



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Genética y Biología Molecular

**Análisis de la función biológica del
hsa-miR125a-5p**

Tesis que presenta:

M. en C. Natalia Martínez Acuña

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

En la especialidad de:

Genética y Biología Molecular

Director de Tesis:

Dr. Luis Marat Alvarez Salas

Ciudad de México

Diciembre del 2017

Índice

Índice	1
Agradecimientos	3
Resumen	6
Abstract	7
Introducción	8
Cáncer cérvico-uterino	8
Virus del Papiloma Humano (VPH)	9
Cáncer Cérvico-Uterino y microRNAs	10
Cáncer, oncogenes y miRNAs	11
MiRNAs	12
Organización genómica y biogénesis.....	13
Mecanismo de acción: reconocimiento y represión traduccional.	16
Identificación de transcritos blanco	17
miR-125a-5p	18
Antecedentes	20
Hipótesis	24
Objetivo general	25
Objetivos específicos	25
Estrategia experimental	26
Materiales y Métodos	27
Transfecciones	27
Extracción de Proteínas Totales	27
Western Blot	27
Extracción de RNA total	28
PCR y oligonucleótidos	29
Diseño y construcción de los vectores reporteros	29
Actividad de luciferasa	30
Migración	30
Tinción por CFSE	31

Incorporación de BrdU.....	31
Tinción con Ioduro de propidio.....	32
Crecimiento en agar suave.....	32
Clonogenicidad	32
Resultados	33
Validación de MARK1 como blanco directo de miR-125a-5p	33
Evaluación de la funcionalidad del sitio blanco predicho de MARK1.	33
Caracterización del efecto biológico de miR-125a-5p sobre procesos asociados con el fenotipo tumoral.	36
miR-125a-5p potencia la capacidad migratoria de las células tumorales a través de la regulación de MARK1.....	36
La presencia de mutaciones en el sitio blanco y diferencias en el perfil de expresión de MAPs podría alterar la respuesta a miR-125a-5p.....	40
Perfil de expresión de MAP2.....	42
miR-125a-5p y la activación de Snail	42
miR-125a-5p afecta negativamente la proliferación celular y favorece el crecimiento independiente de anclaje.	44
miR-125a-5p y holoclonas derivadas de la línea tumoral SiHa. Posible relación con el fenotipo tipo troncal.....	48
Discusión	53
Conclusiones	57
Perspectivas.....	59
Bibliografía	60

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Terapia Génica dirigido por el Dr. Luis Marat Alvarez Salas en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N (CINVESTAV) Unidad Zacatenco. El Autor agradece el apoyo para la realización de este trabajo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con el número de registro 243282 así como al CINVESTAV por el apoyo para la obtención de grado.

Agradecimientos

Al Doctor Luis Marat Alvarez Salas por la oportunidad dada para la continuación del proyecto de tesis ahora para la obtención del grado de doctorado. Por haberme dado su apoyo a nivel profesional y personal en los momentos precisos. Gracias por brindarme una agradable familia profesional.

A los Doctores Efrain Garrido, Rosa Ma. Bermudez, Guillermo Aquino y Julia Toscano, por el tiempo invertido y asesoramiento de esta tesis.

Al señor Héctor Vargas Rojas, y a la Química Erika Sánchez Guzmán por su apoyo técnico durante la realización de esta tesis.

Al personal del Departamento de Genética y Biología Molecular: Secretaria Gabriela Mora y al María Guadalupe Aguilar Gonzalez (Responsable del Servicio de Secuenciación) por el apoyo y facilidades de tipo administrativo y técnico para la realización de este trabajo.

A la Dra. J. Virginia Tapia Vieyra por el apoyo en el cultivo de las líneas celulares empleadas en este trabajo, así como su amistad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, quienes estuvieron cuando más los necesité en múltiples momentos. Dra. Gabriela Leija, M. en C. Aida Zamora, M. en C. Alejandro Gonzalez, M. en C. Rodrigo Rosas, M. en C. Diana Valencia, M. en C. Giovanni Palomino, M. en C. Sergio Rangel y a los más nuevos Fernanda Perez, Mateo Martínez, Pablo Franco y Evelyn Bañuelos, gracias por todos los regaños, enseñanzas, crítica técnica y las aventuras vividas dentro y fuera del laboratorio.

A Alejandro González Torres por su trabajo experimental realizado en apoyo a la conclusión de esta tesis. A Giovanni Palomino por su ayuda en esquemas aquí utilizados.

A Carmen, amiga y roomie, por todo el apoyo dado durante los últimos años. Gracias por todo. A Gerson Caraballo por hacer las preguntas correctas, y mostrarme una nueva perspectiva.

A mis padres, quienes a pesar de no entender que estaba haciendo...me apoyaron siempre.

Resumen

La expresión aberrante de los microRNAs (miRNAs) se encuentra asociada al desarrollo de varias enfermedades incluyendo el cáncer cervical. Aunque el cáncer cérvico uterino se ha relacionado con la infección persistente por el virus del papiloma humano de alto riesgo, se requieren de factores adicionales para la transformación maligna, entre estos se encuentran los miRNAs. La desregulación de miR-125a-5p está implicada en una variedad de tumores, pero su papel en el cáncer cervical ha sido poco estudiado. En este trabajo, se analizó en un panel de 9 líneas de células epiteliales cervicales además de la predicción y validación de blancos potenciales. A través del análisis bioinformático MARK1 fue postulado como un blanco potencial para miR-125a-5p en cáncer cérvico-uterino. MARK1 mostró un nivel de expresión inversamente proporcional al nivel de expresión de miR-125a-5p en las líneas celulares de fenotipo tumoral. A través de ensayos basados en construcciones reporteras de luciferasa, se confirmó el reconocimiento directo del sitio blanco predicho encontrado en el 3'UTR del RNAm de MARK1. MARK1 fosforila específicamente el dominio de unión de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP), las cuales regulan la dinámica de los microtúbulos durante la migración celular. Las líneas celulares HeLa y C-33A mostraron un aumento en la migración después de la transfección con miR-125a-5p. La estimulación de la migración celular fue reproducida por el silenciamiento de MARK1, sugiriendo un efecto regulador de la migración a través de la relación miR-125a-5p:MARK1. Adicionalmente, se encontró miR-125a-5p promueve el crecimiento independiente de anclaje pero afecta la proliferación celular en la línea tumoral HeLa.

Abstract

Aberrant microRNA (miRNA) expression is associated with the development of several diseases including cervical cancer. Although cervical cancer has been linked to persistent infection with high-risk human papillomavirus (hrHPV), additional factors are required for malignant transformation including the participation of miRNAs. Dysregulation of miR-125a-5p is involved in a variety of tumors, but its role in cervical cancer is little known. In this study, the expression profile of miR-125a-5p was analyzed in a panel of 9 epithelial cervical cell lines including prediction and validation for potential targets. Thermodynamic and ontological analyses showed four probable targets for miR-125a-5p in cervical tumors: MARK1, VEGF, MMP11 and bcl-2. Differential miR-125a-5p expression was observed in immortal and tumor cells regardless the HPV content. An inverse correlation was found between miR-125a-5p expression and Microtubule-affinity-regulating kinase1 (MARK1), VEGF and bcl-2 proteins in tumor cell lines. Luciferase assays showed direct miR-125a-5p regulation of MARK1 mRNA via 3'-UTR target site recognition. MARK1 specifically phosphorylate the binding domain of microtubule-associated proteins (MAPs) regulating microtubule dynamics and stability during cell migration. HeLa and C-33A cervical tumor cells enhanced migration after transfection of miR-125a-5p mimics. Cell migration stimulation was reproduced by anti-MARK1 siRNA transfection suggesting a regulatory effect of migration via miR-125a-5p:MARK1 circuit. Additionally, miR-125a-5p promotes anchorage independent cell growth and inhibits cell proliferation, suggesting a implication in cancer dissemination. Our results suggest that miR-125a-5p regulates MARK1 as a novel functional target, promotes cell migration and promotion of anchorage independent cell growth, inhibits cell proliferation and is overexpressed in stem cell like phenotype.

Introducción

Cáncer cérvico-uterino

El cáncer cérvico-uterino (CaCU) representa el segundo tipo de cáncer más frecuente entre la población femenina, así como la cuarta causa de muerte a nivel mundial. Se estima que cerca 529,000 nuevos casos son diagnosticados anualmente, mientras que 275,000 muertes por año son ocasionadas por este padecimiento (GLOBOCAN,2008). En México, el cáncer cervical representa un problema de salud nacional el cual se ha mantenido sin cambios durante años, a pesar de los distintos esquemas de prevención, monitoreo y de las vacunas disponibles, con una incidencia de 13,960 nuevos casos anuales y 4769 muertes anuales (ICO, 2016).

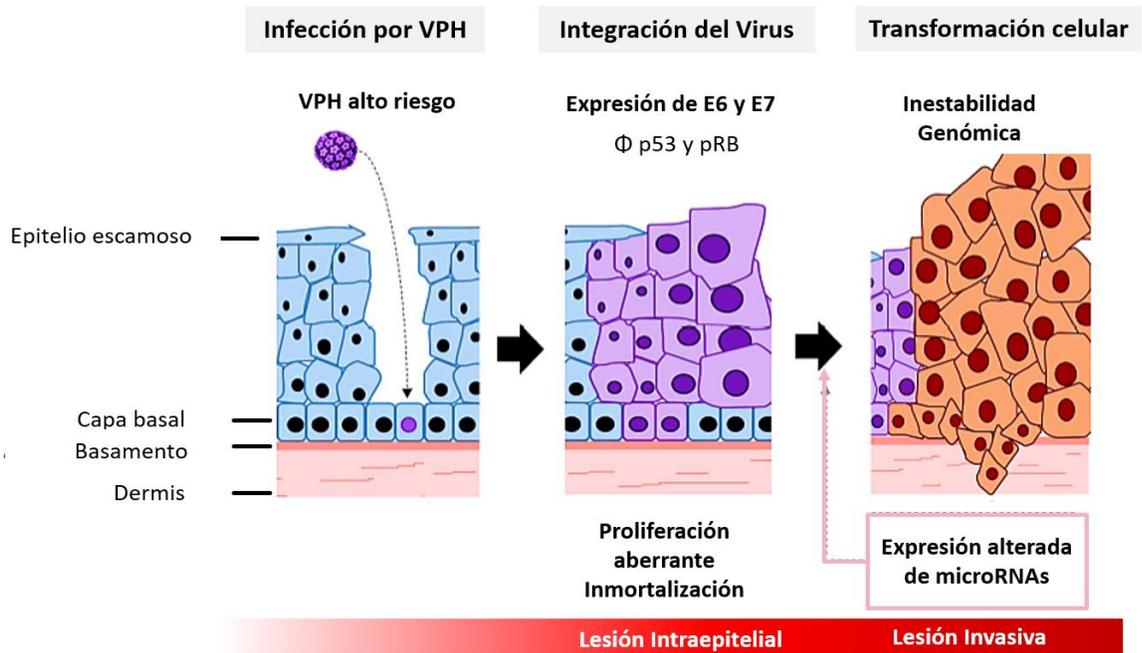


Figura 1. VPH y Cáncer cérvico-uterino

Los virus de alto riesgo del VPH infectan a través de lesiones a las células de la capa basal. En estas células y después de la integración viral al genoma celular, el virus es capaz de abatir los principales sistemas de supresión de tumores p53 y pRB por efecto de las oncoproteínas E6 y E7. Esto genera la hiperproliferación e inmortalización de la célula. Posteriormente, estos cambios pueden llevar a un ambiente de inestabilidad genómica favoreciendo la adquisición de nuevas mutaciones (que junto con factores adicionales) pueden llevar a la transformación celular.

Este tipo de cáncer, se origina en el epitelio que recubre al cérvix, órgano que conecta el útero con la vagina. Se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras de progresión lenta, que posteriormente evolucionan hacia un cáncer dentro de los límites de la superficie epitelial y por último en un cáncer invasor, cuando la lesión traspasa la membrana basal.

Epidemiológicamente, el desarrollo de este tipo de cáncer se encuentra fuertemente asociado a la infección persistente con el Virus del Papiloma Humano (VPH) (**Figura 1**), siendo los tipos 16 y 18 los responsables del 70% de todos los casos (Jemal et al. 2011). El riesgo de contraer este padecimiento también se ve aumentado por el estilo de vida y hábitos como el tabaquismo, vida sedentaria y múltiples parejas sexuales (Bosch F, Munoz MT 1997; Walboomers et al. 1999; Burd 2003).

Virus del Papiloma Humano (VPH)

El VPH es un virus perteneciente a la familia Papillomaviridae. Es un virus relativamente pequeño, no envuelto de aproximadamente 55 nm de diámetro. Posee una cápside icosaédrica formada por 72 capsómeros, compuestos por 2 proteínas denominadas como L1 y L2 (Z. Zheng & Baker 2006).

El genoma de este virus está compuesto por una doble cadena de ADN circular de aproximadamente 7,900 pbs, la cual se encuentra asociada con histonas (Zheng & Backer 2006). El genoma del virus se encuentra funcionalmente organizado en 3 regiones (i) una región reguladora no codificante denominada LCR (del inglés *long control region*) de 400- 1000 pb la cual controla la replicación y la transcripción del virus; (ii) una región de expresión temprana que incluye los genes para las proteínas virales E1, E2, E5, E6 y E7 involucradas en la replicación viral y la oncogénesis y (iii) la región de expresión tardía que incluye a las proteínas de la cápside L1 y L2 (Burd 2003).

Cerca de 200 tipos de VPH han sido identificados en base a las diferencias en su genoma y 85 de ellos han sido bien caracterizados (Burd 2003; Muñoz et al. 2003). Con base a su potencial oncogénico y su asociación al desarrollo de CaCU se han clasificado en virus de bajo riesgo como los 6 y 11, que sólo causan verrugas; y de alto riesgo como los 16 y 18 entre otros, cuya infección está asociada en el 70% de los casos de CaCU además de presentar la mayor distribución geográfica (Muñoz et al. 2003; Walboomers et al. 1999; WHO/ICO 2010).

El potencial oncogénico de los VPH se basa en la capacidad de las oncoproteínas E6 y E7 de alterar el ciclo celular y el proceso de apoptosis; esto a través de la inactivación de los factores celulares p53 y pRB (Scheffner et al. 1990; Zur Hausen 1996; Walboomers et al. 1999; X. Liu et al. 2005; Jemal et al. 2011). Cooperativamente la proteína E5 potencia el efecto de E6 y E7 al favorecer la activación y mantenimiento de la señalización de vías como la de EGFR y MAPK así como contribuir al escape de la respuesta inmune (Moody & Laimins 2010).

A pesar de la capacidad del VPH por alterar el comportamiento celular, la sola infección no es suficiente para la inducir la formación de tumores por lo cual sólo una fracción de las mujeres infectadas por VPH de alto riesgo llegan a desarrollar cáncer. Esto sugiere la requisición de alteraciones celulares adicionales que medien la transformación celular.

Cáncer Cérvico-Uterino y microRNAs

En términos generales, el cáncer es causado por una proliferación descontrolada y una sobrevivencia inapropiada de un cierto grupo de células con algún tipo de daño geneético, sumadas a la incapacidad del sistema inmune del huésped para identificar y eliminar adecuadamente este tipo de alteración. Normalmente, la proliferación y muerte celular se encuentran finamente reguladas por un gran número de factores, así como procesos conjuntos que aseguran que ninguna célula dañada sea mantenida en el organismo. Sin embargo, en el caso del cáncer cervical, la infección con el VPH favorece la inactivación de aquellos genes

que normalmente median el arresto celular, sistemas de reparación apoptosis y diferenciación, conocidos como genes supresores de tumores; o bien activa permanentemente a aquellos involucrados en la promoción de la división celular, proliferación y sobrevivencia, denominados proto-oncogenes (Bertram 2000; E. Y. H. P. Lee & Muller 2010). Anteriormente, se suponía que la afección de genes codificantes eran los principales mediadores de la transformación maligna; sin embargo, la expresión aberrante de los miRNAs ha sido asociada recientemente a múltiples desórdenes, incluyendo al proceso de carcinogénesis (Calin & Croce 2006). De igual manera, si un miRNA determinado promueve o frena la progresión del tumor, puede clasificarse como un miRNA supresor de tumores y oncomiRs, respectivamente.

Diferentes líneas de investigación han demostrado que el perfil de expresión de miRNAs (miRnoma) es característico del tipo de cáncer, estadio y de otras variables clínicas importantes; por lo que surgen como posibles marcadores para el diagnóstico y prognosis, así como blancos terapéuticos (Wei et al. 2009; Yu et al. 2010; Boeri et al. 2011). Igualmente, la pérdida general de la maquinaria de biogénesis de los miRNAs es capaz de estimular la transformación y tumorigénesis *in vivo*; indicando que los cambios en el miRnoma pueden considerarse un agente causal del cáncer y no sólo una consecuencia de este (Y. S. Lee & Dutta 2009). Por lo anterior, el análisis del perfil de expresión de los miRNAs, así como el establecimiento de su circuito regulatorio es un paso esencial para el entendimiento de del proceso de tumorigénesis en el cáncer cérvico-uterino y brinda la posibilidad del desarrollo de nuevas estrategias para su diagnóstico y/o tratamiento.

Cáncer, oncogenes y miRNAs

Diferentes líneas de investigación han demostrado que el perfil de expresión de miRNAs o miRnoma es característico del tipo de cáncer, estadio y de otras variables clínicas importantes; por lo que surgen como posibles marcadores para el diagnóstico y prognosis así como blancos canceroso ha sido asociado a la

pérdida de estas pequeñas moléculas; incluso la supresión global de los miRNAs a través del “*knock down*” de la maquinaria de biogénesis es capaz de estimular la transformación y tumorigénesis *in vivo*; indicando que los cambios en el miRnoma pueden considerarse un agente causal del cáncer y no sólo una consecuencia de éste (Y. S. Lee & Dutta, 2009).

Distintos mecanismos pueden mediar la expresión alterada de los miRNAs. A través del análisis *in silico* se ha observado que una cantidad significativa de miRNAs se encuentran codificados en sitios frágiles del genoma; susceptibles a inserciones, eliminaciones, duplicaciones o traslocaciones normalmente asociados al proceso de tumorigénesis. Adicionalmente un miRNA puede quedar silenciado a través de marcas epigenéticas asociadas al cáncer (como es la hipermetilación de las islas CpG de la región promotora) que conlleva a la modificación de histonas y al rearrreglo de la cromatina; o bien por la activación o pérdida de factores transcripcionales específicos. Por otra parte, no sólo los cambios en el nivel de expresión de los miRNAs pueden alterar el comportamiento celular, sino que cambios en la secuencia del miRNA o en el sitio de unión localizado en el 3'UTR de los genes blanco, pueden alterar su maduración así como el reconocimiento del blanco (Y. S. Lee & Dutta, 2009).

