



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

Unidad Zacatenco

Departamento de Genética y Biología Molecular

**“Papel funcional de LIN28B sobre la expresión del
cluster hsa-miR-125a/let-7e/miR-99b en células de
carcinoma hepatocelular”**

TESIS

Que presenta

LBT Irving Figueroa García

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de Tesis: Dr. Luis Marat Alvarez Salas

Ciudad de México

Diciembre 2020

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapia Génica del departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN bajo la dirección del Dr. Luis Marat Alvarez Salas y gracias al apoyo de CONACYT con la beca de maestría número 726432 y el proyecto de Ciencia Básica A1-S-9160.



Agradecimientos

Al Dr. Luis Marat Alvarez Salas, por haberme dado la oportunidad de incluirme en este gran grupo de trabajo y por la dirección brindada para realizar este proyecto, le agradezco todo el apoyo que me dio, no solamente en el ámbito académico, pero en lo personal también.

A mis asesores, el Dr. Luis Y. Kameyama Kawabe y el Dr. Javier Hernández Sánchez, por la atención prestada y los consejos dados para que este trabajo resultara lo mejor posible.

A la Sra. Gabriela Mora Macías, por el apoyo secretarial que siempre estuvo disponible, facilitando toda la parte administrativa.

A mis compañeros de laboratorio, que se convirtieron en amigos, Fernanda, Sergio, Mateo, Víctor, Pablo y Evelyn, por todo el conocimiento y la ayuda brindados, así como por los buenos momentos compartidos.

A mis amigos Luisa, Emmanuel, Rodrigo y Sofía, por su amistad, que siempre ha sido muy importante para mí, y que me ayudó a sobrellevar los momentos difíciles. De igual manera a mis compañeros de generación, especialmente Jairo y Karla, por el tiempo compartido.

Finalmente, pero no menos importante, a mis padres, quienes son mis pilares en la vida y siempre me impulsaron para que alcanzara mis metas en la vida y creyeron en mí. Sin la educación y el amor que me han dado siempre no podría ser la persona que soy ahora, todo se los debo a ustedes.

Índice	Página
1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Introducción	3
3.1 MicroRNAs (miRNAs)	3
3.2 Cluster de miR-125a/let-7e/miR-99b.....	7
3.3 miR-99b	8
3.4 miR-125a	10
3.5 let-7e.....	11
3.6 Regulación post-transcripcional de los miRNAs let-7.....	13
4. Antecedentes	16
5. Justificación	20
6. Hipótesis	21
7. Objetivos.....	21
7.1 Objetivo General.....	21
7.2 Objetivos Específicos.....	21
8. Diseño Experimental	22
9. Materiales y Métodos	23
9.1 Cultivo de células.....	23
9.2 Extracción de RNA total	23
9.3 Evaluación de la expresión de miRNAs y sus precursores mediante RT- qPCR.....	24
9.4 Análisis estadístico.....	26
9.5 Cálculo de eficiencias de qPCR.....	27
10. Resultados	28
10.1 Eficiencias qPCR.....	28

10.2 Niveles de expresión endógena de pre-miR-125a, pre-let-7e y pre-miR-99b.....	29
10.3 Niveles de expresión endógena de miR-125a, let-7e y miR-99b	33
10.4 Cuantificación de los niveles de pre-miRNAs y miRNAs maduros	36
11. Discusión	37
12. Conclusiones	41
13. Perspectivas	42
14. Referencias	43

Figuras

Página

Figura 1. Vía canónica de la biogénesis de miRNAs	6
Figura 2. Organización genómica del cluster miR-99b/let-7e/miR-125a .	8
Figura 3. Regulación de let-7 por LIN28A/LIN28B.....	15
Figura 4. LIN28B se une al pre-miR125a y bloquea su procesamiento a la forma madura en hepatoblastos	16
Figura 5. Supresión de miR-125a por LIN28B	18
Figura 6. Expresión de precursores de let-7 y LIN28B en HepG2 y distintas líneas cervicales inmortales y tumorales	19
Figura 7. Gráficas de las rectas utilizadas para el cálculo de eficiencias de qPCR.....	29
Figura 8. Indicadores de integridad y pureza del RNA para pre-miRNAs	30
Figura 9. Curvas de amplificación por RT-qPCR para pre-miRNAs	32
Figura 10. Especificidad de la RT-qPCR para pre-miRNAs.....	33
Figura 11. Curvas de amplificación por RT-qPCR para miRNAs maduros	34
Figura 12. Especificidad de la RT-qPCR para miRNAs maduros	35
Figura 13. Perfil de expresión de precursores y miRNAs maduros	36

Tablas**Página**

Tabla 1. Cebadores utilizados para la retrotranscripción.....	25
Tabla 2. Cebadores utilizados para qPCR	26

