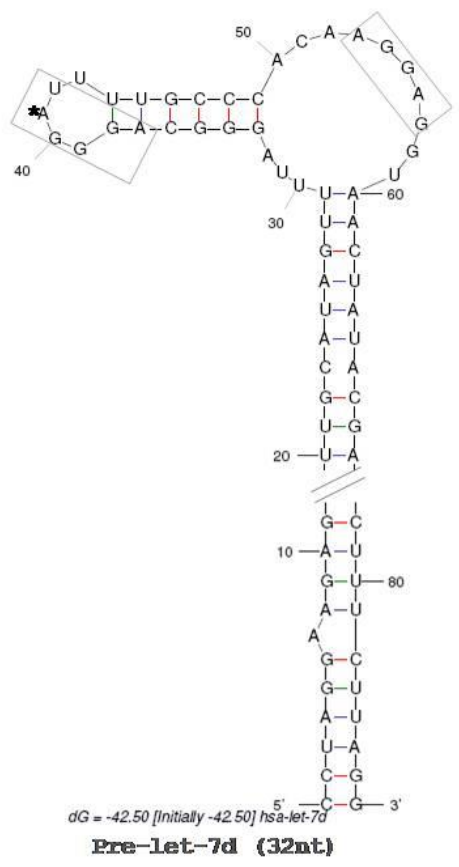
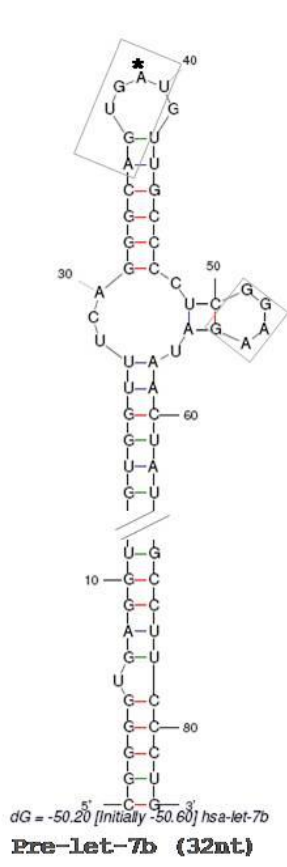
Pre-let-7a-3 (26nt)

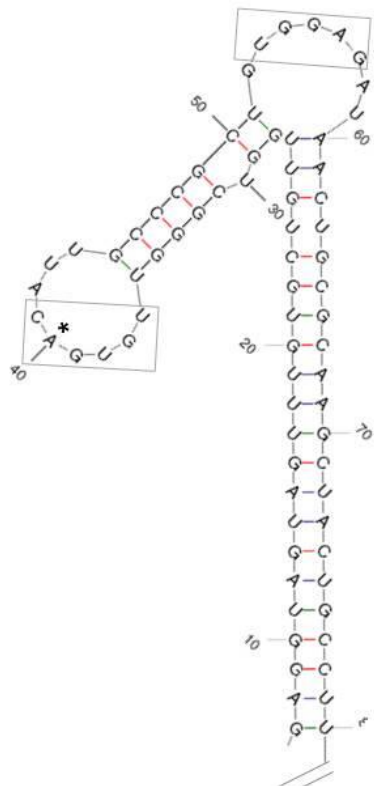


Pre-let-7f-2 (28nt)

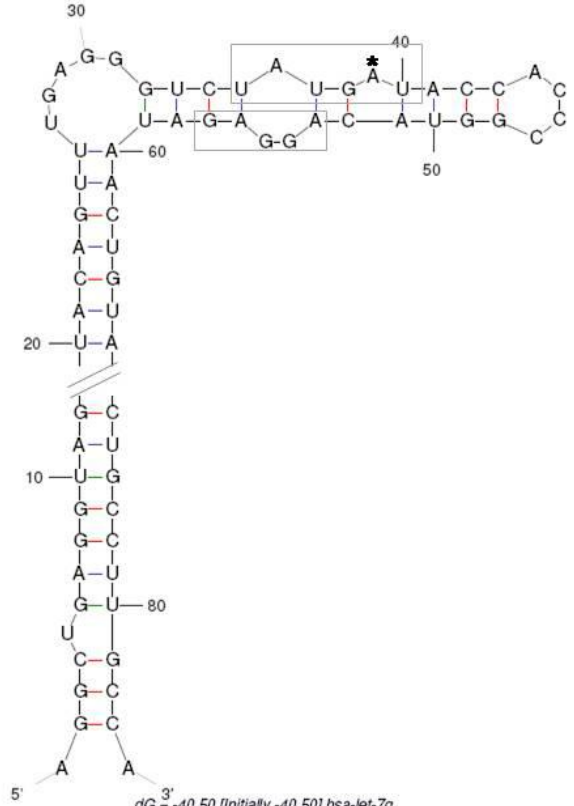


Pre-let-7a-1 (29nt)

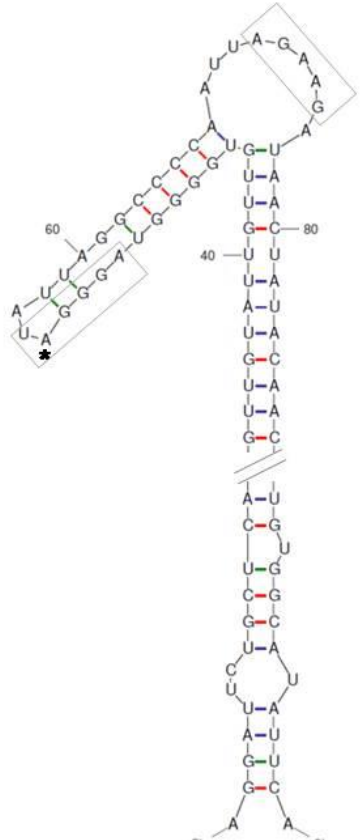




$dG = -39.60$ [Initially -39.60] hsa-let-7i
Pre-let-7i (34nt)



$dG = -40.50$ [Initially -40.50] hsa-let-7g
Pre-let-7g (35nt)



$dG = -58.80$ [Initially -58.80] hsa-mir-98
Pre-mir-98 (36nt)

SECUENCIAS DE OLIGOS DEOXINUCLEOTIDOS PARA PCR

Se muestran los oligodeoxinucleótidos diseñados para este proyecto. Aun cuando no todos se utilizaron, se incluyen las secuencias como anexos para futuras referencias.