MiRNAs

Desde su descubrimiento en *Caenorhabditis elegans* (R. C. Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993) los miRNAs han venido a revolucionar el concepto existente sobre la regulación de la expresión génica. Posteriormente, se observó que estas pequeñas moléculas, regulaban la mayoría de los procesos celulares mediante mecanismos ampliamente conservados a través de animales y plantas. En la actualidad, se tienen registrados dentro de la miRBase 28645 horquillas precursoras, las cuales expresan 35828 productos en 223 especies. (Griffiths-Jones, Saini, van Dongen, & Enright, 2008).

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA, no codificante, de origen endógeno y en cuya forma madura, poseen una longitud entre los 18 y 24

nucleótidos. Funcionalmente, actúan como reguladores post-transcripcionales de la expresión génica a través del reconocimiento por complementariedad de los transcritos blanco (Bartel, 2004; Lai, 2002) evitando su traducción.

Organización genómica y biogénesis

Los miRNAs son generados a partir de transcritos endógenos codificados dentro del genoma de la célula (**Figura 2**). En un amplio sentido, los genes para miRNAs se componen de secuencias complementarias separadas por una región sin complementariedad, que al transcribirse permite que el RNA se pliegue en estructuras de tallo y asa (horquillas) que posteriormente son procesadas para dar origen al miRNA maduro.

Las secuencias codificantes para miRNAs se encuentran distribuidas dentro de diferentes contextos genómicos por lo cual su biogénesis puede depender de distintos mecanismos (Olena & Patton, 2010). De manera canónica los miRNAs son transcritos por la pol II, generando transcritos primarios o pri-miRNAs. Estos carecen de marcos de lectura abiertos, poseen estructuras tallo-asa y sufren de las modificaciones post transcripcionales típicas de un RNA mensajero como la poliadenilación del extremo 3' y la adición de una 7 metil-guanosina hacia el 5' (Cai, Hagedorn, & Cullen, 2004; Y. Lee et al., 2004). Posteriormente, el pri-miRNA es procesado por la RNAasa tipo III *Drosha*, la cual reconoce las estructuras tallo-asa presentes en el pri-miRNA (Y. Lee et al., 2003). *Drosha* junto con su cofactor DGCR8 (*Pasha* en *Drosophila*), propician el corte de ambas cadenas del pri-mirna en la base del tallo de la horquilla principal (Gregory et al., 2004; Han et al., 2004). El corte realizado es asimétrico, dejando dos bases salientes en el extremo 3' que define uno de los extremos de lo que será el miRNA maduro. Finalmente una horquilla intermediaria de ~60-70 bases es liberada y recibe el nombre de miRNA precursor o pre-miRNA (Grishok et al., 2001; Y. Lee et al., 2003; Y. Lee, Jeon, Lee, Kim, & Kim, 2002). En seguida el pre-miRNA es exportado del núcleo hacia el citoplasma por la Exportina 5 (Lund, Güttinger, Calado, Dahlberg, & Kutay, 2004; Yi, Qin, Macara, & Cullen, 2003), una proteína de unión a RNA de doble

cadena dependiente de RanGTP (Bohnsack, Czaplinski, & Gorlich, 2004). Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es sometido a un segundo paso de procesamiento mediado por otra RNAasa tipo III, denominada *Dicer* (Bernstein, Caudy, Hammond, & Hannon, 2001; G Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001; Y. Lee et al., 2003). En este segundo paso, *Dicer* reconoce el extremo saliente del pre-miRNA dejado por *Drosha* e independientemente de su secuencia y realiza un corte en ambas cadenas aproximadamente a 2 giros helicoidales del extremo 3' (Ma, Ye, & Patel, 2004; Zamore, Tuschl, Sharp, & Bartel, 2000). Lo anterior provoca la remoción del asa de la horquilla del pre-miRNA generando como producto un dúplex imperfecto de 22 nucleótidos, con 2 bases salientes hacia cada uno de sus extremos 3' (Bartel, 2004; Bernstein et al., 2001; S M Elbashir, Martinez, Patkaniowska, Lendeckel, & Tuschl, 2001; Sayda M Elbashir, Lendeckel, & Tuschl, 2001; Kim, 2005; Zamore et al., 2000).

Para ejercer su función, los miRNA requieren de la formación del complejo efector RISC (del inglés *RNA-induced silencing complex*) (Hammond, Bernstein, Beach, & Hannon, 2000), un complejo multimérico formado principalmente por *Dicer*, TRBP/D2R2 y Argonauta. Sólo una de las cadenas del dúplex es mantenida en el complejo de RISC (Martinez, Patkaniowska, Urlaub, Lührmann, & Tuschl, 2002; Sakurai et al., 2011), mientras que la cadena opuesta, denominada miRNA* ó cadena pasajera, es eliminada. La selección de la cadena depende de una serie de factores estructurales y termodinámicos que permiten distinguir a la cadena guía de la cadena pasajera (Khvorova, Reynolds, & Jayasena, 2003; Sano et al., 2008; Schwarz et al., 2003). Si ambas cadenas muestran características similares la frecuencia de selección es la misma para ambas (Schwarz et al., 2003). Estas diferencias son sensadas por una de las subunidades de *Dicer*, TRBP en humanos y D2R2 en *Drosophila* (Q. Liu et al., 2003; Sakurai et al., 2011), que reconoce el extremo 5' de la cadena pasajera (extremo 5' con mayor apareamiento con su cadena complementaria) orientando al dúplex de RNA de tal forma que el resto de *Dicer* pueda tomar el extremo 5' de la cadena guía (Tomari, Matranga, Haley, Martinez, & Zamore, 2004). Posteriormente, Argonauta 2 (proteína principal del complejo de RISC) (Hwang & Mendell, 2006) reconoce al extremo 3' de la

cadena guía y corta a la cadena pasajera, favoreciendo su eliminación (Matranga, Tomari, Shin, Bartel, & Zamore, 2005; Rand, Petersen, Du, & Wang, 2005). Esto permite la interrupción del dúplex y la activación de RISC (Nykänen, Haley, & Zamore, 2001; Okamura, Ishizuka, Siomi, & Siomi, 2004; Tomari et al., 2004). Proteínas accesorias como MOV10 y la RNA Helicasa A pueden asociarse al complejo de RISC humano, para formar finalmente un complejo activo (Robb & Rana, 2007) . Una vez activado el complejo RISC, la cadena incorporada es empleada como guía para la identificación de los mRNA que deben ser silenciados; haciendo que el reconocimiento del blanco sea un proceso altamente específico (Martinez et al., 2002; Schwarz, Hutvagner, Haley, & Zamore, 2002; Zamore et al., 2000).

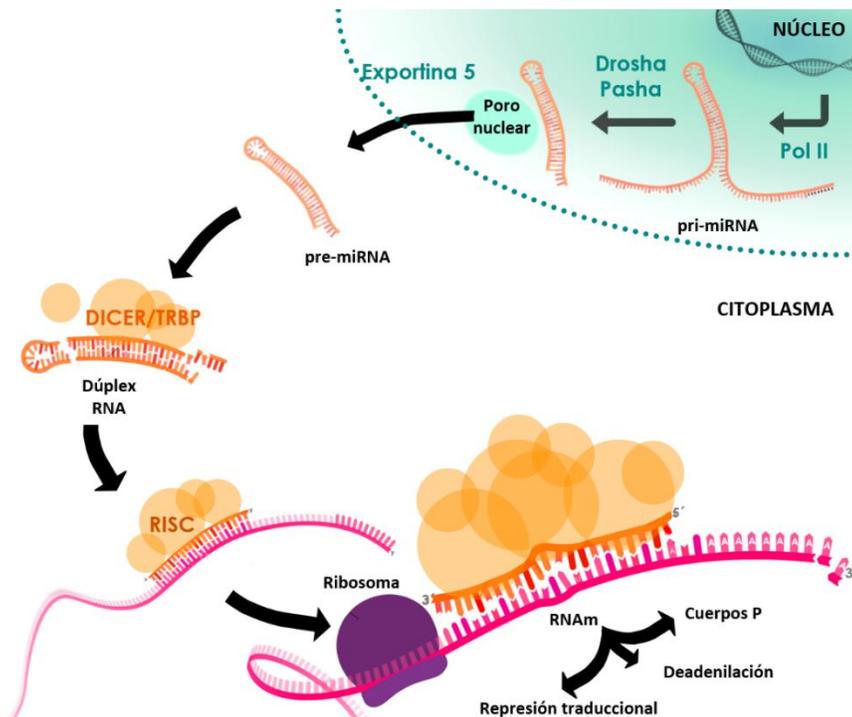


Figura 2. Biogénesis de los miRNAs: Vía canónica.

Los miRNAs son transcritos por acción de la pol II dando origen al miRNA primario. Este contiene estructuras en forma de tallo-asa que son reconocidas y procesadas por Drosha/Pasha generando una horquilla conocida como miRNA precursor. Esta horquilla es trasladada al citoplasma por la exportina 5. En el citoplasma es sometida por un segundo paso de procesamiento mediado por DICER/TRBP generando un dúplex de RNA. Una de las dos cadenas será mantenida y formará parte del complejo de RISC. RISC utilizará a la cadena incorporada como guía hacia el reconocimiento de los transcritos blanco donde la unión mediará su silenciamiento.

Mecanismo de acción: reconocimiento y represión traduccional.

El reconocimiento de los blancos que deben ser silenciados se basa en el apareamiento de bases entre la cadena incorporada con secuencias localizadas generalmente en el extremo 3'UTR (**Figura 3**) (Lai, 2002) o en el 5'UTR en casos particulares (Kloosterman, Wienholds, Ketting, & Plasterk, 2004). El grado de complementariedad miRNA:mRNA determinará el mecanismo de represión (György Hutvagner et al., 2002). Un apareamiento perfecto miRNA:mRNA provocará el corte endonucleolítico y degradación del transcrito blanco. Aunque este mecanismo se da mayoritariamente en plantas (Jones-Rhoades, Bartel, & Bartel, 2006) algunos genes de metazoarios también siguen este tipo de regulación; tal es el caso de la regulación de HOXB8 mediada por miR-196 (Yekta, Shih, & Bartel, 2004). Para la gran mayoría de los casos, el reconocimiento se da a través de apareamientos imperfectos (R. C. Lee et al., 1993).

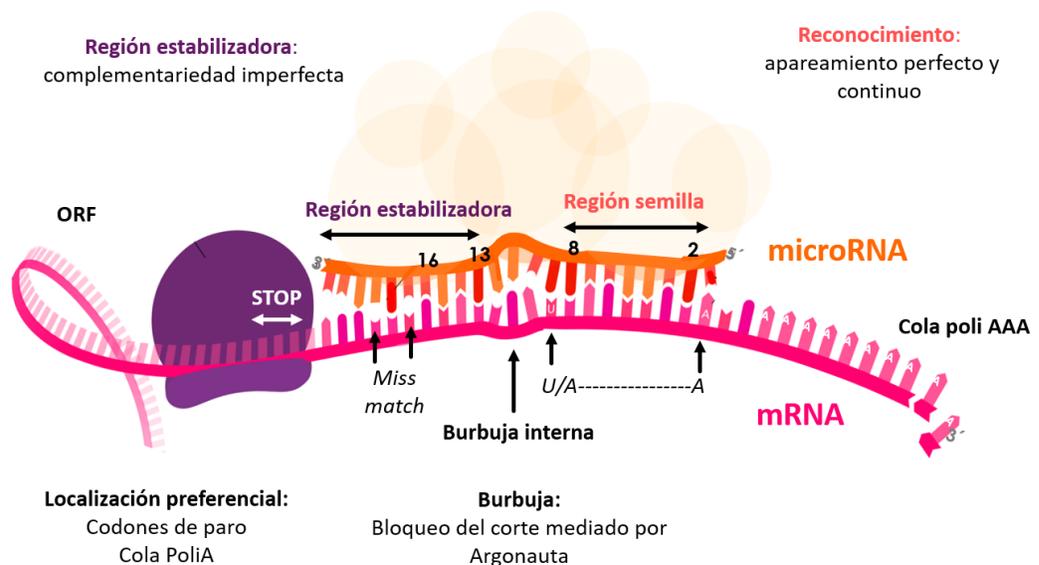


Figura 3. Principios básicos de la interacción miRNA:mRNA.

El silenciamiento mediado por miRNAs es basado en el reconocimiento por complementariedad entre el miRNA y su el extremo 3'UTR de su blanco. Este sitio debe ser accesible, siendo funcionales aquellos sitios localizados cerca del codón de paro o de la cola poli A del mensajero. El reconocimiento recae en la región 5' del miRNA (región semilla) siendo necesario un apareamiento perfecto con las bases 2-8. La unión con el transcrito blanco es estabilizada por la región 3' del miRNA, donde los *missmatch* son tolerados. La burbuja interna presente en dúplex RNAm:miRNA previene el corte del mRNA.

En la primera situación se realiza un corte entre los nucleótidos 10 y 11, a través de la acción de la proteína Argonauta (Ago2 en mamíferos, Ago1 en *Drosophila*) del complejo RISC (J. Liu et al., 2004; Pillai, 2005). Posteriormente, un tracto de Adeninas o Uridinas es añadido al extremo 5' del fragmento producido; lo cual aparentemente estimula su degradación (Ibrahim, Rohr, & Hesson, 2006; Shen & Goodman, 2004). Después del corte, RISC mantiene su estado activo y es capaz de actuar como una enzima de recambio múltiple mediando el corte de nuevas moléculas de transcrito blanco (György Hutvagner et al., 2002). En caso de un apareamiento parcial, que sucede en la mayoría de los casos en metazoarios, ocurre también la represión de la síntesis de las proteínas pero sin el corte del transcrito blanco (Olsen & Ambros, 1999; Wightman, Ha, & Ruvkun, 1993) y a través de varios mecanismos propuestos, que pueden ocurrir secuencialmente o como procesos únicos (Filipowicz, Bhattacharyya, & Sonenberg, 2008; Janas & Novina, 2012).

Identificación de transcritos blanco

Debido a que un miRNA puede tener cientos de transcritos blancos, validarlos de manera experimental resulta en una tarea difícil. Actualmente una de las mejores herramientas para la predicción de los posibles blancos de un miRNA es la aplicación de algoritmos computacionales (Mazière & Enright, 2007). Dichos algoritmos están basados en la búsqueda de elementos complementarios entre los extremos 3'UTR y la región semilla del miRNA (nucleótidos 2-9 del miRNA) así como la conservación de estos elementos entre especies. Ya que tales características son un indicio importante de sitios tentativos de reconocimiento (Lewis, Burge, & Bartel, 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos no siempre reflejan una interacción verdadera por lo que se requiere un segundo paso de análisis basado en las propiedades estructurales y termodinámicas de las regiones adyacentes al sitio blanco (Kuhn et al., 2007), ya que se ha demostrado que la estructuración del RNA en regiones cercanas puede interferir en la interacción y reconocimiento con el miRNA (Ameres, Martinez, & Schroeder, 2007; Long et al., 2007).

Para dicho propósito se utilizan rutinas simuladoras de estructura secundaria, como es el conjunto de herramientas del paquete Vienna RNA (Gruber, Lorenz, Bernhart, Neuböck, & Hofacker, 2008). Finalmente, se requiere la confirmación experimental del blanco. Para esto, se transfiere el extremo 3'UTR (completo o solo el sitio blanco predicho) hacia un gen reportero (GFP ó luciferasa) y se determina si este es capaz de reprimir la expresión del gen ante la sobreexpresión del miRNA de interés. Para corroborar que el efecto es debido a la presencia del sitio blanco, se requiere una segunda construcción en la que se mute el sitio tentativo de reconocimiento, con la cual se evite dicho efecto. Otros métodos que permiten analizar los blancos potenciales de miRNAs es el uso de los microarreglos y las herramientas de la proteómica, los cuales permiten observar a nivel global aquellos genes con disminución ante la sobreexpresión de un miRNA en especial (Zhu, Si, Wu, & Mo, 2007). Sin embargo, el análisis bioinformático previo permite definir aquellos genes cuyos transcritos cumplen con las características de un transcrito blanco, permitiendo filtrar los resultados obtenidos posiblemente como artefacto de las técnicas como los microarreglos.

miR-125a-5p

miR-125a-5p, junto con sus homólogos hsa-miR-125b-1 y hsa-miR-125b-2, conforma la familia altamente conservada de miR-125a-5p y su desregulación se encuentra involucrada en una amplia variedad de carcinomas y otras enfermedades. Enfocándonos en el miR-125a-5p, éste se transcribe en forma de un transcrito policistrónico (en conjunto con miR-99 y let-7e), a partir del locus 19q13. Funcionalmente, se encuentra asociado con varios procesos biológicos como metabolismo (Herrera et al., 2009), hematopoyesis (Gerrits et al., 2012; S. Guo et al., 2010), vasoconstricción (Li et al., 2010) e interacción virus-hospedero (Potenza et al., 2011). En el contexto del cáncer, miR-125a-5p ha sido descrito como un blanco de la activación del receptor para el factor de crecimiento epidermal (EGFR) (Dahl, Dahl, Kruichak, and Hudson, 2009). Sin embargo, solo se han descrito y validado una pequeña cantidad de blancos directos, por lo que su función no ha sido completamente entendida. Adicionalmente, se ha asociado a

efectos opuestos dependiendo el estado fisiológico de la célula y el tipo celular. Por ejemplo, en el caso de cáncer de pulmón (Wang, Mao, Zheng, & Ye, 2009), y cáncer mamario, miR-125a-5p inhibe fuertemente la proliferación e induce apoptosis, y su sobreexpresión reprime la migración celular a través del silenciamiento de HuR (X. Guo, Wu, & Hartley, 2009). La expresión ectópica de miR-125a-5p (así como miR-125b) puede inhibir la proliferación y la metástasis del carcinoma hepatocelular, así como inhibir el fenotipo maligno a través de la represión de MMP11 y VEGF-A (Bi et al., 2012). En contraste a las propiedades como supresor de tumores, miR-125a-5p puede también actuar como oncogen en otros contextos celulares. En carcinoma urotelial, miR-125a favorece el potencial invasivo (Ratert et al., 2012) y se encuentra sobre-expresado en células basales de carcinoma comparado contra células sanas adyacentes (Sand et al., 2012). Además, promueve un fenotipo proliferativo y resistente a apoptosis en células B malignas (Kim et al., 2012) y potencia el carácter migratorio e invasivo en cáncer de pulmón de células no pequeñas (Jiang et al., 2010).

Antecedentes

A pesar de su creciente estudio, la participación de miR-125a-5p en el contexto de cáncer cérvico uterino no ha sido estudiado por completo; por lo anterior en nuestro grupo de trabajo, nos hemos enfocado en evaluar tanto su perfil de expresión como la regulación sobre sus posibles blancos utilizando para ello, un panel de líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino.

Previamente, a través del análisis basado de microarreglos, se encontró que miR-125a-5p se encontraba expresado diferencialmente entre los fenotipos tumoral e inmortal (López J, 2010). Posteriormente, el análisis fue ampliado a 9 líneas celulares (5 de fenotipo tumoral y 4 de fenotipo inmortal), encontrando que el miRNA de interés se expresaba diferencialmente entre las líneas celulares (Figura 4-A), siendo sobre-expresado en las líneas tumorales VPH+ (Figura 4-B)(Martínez-Acuña N, 2012).