1. Resumen

Los microRNAs (miRNAs) pueden ser transcritos individualmente como un monocistron o como RNAs policistrónicos, en los que se genera un solo transcrito primario (pri-miRNA) y después es procesado para expresar cada miRNA del cluster individualmente. A pesar de que los miRNAs de un cluster pueden ser transcritos en una sola unidad, los niveles de expresión de cada miRNA pueden ser diferentes, como lo es el caso de los miRNAs del cluster hsa-miR-99b/let-7e/miR-125a, los cuales se transcriben en un solo pri-miRNA, pero se han observado diferentes niveles de expresión de los miRNAs maduros. Como LIN28B es una proteína involucrada en la regulación de let-7e y miR-125a, se planteó estudiar qué efecto tiene LIN28B en la expresión de los miRNAs del cluster antes mencionado. Se midieron los niveles endógenos de let-7e, miR-99b, miR-125a y sus precursores en la línea HepG2 (que produce altos niveles de LIN28B), donde se observó que el pre-miR-125a presentó una acumulación en comparación con los otros dos precursores, mientras que entre los miRNAs maduros no hubo una diferencia significativa. Así, es posible que miR-125a lleva a cabo un paso regulatorio extra a nivel del precursor que disminuye su maduración. Esta regulación diferencial podría significar que los miRNAs del cluster hsa-miR-99b/let-7e/miR-125a se necesitan diferencialmente en contextos celulares distintos, por lo que su expresión puede variar según los requerimientos temporales de la célula.

2. Abstract

MicroRNAs (miRNAs) can be transcribed alone as a monocistron or generated as a polycistronic primary transcript (pri-miRNA) and processed to express each individual miRNA. Even though clustered miRNAs are transcribed from a single promoter, the expression levels of each miRNA within the cystronic RNA can be different. Such is the case of cluster hsa-miR-99b/let-7e/miR-125a, in which the miRNAs are transcribed as a single pri-miRNA, but it has been observed different levels of expression of the mature miRNAs. A protein involved in the maturation of miRNAs is LIN28B, which is a known regulator of the let-7 family miRNAs. Because the cluster hsa-miR-99b/let-7e/miR-125a harbors a let-7 miRNA, and miR-125a also has been shown as a possible LIN28B target, this work proposes the study of LIN28B effect in the expression of the hsa-miR-99b/let-7e/miR-125a cluster. The endogenous levels of the three miRNAs and their precursors were individually measured in the HepG2 cell line (an hepatocarcinoma line with constitutive LIN28B expression), and it was observed that pre-miR-125a showed an accumulation relative to let-7e and miR-99b, although no significant difference was observed between the three mature miRNAs. Therefore, is possible that miR-125a may go through a regulatory step at the precursor level which decreases its maturation. This differential regulation can mean that the miRNAs of this cluster are required at different cellular contexts, so that their expression can oscillate according to the temporal requirements of the cell.

3. Introducción

3.1 MicroRNAs (miRNAs)

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs pequeños no codificantes, de aproximadamente 22 nt de largo que regulan negativamente la expresión génica, afectando la transcripción y estabilidad de RNAs mensajeros (mRNA) blanco mediante el reconocimiento de una secuencia complementaria normalmente localizada en la región no traducida 3' (3'-UTR). Los miRNAs están involucrados en diversas funciones biológicas incluyendo desarrollo, proliferación celular, diferenciación, vías de señalización, apoptosis y metabolismo (Roush & Slack, 2008).

Las secuencias de los miRNAs se encuentran dentro de varios contextos genómicos. En humanos, la mayoría de los miRNAs se encuentran dentro de regiones intrónicas de transcritos no codificantes o codificantes, aunque algunos se encuentran en regiones exónicas (Ha & Kim, 2014).

La unión de un miRNA a su secuencia complementaria disminuye la traducción del mRNA blanco mediante distintos mecanismos, entre los que se incluyen la degradación del transcrito y la inhibición de la iniciación y elongación traduccional (Lee, Han, Kwon, & Lee, 2016).

Los miRNAs son transcritos producidos principalmente por la RNA polimerasa II como un miRNA primario (pri-miRNA) (Figura 1). Este pri-miRNA puede llegar a ser de hasta miles de nucleótidos de largo y se

caracteriza por la presencia de una estructura de tallo-burbuja que presenta entre 33 y 35 pb en el tallo y que contiene al miRNA maduro, un bucle apical y extremos 3' y 5' de cadena sencilla que pueden ser de longitudes variables (Ha & Kim, 2014).

Durante la biogénesis canónica de miRNAs, la estructura de tallo-burbuja es reconocida por la enzima *Drosha*, que es una RNAsa tipo III, y su cofactor DGCR8. Estas dos proteínas junto con un complejo de proteínas forman el complejo *Microprocesador* y donde *Drosha* es el centro catalítico que corta el RNA de doble cadena, mientras que DGCR8 asegura que el complejo esté posicionado correctamente para su corte (Roush & Slack, 2008). Esto genera una estructura de tallo-burbuja más corta llamada pre-miRNA. *Drosha* corta al tallo-burbuja aproximadamente 11 pb más allá de la unión basal entre el RNA de cadena sencilla y el RNA de doble cadena y aproximadamente 22 pb más allá de la unión al bucle apical. El corte realizado es asimétrico dejando dos bases salientes en el extremo 3' (Ha & Kim, 2014). Ya que el corte de *Drosha* define el límite del miRNA, y por lo tanto determina su especificidad, es importante que *Microprocesador* reconozca y corte al pri-miRNA de manera correcta.