Descripción	F/R	Secuencia	Condiciones de reacción
1. Para clonar región codificante de Lin28B humano desde pCR3.1-LIN28B u otra construcción que no contenga intrones. No se recomiendan para su uso directo en RNA total.			
	FOR	ATGGCCGAAGGCGGGGCTAG	Hot Start: 94°C, 1.5' Desnaturalización: 94°C, 1.5min. Alineamiento: 44°C, 0.5min. Extensión: 72°C, 1min. Extensión final: 72°C, 10min. 40 ciclos
	REV	TTATGTCTTTTCTTTTTTGAAGGCCC	
2. Para clonar Lin28B desde pCR3.1-Lin28B con sitios XbaI-BamHI y 5nt en extremo 5'.			
	FOR	GTAATCTAGAATGGCCGAAG	Hot Start: 95°C, 3' Desnaturalización: 95°C, 0.5min. Alineamiento: 50°C, 0.5min. Extensión: 72°C, 1min. Extensión final: 72°C, 2min. 35 ciclos
	REV	TACTGGATCCTGAGGTAGAC	
3. Para clonar Lin28B desde pCR3.1-Lin28B con sitios XbaI-BamHI y 10nt en extremo 5'.			
	FOR	TTATCTGTAATCTAGAATGGCCGAAG	Hot Start: 95°C, 3' Desnaturalización: 95°C, 0.5min. Alineamiento: 50°C, 0.5min. Extensión: 72°C, 1min. Extensión final: 72°C, 2min. 35 ciclos
	REV	TAAACTTACTGGATCCTGAGGTAGAC	
4. Para amplificar precursores de let7's y cuantificarlos en RTqPCR a partir de RNA pequeño. (No amplifican el precursor completo, excepto la pareja miR-98-120nt).			
let-7a-2	FOR	GAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTAGAA	Desnaturalización: 95°C, 15s Alin./Ext.: 52°C, 30s 40 ciclos
	REV	AAAGCTAGGAGGCTGTACA	
let-7a-3	FOR	GAGGTAGTAGGTTGTATAGTTTGG	Desnaturalización: 95°C, 15s Alin./Ext.: 53°C, 30s 40 ciclos
	REV	GGAAAGACAGTAGATTGTATAGTTAT	
let-7c	FOR	TTGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT	Desnaturalización: 95°C, 15s Alin./Ext.: 52°C, 30s 40 ciclos
	REV	GGAAAGCTAGAAGGTTGTACAG	
let-7e	FOR	GAGGTAGGAGGTTGTATAGTTGAG	Desnaturalización: 95°C, 15s Alin./Ext.: 53°C, 30s 40 ciclos
	REV	GAAAGCTAGGAGGCCGTATAG	
let-7f-1	FOR	GATTGTATAGTTGTGGGGTAGTG	Desnaturalización: 95°C, 15s Alin./Ext.: 52°C, 30s 40 ciclos
	REV	GGGAAGGCAATAGATTGTATAG	
let-7g	FOR	GTAGTAGTTTGTACAGTTTGGGGT	Desnaturalización: 95°C, 15s Alin./Ext.: 60°C, 30s 40 ciclos
	REV	GGCAGTGGCCTGTACAGT	
let-7i	FOR	TGTGCTGTTGGTCGGT	Desnaturalización: 95°C, 15s Alin./Ext.: 58°C, 30s 40 ciclos
	REV	GCAGTAGCTTGCGCAGTT	
miR-98	FOR	GGTAGTAAGTTGTATTGTTGTGGG	Desnaturalización: 95°C, 15s Alin./Ext.: 54°C, 30s 40 ciclos
	REV	TATAGTTATCTTCTAATTGGGGCC	

Descripción	F/R	Secuencia	Condiciones de reacción
miR-98-120nt	FOR	AGGATTCTGCTCATGCCAG	N/D
	REV	TGAATATGCCACACACCAGG	
5. Para cuantificar RNAm 5S humano mediante RTqPCR a partir de RNA pequeño. (No amplifican el RNAr 5S completo).			
Hairpin	RT	CGCGCCTGCAGGTCGACAATTAACCCTCACTAA AGGGGTCTCCCATCC	N/A
	FOR	GTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGAGGGTTA GTACTT	Desnaturalización: 95°C, 15s Alin./Ext.: 60°C, 30s 25 ciclos
	REV	CGCGCCTGCAGGTCGAC	
6. Para generar transcritos con T7 a partir de amplicones de let-7's del punto 4.			
T7-let-7a-3	FOR	TAATACGACTCACTATAGGGGAGGTAGTAG	N/D
	REV	GGAAAGACATAGATTGTATAGTTATGGGTA	
T7-miR-98	FOR	TAATACGACTCACTATAGGGGGTAGTAAG	N/D
	REV	TATAGTTATCTTCTAATTGGGGCCATT	
T7-miR-98-120nt	FOR	TAATACGACTCACTATAGGGAGGATTCTG	N/D
	REV	TGAATATGCCACACACCAGGG	
T7-let-7c	FOR	TAATACGACTCACTATAGGGTTGAGGTAGTAG	N/D
	REV	GGAAAGCTAGAAGTTGTACAGTTAAC	
7. Para secuenciación de Sanger de precursores let-7's a partir de amplicones del punto 4.			
let-7a-2	FOR	GTCACACTGAGATACTTGAGGTAGTAG	N/D
	REV	GTAAGATGACTACTGGGAAAGCTAG	
let-7a-3	FOR	idem let-7a-2 For	N/D
	REV	GTAAGATGACTACTGGGAAAGACAG	
let-7c	FOR	idem let-7a-2 For	N/D
	REV	idem let-7a-2 Rev	
let-7e	FOR	CACACTGAGATACTTGAGGTAGGAG	N/D
	REV	idem let-7a-2 Rev	
let-7f-1	FOR	GTCACACTGAGATACTTGATTGTATAG	N/D
	REV	GTAAGATGACTACTGGGAAGGCAA	
let-7g	FOR	GTCACACTGAGATACTTGTAGTAGTTTG	N/D
	REV	GTAAGATGACTACTGGGCAGTGG	
let-7i	FOR	GTCACACTGAGATACTTGTGCTGTTG	N/D
	REV	GTAAGATGACTCTGGGCAGTAGCTTG	
miR-98	FOR	GTCACACTGAGATACTTGGTAGTAAG	N/D
	REV	GTAAGATGACTACTGGGTATAGTTATC	
8. Oligos genéricos para aumentar tamaño de amplicones para secuenciación de Sanger a partir de amplicones del punto 7			
	FOR	GTAACCTACAACCCTAGTCACACTGAG	N/D
	REV	AGCAACCAGCCAATGAGTAAGATGAC	

N/A: No aplica N/D: No determinado

RESEARCH ARTICLE

Let-7 miRNA Precursors Co-express with LIN28B in Cervical CellsAída Margarita Zamora-Contreras^{1,2} and Luis Marat Alvarez-Salas^{1,*}

¹Laboratorio de Terapia Génica, Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., Av. I.P.N. 2508, Ciudad de México 07360, México; ²Departamento de Bioprocesos, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional (UPIBI-IPN), Av. Acueducto de Guadalupe S/N, Ciudad de México 07340, México

Abstract. Background: The let-7 microRNAs (miRNAs) are frequently dysregulated in carcinogenic processes, including cervical cancer. LIN28 proteins regulate let-7 biogenesis by binding to conserved sequences within the pre-miRNA structure. Nevertheless, recent research has shown that some let-7 miRNAs may escape LIN28 regulation.

Objective: Correlate pre-let-7 miRNAs and LIN28B levels in cervical cell lines with different malignancy and HPV content.

Methods: Pre-let-7 levels were determined by RTqPCR. LIN28B and other let-7 targets were analyzed by immunoblot. *In silico* tools were used to correlate let-7 and LIN28B expression and to analyze pre-let-7 sequences and structures.

Results: Lin28B protein was detected in all tested cell lines although it was more expressed in tumor cell lines. High levels of pre-let-7c/f-1 and pre-miR-98 were present in almost all cell lines regardless malignancy and LIN28B expression. Pre-let-7g/i were mainly expressed in tumor cell lines, pre-let-7e and pre-let-7-a3 were absent in all cell lines and pre-let-7a-2 showed indistinct expression. LIN28B showed positive correlation with pre-let-7i/g/f-1 and pre-miR-98 in tumor cell lines, suggesting escape from regulation. Sequence alignment and analysis of pre-let-7 miRNAs showed distinctive structural features within the preE region that may influence the ideal pre-let-7 structuring for LIN28B interaction. Short preE-stems were present in pre-let-7 that may escape LIN28B regulation, but long preE-stems were mostly associated with high-level pre-let-7 miRNAs.

Conclusion: The observed differences of pre-let-7 levels in cervical cell lines may be the result of alternative preE structuring affecting interaction with LIN28B thus resulting in differential let-7 regulation.

ARTICLE HISTORY

Received: September 18, 2017

Revised: November 23, 2017

Accepted: January 11, 2018

DOI:

10.2174/2211536607666180115149014

Keywords: Cervical cancer, let-7 biogenesis, let-7 regulation, Lin28B, miRNAs, pre-let-7.

1. INTRODUCTION

Cervical cancer has been causally associated with high-risk human papillomavirus (HPV) infection [1]. Nevertheless, most HPV infections clear spontaneously in immunocompetent subjects, so only a small fraction of HPV-infected women will develop cervical cancer [2]. Therefore, additional factors may contribute to cervical malignant progression.

MicroRNAs (miRNAs) are small regulatory non-coding RNAs of approximately 21 nt that suppress expression of target mRNAs. Binding specificity and affinity relies on a

6-7 nt sequence at the 5' end (the "seed sequence"), which is the primary binding site to complementary sequences at the 3'-UTR of the target transcript [3, 4].