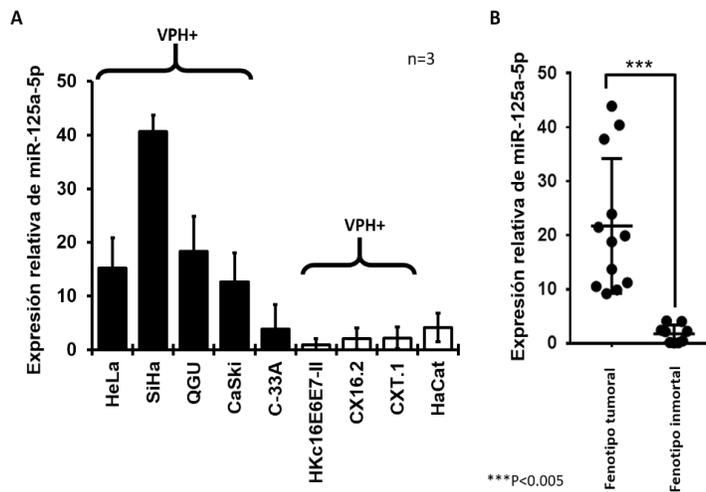


Figura 4. Perfil de expresión de miR-125a-5p en líneas derivadas de cáncer cérvico uterino.

A) El nivel de expresión del miR-125a-5p fue obtenido mediante RT-qPCR a partir de extractos de RNA pequeño <200 b de las líneas cultivadas. El Nivel de expresión de miR-125a-5p fue normalizado el rRNA 5S. Los valores de Δ CT fueron convertidos a 100 unidades finales para cada experimento. El gráfico muestra el valor promedio \pm DS. **B)** Comparación del nivel de expresión de miR-125a-5p entre fenotipos tumoral e inmortal VPH+. El gráfico muestra los valores de 3 pases independientes para cada una de las líneas analizadas.

Con el fin de entender las posibles vías de regulación dependientes de miR-125a-5p se realizó una búsqueda *in silico* de blancos potenciales basándonos en el uso conjunto de tres algoritmos distintos (TargetScan, Miranda y miRWalk). Se seleccionaron aquellos relacionados con características asociadas al fenotipo tumoral (Hanahan & R. A. A. Weinberg, 2011) usando el programa GOEAST (Gen Ontology Enrichment Analysis Software Toolkit)(Engeitner, 2005) para su anotación funcional. Se analizaron las propiedades termodinámicas de las regiones adyacentes al sitio de unión al miR-125a-5p predicho de acuerdo a las recomendaciones previamente reportadas (Kuhn et al., 2007) utilizando el paquete bioinformático Vienna-RNA fold (Gruber et al., 2008). Finalmente se analizó su perfil de expresión a nivel de proteína de aquellos genes con mayor soporte bioinformático y se comparó con el patrón mostrado por el miR-125a-5p.

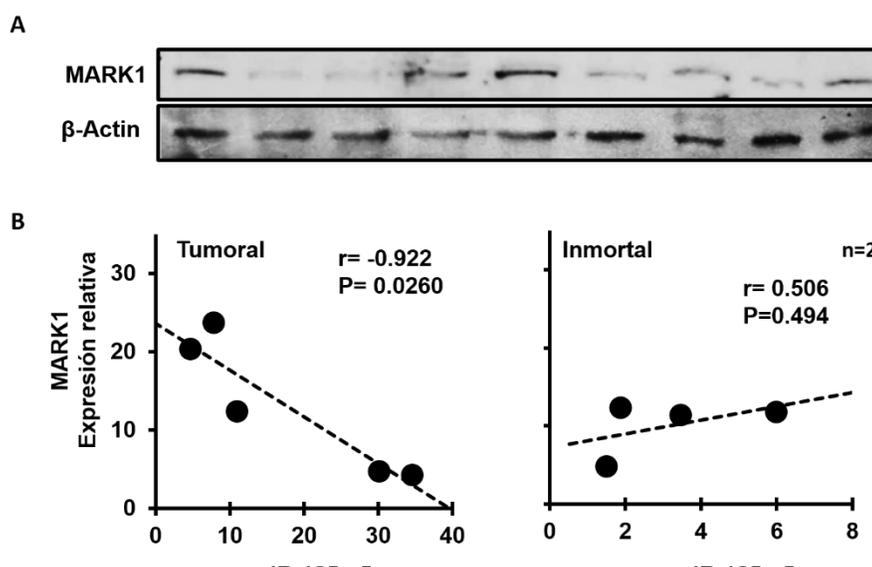


Figura 5. Evaluación de MARK1 como blanco propuesto de miR-125a-5p.

El perfil de expresión de MARK1 en las 9 líneas estudiadas fue evaluado mediante Western Blot. A). Western blot representativo. B) Se determinó el grado de correlación mediante regresión de Pearson por fenotipos entre MARK1 y miR-125a-5p a partir de muestras pareadas de RNA pequeño y proteínas. La grafica muestra valores promedio de dos ensayos independientes.

MARK1 fue una de las proteínas con mayor grado de correlación con el miR-125a-5p, aunque solo en el fenotipo tumoral. Sugiriendo que su relación funcional es de relevancia en este fenotipo (**Figura 5**).

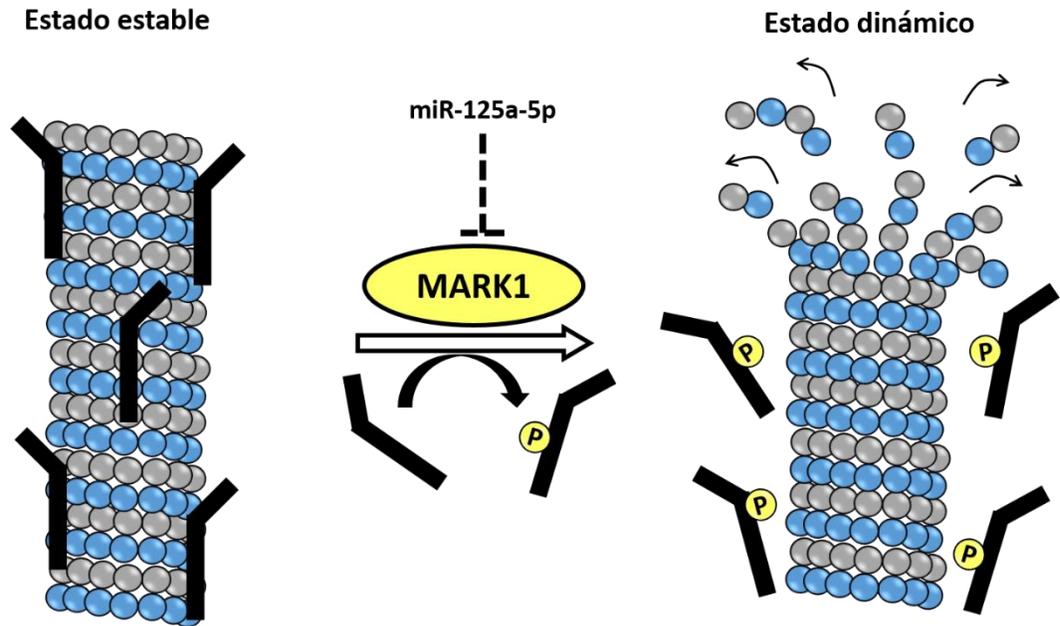


Figura 6. MARK1 regula la dinámica de microtúbulos a través de la fosforilación de MAP.

MARK1 pertenece a la familia de cinasas de serinas/treoninas que tienen como blanco a las MAPs. En conjunto con las MAPs, estas regulan la frecuencia entre los eventos de catástrofe (depolymerización) y rescate (polimerización) de los filamentos tubulina (**Figura 6**).

Aunque la implicación biológica del circuito MARK1:MAPs ha sido caracterizada principalmente en células neuronales, varios estudios analizan parte de este circuito en tejido no neuronal y con implicaciones en el proceso migratorio de células tumorales. Tal es el caso de la sobre-expresión de MAP2 en células derivadas de melanoma, donde induce defectos mitóticos, inhibición de crecimiento y predisposición a metástasis.

Adicionalmente, MAP2A se ha encontrado altamente sobre-expresada en cáncer oral invasivo, y su expresión ectópica es capaz de promover la migración de

células Ca9-22. (Ebneith et al., 1999; Fang et al., 2001; S.-Y. Liu et al., 2008; Matenia & Mandelkow, 2009; Ng et al., 2001; Soltani et al., 2005).

En conjunto, estos reportes junto con nuestras observaciones, sugieren que el silenciamiento de MARK1 en las células tumorales (como lo observado en células SiHa y QGU) posiblemente mediado por miR-125a-5p, podría conferir una mayor capacidad migratoria, al enriquecer el pool de MAPs no fosforiladas; facilitando de esta manera la formación de estructuras migratorias que requieren de un aumento en la fuerza mecánica.

Adicionalmente, esta asociación MARK1:miR-125a-5p podría explicar el efecto regulador sobre el proceso migratorio observado por Wang y Gerris en cáncer de pulmón(Jiang et al., 2010; Wang, Mao, Zheng, & Ye, 2009) dependiente de miR-125a-5p.

Hipótesis

Si la expresión de miR-125a-5p se encuentra asociada al fenotipo tumoral en líneas celulares derivadas de CaCU, entonces inducir su sobre-expresión en células con bajos niveles de miR-125a-5p deberá potenciar las capacidades necesarias para el crecimiento y progresión tumoral presentes en las líneas celulares (como: migración, invasión, resistencia a apoptosis, proliferación y crecimiento independiente de anclaje); mientras que su inhibición en aquellas con altos niveles, deberá suprimirlas.

Adicionalmente, dada la correlación inversa entre la expresión de miR-125a-5p y MARK1 observada en líneas tumorales derivadas de CaCU, la sobre-expresión o supresión de miR-125a-5p deberá disminuir o elevar los niveles de la proteína de MARK1; alterando de igual manera, a sus los procesos celulares asociados.

Objetivo general

Validar el efecto regulatorio de miR-125a-5p sobre MARK1 y determinar su significado biológico en líneas celulares derivadas de cáncer cérvico-uterino.

Objetivos específicos

Validación de MARK1 como blanco directo de miR-125a-5p

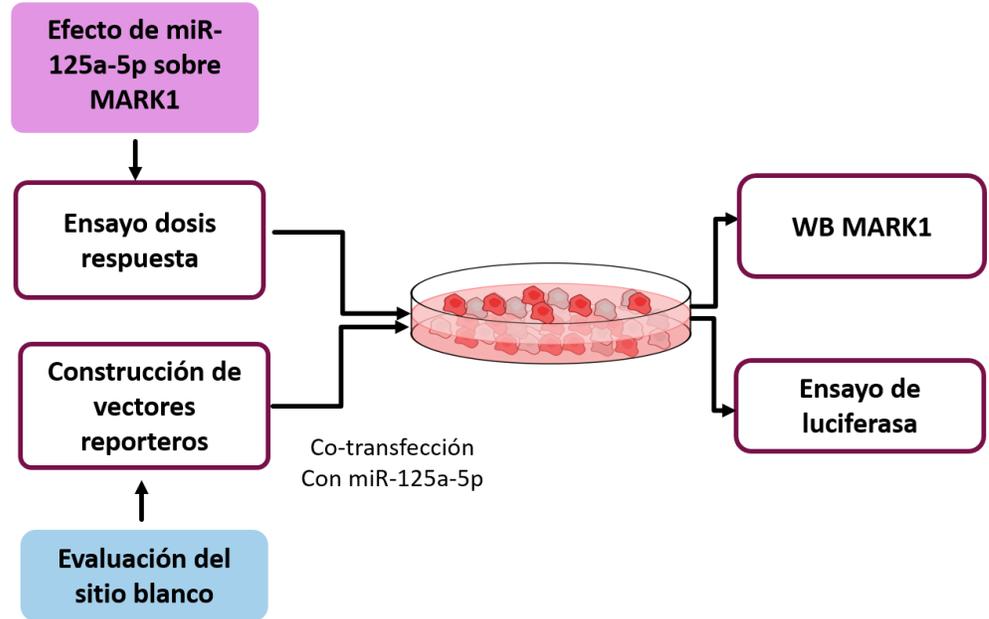
- a) Analizar el efecto de la ganancia/pérdida de función de miR-125a-5p en el nivel de expresión endógeno de MARK1.
- b) Evaluar la funcionalidad del sitio predicho en MARK1.

Caracterizar el efecto biológico de miR-125a-5p sobre procesos asociados con el fenotipo tumoral, utilizando como modelo distintas líneas celulares de cáncer cérvico-uterino

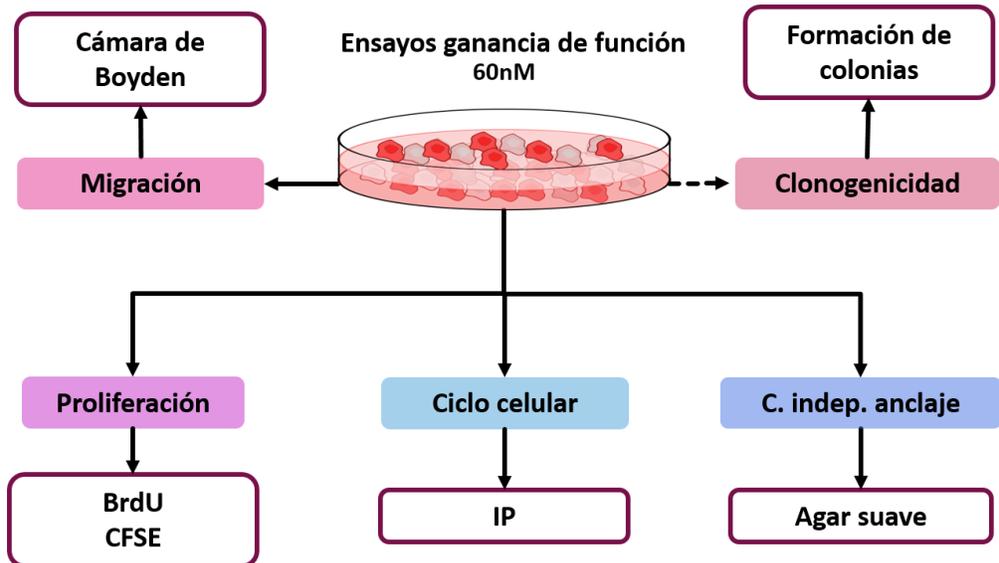
- Ciclo celular
- Migración
- Invasión
- Proliferación
- Clonogenicidad

Estrategia experimental

Validación de MARK1 como blanco directo de miR-125a-5p



Caracterizar el efecto biológico de miR-125a-5p sobre procesos asociados con el fenotipo tumoral, utilizando como modelo distintas líneas celulares de cáncer cérvico-uterino



Materiales y Métodos

Transfecciones

Placa	Células	Vol. Mezcla de transfección	Vol. Final	Lipofectamina RNAimax	Dosis precursor/siRNA
96 pozos	2.5×10^3	20 μ L	0.1 mL	0.075 μ L	60nM
24 pozos	$0.5-2 \times 10^5$	100 μ L	1mL	0.5 μ L 1 μ L **	60 nM 10nM**
6 pozos	3×10^5 - 5×10^5	100 μ L	1mL	1.5 μ L	60-120 nM

**cotransfecciones con 200ng de plásmido

Extracción de Proteínas Totales

Para la obtención de proteínas totales, las células se lisaron con 300- 500 μ L de buffer de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Deoxicolato de Sodio 0.5%, Tritón X-100 1%, AEBSF 1mM, Tableta de inhibidores de proteasas Complete TM de Roche 1/50mL). Posteriormente los lisados fueron incubados 5 min en hielo y homogenizados con una espátula estéril. Los lisados fueron transferidos a un tubo de 1.5 mL y pasados secuencialmente por jeringas con aguja de distinto calibre (21 y 25 G) y centrifugados a 13,000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo. Los extractos fueron cuantificados utilizando el kit comercial Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Western Blot

30 μ g de proteína total fueron cargados y separados según su peso molecular mediante un gel desnaturizante de acrilamida-bisacrilamida 29:1 al 10% dependiendo el tamaño de la proteína a evaluar. Previo a cargar, cada uno de los extractos fue mezclado con el volumen adecuado de buffer de carga para proteínas Laemmli (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glicerol 25%, SDS 2%, Azul de

bromofenol 0.01%) y hervido durante 5 minutos. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de Nitrocelulosa (Biorad) o de PVDF (Immobilion™ de MILIPORE) mediante un sistema de transferencia semiseca (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Biorad). Las membranas de PVDF fueron previamente activadas a través de inmersiones secuenciales en Metanol, H₂O de-ionizada y solución de transferencia (Tris HCl 25mM pH 9.2, Glicina 192mM, Metanol 10-15%) durante 5, 3 y 3 min, respectivamente. Después de la transferencia, se dejó que las membranas se secaran al aire para favorecer la adsorción de las proteínas a la membrana.

Para el boqueo las membranas se incubaron en una solución compuesta por PBS (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 8mM, KH₂PO₄ 1.46mM pH 7.4)-Tween²⁰ 0.1% + leche en polvo libre de grasa al 10%, durante un tiempo mínimo de 2 hrs. Posteriormente se realizaron las incubaciones con el anticuerpo primario y secundario adecuado. Entre cada una de las incubaciones, se realizaron 3 lavados (15, 5 y 5 minutos) con solución de lavado (PBS-Tween²⁰ 0.1%). La unión fue revelada por una reacción de quimioluminiscencia utilizando el Kit de Luminata Western HRP substrate (Milipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal fue captada mediante el sistema de detección C-DIGIT (Licor) y evaluada mediante densitometría de la imagen capturada.

Extracción de RNA total

El RNA total fue extraído a partir de células crecidas al 80% de confluencia en placas de Petri de 100mm utilizando 1 mL de TRIzol® (Invitrogen™), seguido de una extracción orgánica con 200 µL de cloroformo. El homogenado fue centrifugado a 13,000 xg en una microcentrífuga a temperatura ambiente durante 5 min, recuperándose la fase acuosa. Para precipitar el RNA, se añadió 1 volumen de isopropanol frío y se incubó a -20°C por un tiempo mínimo de 2 horas. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 xg durante 30 min. La pastilla obtenida fue lavada con 1 mL de etanol al 85% y centrifugada nuevamente durante 15 min. Finalmente se decantó el etanol y se dejó secar la pastilla durante 5 min. La pastilla de RNA fue resuspendida en H₂O libre de nucleasas. El RNA

fue cuantificado (Nanodrop 2000 spectrophotometer, Thermo scientific) y su calidad fue determinada por la proporción de A260/A280. La integridad del RNA total fue analizado en un gel de agarosa al 1% y determinada en relación al bandeo de los RNA ribosomales 18 y 28S.