El corte de *Drosha* resulta en un miRNA precursor (pre-miRNA) de aproximadamente 70 nt de largo y es exportado del núcleo al citoplasma mediante la exportina 5 en una manera dependiente de Ran-GTP (Lee et

al., 2016). Ya en el citoplasma el pre-miRNA se une a una segunda enzima RNAsa tipo III, llamada *Dicer*. Los sitios de corte de *Dicer* están fijos a cierta distancia del extremo 3' del RNA de doble cadena, la cual es normalmente de 21 a 25 nt de longitud y remueve el bucle apical (MacRae *et al.*, 2006). Como parte de la regulación homeostática de la actividad de *Dicer* en humanos, su transcrito contiene sitios de unión para el miRNA let-7, lo cual resulta en un ciclo de retroalimentación negativo entre *Dicer* y let-7 (MacRae *et al.*, 2006).

El dúplex imperfecto de RNA generado por *Dicer* presenta 2 bases salientes en cada extremo 3', y contiene la región semilla del miRNA maduro, que es la región 5' necesaria para el reconocimiento del blanco y abarca de las bases 2 a 8. Este dúplex es subsecuentemente cargado en una proteína Argonauta (AGO) para formar el complejo efector llamado Complejo Silenciador Inducido por RNA (RISC), formado principalmente por *Dicer*, TRBP/D2R2 y Argonauta. Sólo una de las dos cadenas del dúplex es mantenida en el complejo RISC, la cadena guía que es la responsable del silenciamiento, mientras que la cadena complementaria denominada pasajera es eliminada o puede ser incluida en otros complejos RISC con diferente especificidad (Sakurai *et al.*, 2011). La estabilidad termodinámica del extremo 5' de las cadenas que conforman el dúplex de miRNA maduro determina la identidad de la cadena guía y la

cadena pasajera, siendo la que presenta el extremo 5' menos estable la que normalmente se selecciona como la cadena guía (Liu *et al.*, 2005).

El mecanismo de reconocimiento de los miRNAs se basa en el apareamiento de bases entre la cadena incorporada al complejo RISC con secuencias localizadas generalmente en el extremo 3' UTR del mRNA blanco (Lai, 2002). Cuando la complementariedad entre el miRNA y el mRNA blanco es parcial, la traducción del mRNA blanco se ve reprimida, aunque sin afectar sus niveles. Sin embargo, si la complementariedad es perfecta, el mRNA blanco se deadenila y provoca el corte endonucleolítico y su degradación (Eulalio, Huntzinger, & Izaurralde, 2008).

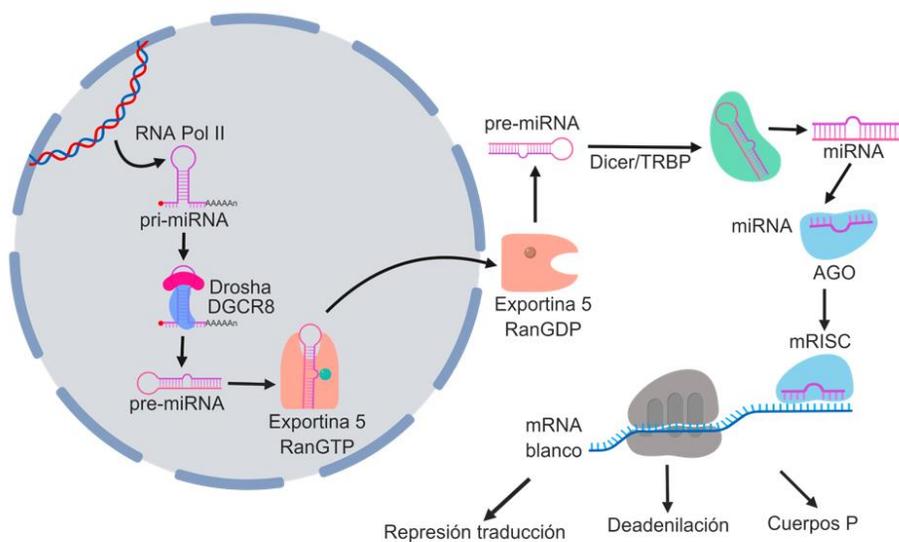


Figura 1. Vía canónica de la biogénesis de miRNAs. Un transcrito primario producido por la RNA polimerasa II es procesado por el microprocesador en el núcleo. El pre-miRNA generado es transportado al citoplasma en una manera dependiente de EXP5-Ran-GTP y posteriormente procesado por *Dicer* para generar el miRNA maduro. El miRNA maduro es cargado al complejo RISC para inhibir la traducción del RNA mensajero blanco.

3.2 Cluster de miR-125a/let-7e/miR-99b

Un cluster de miRNAs es un juego de dos o más miRNAs que son transcritos de genes de miRNAs físicamente adyacentes (policistrón). Éstos pueden ser encontrados en unidades de transcripción de regiones codificantes para proteínas, o regiones no codificantes. Los clusters de miRNAs juegan roles importantes al controlar varios procesos celulares (Lai 2013).