Most miRNAs are coded within the genome of plant and animals either as individual genes or gathered in clusters along with other miRNAs, and either expressed from their own promoters or as passenger transcripts within introns [5, 6]. Genomic data from cervical tumors and cell lines indicate that aberrant miRNA function or expression may contribute to malignant transformation [7]. Canonical miRNA biogenesis is a heavily regulated process that starts with a primary transcript (pri-miRNA) containing 5' cap and 3' polyA tail, generally produced by RNAPolIII transcription [8, 9]. The pri-miRNA adopts a defined stem-loop structure determined by internal base-pairing and is processed in the nucleus by the *Microprocessor* complex, composed of the RNase III-like enzyme *Drosha* and the RNA binding protein DGCR8,

*Address correspondence to this author at the Laboratorio de Terapia Génica, Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., Av. I.P.N. 2508, Ciudad de México 07360, México; Tel: +52-55-5747-3800 ext. 5387; E-mail: lalvarez@cinvestav.mx.

that cleaves the base of the stem generating a 2 nt overhang at the 3' end. The resulting precursor miRNA (pre-miRNA) retains the stem-loop structure and is exported to the cytoplasm by the Exportin 5/Ran-GTP complex [10-13]. There, a second RNase III-like enzyme, *Dicer*, trims out the loop leaving a 21 nt double-stranded miRNA molecule. The miRNA is bound by an RNA-induced silencing complex (RISC) composed of TRBP, *Dicer* and AGO2 in humans [14], where one of the strands is used as guide sequence to mediate silencing of complementary target mRNAs [15].

One of the most studied miRNAs, *let-7* (let-7), belongs to a group of miRNAs conserved among several species complementary to the let-60/RAS gene and pivotal for the development of the nematode *Caenorhabditis elegans* [16, 17]. In humans, there are several let-7 miRNA variants (let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, miR-98 and miR-202), found in nine different chromosomal loci [18]. Because the seed sequence of all let-7 miRNAs is identical (5'-GAGGUAG-3'), it has been long assumed that they all target the same transcripts [19]. Several oncogenes and regulatory genes have been found as targets for let-7 miRNAs including RAS [17], HMGA2 [20], Cyclin D1/2/3 and Cyclin A [21], IL6 [22], c-MYC [23], DICER1 [24], LIN28A and LIN28B [25]. Let-7 targets are related to various key cellular processes such as proliferation, pluripotency, cell cycle control, self-renewal and inflammation. Thus, let-7 miRNAs are generally considered as tumor suppressors. Both the pri-let-7 and pre-let-7 harbor a typical miRNA hairpin structure with a stem containing the 5' sequence (5p) extensively paired with the partially complementary 3' sequence (3p) connected by a terminal loop region of variable length and structure among the different let-7 miRNAs. A region within pre-let-7 miRNAs, referred as the pre-element (preE), serves as a platform to recruit RNA-binding proteins including LIN28A/LIN28B, KHSRP (also known as KSRP), hnRNPA1 and TRIM25 [26-32]. Only three let-7 miRNAs (let-7a-2, let-7c and let-7e) are produced by the canonical miRNA biogenesis pathway (Group I). The other let-7 miRNAs go through additional processing because they possess a single-nucleotide 3' overhang (Group II). This appears associated with a bulge next to the processing site present in some pri-let-7, causing a defective pri-miRNA recognition and cleavage by the *Mi-croprocessor* complex [33].

The highly conserved LIN28 family includes the LIN28A and LIN28B RNA-binding proteins, which harbor a similar structure and function. Like let-7, LIN28A was also first identified in *C. elegans* [34]. LIN28A is mainly expressed in undifferentiated stem cells, although many reports found over-expression of LIN28A in several types of cancer, including cervical cancer [35]. It has been widely accepted that LIN28A/LIN28B and let-7 miRNAs may have opposing roles in cancer development and progression, as their expression is inversely correlated in normal and malignant tissues [35, 36].

The functional relationship between LIN28A/LIN28B and let-7 has been extensively reviewed [37]. Both LIN28A and LIN28B negatively regulate let-7 miRNAs through their RNA-binding domains: the cold-shock domain (CSD) at the N-terminus and two CCHC-type zinc finger (ZnF12) do-

main at the C-terminus. LIN28A and LIN28B interact with let-7 precursors at the preE domain, impeding further processing by *Dicer* in the cytoplasm and by *Drosha* in the nucleus, respectively [38]. Whenever LIN28A is not expressed, the uridyl-transferases TUT2, TUT4 or TUT7 mono-uridylate the pre-let-7 3' overhang in order to be recognized by *Dicer* and produce a mature let-7 [33]. Alternatively, LIN28A interacts with pre-let-7 and recruits TUT4 or TUT7 to add around 14 uracyl residues to the 3' end [39, 40], resulting in pre-let-7 degradation by the 3'-5' exonuclease Dis3L2 [41]. LIN28B has nuclear and nucleolar localization signals suggesting that it can be regulating let-7 inside the nucleus [42]. Although LIN28B shares about 70% identity with LIN28A, it conserves the same exact sequences for the CSD and ZnF12 domains which hypothetically allow interaction with let-7 in a similar way that LIN28A [32, 40, 43]. Moreover, it has been suggested that LIN28B may block the biogenesis of let-7 in the cytoplasm by the same TUT4 and Dis3L2 mechanism described for LIN28A although the translocation mechanism is still not described [44].

Numerous studies have detailed the molecular basis of the interaction between LIN28A and several let-7 miRNAs. The CSD and ZnF12 domains within LIN28A specifically interact with the preE. An ideal preE contains a loop with the 5'-NGNGAY-3' motif that docks with the CSD followed by the 5'-NGNNG-3' sequence (preE-bulge) that interacts with ZnF12, separated by a variable length spacer that forms a stem-like structure (preE-stem) [32, 40, 43]. This model postulates that the preE-loop encircles a protrusion of the CSD with extensive contacts around the RNA loop [32].

The diverse let-7 miRNAs appear differentially regulated in regards the type of cancer [42]. In cervical cancer, the overall miRNA expression is depleted but some mature let-7s are upregulated [44, 45]. Although LIN28A and LIN28B may exert a similar degree of repression on the different let-7 miRNAs [26, 32, 43], the existing data suggest that both proteins interact with let-7 precursors relying on the preE structure for binding [43, 46]. It is unclear whether such differences reflect on cellular regulatory changes leading to cancer.

In the present work, a panel of cervical cancer cell lines with different malignancy and HPV content was used to explore the relationship between pre-let-7 miRNAs and LIN28A and LIN28B proteins. The precursors of eight human let-7 miRNAs (let-7a-2, let-7a-3, let-7c, let-7e, let-7f-1, let-7g, let-7i and miR-98), each one representative of a different chromosomal locus, were evaluated using RT-qPCR. Although the overall pre-let-7 miRNA content was more prominent in tumor cells than in immortal cells, high levels of pre-let-7c, pre-let-7f-1 and pre-miR-98 were found in all cell lines tested, while pre-let-7a-2, pre-let-7i and pre-let-7g showed medium levels throughout the different cell types suggesting differential regulation. Pre-let-7a-3 and pre-let-7e presented very low levels in all cell lines tested. Concurrently, three validated let-7 targets (RAS, MYC and LIN28B) co-expressed with some let-7 pre-miRNAs, including the antagonist LIN28B protein again suggesting differential expression and/or regulation of let-7 miRNAs in cervical cancer. Such differences are probably related to alterations in LIN28B binding produced by small changes in pre-let-7

structure. Bioinformatics analysis of all pre-let-7 miRNAs tested revealed two main groups according to their preE. One group contained a short preE stem (23-29nt), including low or medium miRNA levels and the other group with long preE stems which included highly expressed let-7 miRNAs. Therefore, the length and structure of the preE stem in let-7 miRNAs may be additional key elements for binding and regulation by LIN28B with relevance in cervical cancer.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Cell Culture

The HPV16 positive cervical tumor cell lines (TCL)SiHa (ATCC[®] HTB-35[™]), CaSki (ATCC[®] CRL-1550[™]), QGH and QGU [47], the HPV18 positive cervical tumor line HeLa (ATCC[®] CCL-2[™]) and the HPV negative cervical tumor line C-33A (ATCC HTB-31[™]) were all cultured in GIBCO[™] DMEM medium (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories GmbH, Germany) and 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (PAA Laboratories), and 10mg/mL gentamicin. The hepatocarcinoma derived cell line HEPG2 (ATCC[®] CRL-11997[™]) was grown in GIBCO[™] RPMI 1640 (Thermo Fisher) enriched with 5% FBS (PAA Laboratories). The HPV16-immortalized cell lines (ICL) HKc16E6/E7II [48], Cx16.2 [49] and the tumor-derived CXT.1 cell line [50] were cultured in GIBCO[™] keratinocyte serum-free medium (K-SFM) (Thermo Fisher). The immortal HaCaT keratinocytes [51] were grown in GIBCO[®] DMEM/F12 1:1 medium (Thermo Fisher) supplemented with 5% FBS (PAA Laboratories). All cell lines were maintained at 37°C in a humidity-saturated 5% CO₂ atmosphere.