PCR y oligonucleótidos

Para el análisis de la región blanco para miR-125a-5p a partir de RNAm de MARK1 endógeno se emplearon los siguientes oligonucleótidos: MK1-TS-Fwd: ACTTAATGGGGTTCGCTTCAA y MK1-TS-Rvs: TCTACATGGGGAGATTACAGG, los cuales generan un producto de 200pb. Para evaluar el perfil de expresión de Snail, Snail1-Fwd: GCGAGCTGCAGGACTCTAAT y Snail1-Rvs: CCTCATCTGACAGGGAGGT, que generan un amplicón de 225 pb. Para normalizar los niveles de expresión se utilizó a β -actina como gen de referencia, amplificando un producto de 148 pbs con el siguiente par de oligonucleótidos: beta actina-fwd: TCATTCCAATATGAGATGCGTTGT y beta actina-Rvs: TGCATTACATAATTTACACGAAAGC.

El programa empleado para los tres juegos de primers, fue el siguiente: Retrotranscripción (50°C/30 min) (94°/5 min); PCR (94°C/3 min), (94°C/15 seg, 60°/30 seg)x40 ciclos; Melt (50-90°C, 1°/seg).

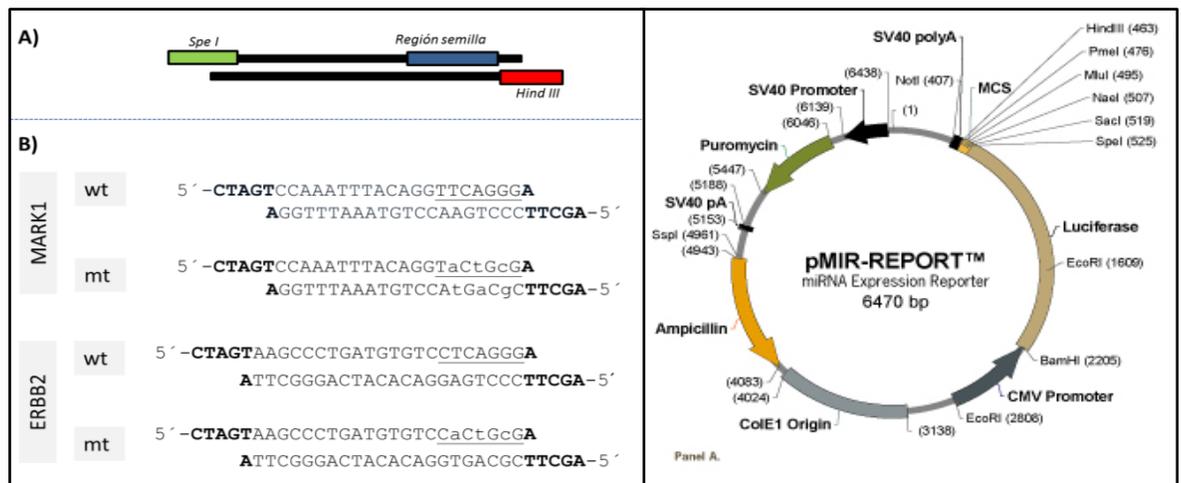
Diseño y construcción de los vectores reporteros

Para este ensayo se diseñaron 4 pares de oligonucleótidos (oligoT4) que al hibridar reproducen el sitio blanco para miR-125a-5p predicho en MARK1 así como una versión mutante y 2 sitios blanco adicionales que serán empleados como controles, basados en las especificaciones de Nishida y cols. (Nishida, et al., 2011). El producto hibridado posee extremos salientes que son compatibles con los sitios de restricción SpeI y HindIII del vector pMIR-Report (**Figura 8A**); permitiendo la clonación dirigida de estos en el extremo 3'UTR del gen de la luciferasa. Posteriormente, células HeLa fueron co-trasfectadas con el precursor y

cada una de las construcciones; utilizando un vector con GFP como control interno. Por último, se evaluó la actividad de luciferasa mediante un kit comercial.

Actividad de luciferasa

2.5x10⁴ células HeLa fueron co-transfectadas con 200 ng de cada uno de los vectores reporteros y una dosis de 10nM de cada uno de los precursores. 48 hrs post transfección, las células fueron lavadas con PBS y lisadas utilizando el buffer de lisis y sustrato del kit Bright Glo de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad de luciferasa (fluorescencia) fue medida inmediatamente en el Glomax® Multi JR luminometer (Promega Corp.)



Diseño y construcción de vectores reporteros

A) Esquema que muestra el diseño general de los pares de oligos. B) Secuencia y alineamiento de los pares de oligonucleótidos diseñados. Las bases en negritas corresponden a los sitios de restricción, mientras que aquellas subrayadas indican la secuencia complementaria a la región semilla del miRNA. Finalmente las bases en minúscula indican las bases que se modificaron y que no son complementarias a la región semilla de miR-125a-5p. C) Mapa del vector en el que se clonarán cada uno de los pares de oligos mostrados. La clonación se hará en los sitios de SpeI y Hind III, permitiendo la clonación dirigida en el extremo 3'UTR de la luciferasa.

Migración

24 hrs post transfección, 4X10⁵ (C-33A) o 1X10⁵ (HeLa) células fueron sembradas en cámaras de Boyden y sometidas a un ayuno de 16 h en medio DMEM basal.

Posteriormente se estimuló la migración utilizando DMEM suplementado con 5% FBS y se dejó que las células migraran durante 48 horas después. Las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. Las células que no migraron fueron removidas con ayuda de un hisopo para finalmente evaluar el grado de migración ocasionado por los tratamientos mediante la lectura de la absorbancia a 600nm o densitometría de las membranas.

Tinción por CFSE

La CFSE, es un colorante permeable a la membrana celular que al entrar a la célula es procesado por las esterasas celulares generando un colorante altamente reactivo que es capaz de unirse covalentemente a las proteínas celulares. Este marcaje es retenido por las células y es intransferible. Conforme las células se dividen, el colorante es segregado de igual manera, por lo que es posible monitorear el número de veces que la célula se divide con base a la intensidad del colorante. 12hrs post transfección, se realizó una tinción con carboxifluoresceína diacetato succinimidil-ester (CFSE). Para teñir las células, se incubó con CFSE a una concentración final de 5 nM durante 10 min en hielo. Posteriormente se lavó el exceso del compuesto con DMEM-FBS 5% 1 vez y se dejaron proliferar en las condiciones normales de cultivo. Las células fueron cosechadas 72 hrs post tinción y llevadas al citómetro para su valoración.

Incorporación de BrdU

2500 células fueron sembradas en placas de 96 pozos, y transfectadas 24 hrs después con una dosis de 60nM de cada precursor. 72 horas post transfección, las células fueron sometidas a un pulso de 5 hrs de BrdU. Finalizado el tiempo de incorporación, las células fueron fijadas/permeabilizadas para posteriormente realizar la detección del BrdU incorporado, mediante un sistema basado en anticuerpos. Para esto se empleó el kit comercial Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) de Roche. La incorporación fue revelada mediante una reacción luminiscente.

Tinción con Ioduro de propidio

Células transfectadas fueron resembradas a una densidad de 1500 células y cultivadas durante 48, 72 y 96 horas. Al finalizar tales tiempos las células fueron cosechadas fijadas y teñidas con ioduro de propidio durante 30 min y analizadas en el citómetro. Se determinó el perfil de ciclo celular para cada población tratada en base a la fluorescencia del Ioduro de Propidio.

Crecimiento en agar suave

Células transfectadas fueron resembradas 12 horas post transfección a una densidad de 1500 células embebidas en medio DMEM FBS5%+ Agarosa al 0.7% sobre una base de DMEM FBS5%-Agar al 1% y cultivadas durante 15 días. Al finalizar el tiempo, las colonias desarrolladas fueron fotografiadas al microscopio y posteriormente teñidas con cristal violeta.

Clonogenicidad

Para caracterizar el tipo de colonias presente en la línea celular de interés se realizó una siembra de 100 células por placa, y se dejaron crecer durante 15 días. Al finalizar el tiempo, las colonias desarrolladas son fijadas en Metanol y teñidas con cristal violeta. Las colonias fueron observadas bajo el microscopio, fotografiadas y caracterizadas de acuerdo a su morfología (**Figura 18**). De manera paralela, se realiza una siembra de una célula/ pozo en una placa de 96 pozos. Las cuales se dejan proliferar durante 15 días. Transcurrido el tiempo, se realiza una resiembra por duplicado para evaluar mediante el patrón de crecimiento el tipo de colonia de la célula original y extracción de RNA pequeño. En el primer caso las colonias fueron fijadas en metanol durante 10 min a 4°C y posteriormente fueron teñidas con cristal violeta. Para el aislamiento de RNA pequeño proveniente de cada tipo de clona, el cultivo se amplificó a través de resiembras hasta obtener la cantidad de células suficiente para la extracción de RNA pequeño y así evaluar el nivel de expresión del miR-125a-5p mediante tiempo real.

Resultados

Con el fin establecer si existía un efecto funcional real de miR-125a-5p sobre el blanco propuesto MARK1 se procedió a realizar ensayos de ganancia de función, donde células C-33A o HeLa (líneas con baja expresión endógena del miRNA en cuestión) eran transfectadas con precursores sintéticos y posteriormente se evaluaba el efecto de esta a los tiempos de 24 o 48 horas, según el set experimental.

Validación de MARK1 como blanco directo de miR-125a-5p

Inicialmente se evaluó si miR-125a-5p tenía efecto sobre la expresión del blanco postulado MARK1. Para ello, se sobre-expresó el miRNA mediante la transfección de la línea celular C-33A con un precursor sintético del miR-125a-5p. 48hrs post transfección, se obtuvieron extractos de proteína total y el nivel de MARK1 fue evaluado mediante Western Blot. La sobre-expresión miR-125a-5p ocasionó una disminución en el nivel endógeno de la proteína MARK1, en una manera dependiente a la dosis (**Figura 7-A**). Observando una disminución significativa a las dosis de 180 y 240 nM (**Figura 7-B**). Este efecto no se observó en las células tratadas con el control. De esta manera se establece un efecto dependiente de miR-125a-5p en el nivel de expresión del blanco postulado MARK1.

Evaluación de la funcionalidad del sitio blanco predicho de MARK1.

Con el fin de evaluar si el efecto regulatorio observado sobre MARK1 por parte de miR-125a-5p se debía al reconocimiento directo del sitio blanco predicho en el extremo 3'UTR, se realizó un ensayo basado en el uso del gen reportero de luciferasa.

Para esto, el sitio predicho (23 pb) encontrado en el extremo 3'UTR de MARK1 fue clonado en el vector pmiR REPORT. Así mismo se diseñó una versión mutante, en la cual 3 de las 6 bases de la región complementaria a la región

semilla del miRNA fueron cambiados con el fin de anular el reconocimiento (Figura 8-A).

Al realizar la co-transfección con cada uno de los vectores y el precursor del miRNA y evaluar la actividad de luciferasa a las 48hrs post-transfección, se observó que la adición del sitio blanco en su forma silvestre mediaba el reconocimiento por miR-125a-5p, ocasionando una disminución en la actividad de luciferasa (**Figura 8B**, panel izquierdo). Este efecto se pierde en el vector mutante (**Figura 8B**, panel derecho), confirmando que el reconocimiento y regulación era específicamente mediado por el sitio predicho

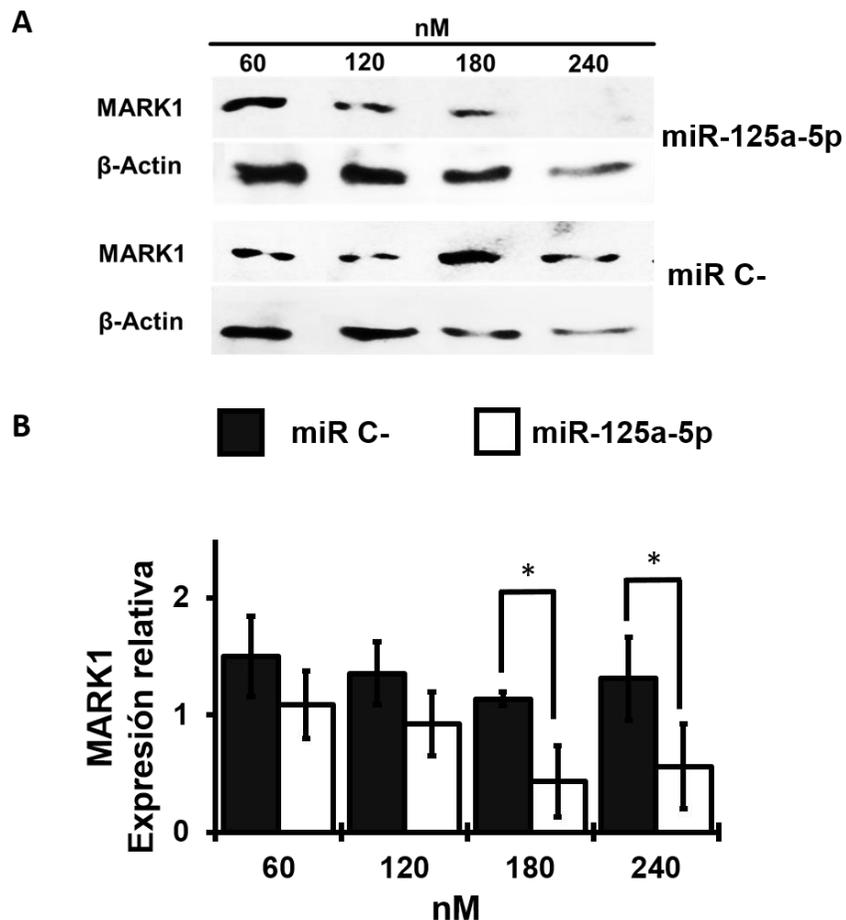


Figura 7. Efecto de miR-125a-5p sobre la expresión de MARK1 endógeno

2×10^5 Células de la línea C33-A fueron transfectadas con dosis crecientes del precursor sintético del miR-125a-5p o un miR-control. 48 h después, la expresión de MARK1 fue evaluada mediante Western Blot. **A)** Western Blot representativo. **B)** Análisis densitométrico. $n=2$. Valores promedio \pm DS. * $P < 0.05$

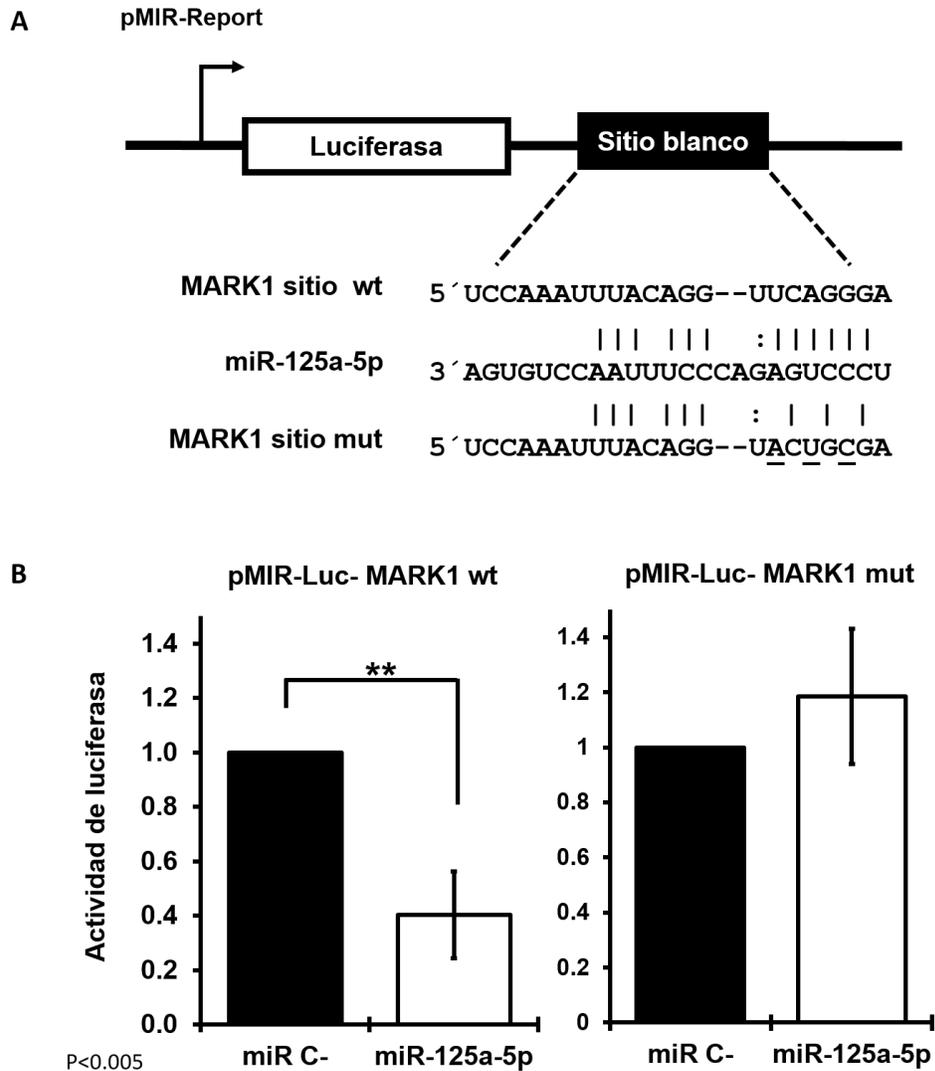


Figura 8. miR-125a-5p reconoce específicamente al sitio blanco predicho en el mRNA de MARK1.

A) Diseño de las construcciones reporteras. | apareamiento canónico, apareamiento no canónico. Las bases subrayadas indican las bases mutadas a fin de eliminar el reconocimiento por miR-125a-5p. **B)** Actividad de luciferasa normalizada contra el control, en células HeLa y **C)** C-33A. Valores promedios \pm DS normalizados contra los tratados con el miR C-. n=3. * = P<0.05

Caracterización del efecto biológico de miR-125a-5p sobre procesos asociados con el fenotipo tumoral.

El fenotipo tumoral se ha distinguido por la adquisición de un listado de capacidades y alteraciones en ciertos procesos clave como: migración, invasión, proliferación, apoptosis, ajuste metabolismo, entre otros (Hanahan & Weinberg, 2011).

Por lo anterior, se evaluó el efecto de miR-125a-5p en algunos de los procesos celulares de interés: migración, proliferación, ciclo celular, crecimiento independiente de anclaje y clonogenicidad. Para ello, se realizaron ensayos de ganancia de función utilizando las líneas celulares de fenotipo tumoral con baja expresión endógena del miR-125a-5p HeLa y C-33A. Posteriormente, a través de la metodología adecuada, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de miR-125a-5p en cada uno de los procesos.

miR-125a-5p potencia la capacidad migratoria de las células tumorales a través de la regulación de MARK1.

Debido a la función de MARK1, uno de los procesos celulares de mayor interés fue la migración celular. El efecto de la sobreexpresión de miR-125a-5p en la capacidad migratoria de las líneas celulares fue evaluado mediante el uso de cámaras de Boyden.