Uno de estos clusters es el que contiene a los miRNAs miR-99b, let-7e y miR-125a, el cual se encuentra en el cromosoma 19 en humanos (Figura 2). Inicialmente se reportó que éste cluster se encontraba inmediatamente río arriba del primer exón anotado de NCRNA00085, un RNA largo no codificante con función desconocida (Gascoigne *et al.*, 2012). Después, basándose en homología de secuencia con el genoma de ratón, se encontró un marco de lectura abierto (ORF) y se volvió evidente que el transcrito codificaba una cadena de polipéptidos de 324 residuos de aminoácidos, denominada Proteína 6 Asociada al Acrosoma de Espermatozoide (SPACA6), que en ratones está implicada en la fusión del espermatozoide con el óvulo durante la fertilización (Lorenzetti *et al.*, 2014). Más recientemente un nuevo exón del gen de *Spaca6* fue encontrado. Se localiza 3029 pb río arriba de pre-miR-99b y pertenece a un transcrito que codifica una isoforma diferente de la proteína SPACA6

de 283 residuos de aminoácidos, denominada isoforma 2 (Chang, Perteau, Lee, Salzberg, & Mendell, 2015).

Un método de detección basado en un vector reportero sin promotor demostró que el cluster de miR-125a/let-7e/miR-99b y SPACA6 comparten el mismo promotor. La secuencia identificada es un promotor de RNA polimerasa II sin caja TATA que contiene un iniciador y elementos promotores río abajo. Ensayos de luciferasa mostraron que su actividad es inducida por p65, la principal subunidad de NF- κ B, un factor de transcripción que juega un papel importante en la respuesta inflamatoria (Potenza, Panella, *et al.*, 2017).

Locus 19q13

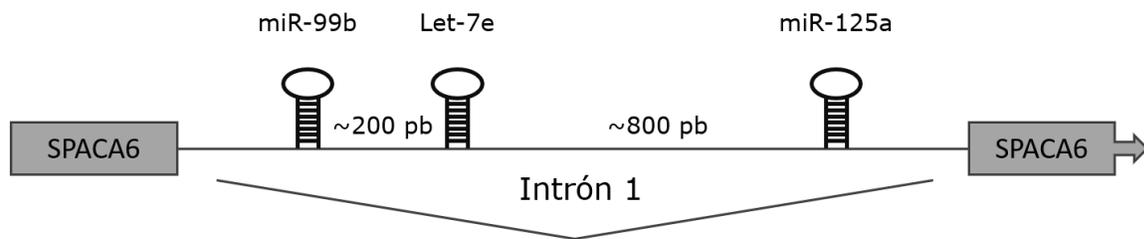


Figura 2. Organización genómica del cluster miR99b/let-7e/miR-125a. El cluster se encuentra dentro del primer intrón del transcrito primario de *Spaca6*, ubicado en el locus 19q13.2 – 19q13.4

3.3 miR-99b

En el caso de miR-99b, se ha reportado que está involucrado en la diferenciación, migración y proliferación de células cancerosas. Algunos

estudios han demostrado que miR-99b puede funcionar como modulador dentro de una red compleja de factores que regulan la transición epitelio mesénquima inducida por TGF- β (Li Wang et al., 2014). Además miR-99b inhibe la invasión celular en cáncer cervical y proliferación al elegir como blanco la vía de señalización de mTOR (Turcatel, Rubin, El-Hashash, & Warburton, 2012). En otro estudio se demostró que la sobreexpresión de miR-99b suprimió significativamente la proliferación de queratinocitos humanos a las 48 y 72 horas después de la transfección (Li et al., 2015)

Por otro lado, se ha reportado que miR-99b promueve el fenotipo metastásico en líneas celulares de carcinoma hepatocelular (HCC) mediante la inhibición de la proteína asociada a uniones estrechas Claudina 11, para promover la transición epitelio mesénquima de las células HCC llevando a metástasis (Yang, Liu, Yuan, & Wang, 2015).

También se ha mostrado que miR-99b regula la proliferación celular en células normales. En epitelio normal de glándula mamaria de ratón, la sobreexpresión de miR-99a y miR-99b resultó en mayor proliferación, migración y expresión de fibronectina (Turcatel et al., 2012), por lo que es aparente que miR-99b tiene funciones distintas en diferentes tipos celulares.

3.4 miR-125a

Por su parte, el miRNA-125a, denominado *lin-4* en nematodos y parte de la familia miR-125 (miR-125a, miR-125b1 y miR-125b2), es expresado en todos los animales con simetría bilateral. Su secuencia nucleotídica está altamente conservada y presenta un segmento de 11 nt que incluye a la región semilla que es idéntico en todas las especies analizadas (Potenza & Russo, 2013). Este miRNA juega un papel esencial en la regulación de la proteína LIN28, por lo tanto, promoviendo las transiciones de fase en el desarrollo y diferenciación en nematodos, insectos y mamíferos. En mamíferos, miR-125a está expresado en la mayoría de los tejidos, teniendo como blancos principalmente receptores de membrana o transductores de señales mitogénicas intracelulares, limitando así la proliferación celular (Russo & Potenza, 2018).