2.2. Immunoblot Analysis

Total protein extracts from 90% confluent cultures (100 µg) were resolved in denaturing SDS-polyacrylamide gels and electrotransferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Merck Millipore, Billerica MA). Blotted membranes were blocked with 10% non-fat milk and incubated with primary antibodies against LIN28A, LIN28B, β-Actin, c-Myc or RAS (Santa Cruz Biotechnology[™] Inc., Santa Cruz CA) overnight at 4°C. A further incubation was performed with isotype-specific secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Santa Cruz) to visualize blotted proteins using Luminata[™] chemiluminescence kits (Merck Millipore) and analyzed in a C-Digit[™] 3600 scanner (LI-COR Biotechnology, Lincoln NE).

2.3. RT-qPCR Analysis for the let-7 Family

Small RNA (<200 nt) was isolated from subconfluent (80-90%) cultures and stored at -70°C, as described [52]. Steady-state pre-miRNA levels were quantified using primer sets specific for human pre-let-7a-2, pre-let-7a-3, pre-let-7c, pre-let-7e, pre-let-7f-1, pre-let-7g, pre-let-7i and pre-miR-98 [18], using 5S RNA as endogenous control [52]. End-point RT-PCR analysis showed the expected amplicon size for each let-7 precursor amplification reaction (Supplemental Fig. S1). RT-qPCR reactions were performed in a Rotor Gene[™] 3000 thermocycler (Corbett Research Pty Ltd., Australia) using the Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific). RT-qPCR reactions were per-

formed for 15 s at 95°C and 30 s at the corresponding T_m (Supplemental Fig. S1) for 40 cycles. MiRNA gene expression was analyzed using the comparative C_T method using 5S RNA as standard [53].

2.4. Statistical Analysis

C_T readings were analyzed by ANOVA using the Minitab 15 software to estimate if biological replicates were statistically equivalent. P<0.05 was considered as significant. The cell line vs. pre-let-7 2^{-ΔCT} expression array was analyzed by bootstrap probability using Euclidean distance method and 1000 iterations. The analysis was performed at (www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HEATMAP/heatmap.html) to cluster let-7 miRNAs and cell lines by their expression pattern. The 2^{-ΔCT} readings were also analyzed using the non-parametric Kruskal-Wallis and Median Mood Test methods using Minitab 15 software.

3. RESULTS

3.1. Cervical Cells Express LIN28B but not LIN28A

The relative levels of LIN28A and LIN 28B proteins were analyzed by immunoblotting in a panel of cervical cell lines with different malignancy and HPV content. Total protein extracts from HPV-containing tumor cell lines (TCL) SiHa, QGU and HeLa (only for LIN28B), immortal cell lines (ICL) Cx16.2, CxT1 and HKc16E6/E7-II, and HPV-free C-33A and HaCaT cell lines were processed by denaturing SDS-PAGE and probed with specific antibodies for LIN28A and LIN28B. SiHa cells transfected with a LIN28A expression plasmid and the hepatocarcinoma cell line HepG2 were used as a positive controls for LIN28A and LIN28B [25], respectively. The cytoskeleton protein β-actin was used as load control. The levels of LIN28A protein were barely detectable in all cell lines tested with the exception of the positive control, suggesting that LIN28A is not expressed in all tested cell lines (Fig. 1A). LIN28B showed a differential protein expression pattern through all tested cell lines. LIN28B was present in most TCLs with the exception of QGU cells, but barely observable in ICLs with the exception of HaCaT cells (Fig. 1B). No correlation with HPV content was observed.

3.2. Differential Expression of Let-7 miRNAs in Cervical Tumor Cell Lines

To analyze the levels of the several let-7 miRNA variants, small RNA (<200 nt) samples from several HPV-containing TCLs (SiHa, CaSki, QGH, QGU and HeLa) and ICLs (Cx16.2, CxT1 and HKc16E6/E7II) were evaluated by RT-qPCR. C-33A and HaCaT cells were used as HPV-negative controls. A total of eight precursor let-7 variants (pre-let-7a-2, pre-let-7a-3, pre-let-7c, pre-let-7e, pre-let-7f-1, pre-let-7g, pre-let-7i and pre-miR-98) were analyzed (Table 1). It was assumed that transcriptional control was the same for the miRNAs included within each cluster as they are expressed in polycistronic transcripts [54]. Let-7 pre-miRNA content was independently normalized to ribosomal 5S RNA. The pre-let-7a-3 and pre-let-7e miRNAs presented very low levels in all tested cell lines. On the other hand, pre-let-7i showed higher levels in TCL when compared to ICL. Pre-let-7a-2 and pre-let-7g showed differential levels through all

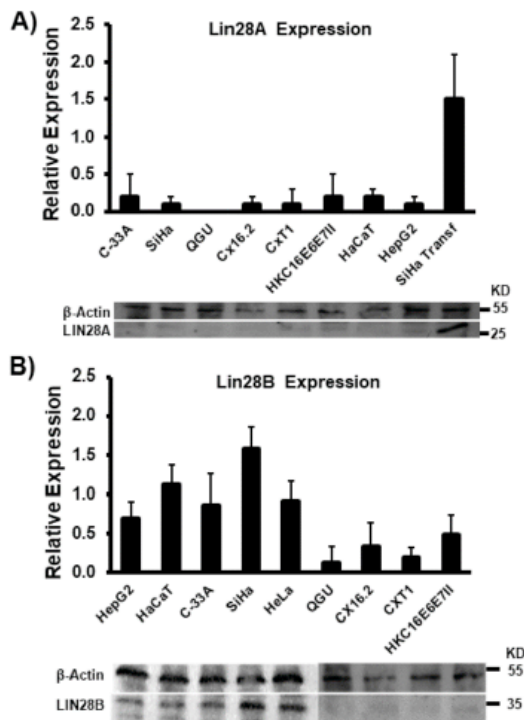


Fig. (1). LIN28A and LIN28B expression in cervical immortal (ICL) and tumor (TCL) cell lines. **A)** Upper panel. LIN28A protein expression in total protein extracts from the cervical tumor cell lines C-33A (HPV-negative), SiHa (HPV-16), and QGU (HPV-16); the immortal cell lines Cx16.2 (HPV-16), CxT1 (HPV-16) and HKC16E6E7II (HPV-16); the immortal keratinocytes HaCaT (HPV-negative) and the hepatocarcinoma cell line HepG2. SiHa cells were transfected with a LIN28A-expression plasmid as positive control (SiHa Transf). The plots represent the mean and standard deviation of at least three independent experiments. Lower panel. Representative immunoblot of LIN28A expression in cervical cells. The relative migration of LIN28A and β -actin is indicated. **B)** Upper panel. LIN28B protein expression in total protein extracts from the cervical tumor lines C-33A, SiHa, QGU, the immortal cell lines Cx16.2, CxT1, HKC16E6E7II and HaCaT. The hepatocarcinoma line HepG2 was used as a LIN28B positive control [25]. The plots represent the mean and standard deviation of at least three independent experiments. Lower panel. Representative immunoblot of LIN28B expression in cervical cells. The relative migration of LIN28B and β -actin is indicated.

cell lines tested, regardless of their malignancy. However, pre-let-7c, pre-let-7f-1 and pre-miR-98 showed significantly higher levels in all cell lines, being pre-miR-98 and pre-let-7f-1 the pre-miRNAs with the highest levels (Fig. 2A).