La cámara de Boyden se basa en la separación de dos compartimientos separados mediante una membrana porosa, siendo el diámetro de cada poro considerablemente menor al de una célula. Las células, se siembran en el compartimiento pobre de nutrientes (compartimiento superior) y son atraídas hacia el compartimiento con medio enriquecido (compartimiento inferior). Sin embargo, las células deben sufrir una serie de re-arreglos en su morfología para atravesar el poro de la membrana y llegar al así al otro compartimiento. La sobre-expresión de miR-125a-5p aumentó de manera significativa la capacidad migratoria de las células transfectadas (**Figura 9**).

Una vez demostrado el reconocimiento directo y un silenciamiento de MARK1 mediado por miR-125a-5p, se evaluó si el efecto observado en la migración es atribuible a la regulación sobre MARK1. Para esto se silenció el blanco MARK1 mediante una estrategia basada en siRNAs.

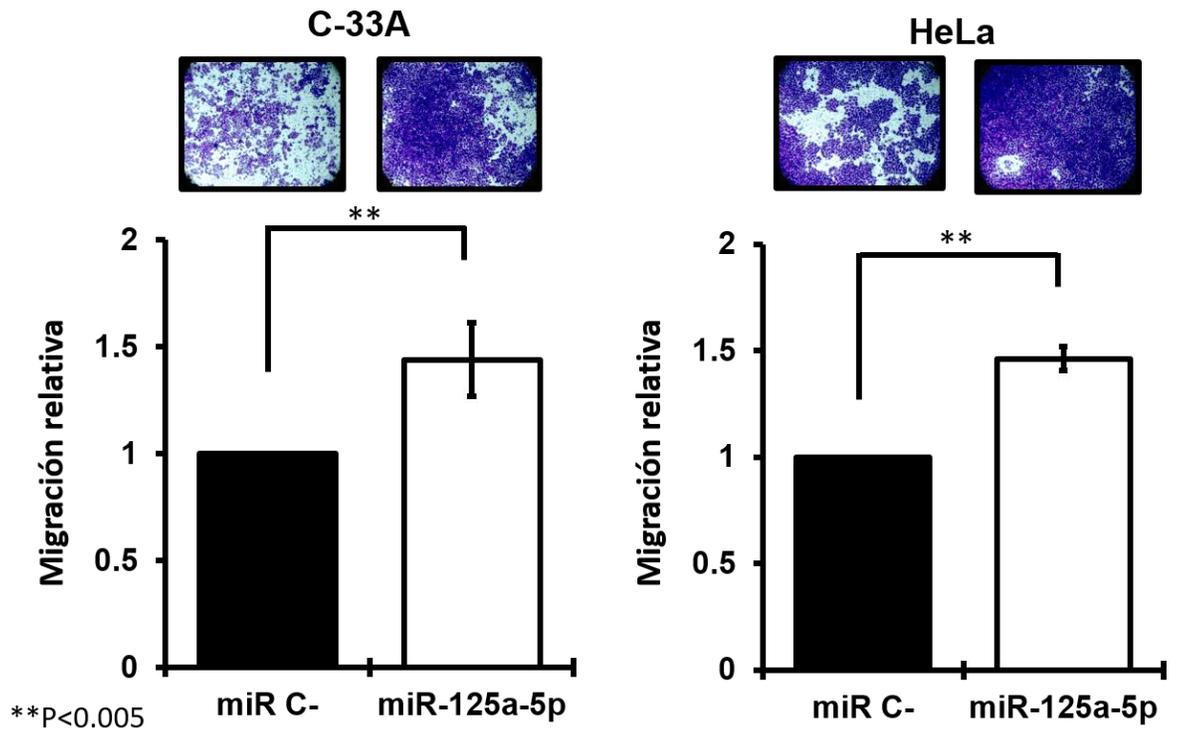


Figura 9. La sobreexpresión de miR-125a-5p potencia la capacidad migratoria de células tumorales.

Células HeLa y C33-A fueron transfectadas con una dosis de 60nM del precursor sintético de miR-125a-5p. Después de un lapso de 48 hr en la cámara de Boyden, las células que no migraron fueron removidas. Las células que migraron fueron fijadas y teñidas con cristal violeta y visualizadas bajo el microscopio con el objetivo 10X. Después de ser teñidas, las membranas completas fueron escaneadas para su análisis por densitometría. Campos representativos (panel superior) y densitometría expresada en veces de cambio en relación al control (panel inferior). Valores promedio \pm DS. n=3.

El silenciamiento de MARK1 ocasionó un incremento significativo en la capacidad migratoria de la línea celular HeLa (**Figura 10B**, panel derecho), mientras que el efecto observado en la línea C-33A fue marginal (**Figura 10B**, panel izquierdo). Esto nos permite concluir, que la regulación de MARK1 por miR-125a-5p afecta directamente la capacidad migratoria en la línea celular HeLa. Mientras tanto, en

el caso de la línea celular C-33A, el efecto de miR-125a-5p observado en migración es independiente de la regulación de MARK1 y probablemente se deba

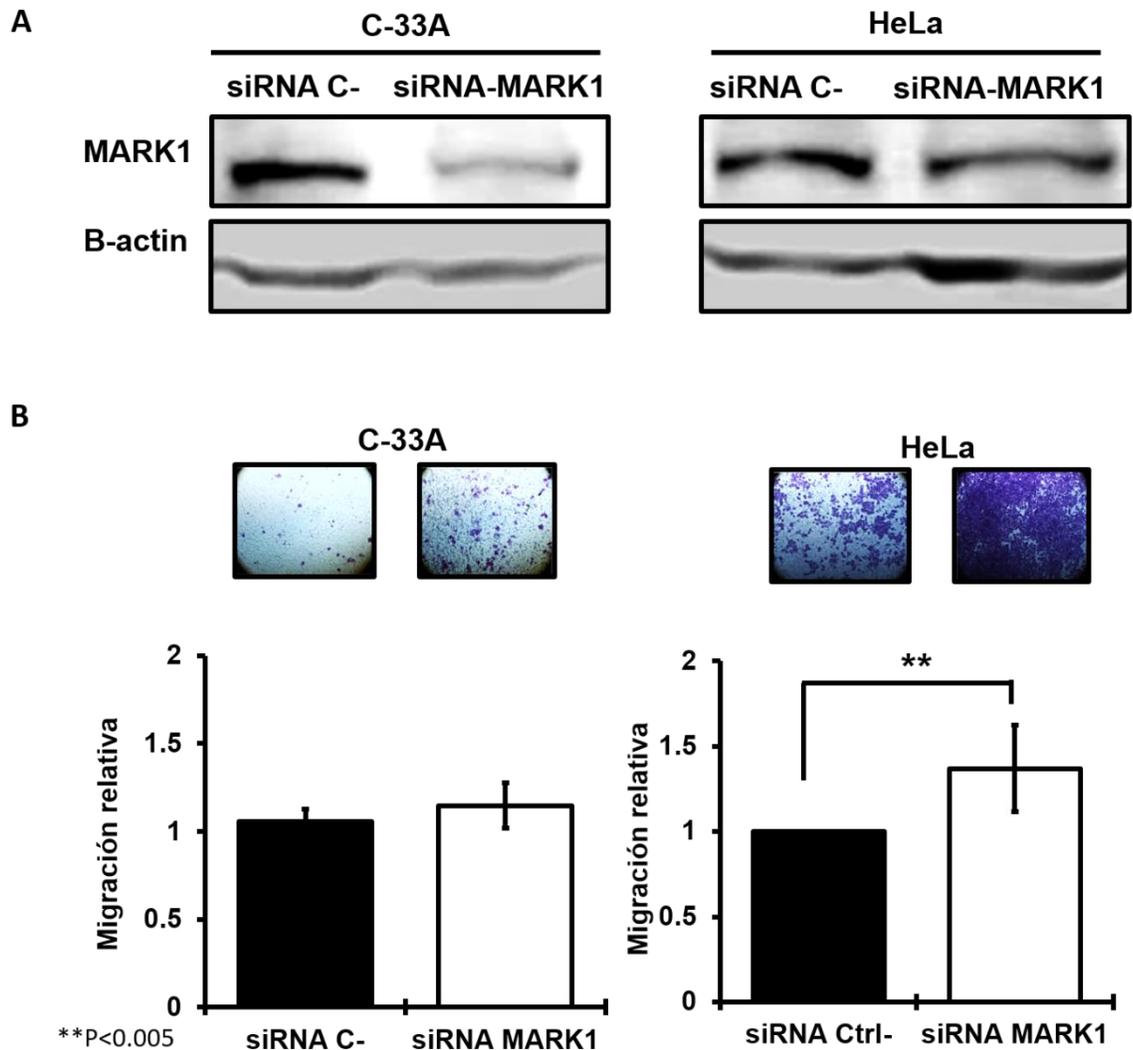


Figura 10. La regulación negativa de MARK1 mediada por siRNAs promueve la migración de las células tumorales HeLa.

Células HeLa y C33-A fueron transfectadas con una dosis de 60nM del siRNA dirigido contra MARK1 o bien un siRNA control (C-). Después de un lapso de 48 hr en la cámara de Boyden, las células que no migraron fueron removidas. Las células que migraron fueron fijadas y teñidas con cristal violeta y visualizadas bajo el microscopio con el objetivo 10X. Después de ser teñidas, las membranas completas fueron escaneadas para su análisis por densitometría **A**) Western Blot de MARK1 donde se corrobora el silenciamiento de MARK1 mediado por siRNAs en ambas líneas celulares. **B**) Campos representativos (panel superior) y densitometría expresada en veces de cambio en relación al control (panel inferior). Valores promedio \pm DS. n=3.

a otros blancos (como moléculas de adhesión o de señalización) no evaluados en este trabajo.

Adicional al efecto en migración observado, tanto la transfección con miR-125a-5p como el silenciamiento específico de MARK1 mediante siRNAs ocasionó cambios en la morfología de las células. Se logró apreciar un alargamiento en las células, así como la formación de proyecciones celulares (**Figura 11**, tratadas vs controles). Las alteraciones observadas son consistentes con vía MAP:MARKs y microtúbulos. Sin embargo, es necesaria una aproximación distinta a fin de

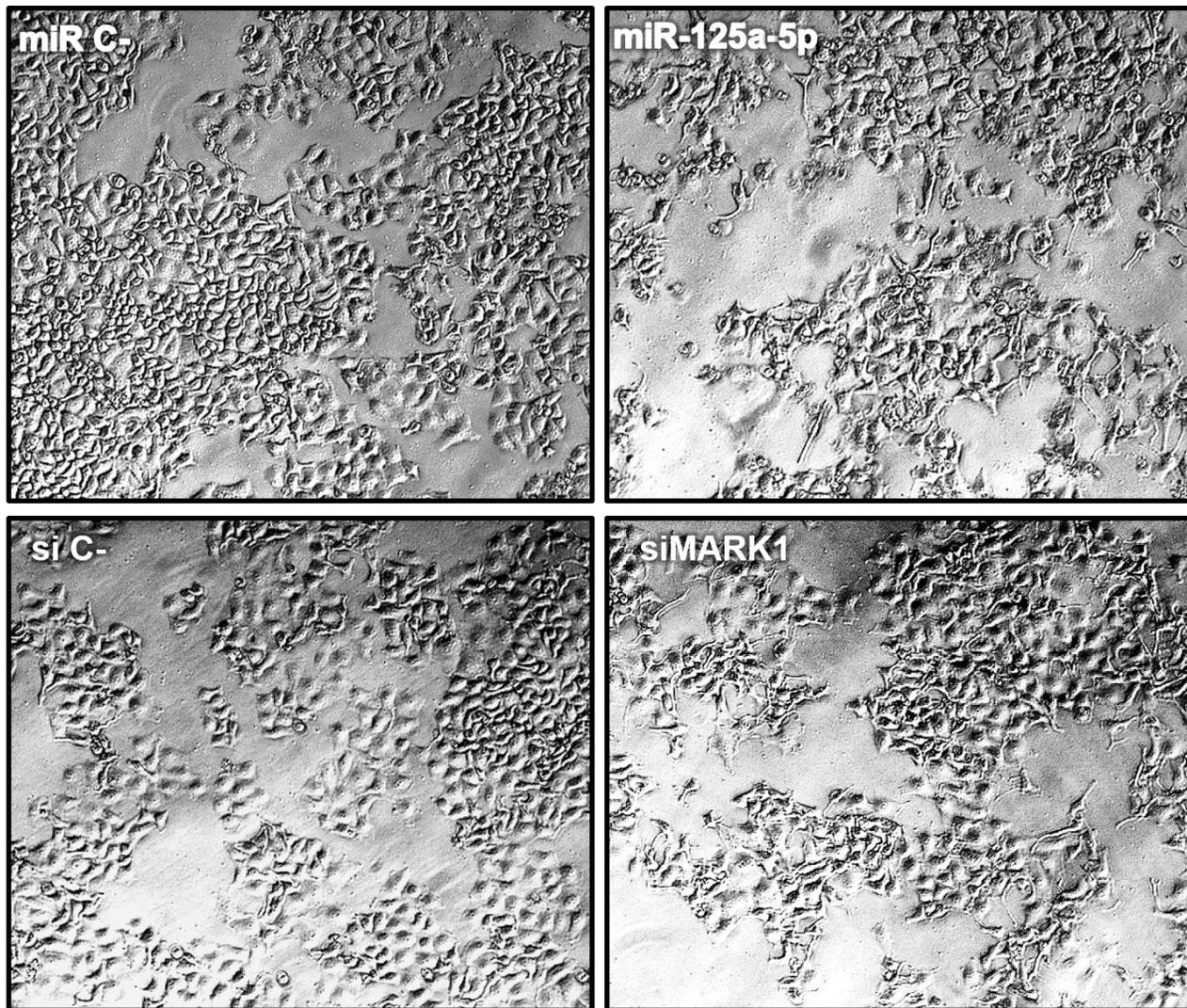


Figura 11. La sobreexpresión de miR-125a-5p y el silenciamiento de MARK1 altera la morfología de las células tumorales HeLa.

48hrs post transfección con el miR-125a-5p (20 nM) o el siMARK1 (60nM) ocasionó el alargamiento de las células y la formación de proyecciones celulares.

confirmar esta observación.

La presencia de mutaciones en el sitio blanco y diferencias en el perfil de expresión de MAPs podría alterar la respuesta a miR-125a-5p.

Debido a la diferencia de resultados obtenidos entre líneas celulares y entre el tratamiento con el miRNA o siRNA, se decidió analizar la integridad de la secuencia blanco dentro del extremo 3'UTR de los transcritos a partir de las líneas C-33A y HeLa. Esto con el fin de evaluar si existían mutaciones que pudieran provocar la pérdida del reconocimiento por parte del miR-125a-5p.

Para esto, se diseñaron un par de oligonucleótidos que flanquean un fragmento de 200 pb del extremo 3'UTR del RNAm de MARK1, que contiene el sitio predicho para el reconocimiento por miR-125a-5p. Este fragmento fue obtenido mediante PCR y subclonado en el plásmido pJET para su posterior caracterización por secuenciación. Al caracterizar los productos clonados en el vector pJET, se observó que aquellos derivados de la línea celular C-33A tenían diferente tamaño de inserto en comparación a los provenientes de la línea celular HeLa. Al secuenciar algunos de las construcciones obtenidas se encontró una amplia variación en cuanto a la presencia del sitio de reconocimiento en los vectores provenientes de la línea celular C-33A. En una fracción de las clonas analizadas, se observó la presencia e identidad del sitio blanco (**Figura 12**, clonas C33A-7 y C33A-8); mientras que, en otras, se observaron mutaciones (**Figura 12**, clonas C33A-4, C33A-5) así como la pérdida de parte de la región 3'UTR (**Figura 12**, clona C33A-2).

Estas alteraciones, nos confirman que en la línea C-33A, MARK1 escapa del reconocimiento de miR-125a-5p por lo cual el efecto observado en migración depende de la regulación de otros blancos. En el caso del silenciamiento de MARK1 basado en siRNAs, este se da por el reconocimiento de otras regiones localizadas fuera del 3'UTR. Sin embargo, en esta línea celular en particular MARK1 parece no jugar un papel importante en el proceso migratorio, por lo que cambios en su nivel de expresión no alteran tal proceso.

Perfil de expresión de MAP2

Debido a nuestro interés sobre la regulación de la migración celular a través de la asociación regulatoria de miR-125a-5p y MARK1, decidimos evaluar el perfil de expresión de la proteína blanco MAP2. Esto debido a que una alta o baja expresión de estas proteínas puede afectar la sensibilidad de las células a los cambios en la expresión de MARK1.

Ensayos preliminares, mostraron que existe una expresión diferencial de MAP2 entre las líneas celulares usadas en este estudio (**Figura 13**). Explicando así el efecto diferencial entre líneas celulares ante el tratamiento con miR-125a-5p o siMARK1

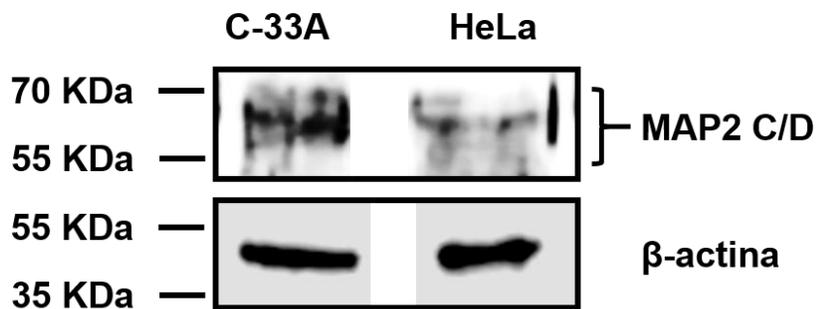


Figura 13. Perfil de expresión de MAP2.

Células C-33A y HeLa fueron cultivadas a un 80% de confluencia a partir de las cuales se obtuvieron proteínas totales. El nivel de MAP2 fue evaluado mediante Western Blot. β-actina fue empleado como control de carga.

miR-125a-5p y la activación de Snail

Además del rol canónico de MARK1 y la regulación de la estabilidad de microtúbulos, MARK1 es capaz de fosforilar a una amplia cantidad de proteínas distintas a las MAPs. Algunos de ellos implicadas en el control del movimiento celular. Una de los mecanismos migratorios que puede ser afectado por cambios en la expresión de MARK1 es Snail. Snail es un factor de transcripción primordial en el encendido del programa de transición epitelio-mesenquima. Su activación en células tumorales es capaz de mediar un aumento en la capacidad migratoria e

invasiva. Previamente se demostró que el programa dependiente de Snail puede ser encendido por cambios en el nivel de MARK1. La pérdida de función de MARK1 (y MARK4) trae como consecuencia un aumento en la actividad de Snail favoreciendo un fenotipo migratorio e invasivo en células epiteliales.