La expresión de miR-125a generalmente incrementa la diferenciación celular, mientras que en varios tipos de cáncer se encuentra regulado negativamente, incluyendo cáncer de colon, cervical, gástrico, ovárico, pulmonar, y de mama, así como en osteosarcoma, neuroblastoma, glioblastoma, meduloblastoma, retinoblastoma y carcinoma hepatocelular (Wu & Belasco, 2005).

ERBB2 y ERBB3 fueron de los primeros blancos validados de miR-125a; codifican para receptores de tirosina quinasa que se unen al Factor de

Crecimiento Epidermal (EGF) y factores de crecimiento relacionados que inducen proliferación celular y supervivencia. En células de cáncer de mama de humano, miR-125a interfiere con la expresión de ERBB2 y ERBB3 al unirse directamente a sus transcritos, inhibiendo así la proliferación (Scott *et al.*, 2007).

En células hepáticas miR-125a regula negativamente varias proteínas con actividad proliferativa. Estas incluyen la Metaloproteinasa de Matriz-11 (MMP11), Sirtuina-7 (deacetilasa de histonas), c-RAF, LIN28B, y el factor de transcripción ZBTB7A (Bi *et al.*, 2012; Potenza, Mosca, *et al.*, 2017; Takashima *et al.*, 2016). Un estudio reciente en un grupo de 55 pacientes de HCC fue realizado midiendo los niveles de miR-125a en biopsias de cáncer y tejido adyacente no tumoral, mostrando una expresión menor del miRNA en 80% de las muestras cancerosas con un decremento medio de 4.7 veces (Coppola *et al.*, 2017)

3.5 let-7e

Lethal-7 (let-7) fue uno de los primeros miRNAs en ser descubiertos. Inicialmente fue identificado como un regulador de la sincronización del desarrollo en el nematodo *Caenorhabditis elegans* y fue considerado un gen heterocrónico (Reinhart *et al.*, 2000). El miRNA let-7 está conservado evolutivamente a través de varias especies animales, incluyendo insectos

y mamíferos. En nematodos y la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) let-7 tiene una sola isoforma, mientras que en vertebrados presenta varias todas ellas con la misma especificidad o región semilla. En humanos por ejemplo, la familia de let-7 está compuesta de doce isoformas: let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i y miR-98, algunos de las cuales están agrupados en clusters (Ruby *et al.*, 2006). Para distinguir entre las múltiples isoformas una letra es colocada después de let-7 para indicar un let-7 con secuencia ligeramente diferente, y un número al final denota que la misma secuencia se encuentra en múltiples locaciones genómicas (Roush & Slack, 2008). La mayoría de las secuencias de los let-7 incluyen una región semilla altamente conservada que abarca los nucleótidos 2 al 8, y es un componente esencial requerido para el reconocimiento del blanco por el complejo RISC (Ruby *et al.*, 2006).

En el contexto de cáncer la evidencia sugiere que la expresión de let-7 reprime la proliferación celular, invasión, metástasis y resistencia a terapia. También se demostró que let-7 puede reprimir la renovación de las células troncales cancerígenas en HCC (Jin *et al.*, 2016). Así, let-7e es un regulador clave en la función endotelial y la inflamación, y también regula la migración de las células progenitoras endoteliales al tener como blanco a FASLG (Kong *et al.*, 2016). La sobreexpresión de let-7e puede activar células Th1 y Th17 y agravar la encefalomiелitis autoinmune y la

enfermedad de Hashimoto al tener como blanco a IL-10 (Guan *et al.*, 2013). En HCC se ha reportado que la expresión aberrante de let-7 contribuye al desarrollo y progresión del HCC. En este cáncer se encontró que los miRNAs let-7 reprimen a Ras, Bcl-xl, MAPK, c-Myc, ciclina D1 y otros oncogenes en HCC (Sun *et al.*, 2014).

3.6 Regulación post-transcripcional de los miRNAs let-7

La expresión de los miRNAs let-7 en mamíferos está regulada, en parte, a nivel post-transcripcional. Esto se descubrió ya que durante la diferenciación de células troncales embrionarias de ratón los niveles de pri-let-7e incrementaron en las células diferenciadas en comparación con las no diferenciadas; sin embargo, no se observó el incremento correspondiente en los niveles del miRNA maduro (Wulczyn *et al.*, 2007).

La proteína de unión a RNA, LIN28, se encontró como un regulador que reprime selectivamente la expresión de los miRNAs let-7 (Figura 3) (Viswanathan, Daley, & Gregory, 2008). Esta regulación post-transcripcional de let-7 por LIN28 es requerida para el desarrollo normal y contribuye al estado de pluripotencia, al prevenir la diferenciación de células troncales embrionarias mediada por let-7.

A diferencia de *C. elegans* donde un solo gen de Lin28 es responsable de la represión de la expresión de let-7 en mamíferos hay dos parálogos, LIN28A (también conocido como LIN28) y LIN28B, los cuales pueden unirse tanto al pri- y al pre-let-7 para bloquear las actividades de *Drosha* y *Dicer* (Newman, Thomson, & Hammond, 2008).