Assuming that let-7 miRNAs are all tumor suppressors [55, 56], it was expected that the overall content of let-7 miRNA precursors would be less in TCL than in ICL. However, the added $2^{-\Delta\Delta CT}$ scores of let-7 pre-miRNAs from the QGH, QGU (TCLs) and CxT1 and HKC16E6/E7-II (ICLs) showed less overall pre-let-7 content regardless the differences in malignancy. Moreover, pre-let-7f-1 and pre-miR-98

Table 1. Genomic organization of let-7 family. The let-7 miRNAs used in this study are in boldface.

Let-7	Chr.	Cluster
hsa-let-7a-2	11	mir-100, let-7a-2
hsa-let-7a-3	22	let-7a-3 , mir-4763, let-7b
hsa-let-7c	21	mir-99a, let-7c
hsa-let-7e	19	mir-99b, let-7e, mir-125a
hsa-let-7f-1	9	let-7a-1, let-7f-1, let-7d
hsa-let-7g	3	let-7g
hsa-let-7i	12	let-7i
hsa-miR-98	X	let-7f-2, miR-98

appeared relatively high-level considering both ICLs and TCLs (Fig. 2B). SiHa, HeLa and C-33A cell lines (all expressing LIN28B) showed the highest levels of let-7 precursors regardless their HPV content (Fig. 2B). These results suggested that for at least some let-7 precursors (pre-let-7f-1 and pre-miR-98) regulation may be independent of the cell context. In addition, the HPV content did not appear to be a factor for let-7 miRNA levels.

3.3. Differential Levels of RAS and c-MYC Proteins in Cervical Cell Lines

The validated let-7 targets c-MYC and RAS oncogenes [57, 58], were evaluated by immunoblotting to determine their levels in ICLs and TCLs. β -Actin was used as load control. Overall, a higher level of c-MYC and RAS expression was observed in TCLs than in ICLs (with the exception of HaCaT cells) (Fig. 3), even though pre-let-7f-1 and pre-miR-98 (containing seed regions with specificity for both oncogenes) were present in all tested cell lines (Fig. 2). Because of this, the levels of the let-7 antagonist and validated target LIN28B [25], were evaluated in the same cell extracts as those used for c-MYC and RAS. A correlation analysis of pre-let-7 against LIN28B in ICLs showed that most let-7 pre-miRNAs reverse-correlated with LIN28B expression although a small positive R-value was observed with pre-let-7i. However, the correlation analysis in TCLs showed LIN28B expression even in the presence of pre-let-7e, pre-let-7i, pre-let-7g, pre-let-7f-1 and pre-miR-98 again suggesting that these miRNAs may escape LIN28B regulation in TCLs (Fig. 4).

4. DISCUSSION

In this study, the expression levels of human let-7 pre-miRNAs and LIN28B protein were analyzed in several cervical cancer cell lines with different malignancy and HPV content. A differential pre-let-7 level was observed between TCLs and ICLs, where the overall concentration of let-7 precursors is enhanced in TCLs. It is difficult to reach an absolute agreement about the expression levels of let-7 in cervical cancer, probably due to the variability of the samples and experimental conditions used. A previous study comparing

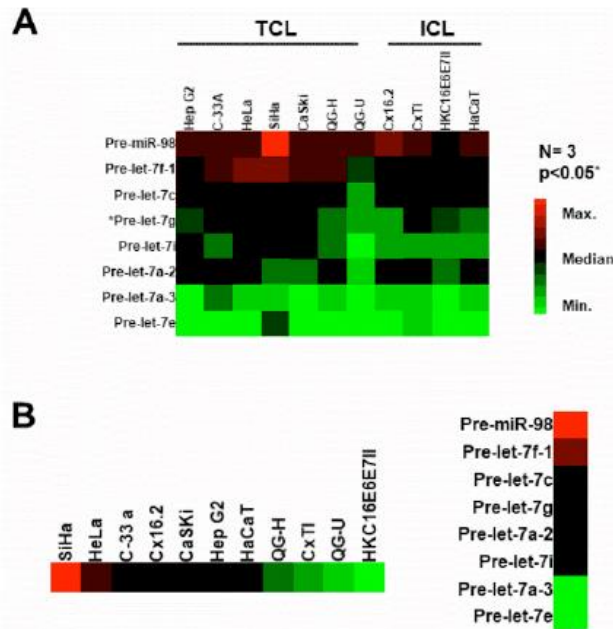


Fig. (2). Expression levels of let-7 precursors (pre-let-7) in cervical tumor (TCL) and immortal (ICL) cell lines. A) Heatmap showing the average $2^{-\Delta CT}$ values for human pre-let-7a-2, pre-let-7a-3, pre-let-7c, pre-let-7e, pre-let-7f-1, pre-let-7g, pre-let-7i and pre-miR-98 (normalized against 5s RNA expression) in the HPV-containing tumor cell lines SiHa, QGU and HeLa, the immortal cell lines Cx16.2, CxT1 and HKc16E6/E7-II, and the HPV-free C-33A and HaCaT cell lines. The hepatocarcinoma line HepG2 was used as a positive control for LIN28B. Red indicates the highest miRNA expression, black represents the median value of $2^{-\Delta CT}$, and green represents the lowest miRNA expression (N=3). The pre-let-7 expression pattern was made according to hierarchical grouping (www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HEATMAP/heatmap.html). Cell lines were arranged according to their malignancy status (left to right). B) Added $2^{-\Delta CT}$ average values from all evaluated pre-let-7 present in each cell line (n=3).

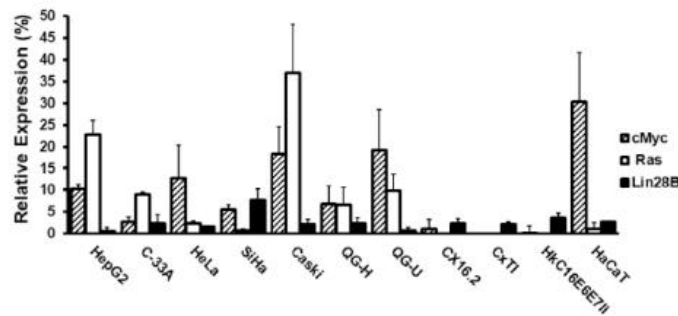


Fig. (3). Expression levels of the let-7 validated targets c-MYC, RAS and LIN28B in tumor (TCL) and immortal (ICL) cell lines. Protein expression of c-MYC (Slotted bars), RAS (White bars) and LIN28B (Black bars) was evaluated by immunoblotting and plotted relative to b-actin expression. The plots represent the average and standard deviation of at least three independent experiments.

the miRNA transcriptomes from normal cervical tissue and tumor cell lines by sequence and northern blot analyses found low expression of mature let-7a, let-7b, let-7c and let-7d in cervical cancer cell lines. In contrast, let-7e, let-7f, let-7g and let-7i appeared differentially expressed in both cell types regardless of their malignancy [44]. Other study using a RT-qPCR array method comparing clinical samples from normal and tumor cervical tissues showed that mature let-7e, let-7i, and let-7g were over-expressed in tumor cervical cells.

Let-7d and let-7b showed an indistinct expression pattern in normal and tumor tissue [45]. None of the studies mentioned which was the LIN28A/LIN28B expression level within their samples. However, the differential expression between the let-7 versions appears independent from the malignancy status of the cell, although probably linked to regulatory mechanisms depending on sequence or structural changes. Two potentially functional polymorphisms within the promoters of the let-7 family have been described in humans:

rs10877887 at -286 bp from the transcription start site of let-7i in chromosome 12 and rs13293512 at -8496 bp from the transcription start site of the let-7a-1/let-7f-1/let-7d cluster in chromosome 9 [59]. Nevertheless, no significant difference was found on let-7d and let-7f-1 levels between cervical squamous cell carcinoma tissues and adjacent normal tissues and no association correlated rs13293512 with let-7a levels in both tumor and adjacent normal tissues. Only rs10877887 showed a lower level of let-7i in tumor tissues but not in adjacent normal tissues [60]. In our RT-qPCR analysis, pre-let-7f-1 levels were generally higher than pre-let-7i levels in all cell lines tested, suggesting that the observed variations reflect differential processing rather than differential expression (Fig. 2).