Para probar si el aumento en la capacidad migratoria producida por la transfección con miR-125a-5p era atribuible al encendido del factor de transcripción Snail, se evaluó la expresión de este mediante RT-qPCR en células transfectadas. Un ensayo preliminar mostró que células HeLa tratadas con una dosis de 60 nM del precursor para miR-125a-5p presentaba un aumento de aproximadamente 4 veces en el nivel de expresión de Snail (**Figura 14**) en comparación al tratamiento control. Sin embargo; es necesario evaluar si el efecto es atribuible a la regulación sobre MARK1.

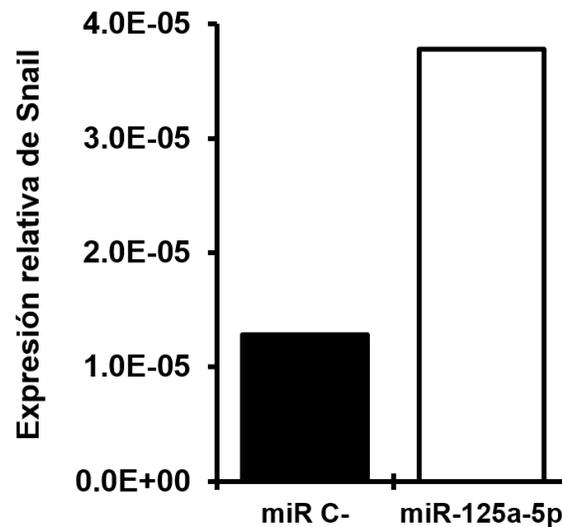


Figura 14 Activación de Snail en células tratadas con el miR-125a-5p

Células HeLa fueron tratadas con una dosis de 60 nM del precursor para miR-125a-5p o un precursor control. El nivel de expresión de Snail fue evaluado a las 48hrs post transfección mediante RT-qPCR.

miR-125a-5p afecta negativamente la proliferación celular y favorece el crecimiento independiente de anclaje.

Con el fin de evaluar el efecto de miR-125a-5p en la proliferación celular, células tratadas con el miRNA de interés o el miR Control fueron teñidas con Carboxi-Fluorescein-Succinidil-Ester (CFSE). La sobreexpresión del miR-125a-5p en la línea tumoral HeLa, ocasionó un desfase en el perfil de proliferación entre tratamientos a las 72 hrs (**Figura 15A**). Al graficar la fluorescencia media (MFI) observamos que las células tratadas con el miR-125a-5p mantienen el marcaje durante los tiempos evaluados (**Figura 15B**, barras blancas) mientras que, en las células tratadas con el control, la intensidad de la fluorescencia disminuye conforme avanza el tiempo (**Figura 15B**, barras negras). Indicando que la sobreexpresión del miR-125a-5p ocasiona una disminución en la proliferación de las células.

Con el fin de corroborar el efecto, se realizó un segundo ensayo en el cual la proliferación celular es evaluada a través de la incorporación de Bromo-desoxiuridina (BrdU), un análogo de base que es incorporado durante la fase de síntesis del ciclo celular. De manera consistente, se observó una disminución en la tasa de proliferación de las células transfectadas con el miR-125a-5p (**Figura 16**), reflejado a través de una disminución en la tasa de incorporación de BrdU comparada contra el control. Confirmando que el miR-125a-5p afecta negativamente la capacidad proliferativa de las células tumorales.

Otra de las características de nuestro interés, fue el crecimiento independiente de anclaje ya que es un indicativo de la capacidad de las células para generar tumores. Un método *in vitro* de hacerlo es a través de un ensayo de formación de colonias en agar suave. En este caso, la transfección con el miR-125a-5p ocasionó un aumento en el número de colonias por pozo (**Figura 17A- B**).

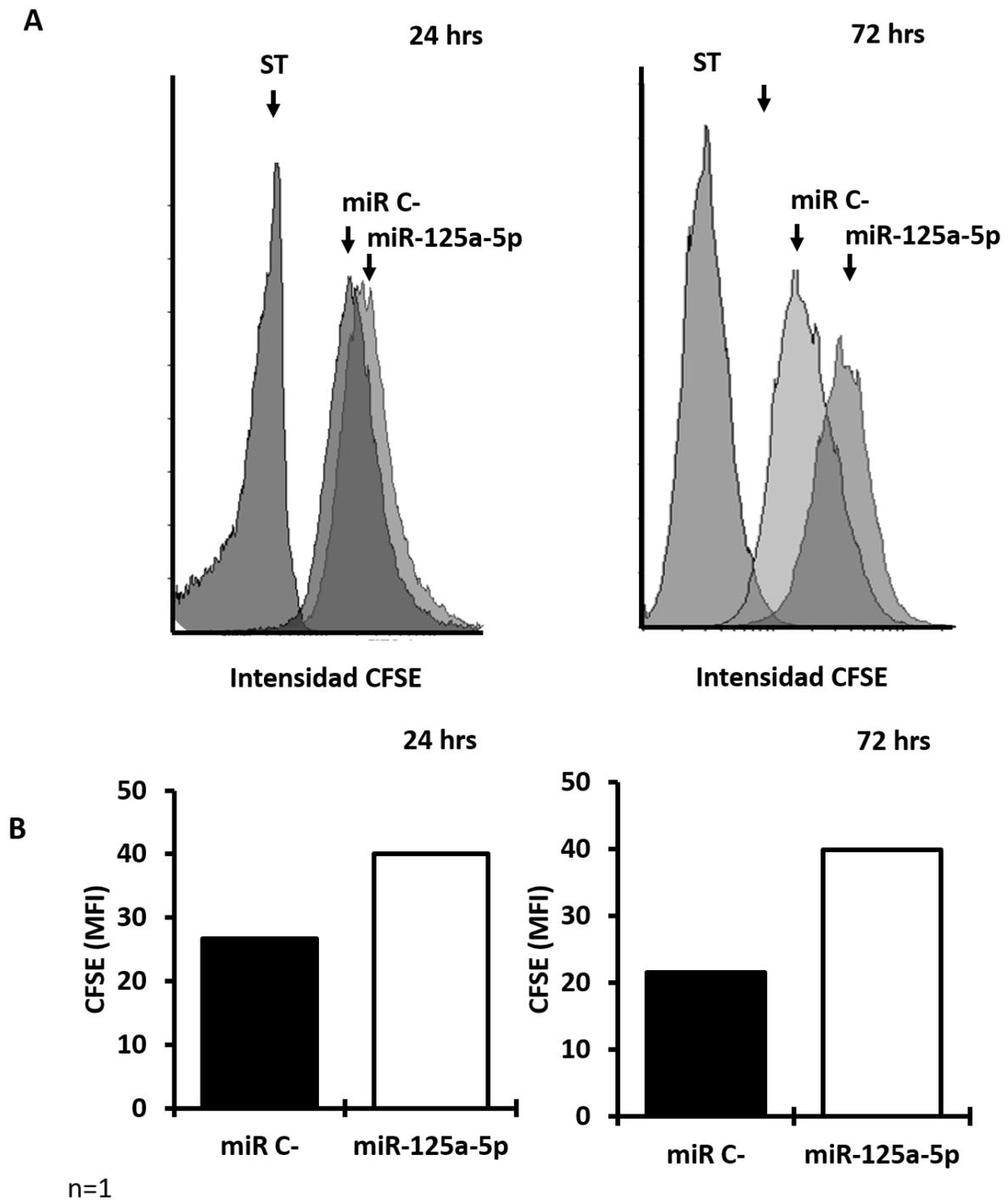


Figura 15. Efecto de miR-125a-5p en la proliferación celular-Tinción con CFSE

3×10^5 células tratadas con una dosis de 60nM de miR-125a-5p o miR Control, fueron teñidas con CFSE $5 \mu\text{M}$ durante 10 min. Las células fueron cosechadas a los tiempos de 24 y 72 hrs y analizadas mediante citometría. **A)** Histograma de la intensidad de CFSE de la población analizada a las 24 y 72 hrs. **B)** El índice de fluorescencia media (MFI) de la población fue graficado.

Al evaluar las colonias bajo el microscopio, se observó que aquellas derivadas de la transfección con miR-125a-5p, eran de menor tamaño en comparación a las colonias desarrolladas en la transfección con el control (**Figura 17C**). Este efecto es consistente con la disminución en la tasa proliferativa vista en los experimentos anteriores.

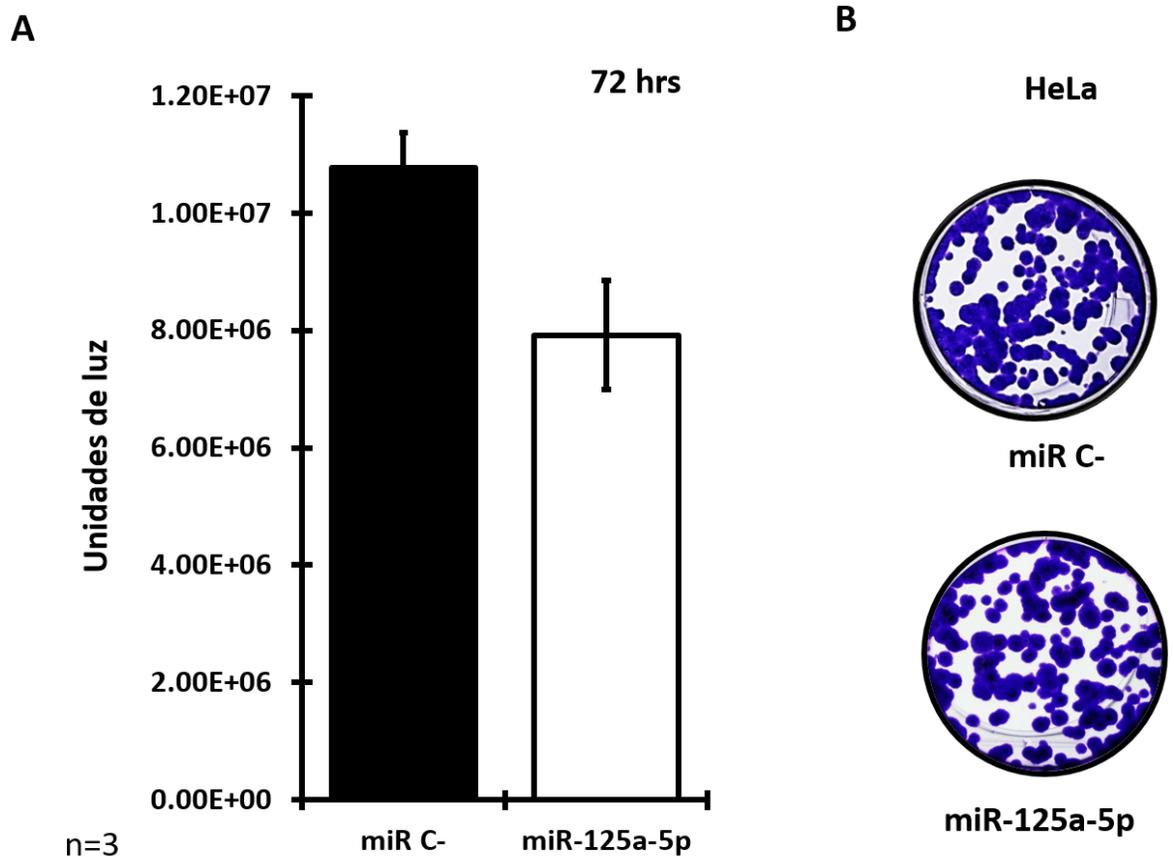


Figura 16. Efecto de miR-125a-5p en la proliferación celular-Incorporación de BrdU.

2.5×10^3 células fueron transfectadas en placas de 96 pozos con una dosis de 60nM del miR-125a-5p o un miR Ccontrol. 72hrs post transfección, las células fueron sometidas a un pulso de BrdU durante 5 hrs. El BrdU incorporado fue detectado mediante una reacción lumínica mediante un anticuerpo conjugado con peroxidasa. A) Unidades de luz. B) Tinción de 2.5×10^3 células crecidas en placa 15 días posttransfección.

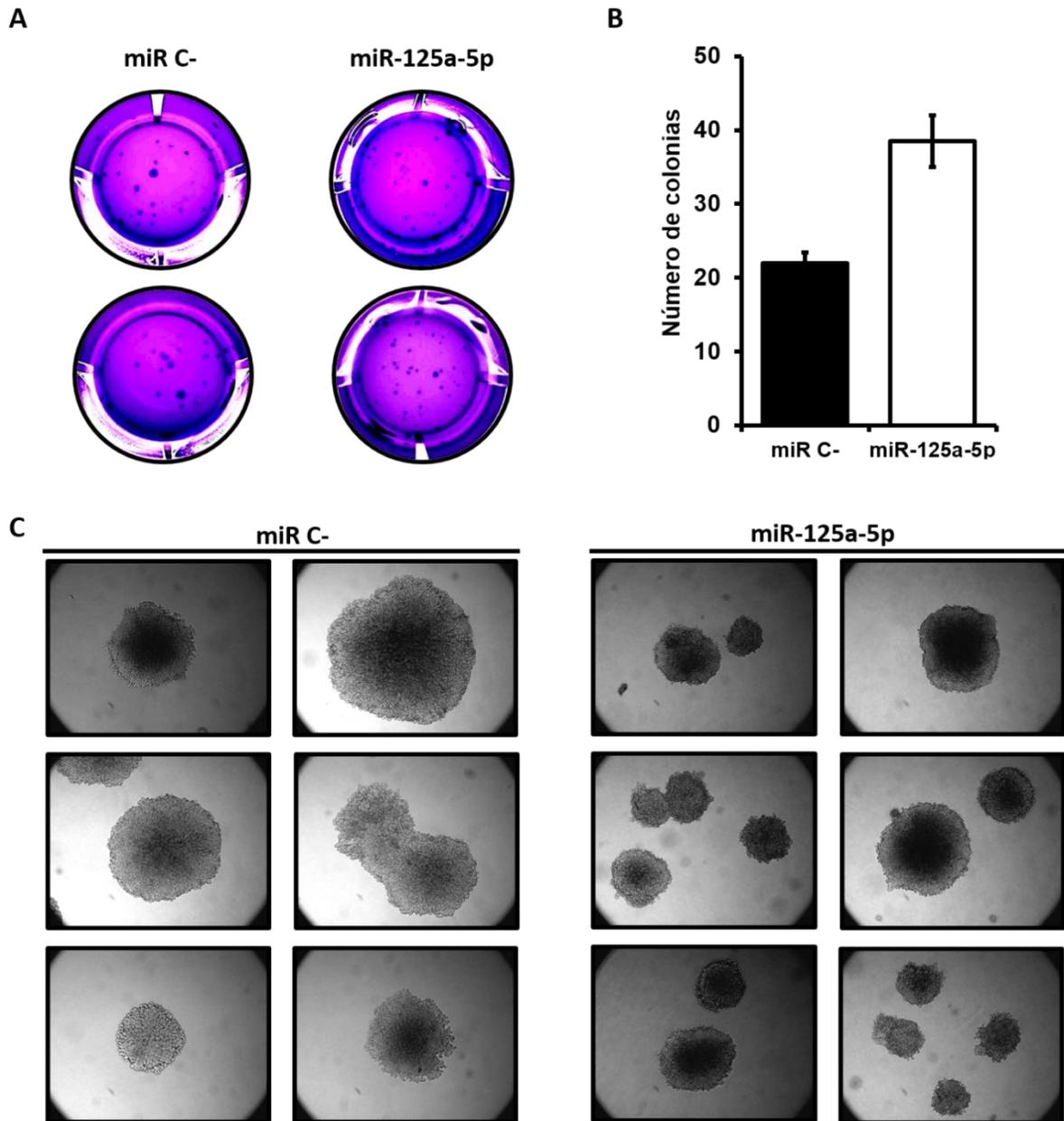


Figura 17. miR-125a-5p favorece el crecimiento independiente de anclaje en las células tumorales HeLa.

1,250 células previamente transfectadas, fueron crecidas en agar suave durante 15 días en placas de 24 pozos por duplicado. A) Tinción con cristal violeta de las colonias desarrolladas en medio del agar. Vista superior del pocillo de un experimento representativo. B) El número promedio de colonias contadas del experimento mostrado en A. C) Vista bajo el microscopio de las colonias desarrolladas.

Debido al efecto observado sobre la proliferación celular ocasionado por la sobreexpresión de miR-125a-5p se evaluó si existía una alteración en el perfil de ciclo celular y si este efecto se debía al arresto en alguna fase en específico.

Para ello, células transfectadas fueron teñidas con ioduro de propidio 48 hrs post transfección y su perfil de ciclo celular fue evaluado mediante citometría. El ioduro de propidio es un agente intercalante del DNA que nos permite monitorear en qué fase del ciclo celular se encuentra una célula según su contenido de DNA. En este caso y bajo las condiciones evaluadas, no se observó efecto alguno ante la sobreexpresión de miR-125a-5p (Figura R13).

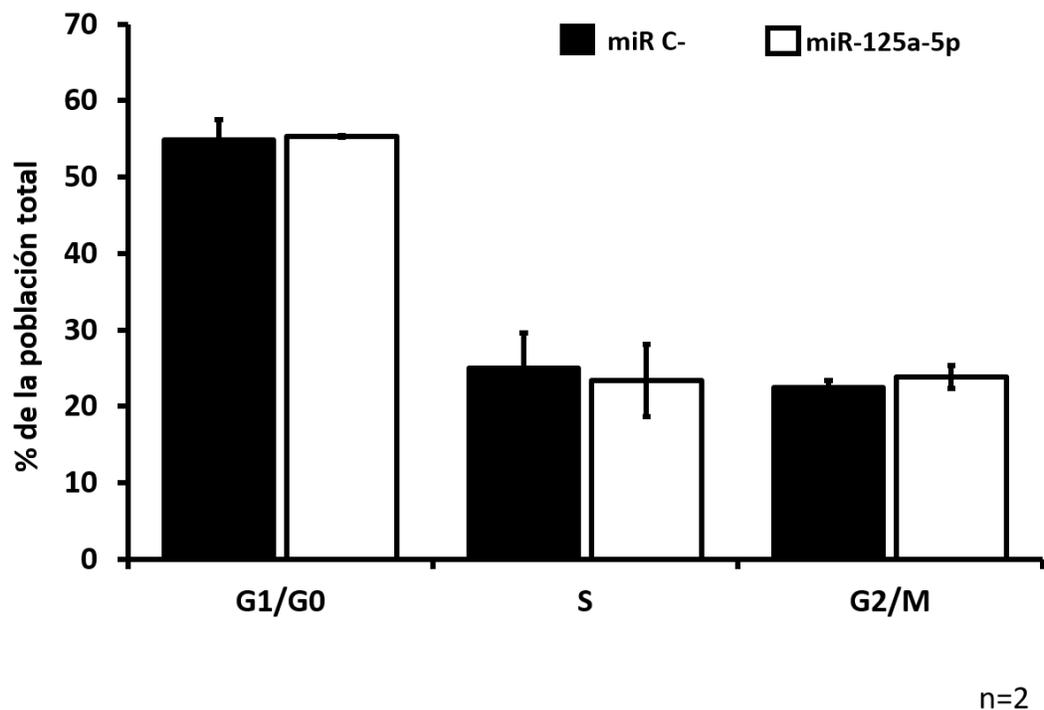


Figura 18. La sobreexpresión de miR-125a-5p no altera el perfil de ciclo celular de células C-33A.