Tanto LIN28A como LIN28B tienen dos dominios diferentes de unión a RNA, un *cold-shock domain* (CSD) que reconoce el bucle terminal y parte del tallo, y dos motivos de dedos de zinc en tándem, que reconocen un motivo GGAG (Nam, Chen, Gregory, Chou, & Sliz, 2011).

A pesar de su alto grado de homología, LIN28A y LIN28B funcionan a través de distintos mecanismos. LIN28A recluta a la uridililtransferasa terminal TUT4, que poliuridila al extremo 3' del pre-miRNA lo cual estimula su degradación por la exonucleasa DIS3L2, o a TUT2/7 que monouridila el extremo 3' lo cual, al contrario del proceso de poliuridilación, promueve la biogénesis del miRNA al extender el extremo y mejorando la actividad de *Dicer* (Longfei Wang et al., 2017). Mientras que LIN28B funciona mediante un mecanismo independiente de TUTasa (Piskounova et al., 2011). LIN28A y LIN28B se encuentran diferencialmente localizados en la célula, siendo LIN28A predominantemente citoplasmático mientras que LIN28B se acumula en el núcleo debido a su señal de localización nuclear, donde se une al pri-

miRNA para bloquear la actividad del *Microprocesador* (Piskounova *et al.*, 2011).

La activación de LIN28A/LIN28B se da en varios tumores primarios de humano y estos tumores muestran bajos niveles de expresión de let-7. LIN28A/LIN28B pueden contribuir al desarrollo de tumores agresivos poco diferenciados, dado que su expresión está asociada con estadios avanzados de HCC, leucemia mieloide crónica, carcinoma de ovario y (Guo *et al.*, 2006; Iliopoulos, Hirsch, & Struhl, 2009; Viswanathan *et al.*, 2008).

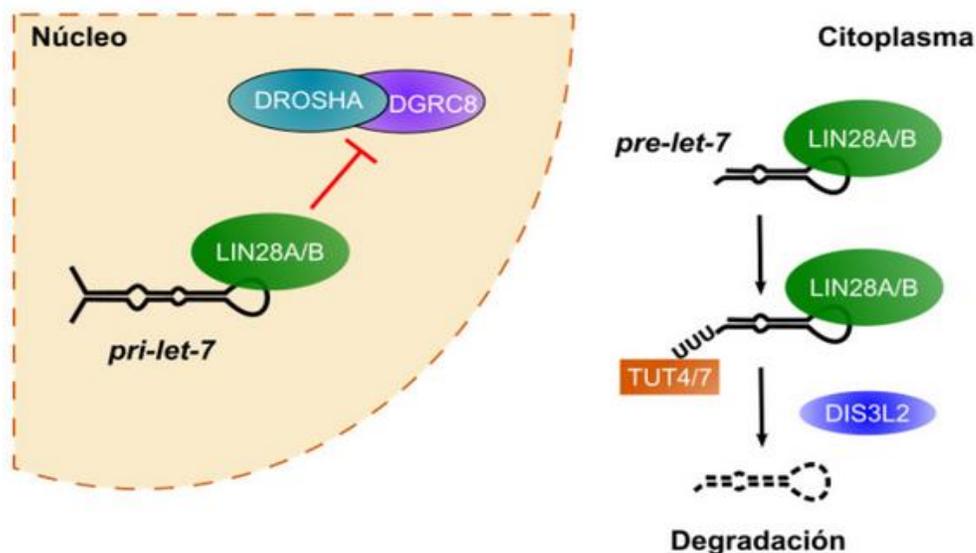


Figura 3. Regulación de let-7 por LIN28A/LIN28B. LIN28B se une al pri-let-7 en núcleo y evita su procesamiento por *Drosha*. LIN28A recluta a TUT4/7 que uridila al pre-let-7, promoviendo su degradación por DIS3L2.

4. Antecedentes

Habiendo demostrado que LIN28B se encuentra regulado negativamente por miR-125a en células hepáticas de ratón, Takashima *et al.* (2016) analizaron el mecanismo por el cual los niveles de miR-125a se mantienen normalmente bajos en hepatoblastos, similar a los de let-7b. Para esto analizaron los niveles de expresión del precursor y la forma madura de miR-125a en hepatoblastos de ratón transfectados con siRNAs contra el transcrito de *lin28b*. Los resultados mostraron que la expresión del precursor fue disminuida, mientras que la forma madura aumento su expresión (Figura 4A).

Además, realizaron un análisis RIP-qPCR, donde mostraron que LIN28B se une directamente al precursor de miR-125a en hepatoblastos de ratón en comparación con un anticuerpo anti-IgG donde no hubo unión (Figura 4B).