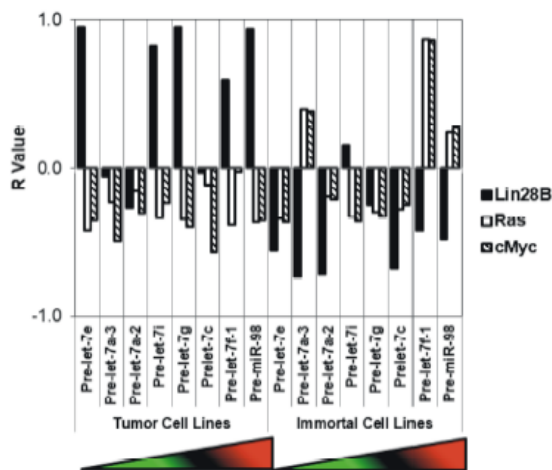


Fig. (4). Correlation of let-7 precursors with LIN28B, RAS, and c-MYC expression in cervical tumor (TCL) and immortal (ICL) cell lines. Linear correlation analysis was performed with the protein levels of c-MYC (Slotted bars), RAS (White bars) and LIN28B (Black bars) and the relative levels of let-7 precursors pre-let-7a-2, pre-let-7a-3, pre-let-7c, pre-let-7e, pre-let-7f-1, pre-let-7g, pre-let-7i and pre-miR-98 (n=3). The precursor let-7e are arranged by relative expression levels in TCL and ICL (green to red).

A sequence alignment of all pre-let-7 relative to the preE identified four distinctive domains: the well-known CSD (preE-loop) and ZNF12 (preE-bulge) docking sites, a single G-rich 5'-preE-stem domain located prior to the CSD and a complementary 3'-preE-stem C-rich domain located between the preE-loop and preE-bulge domains (Table 2). These complementary domains allow the formation of a preE-stem that may facilitate interaction with the CSD of LIN28A (and probably LIN28B) through the 5'-NGNGAY-3' docking sequence found within the preE-loop [32]. Precursors for let-7a-2, let-7e, let-7c, let-7a-3, let-7f-2 and let-7a-1 (which have a preE-stem of less than 30nt), lack the G-rich 5' preE-stem domain. In contrast, precursors for let-7b, let-7d, let-7f-1, let-7i, let-7g and miR-98 (with a preE-stem of over 30 nt) contain both 5' and 3' preE-stem domains (Table 2). A structural bidimensional *in silico* analysis of the several pre-let-7preE-stems showed that pairing of G residues with U and C residues within the C-rich region allows the formation of a wider CSD docking loop than the one formed by short preE-stems

(Supplemental Fig. S2). Thus, short preE-stem let-7 precursors form a stable structure with a smaller preE-loop less accessible for LIN28 binding. Moreover, the predicted structure of pre-let-7a-3 showed that the CSD docking site is completely paired with the C-rich region, which may in part explain the reported escape from LIN28A regulation [61]. Other short preE-stem precursors such as pre-let-7c and pre-let-7a-2 displayed a more accessible CSD docking site with weak pairings that would allow LIN28A/LIN28B interaction. Therefore, let-7 precursors containing long preE-stems, may have a stronger interaction with LIN28B because the preE-loop is wider, thus allowing a more stable binding and a slower turnover rate promoting accumulation in the nucleus or allowing TUTase-mediated degradation. Let-7 precursors with a short preE-stem would have a weaker interaction with LIN28B and may be promptly transformed to a mature miRNA or even bypass interaction with LIN28B protein (Fig. 5). A kinetic study on LIN28A/let-7 interaction reported that LIN28A apparently docks first with the 5'-NGNGAY-3' sequence within the preE-loop, rearranges the preE structure and then interacts with the ZNF12 sites [62]. Thus, a short preE-stem could effectively hamper the initial docking by narrowing the preE-loop resulting in a less stable configuration. Another report showed that hsa-pre-let-7a-3 and mmu-pre-let-7c-2, both with short preE-stem, did not interact in the same way with LIN28A/LIN28B as the rest of the let-7 pre-miRNAs [61]. Other studies also provided affinity data between let-7 precursors and LIN28A, mostly using pre-let-7g (with a long preE-stem). Under similar binding conditions, long preE-stems pre-let-7f-1, pre-let-7d and pre-let-7g have greater affinity for LIN28A than other short preE-stem let-7 miRNAs (let-7a-1, let-7a-2, let-7c and let-7f-2) [28, 63]. A recent bioinformatics approach concluded that the structure of the preE is more important for LIN28A recognition than the sequence [46], although the relevance of the length and sequence of the preE-stem among let-7 precursors for the interaction with LIN28B has not been experimentally approached. Further analyses on mature let-7 miRNA levels will allow functional correlation with pre-let-7 status.

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

Here, we first describe the content of several let-7 miRNA precursors (from all different let-7 loci) and four of their validated targets in a panel of cervical cell lines with different malignancy. Our results showed that the differential content of let-7 miRNA precursors is not associated with malignancy or HPV content. Although this can be the consequence of differences in transcriptional control through the let-7 loci, it can also be related to alternative biogenesis pathways independent from LIN28A/LIN28B regulation. Pre-let-7c, pre-let-7f-1 and pre-miR-98 were expressed through the entire panel of cell lines. Other precursors, namely pre-let-7a-3 and pre-let-7e, were mostly undetectable but pre-let-7a-2, pre-let-7g and pre-let-7i showed less pronounced expression. No significant LIN28A protein was detected in the cell line panel but LIN28B did show significant higher levels in TCLs. Co-expression with pre-let-7c, pre-let-7f-1 and pre-miR-98, suggested escape from LIN28B regulation. The oncogenic let-7 targets c-MYC and RAS were also significantly expressed in TCLs but also in the