3x10⁵ células fueron transfectadas con una dosis de 60 nM. El perfil de ciclo celular fue evaluado a las 48 hrs post-transfección.

miR-125a-5p y holoclonas derivadas de la línea tumoral SiHa. Posible relación con el fenotipo tipo troncal.

Durante los últimos años, se ha observado que los miRNAs son capaces de regular el proceso de diferenciación; sin embargo, se conoce muy poco sobre cómo estas moléculas pueden influir en el estado troncal de las células. Previamente, miR-125a ha sido relacionado en el control del tamaño de la población troncal a través de la regulación de la apoptosis en el las células progenitoras o troncales del linaje hematopoyético (S. Guo et al., 2010). En un segundo trabajo, la sobreexpresión sostenida de miR-125a ocasionó un enriquecimiento de la población primitiva del linaje hematopoyético, que finalmente resultó en la inducción de un neoplasma mieloproliferativo (Gerrits et al., 2012).

La relación de miR-125a-5p con el enriquecimiento de la población tipo troncal, cobra relevancia en el contexto del desarrollo y progresión del cáncer ya que, se sugiere que existe una población de células dentro de un tumor que mantiene un alto potencial proliferativo con características de linaje tipo troncal, que permite el mantenimiento del mismo. Esta población resulta ser poco sensible a los tratamientos actuales de quimio y radioterapia, dada su baja tasa de proliferación; pero que bajo ciertas condiciones es capaz de regenerar el tumor, ocasionando la recaída del paciente (**Figura 19A**).

Para evaluar la relación del miR-125a-5p sobre el fenotipo tipo troncal en cáncer cervico-uterino recurrimos a realizar ensayos de clonogenicidad. Para esto, partimos del racional de que una línea celular es una población heterogénea con células con diferente capacidad proliferativa (es decir, que cada célula presente en la línea celular, puede dividirse un número definido de veces). Esta capacidad, se encuentra relacionada con ciertas características de las células tipo troncal. Aquellas células con alta capacidad proliferativa, expresan marcadores relacionados con la troncalidad, mientras aquellas con una capacidad proliferativa baja, tienen un fenotipo similar a una célula diferenciada, dejan de proliferar, envejecen y mueren. (**Figura 19B**). Para este fin, empleamos la línea celular SiHa, al ser una línea de fenotipo tumoral y tener una alta expresión de miR-125a-5p.

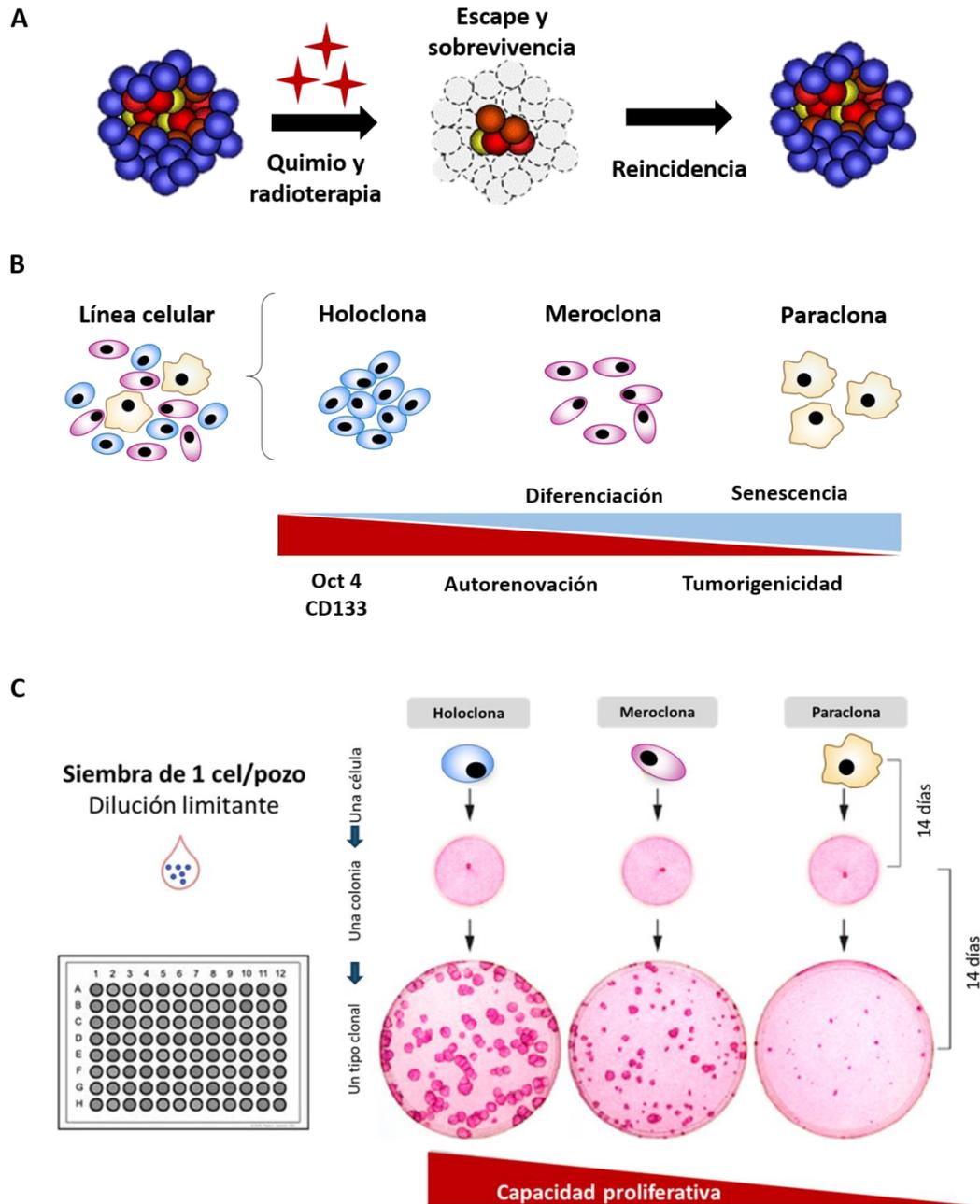


Figura 19- Clonogenicidad y células tipo troncal en el fenotipo tumoral.

A) Relevancia del fenotipo troncal en la evasión a la quimio y radioterapia. **B)** Morfologías Clonales: Las holoclonas son colonias formadas por células tipo stem, las cuales cuentan con el potencial de crecimiento más alto. No contienen células diferenciadas. Pueden expresar marcadores asociados al fenotipo stem y progenitor. Se asocian a la capacidad de auto renovación e iniciación del tumor. Morfológicamente son pequeñas, compactas, circulares y de bordes definidos. Las meroclonas son colonias formadas por una mezcla de células stem y diferenciadas, por lo cual tienen un menor potencial de crecimiento. Son colonias circulares con células pequeñas al centro y bordes dispersos. Las paraclonas son colonias formadas por células diferenciadas, tienen un periodo corto replicativo no mayor a 15 generaciones, después del cual dejan de crecer y se diferencian terminalmente. Se aprecian como grupos de células dispersas y bordes no definidos. (Locke et al. 2005; H. Li et al. 2008) **C)** Ensayo de clonogenicidad.

Primeramente, se evaluó si en esta línea podíamos encontrar los diferentes tipos de colonias. Para esto, se realizó una siembra a baja densidad y se dejó en cultivo durante 15 días. Después de este tiempo, se procedió a realizar el fijado y tinción de las colonias desarrolladas.

Como se puede apreciar en la Figura R15, la línea celular SiHa desarrolla los diferentes tipos clonales. Observándose las holoclonas con alta retención de colorante y borde definido, con células numerosas, pequeñas, de morfología homogénea y capaces de crecer en multicapa (**Figura 20-1**). Paraclonas con menor tamaño, bordes irregulares, células planas con morfología heterogénea (**Figura 20-4 a 6**) y meroclonas las cuales son colonias conformadas con células con ambos tipos de morfología, pequeñas y compactas al centro de la colonia y células aplanadas y dispersas hacia los bordes (**Figura 20-2 y 3**).

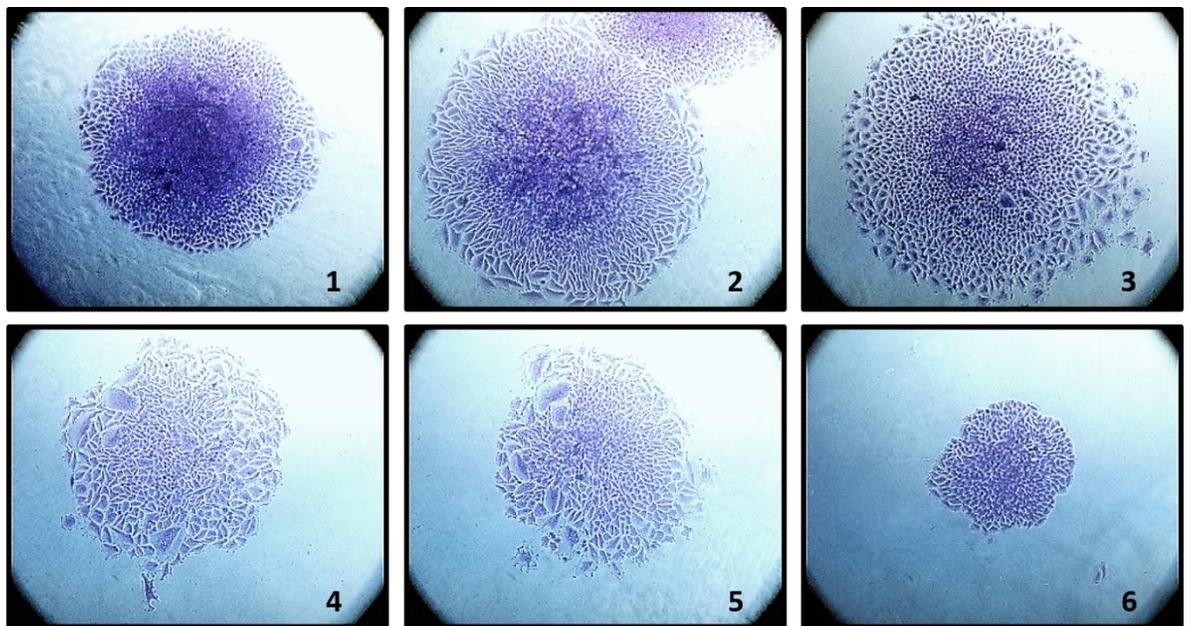


Figura 20. Presencia de los diferentes tipos clonales en la línea tumoral SiHa.

¡00 células de la línea celular SiHa fueron sembradas en una placa de 60mm y cultivadas durante 15 días. La imagen muestra colonias representativas de los diferentes tipos clonales.

Una vez que se observaron los tipos clonales de interés, se procedió a realizar la siembra de células individuales con el fin de obtener colonias aisladas, y evaluar el nivel de miR-125a-5p en cada tipo clonal (**Figura 21**). Aunque por el número de células obtenidas por colonia limitó la cantidad de RNA pequeño obtenido, se lograron evaluar 6 colonias (1 holoclona, 2 meroclonas y 3 paraclonas). Encontrándose que el mayor nivel de miR-125a-5p es expresado en la holoclona. Mientras que en meroclonas y paraclonas el nivel fue menor, sin diferencias entre estos dos tipos clonales.

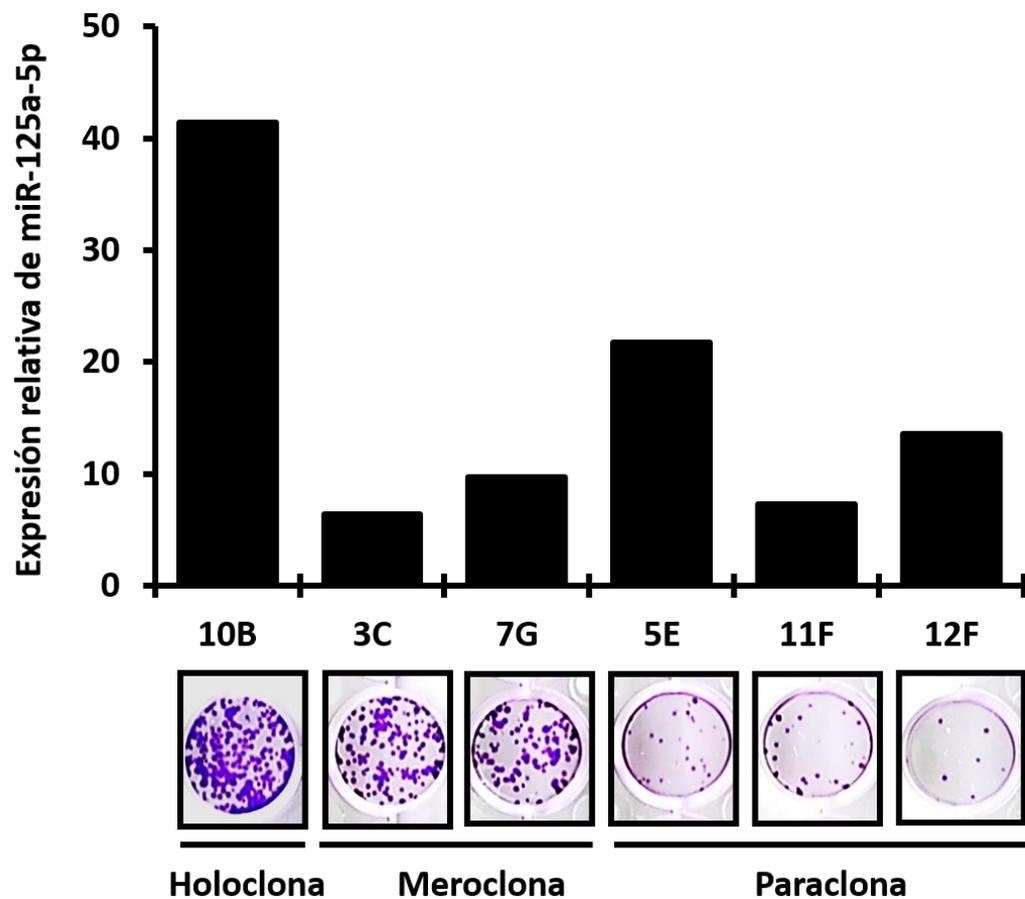


Figura 21. Perfil de expresión de miR-125a-5p en los tipos clonales derivados de la línea celular SiHa

A partir de colonias aisladas obtenidas de la siembra de una sola célula en una placa de 96 pozos, se realizó una segunda resiembra en placas de 24 para clasificar la clona según su patrón de crecimiento (imágenes debajo de la gráfica). El cultivo se amplificó, se aisló el RNA pequeño y se determinó el nivel de expresión de miR-125a-5p para cada clona.

Discusión

Durante la última década, un creciente número de trabajos, ha demostrado que los miRNAs se encuentran involucrados en el control todo proceso celular y su desregulación es un evento frecuente en la aparición, desarrollo y progresión de distintos tipos de tumores. MiR-125a-5p ha sido asociado tanto a un rol de supresor de tumores como de oncogenes en distintos contextos; sin embargo, su participación en cáncer aun es poco conocida. En el presente trabajo, nosotros demostramos una relación directa entre miR-125a-5p y MARK1, un nuevo blanco aquí validado, con relevancia en el proceso migratorio. Nuestros resultados demuestran que tanto la sobreexpresión de miR-125a-5p y la subsecuente disminución de MARK1 estimulan la migración de las líneas celulares derivadas de cáncer cervical .

La relación entre miR-125a-5p y el cáncer cervical ya ha sido previamente explorada, sin una conclusión clara acerca de su rol funcional. Lee y cols in 2008, analizaron el perfil de expresión de miR-125a-5p mediante un arreglo de qRT-PCR comparando carcinoma invasivo de células escamosas de etapa temprana (ISCC) y tejido cervical normal, sin encontrar diferencia significativa. (J.-W. Lee et al., 2008). En contraste, Fan y cols en 2015 encontraron que la expresión de este miRNA estaba considerablemente disminuida en tumores cervicales comparados con su contraparte no tumoral, mediante qRT-PCR.

Funcionalmente, la sobreexpresión de miR-125a es capaz de inhibir la proliferación celular y la capacidad invasiva, mientras suprime el ciclo celular y reduce el crecimiento tumoral y metástasis *in vivo*. Esto, a través de la regulación directa de STAT3. (Zhongyi Fan et al., 2015). En otro trabajo, se evaluó la expresión de miR-125a-5p en 7 líneas derivadas de carcinoma cervical y 12 carcinomas cervicales mediante qRT-PCR encontrándose una disminución en ambos tipos de muestra. Adicionalmente, la sobreexpresión de este miRNA en las líneas HeLa y CaSki inhibió la proliferación y migración tanto *in vitro* como *in vivo* de las células tumorales. (Qin et al., 2015). Aunque en nuestro modelo de líneas

celulares, la sola expresión del miR-125a-5p no fue suficiente para distinguir entre el fenotipo tumoral o inmortal, o presencia a VPH; las diferencias encontradas nos permitieron tener un modelo para la búsqueda y validación de blancos potenciales para miR-125a-5p. Con ello, logramos establecer una correlación inversamente proporcional entre MARK1 y miR-125a-5p. Cabe destacar, que dicha correlación entre blancos y miR-125a-5p, solo fue observada en las líneas con fenotipo tumoral. Sugiriendo que además del tipo celular, la condición específica tiene relevancia en la función del miR-125a-5p. Este fenómeno, ha sido observado en células tumorales de mama (células SKBR3) donde la sobreexpresión del miRNA afecta significativamente la migración y crecimiento de las células tumorales, pero no en células no transformadas (Scott et al., 2007).

En relación al rol en migración, miR-125a-5p actúa como un regulador mayoritariamente negativo a través del efecto sobre HuR (X. Guo, Wu, & Hartley, 2009), ERBB2 y ERBB3 (Scott et al., 2007), ABL2 (Wan, Wang, & Xue, 2016), Gab2 (Lei et al 2016) e indirectamente a través de EGFR (Wang et al., 2009). En contraste, en nuestro trabajo, encontramos que miR-125a-5p estimula la migración celular a través del silenciamiento de MARK1 en líneas celulares derivadas de cáncer cervical HeLa y C-33A. En apoyo a nuestras observaciones, la estimulación de la migración por la sobreexpresión del miR-125a-5p ha sido también reportada en cáncer de pulmón de células no pequeñas (Jiang et al., 2010).