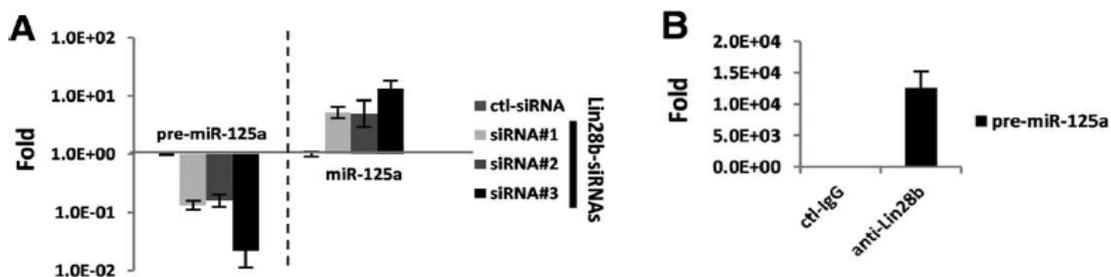


Figura 4. LIN28B se une al pre-miR125a y bloquea su procesamiento a la forma madura en hepatoblastos. A) Niveles de expresión de pre-miR-125a y miR-125a en hepatoblastos de ratón transfectados con siRNA control o siRNA contra Lin28b fueron analizados por qPCR. B) Análisis RIP-qPCR usando anticuerpo anti-LIN28B mostrando la unión directa de LIN28B con el pre-miR-125a en hepatoblastos de ratón

Con el antecedente de Takashima, el grupo de Panella *et al.* (2018) investigó la interacción funcional y estructural entre miR-125a y LIN28B en células de carcinoma hepatocelular, ya que no se habían hecho estudios de este tipo en células humanas. Para lograr esto, transfectaron primeramente un símil de miR-125a en la línea de hepatocarcinoma HuH7 y midieron los niveles de expresión de LIN28b, los cuales estuvieron disminuidos en un 52%, comprobando el efecto silenciador del miRNA. Posteriormente, transfectaron células HuH7 con un vector que expresaba LIN28B y cuantificaron los niveles de miR-125a, observando que disminuyeron en un 33% (Figura 5A).

Luego tomando un motivo GGAG presente en la secuencia del pre-miRNA como el sitio putativo de unión a LIN28B (Figura 5B), procedieron a transfectar células HuH7 con vectores expresando la secuencia normal del pri-miRNA o construcciones mutadas en la última base del motivo GGAG. La transfección con la secuencia mutada incrementó la expresión del miR-125a en un 47% con respecto a las células transfectadas con la secuencia normal, soportando así la hipótesis de la interacción del dominio de dedos de zinc con la secuencia identificada GGAG, llevando a la supresión de la maduración del miR-125a (Figura 5C).

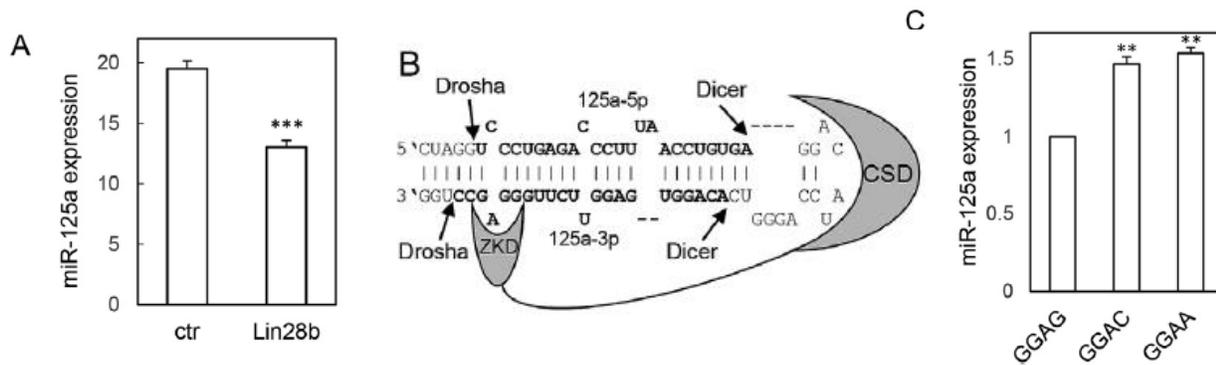


Figura 5. Supresión de miR-125a por LIN28B. A) Células de hepatocarcinoma HuH7 fueron transfectadas con un plásmido que expresaba LIN28B y se cuantificó los niveles endógenos de miR-125a maduro por RT-qPCR. Los datos son la media de dos experimentos independientes, $n=3$; $***p<0.001$. B) Modelo para la unión de LIN28B con pre-miR-125a. El *cold-shock domain* (CSD) de LIN28B se espera que se una al bucle terminal mientras que el dominio de dedos de zinc (ZKD) reconoce un motivo GGAG conservado. C) Mutación del sitio de unión del pre-miR-125a para LIN28B. Células HuH7 fueron transfectadas con un plásmido cargando la transcripción de la secuencia normal del pri-miR-125a (GGAG) o dos construcciones con secuencias mutadas GGAC o GGAA. Después de 48 horas el miR-125a maduro fue cuantificado por RT-qPCR. Los datos son la media de dos experimentos independientes, $n=3$; $**p<0.01$.