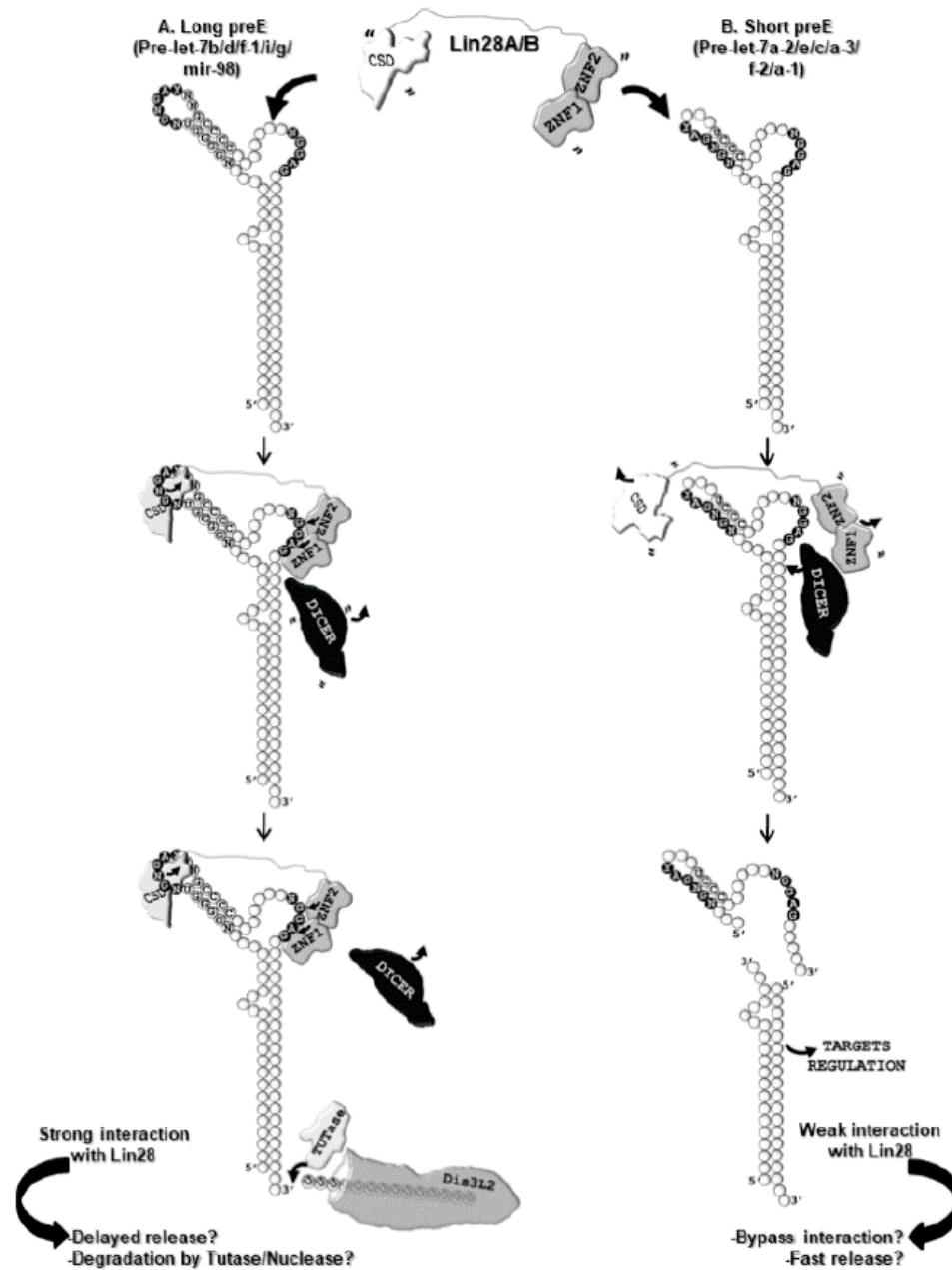


Fig. (5). Hypothetical outcome of let-7 biogenesis regulated by LIN28B in cervical cancer cell lines. The model shows the interaction between the CDS and ZNF12 of LIN28A/LIN28B and the preE-loop of both types of let-7 precursors. A) The left panel shows an ideal long preE-stem interacting with CSD and ZNF domains from LIN28A/LIN28B proteins. Formation of a wider preE-loop will establish a high-affinity interaction with the CSD that may prevent DICER from interaction with its target sequence and thus allow TUTase/Dis3L2-mediated degradation. Alternatively, the long preE-stem precursor may be protected from degradation and have a delayed release. B) The right panel shows a short preE-stem where the CSD docking sequences pair with the C-U region within the 3' preE-stem resulting in a less stable interaction with the CSD, leading to a fast release and thus quick processing or even by pass of LIN28A/LIN28B regulation, hypothetically allowing the mature let-7 regulate its targets.

Table 2. Sequence alignment of human pre-let-7 miRNAs. The complete sequences of the human pre-let-7a-2, pre-let-7a-3, pre-let-7c, pre-let-7e, pre-let-7f-1, pre-let-7g, pre-let-7i and pre-miR-98 were first aligned with CLUSTALW and re-arranged relative to the preE. Each sequence was divided into three main sections: the 5P STEM (which includes the underlined seed sequences), the preE-ELEMENT and the 3P STEM. The preE was further divided in four sub-sections: The G-rich region at the 5' preE-STEM, the CSD docking site in the preE-LOOP, the C-rich region at the 3' preE-STEM and the ZNF interaction sites in the preE-BULGE. The most stable secondary structures were used to identify the pairing nucleotides that can form a preE-stem (Bold).

let-7 PRECURSOR	5P STEM	preE-ELEMENT				3P STEM
		5'preE-STEM	preE-LOOP	3'preE-STEM	preE-BULGE	
Pre-let-7a-2	GGUUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU		UAGAAUAC	AUCAA	GGGAGAU	AACUGUACAGCCUCCUAGCUUUCCU
Pre-let-7e	GGCUGAGGUAGGAGGUUGU-AUAGUUGA		GGAGGA	CACCCA	AGGAGA	UCACUAUACGGCCUCCUAGCUU-UCCC
Pre-let-7c	GGUUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU		UAGAGUUA	CACCCU	GGGAGUU	AACUGUACAACCUUCUAGCUUUCCU
Pre-let-7a-3	GGGUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU		UGGGGCUCU	GCCCGUCU	AUGGGAU	AACUAUACAUCUACUGUCUUUCCU
Pre-let-7f-2	GGAUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	U	UAGGGUCAU	ACCCCAUCU	UGGAGAU	AACUAUACAGUCUACUGUCUUUCCC
Pre-let-7a-1	GGAUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	U	UAGGGUCAC	ACCCACCACU	GGGAGAU	AACUAUACAUCUACUGUCUUUCCU
Pre-let-7b	GGGUGAGGUAGUAGGUUGUGUGUU	UCAGGGC	AGUGAUGUU	GCCCCUC	GGAAGAU	AACUAUACAACCUACUGCCU-UCCUG
Pre-let-7d	GGAAGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	UUAGGGC	AGGGAUUUU	GCCCACA	AGGAGGU	AACUAUACGACCUCGUCUUUUUU
Pre-let-7f-1	GAGUGAGGUAGUAGAUUGU-AUAGUUGU	GGGGU	AGUGAUUUU	ACCCUGUUC	AGGAG	AUAACUAUACAUCUUAUUGCCUUC-CCU
Pre-let-7i	GGCUGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU	GGUCGGGU	UGUGACAUU	GCCCGCUG	UGGAGAU	AACUGGCAAGCUACUGCCUUGCUA
Pre-let-7g	GGCUGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	UGAGGGUC	UAUGAUACC	ACCCGGUAC	AGGAGAU	AACUGUACAGGCCACUGCCUUGCCA
Pre-miR-98	GGGUGAGGUAGUAAGUUGU-AUUGUUG	UGGGGU	AGGGUAUUU	AGGCCCAAUU	AGAAGA	UAACUAUACAUCUUAUCUUCUUC-CCU
Consensus			NGNGAY		NGNNG	

immortal cell line HaCaT suggesting that although pre-let-7c, pre-let-7f-1 and pre-miR-98 are present, they may not be functionally available. It is unclear whether the observed differential let-7 regulation associates with malignancy or if this phenomenon is common to cancer types other than cervical cancer. Moreover, the assessment of mature let-7 miRNAs may provide additional evidence of let-7 dysregulation in cervical cancer. Further binding and structural studies on the interaction between let-7 miRNA precursors and LIN28A/LIN28B may help to better understand the role of these tumor suppressors in normal and cancer cells, including cervical cancer.

LIST OF ABBREVIATIONS

Chr = Chromosome
ICL = Immortal Cell Line
TCL = Tumor Cell Line

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for studies that are base of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by CONACyT (Grant CB-2012-176281).

Aida Margarita Zamora-Contreras M.Sc., performed experiments, analyzed data and wrote the manuscript.

Luis Marat Alvarez-Salas Ph.D., designed the project, provided technical guidance, analyzed the data, reviewed and improved the manuscript.

We thank Sergio I. Rangel-Guerrero M.Sc. and Noé Duran Ph.D. for critical review of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available on the publisher's web site along with the published article.