Es conocido que un solo miRNA puede regular a una amplia cantidad de blancos, sin embargo solo una pequeña cantidad ha sido reportada para miR-125a-5p y de ellos solo un par con relevancia en cáncer cérvico uterino como STAT3 (Z Fan et al., 2016; Zhongyi Fan et al., 2015) y ABL2 (Wan et al., 2016). Aquí nosotros validamos un nuevo blanco para miR-125a-5p: MARK1. MARK1 es una cinasa específica para dominio de unión a microtúbulos de las MAPs, jugando un papel importante en la polimerización de microtúbulos. La regulación de MARK1 por miR-125a-5p es a través del reconocimiento directo del sitio blanco predicho (confirmado por ensayos basados en la proteína reportera luciferasa). El

silenciamiento de MARK1 mediante siRNA reprodujo parcialmente el efecto de miR-125a-5p en migración, sugiriendo que en parte MARK1 es uno de los posibles blancos involucrados en el proceso migratorio regulados por miR-125a-5p.

Aunque la implicación biológica del MARK1:MAPs ha sido caracterizada principalmente en células neuronales, varios estudios analizan parte de este circuito en tejido no neuronal y con implicaciones en el proceso migratorio de células tumorales. Tal es el caso de la sobre-expresión de MAP2, que es capaz de inducir defectos mitóticos, inhibición de crecimiento y predisposición a metástasis, en células derivadas de melanoma. Adicionalmente, la sobreexpresión de MAP2A promueve la migración de células Ca9-22, y se ha encontrado altamente sobre-expresada en cáncer oral invasivo, consistente con la habilidad móvil de estas células (Soltani et al. 2005; Fang et al. 2001; S.-Y. Liu et al. 2008; A. Ebneith et al. 1999; Ng et al. 2001; Matenia & E.-M. Mandelkow 2009).

Aunque el proceso de migración se encuentra principalmente asociado al citoesqueleto de actina, trabajos recientes han demostrado que la red de microtúbulos juega un papel relevante en dicho proceso. Los microtúbulos pueden per se contactar y modificar la forma de la membrana celular, influir en la formación de estructuras de adhesión, entrecruzar con otros elementos del citoesqueleto de la células, acarrear componentes necesarios para la elongación de estructuras migratorias, y regular moléculas de señalización (Etienne-Manneville, 2013). En conjunto, estos reportes nos sugieren que el silenciamiento de MARK1 en las células tumorales (como lo observado en células SiHa y QGU) podría conferir una mayor capacidad migratoria, al enriquecer el pool de MAPs no fosforiladas y favorecer un estado general de mayor estabilidad con un aumento en la resistencia mecánica de los microtúbulos facilitando de esta manera la formación de estructuras migratorias.

Adicionalmente, miR-125a-5p y la estabilidad de los microtúbulos ha sido asociada a la Resistencia a fármacos (Kavallaris, 2010). En células tumorales, un aumento en la estabilidad de estos confiere una mayor sensibilidad al tratamiento con

paclitaxel (Ahmed et al., 2007)(Ahmed et al., 2011). Aunque que la sobreexpresión de miR-125a-5p observada en la línea celular SiHa y QGU puede proveer una ventaja en cuanto invasividad al favorecer la migración y diseminación de las células, también parece brindar una mayor respuesta al tratamiento con paclitaxel, uno de los fármacos de mayor uso en tumores avanzados de cáncer cervical.

Conclusiones

A pesar del creciente número de miRNAs descubiertos, poco se sabe acerca del circuito regulatorio que estas pequeñas moléculas ejercen dentro de la célula; por lo que únicamente solo una fracción de sus blancos ha sido caracterizada. En el presente trabajo nos enfocamos en validar al MARK1 como un blanco directo regulado por miR-125a-5p, así como analizar el efecto de este sobre varios procesos celulares de relevancia al fenotipo tumoral, esto en el contexto de cáncer cervico uterino.

Los resultados obtenidos permitieron confirmar la regulación de MARK1 por miR-125a-5p. La sobreexpresión forzada de este miRNA fue capaz de afectar el nivel de expresión de MARK1 endógena en las líneas HeLa y C-33A. Se confirmó que esta regulación es mediada por el reconocimiento directo del sitio blanco predicho en el extremo 3'UTR del RNAm de MARK1, esto comprobado mediante construcciones reporteras basadas en luciferasa. La adición del sitio blanco ocasionó una disminución en el nivel de expresión de luciferasa y al mutarlo, el reconocimiento es eliminado y con ello la regulación sobre este gen reportero. Validando así, que el sitio predicho es un sitio funcional y que es reconocido por miR-125a-5p de manera específica.

La relación MARK1: miR-125a-5p tuvo relevancia funcional, al ser una de las posibles vías de regulación del proceso migratorio de las células tumorales. La sobre-expresión de miR-125a-5p causó un aumento en la capacidad migratoria de las líneas HeLa y C-33A. El efecto fue reproducido por el silenciamiento de MARK1, en una estrategia basada en siRNAs. El efecto, aunque positivo en ambos casos, fue diferencial entre ambas líneas celulares.

Se encontraron diferencias entre líneas a nivel de integridad y presencia del sitio blanco. En el caso de C-33A, se observaron mutaciones y pérdida del sitio de reconocimiento para miR-125a-5p dentro del 3'UTR de MARK1; mientras que para HeLa, el sitio se mantuvo sin alteraciones. Adicionalmente, parece haber una

diferencia considerable en el perfil de MAP2, proteínas blanco de MARK1 que pudiera influenciar la respuesta a los cambios en MARK1.

Aunque de manera preliminar, se observó que la sobreexpresión del miR-125a-5p ocasiona un aumento de casi 4 veces en el nivel de expresión de Snail, factor de transcripción importante en el encendido de programas de migración y transición epitelio-mesénquima.

Otro de los procesos que se vio afectado por efecto de la transfección con miR-125a-5p, fue la proliferación celular. La sobreexpresión de miR-125a-5p ocasionó una baja en la proliferación de las células tratadas, esto observado por una disminución en la incorporación de BrdU y una retención del marcaje con CFSE. De manera consistente, en los ensayos de crecimiento de colonias en agar suave, además de observar un mayor número de colonias derivadas del tratamiento con el miR-125a-5p, estas fueron de menor tamaño. Indicando nuevamente, que el miR-125a-5p afecta la proliferación de las células tratadas.

Se exploró también la relación entre miR-125a-5p y el fenotipo troncal en células tumorales a través de ensayos de clonogenicidad, encontrándose una mayor expresión en holoclonas, las cuales se considera tienen un fenotipo cercano al troncal, esto evaluado en la línea celular SiHa. No se observó diferencias en el nivel de expresión entre paraclonas y meroclonas.

Perspectivas

Evaluar a través de microscopía confocal si existe relocalización de las proteínas blanco de MARK1, como MAP2 ante el tratamiento con miR-125a-5p. Adicionalmente, analizar si existen cambios en la red de microtúbulos.

Confirmar cambios en el nivel de expresión de Snail en células transfectadas con miR-125a-5p.

Continuar con la caracterización funcional de miR-125a-5p en líneas celulares y cultivo primario.

Bibliografía

- Ameres, S. L., Martinez, J., & Schroeder, R. (2007). Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell*, 130(1), 101–12. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.037>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function. *Cell*, 116, 281–297.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363–6. <http://doi.org/10.1038/35053110>
- Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(6), 167–223. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11173079>
- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., & Gorlich, D. (2004, February). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA (New York, N. Y.)*. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2386927&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Cai, X., Hagedorn, C. H., & Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA (New York, N. Y.)*, 10(12), 1957–66. <http://doi.org/10.1261/rna.7135204>
- Calin, G. a, & Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews. Cancer*, 6(11), 857–66. <http://doi.org/10.1038/nrc1997>
- Drewes, G., Ebner, a, Preuss, U., & Mandelkow, E. M. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell*, 89(2), 297–308. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9108484>

- Ebneth, A., Drewes, G., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (1999). Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 44(3), 209–24. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(199911\)44:3<209::AID-CM6>3.0.CO;2-4](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(199911)44:3<209::AID-CM6>3.0.CO;2-4)
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development*, 188–200. <http://doi.org/10.1101/gad.862301.vents>
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, a, Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *The EMBO Journal*, 20(23), 6877–88. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6877>
- Engleitner, T. (2005). Enrichment analysis of GO terms , KEGG pathways and miRNAs by using the hypergeometrical distribution. *Bioinformatics*, 1–5.
- Fan, Z., Cui, H., Xu, X., Lin, Z., Zhang, X., & Kang, L. (2015). MiR-125a suppresses tumor growth , invasion and metastasis in cervical cancer by targeting STAT3. *Oncotarget*, 6(28).
- Fan, Z., Cui, H., Yu, H., Ji, Q., Kang, L., Han, B., ... Jiao, S. (2016). MiR-125a promotes paclitaxel sensitivity in cervical cancer through altering STAT3 expression. *Oncogenesis*, 5(2), e197. <http://doi.org/10.1038/oncsis.2016.1>
- Fang, D., Hallman, J., Sangha, N., Kute, T. E., Hammarback, J. a, White, W. L., & Setaluri, V. (2001). Expression of microtubule-associated protein 2 in benign and malignant melanocytes: implications for differentiation and progression of cutaneous melanoma. *The American Journal of Pathology*, 158(6), 2107–15. [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64682-2](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64682-2)
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature*

Reviews. Genetics, 9(2), 102–14. <http://doi.org/10.1038/nrg2290>

Gerrits, A., Walasek, M. a, Olthof, S., Weersing, E., Ritsema, M., Zwart, E., ... de Haan, G. (2012). Genetic screen identifies microRNA cluster 99b/let-7e/125a as a regulator of primitive hematopoietic cells. *Blood*, 119(2), 377–87. <http://doi.org/10.1182/blood-2011-01-331686>

Gregory, R. I., Yan, K., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014), 235–240. JOUR. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature03120>

Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S., & Enright, A. J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue), D154-8. <http://doi.org/10.1093/nar/gkm952>

Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., ... Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106(1), 23–34. Retrieved from [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092-8674\(01\)00431-7](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092-8674(01)00431-7)

Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), W70-4. <http://doi.org/10.1093/nar/gkn188>

Guo, S., Lu, J., Schlanger, R., Zhang, H., Wang, J. Y., Fox, M. C., ... Scadden, D. T. (2010). MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 14229–34. <http://doi.org/10.1073/pnas.0913574107>

Guo, X., Wu, Y., & Hartley, R. S. (2009). MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer. *RNA Biology*, 6(5), 575–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875930>

- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, *404*(6775), 293–6. <http://doi.org/10.1038/35005107>
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004, December 15). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development*. <http://doi.org/10.1101/gad.1262504>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, a E., Bálint, E., Tuschl, T., & Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science (New York, N. Y.)*, *293*(5531), 834–8. <http://doi.org/10.1126/science.1062961>
- Hutvagner, G., Zamore, P. D., Caudy, A. A., Hammond, S. M., Rauhut, R., Lendeckel, W., ... Baulcombe, D. C. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science (New York, N. Y.)*, *297*(5589), 2056–60. <http://doi.org/10.1126/science.1073827>
- Hwang, H.-W., & Mendell, J. T. (2006). MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *British Journal of Cancer*, *94*(6), 776–80. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603023>
- Ibrahim, F., Rohr, J., & Hesson, J. (2006). Untemplated Oligoadenylation Promotes Degradation of RISC-Cleaved Transcripts. *Science*, *314*.
- ICO. (2016). Human Papillomavirus and Related Diseases Report, (October). Retrieved from www.hpvcentre.com
- Illenberger, S., Drewes, G., Trinczek, B., Biernat, J., Meyer, H. E., Olmsted, J. B., ... Biol, E. J. (1996). Phosphorylation of Microtubule-associated Proteins MAP2 and MAP4 by the Protein Kinase p110 mark, *271*(18), 10834–10843.

- Janas, M. M., & Novina, C. D. (2012). Not lost in translation: stepwise regulation of microRNA targets. *The EMBO Journal*, *31*(11), 2446–2447. <http://doi.org/10.1038/emboj.2012.119>
- Jiang, L., Huang, Q., Zhang, S., Zhang, Q., Chang, J., Qiu, X., & Wang, E. (2010). Hsa-miR-125a-3p and hsa-miR-125a-5p are downregulated in non-small cell lung cancer and have inverse effects on invasion and migration of lung cancer cells. *BMC Cancer*, *10*, 318. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-10-318>
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *57*, 19–53. <http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218>
- Ketting, R. F., Fischer, S. E. J., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J., & Plasterk, R. H. A. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & Development*, *15*(20), 2654–9. <http://doi.org/10.1101/gad.927801>
- Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, *115*(2), 209–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14567918>
- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *6*(5), 376–85. <http://doi.org/10.1038/nrm1644>
- Kloosterman, W. P., Wienholds, E., Ketting, R. F., & Plasterk, R. H. a. (2004). Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. *Nucleic Acids Research*, *32*(21), 6284–91. <http://doi.org/10.1093/nar/gkh968>
- Kuhn, D. E., Martin, M. M., Feldman, D. S., Terry, A. V, Nuovo, G. J., & Elton, T. S. (2007). Experimental validation of miRNA targets. *Methods (San Diego, Calif.)*, *44*(1), 47–54. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.09.005>
- Lai, E. C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nature Genetics*, *30*(4), 363–

4. <http://doi.org/10.1038/ng865>

Lee, E. Y. H. P., & Muller, W. J. (2010). *Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.*

<http://doi.org/10.1101/cshperspect.a003236>

Lee, J.-W., Choi, C. H., Choi, J.-J., Park, Y.-A., Kim, S.-J., Hwang, S. Y., ... Bae, D.-S. (2008). Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(9), 2535–42. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1231>

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. JOUR. Retrieved from

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009286749390529Y>

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., ... Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415–9. <http://doi.org/10.1038/nature01957>

Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, 21(17), 4663–70. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=126204&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20), 4051–60. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>

Lee, Y. S., & Dutta, A. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Pathology*, 4, 199–227. <http://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092222>

Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are

microRNA targets. *Cell*, 120(1), 15–20.
<http://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>

Liu, J., Carmell, M. a, Rivas, F. V, Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J.-J., ... Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science (New York, N. Y.)*, 305(5689), 1437–41.
<http://doi.org/10.1126/science.1102513>

Liu, Q., Rand, T. a, Kalidas, S., Du, F., Kim, H.-E., Smith, D. P., & Wang, X. (2003). R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science (New York, N. Y.)*, 301(5641), 1921–5.
<http://doi.org/10.1126/science.1088710>

Liu, S.-Y., Chen, Y.-T., Tseng, M.-Y., Hung, C.-C., Chiang, W.-F., Chen, H.-R., ... Chen, J. Y.-F. (2008). Involvement of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in oral cancer cell motility: a novel biological function of MAP2 in non-neuronal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366(2), 520–5.
<http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.179>

Long, D., Lee, R., Williams, P., Chan, C. Y., Ambros, V., & Ding, Y. (2007). Potent effect of target structure on microRNA function. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(4), 287–94. <http://doi.org/10.1038/nsmb1226>

Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science*, 303(5654), 95–98. article.
<http://doi.org/10.1126/science.1090599>

Ma, J.-B., Ye, K., & Patel, D. J. (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, 429(6989), 318–322. JOUR. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature02519>

Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., & Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110(5), 563–74. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12230974>

Matenia, D., & Mandelkow, E.-M. (2009). The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(7), 332–42.

<http://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.03.008>

Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P., & Zamore, P. D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 123(4), 607–20.

<http://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.044>

Mazière, P., & Enright, A. J. (2007). Prediction of microRNA targets. *Drug Discovery Today*, 12(11–12), 452–8.

<http://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.04.002>

Ng, Jt., Takei, Y., Harada, A., Nakata, T., Chen, J., & Hirokawa, N. (2001). Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *The Journal of Cell Biology*, 155(1), 65–76. <http://doi.org/10.1083/jcb.200106025>

Nykänen, a, Haley, B., & Zamore, P. D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 107(3), 309–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11701122>

Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H., & Siomi, M. C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & Development*, 18(14), 1655–66. <http://doi.org/10.1101/gad.1210204>

Olena, A. F., & Patton, J. G. (2010). Genomic organization of microRNAs. *Journal of Cellular Physiology*, 222(3), 540–5. <http://doi.org/10.1002/jcp.21993>

Olsen, P. H., & Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Developmental Biology*, 216(2), 671–80. <http://doi.org/10.1006/dbio.1999.9523>

- Pillai, R. S. (2005). MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* (New York, N.Y.), 11(12), 1753–61. <http://doi.org/10.1261/rna.2248605>
- Rand, T. a, Petersen, S., Du, F., & Wang, X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123(4), 621–9. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.020>
- Robb, G. B., & Rana, T. M. (2007). RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Molecular Cell*, 26(4), 523–37. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.016>
- Sakurai, K., Amarzguioui, M., Kim, D.-H., Alluin, J., Heale, B., Song, M., ... Rossi, J. J. (2011). A role for human Dicer in pre-RISC loading of siRNAs. *Nucleic Acids Research*, 39(4), 1510–25. <http://doi.org/10.1093/nar/gkq846>
- Sano, M., Sierant, M., Miyagishi, M., Nakanishi, M., Takagi, Y., & Sutou, S. (2008). Effect of asymmetric terminal structures of short RNA duplexes on the RNA interference activity and strand selection. *Nucleic Acids Research*, 36(18), 5812–21. <http://doi.org/10.1093/nar/gkn584>
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., & Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115(2), 199–208. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14567917>
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Haley, B., & Zamore, P. D. (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways. *Molecular Cell*, 10(3), 537–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408822>
- Scott, G. K., Goga, A., Bhaumik, D., Berger, C. E., Sullivan, C. S., & Benz, C. C. (2007). Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 1479–86. <http://doi.org/10.1074/jbc.M609383200>
- Shen, B., & Goodman, H. M. (2004). Uridine addition after microRNA-directed

cleavage. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5698), 997.
<http://doi.org/10.1126/science.1103521>

Soltani, M. H., Pichardo, R., Song, Z., Sangha, N., Camacho, F., Satyamoorthy, K., ... Setaluri, V. (2005). Microtubule-associated protein 2, a marker of neuronal differentiation, induces mitotic defects, inhibits growth of melanoma cells, and predicts metastatic potential of cutaneous melanoma. *The American Journal of Pathology*, 166(6), 1841–50. [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62493-5](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62493-5)

Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., & Zamore, P. D. (2004). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5700), 1377–80. <http://doi.org/10.1126/science.1102755>

Wan, Y., Wang, S., & Xue, M. (2016). MicroRNA-125a-5p modulates human cervical carcinoma proliferation and migration by targeting ABL2, 71–79.

Wang, G., Mao, W., Zheng, S., & Ye, J. (2009). Epidermal growth factor receptor-regulated miR-125a-5p--a metastatic inhibitor of lung cancer. *The FEBS Journal*, 276(19), 5571–8. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07238.x>

Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252622>

Yekta, S., Shih, I.-H., & Bartel, D. P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5670), 594–6. <http://doi.org/10.1126/science.1097434>

Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 17(24), 3011–6. <http://doi.org/10.1101/gad.1158803>

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. a, & Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23

nucleotide intervals. *Cell*, 101(1), 25–33. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80620-0](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80620-0)

Zhu, S., Si, M.-L., Wu, H., & Mo, Y.-Y. (2007). MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *The Journal of Biological Chemistry*, 282(19), 14328–36. <http://doi.org/10.1074/jbc.M611393200>