REFERENCES

- [1] Hellner K, Munger K. Human papillomaviruses as therapeutic targets in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 1785-94.
- [2] Nobbenhuis MA, Helmerhorst TJ, van den Brule AJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Bezemer PD, Verheijen RH, Meijer CJ. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet.* 2001; 358: 1782-3.
- [3] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005; 120: 15-20.
- [4] Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* 2005; 433: 769-73.
- [5] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116: 281-97.
- [6] Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2009; 7: 147-54.
- [7] Reshmi G, Pillai MR. Beyond HPV: oncomirs as new players in cervical cancer. *FEBS Lett.* 2008; 582: 4113-6.
- [8] Bracht J, Hunter S, Eachus R, Weeks P, Pasquinelli AE. Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. *RNA.* 2004; 10: 1586-94.
- [9] Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014; 15: 509-24.
- [10] Lee Y *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003; 425: 415-9.
- [11] Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004; 432: 231-5.
- [12] Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 2004; 432: 235-40.
- [13] Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol.* 2004; 14: 2162-7.
- [14] Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 2005; 436: 740-4.
- [15] Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science.* 2001; 293: 834-8.
- [16] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000; 403: 901-6.
- [17] Johnson SM *et al.* RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 2005; 120: 635-47.
- [18] Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen TD. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: 5394-403.
- [19] Yang X, Rutnam ZJ, Jiao C, Wei D, Xie Y, Du J, Zhong L, Yang BB. An anti-let-7 sponge decoys and decays endogenous let-7 functions. *Cell Cycle.* 2012; 11: 3097-108.
- [20] Yu F *et al.* let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell.* 2007; 131: 1109-23.
- [21] Schultz J, Lorenz P, Gross G, Ibrahim S, Kunz M. MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth. *Cell Res.* 2008; 18: 549-57.
- [22] Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell.* 2009; 139: 693-706.
- [23] Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, Petrelli NJ, Dunn SP, Krueger LJ. MicroRNA let-7a downregulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* 2007; 67: 9762-70.
- [24] Tokumaru S, Suzuki M, Yamada H, Nagino M, Takahashi T. let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis.* 2008; 29: 2073-7.
- [25] Guo Y, Chen Y, Ito H, Watanabe A, Ge X, Kodama T, Aburatani H. Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. *Gene.* 2006; 384: 51-61.
- [26] Heo I, Joo C, Cho J, Ha M, Han J, Kim VN. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol. Cell.* 2008; 32: 276-84.
- [27] Michlewski G, Caceres JF. Antagonistic role of hnRNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010; 17: 1011-8.
- [28] Newman MA, Thomson JM, Hammond SM. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA.* 2008; 14: 1539-49.
- [29] Rybak A, Fuchs H, Smirnova L, Brandt C, Pohl EE, Nitsch R, Wulczyn FG. A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat. Cell Biol.* 2008; 10: 987-93.
- [30] Trabucchi M, Briata P, Garcia-Mayoral M, Haase AD, Filipowicz W, Ramos A, Gherzi R, Rosenfeld MG. The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature.* 2009; 459: 1010-4.
- [31] Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science.* 2008; 320: 97-100.
- [32] Nam Y, Chen C, Gregory RI, Chou JJ, Sliz P. Molecular basis for interaction of let-7 microRNAs with Lin28. *Cell.* 2011; 147: 1080-91.
- [33] Heo I, Ha M, Lim J, Yoon MJ, Park JE, Kwon SC, Chang H, Kim VN. Mono-uridylation of pre-microRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 microRNAs. *Cell.* 2012; 151: 521-32.
- [34] Horvitz HR, Sulston JE. Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 1980; 96: 435-54.
- [35] Viswanathan SR *et al.* Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat. Genet.* 2009; 41: 843-8.
- [36] Shyh-Chang N, Daley GQ. Lin28: primal regulator of growth and metabolism in stem cells. *Cell Stem Cell.* 2013; 12: 395-406.
- [37] Wang T, Wang G, Hao D, Liu X, Wang D, Ning N, Li X. Aberrant regulation of the LIN28A/LIN28B and let-7 loop in human malignant tumors and its effects on the hallmarks of cancer. *Mol. Cancer.* 2015; 14: 125-38.
- [38] Thornton JE, Chang HM, Piskounova E, Gregory RI. Lin28-mediated control of let-7 microRNA expression by alternative TUTases Zcchc11 (TUT4) and Zcchc6 (TUT7). *RNA.* 2012; 18: 1875-85.
- [39] Hagan JP, Piskounova E, Gregory RI. Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009; 16: 1021-5.
- [40] Heo I, Joo C, Kim YK, Ha M, Yoon MJ, Cho J, Yeom KH, Han J, Kim VN. TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell.* 2009; 138: 696-708.

- [41] Chang HM, Triboulet R, Thornton JE, Gregory RI. A role for the Perlman syndrome exonuclease Dis3l2 in the Lin28-let-7 pathway. *Nature*. 2013; 497: 244-8.
- [42] Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr. Relat. Cancer*. 2010; 17: F19-F36.
- [43] Loughlin FE, Gebert LF, Towbin H, Brunschweiler A, Hall J, Allain FH. Structural basis of pre-let-7 miRNA recognition by the zinc knuckles of pluripotency factor Lin28. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011; 19: 84-9.
- [44] Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res*. 2007; 67: 6031-43.
- [45] Lee JW *et al.* Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clin. Cancer Res*. 2008; 14: 2535-42.
- [46] Sharma C, Mohanty D. Molecular Dynamics Simulations for Deciphering the Structural Basis of Recognition of Pre-let-7 miRNAs by LIN28. *Biochemistry*. 2017; 56: 723-35.
- [47] Shirasawa H, Tomita Y, Sekiya S, Takamizawa H, Simizu B. Integration and transcription of human papillomavirus type 16 and 18 sequences in cell lines derived from cervical carcinomas. *J. Gen. Virol.* 1987; 68: 583-91.
- [48] Alvarez-Salas LM, Arpawong TE, DiPaolo JA. Growth inhibition of cervical tumor cells by antisense oligodeoxynucleotides directed to the human papillomavirus type 16 E6 gene. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1999; 9: 441-50.
- [49] Woodworth CD, Bowden PE, Doniger J, Prisi L, Barnes W, Lancaster WD, DiPaolo JA. Characterization of normal human exocervical epithelial cells immortalized *in vitro* by papillomavirus types 16 and 18 DNA. *Cancer Res*. 1988; 48: 4620-8.
- [50] Woodworth CD, McMullin E, Iglesias M, Plowman GD. Interleukin 1 alpha and tumor necrosis factor alpha stimulate autocrine amphiregulin expression and proliferation of human papillomavirus-immortalized and carcinoma-derived cervical epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995; 92: 2840-4.
- [51] Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 1988; 106: 761-71.
- [52] Lopez JA, Alvarez-Salas LM. Differential effects of miR-34c-3p and miR-34c-5p on SiHa cells proliferation apoptosis, migration and invasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011; 409: 513-9.
- [53] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25: 402-8.
- [54] Pasquinelli AE *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000; 408: 86-9.
- [55] Sun X, Liu J, Xu C, Tang SC, Ren H. The insights of Let-7 miRNAs in oncogenesis and stem cell potency. *J. Cell Mol. Med.* 2016; 20: 1779-88.
- [56] Su JL, Chen PS, Johansson G, Kuo ML. Function and regulation of let-7 family microRNAs. *Microna*. 2012; 1: 34-9.
- [57] Oh JS, Kim JJ, Byun JY, Kim IA. Lin28-let7 modulates radiosensitivity of human cancer cells with activation of K-Ras. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2010; 76: 5-8.
- [58] Keane M, de Magalhaes JP. MYCN/LIN28B/Let-7/HMGA2 pathway implicated by meta-analysis of GWAS in suppression of post-natal proliferation thereby potentially contributing to aging. *Mech. Ageing Dev.* 2013; 134: 346-8.
- [59] Xie K, Liu J, Zhu L, Liu Y, Pan Y, Wen J, Ma H, Zhai X, Hu Z. A potentially functional polymorphism in the promoter region of let-7 family is associated with survival of hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol.* 2013; 37: 998-1002.
- [60] Liu J, Ni S. Association between genetic polymorphisms in the promoters of let-7 and risk of cervical squamous cell carcinoma. *Gene*. 2018; 642: 256-60.
- [61] Triboulet R, Pirouz M, Gregory RI. A Single Let-7 MicroRNA Bypasses LIN28-Mediated Repression. *Cell Rep.* 2015; 13: 260-6.
- [62] Mayr F, Heinemann U. Mechanisms of Lin28-mediated miRNA and mRNA regulation--a structural and functional perspective. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14: 16532-53.
- [63] Desjardins A, Yang A, Bouvette J, Omichinski JG, Legault P. Importance of the NCp7-like domain in the recognition of pre-let-7g by the pluripotency factor Lin28. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: 1767-77.