Finalmente, en 2018 en nuestro grupo de investigación se estudió la co-expresión de los precursores de *let-7* con LIN28B en células cervicales (Zamora-Contreras & Alvarez-salas, 2018). La línea HepG2 fue usada como control positivo de LIN28B y se midieron sus niveles en esta línea junto con otras líneas de tumores cervicales o inmortales (Figura 6B). Como se observa LIN28B es detectable en la línea HepG2. También en este estudio se analizaron los niveles de diferentes precursores de *let-7* en las mismas líneas donde se analizó LIN28B, donde se observó una expresión diferencial para los diferentes miembros de la familia *Let-7*, con niveles variables entre las distintas líneas estudiadas, pero teniendo en común una baja expresión de *let-7e* en comparación a los otros

precursores estudiados (Figura 6A). La expresión diferencial observada en este trabajo es atribuida a las distintas características estructurales en la región del pre-elemento, lo cual afecta su interacción con LIN28B.

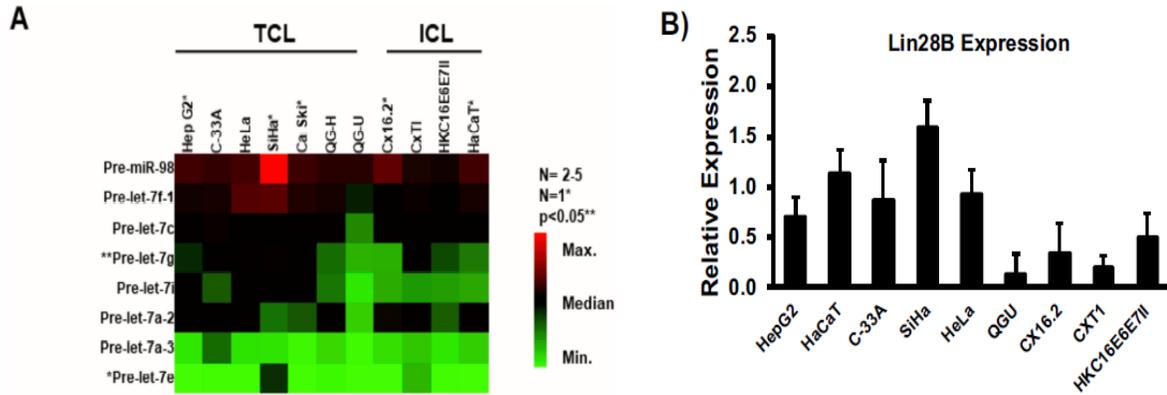


Figura 6. Expresión de precursores de let-7 y LIN28B en HepG2 y distintas líneas cervicales inmortales y tumorales. A) Mapa de calor mostrando los valores $2^{-\Delta CT}$ promedio de pre-let-7a-2, pre-let-7a-3, pre-let-7c, pre-let-7e, pre-let-7f-1, pre-let-7g, pre-let-7i y pre-miR-98 (normalizado con 5s RNA) en las líneas tumorales con VPH SiHa, QGU y HeLa, las líneas inmortales Cx16.2, CxT1 y HKc16E6/E7-II y las líneas sin VPH C-33A y HaCaT, así como la línea de hepatocarcinoma HepG2. B) Expresión de LIN28B en extracto de proteínas totales de las líneas SiHa, QGU, HeLa, Cx16.2, CxT1, HKc16E6/E7-II, C-33A y HaCaT. HepG2 fue usado como control positivo de LIN28B.

5. Justificación

Como se describió con anterioridad, el cluster hsa-miR-125a/let-7e/miR-99b juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis celular y fallas en su regulación pueden llevar a cáncer. Se ha reportado que todo el cluster hsa-miR-125a/let-7e/miR-99b responde a la regulación transcripcional de un único promotor; sin embargo, la expresión de los miRNAs individuales es diferencial (Potenza, Panella, *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta que LIN28 está implicado en la maduración de la familia de miRNAs let-7 y, conforme a evidencias recientes, posiblemente también en la de miR-125a, y que no se ha reportado algún efecto de LIN28 sobre la expresión de miR-99b, no es claro el papel funcional que tiene LIN28 sobre la regulación del cluster hsa-miR-125a/let-7e/miR-99b. Dada la ausencia de LIN28A en hepatocarcinoma y cáncer cervical (Piskounova *et al.*, 2011), LIN28B aparece como un candidato importante para regular postranscripcionalmente la expresión de miR-125a, let-7e y miR-99b los cuales están implicados en la regulación de procesos fundamentales como la proliferación, apoptosis y migración celular. Así, entender los mecanismos moleculares que influyen en la expresión del cluster hsa-miR-125a/let-7e/miR-99b, puede proveer un nuevo enfoque para el entendimiento de los procesos de carcinogénesis y la regulación de la expresión de miRNAs.

6. Hipótesis

La proteína LIN28B interactúa directamente con los miRNAs miR-125a y let-7 por lo que podría regular postranscripcionalmente y de manera diferencial la expresión de los miRNAs del cluster hsa-miR125a/let-7e/miR-99b. Así, la modificación de los niveles de expresión de LIN28B afectará los niveles de expresión de los miRNAs del cluster en diferente medida según la interacción que presenten.

7. Objetivos

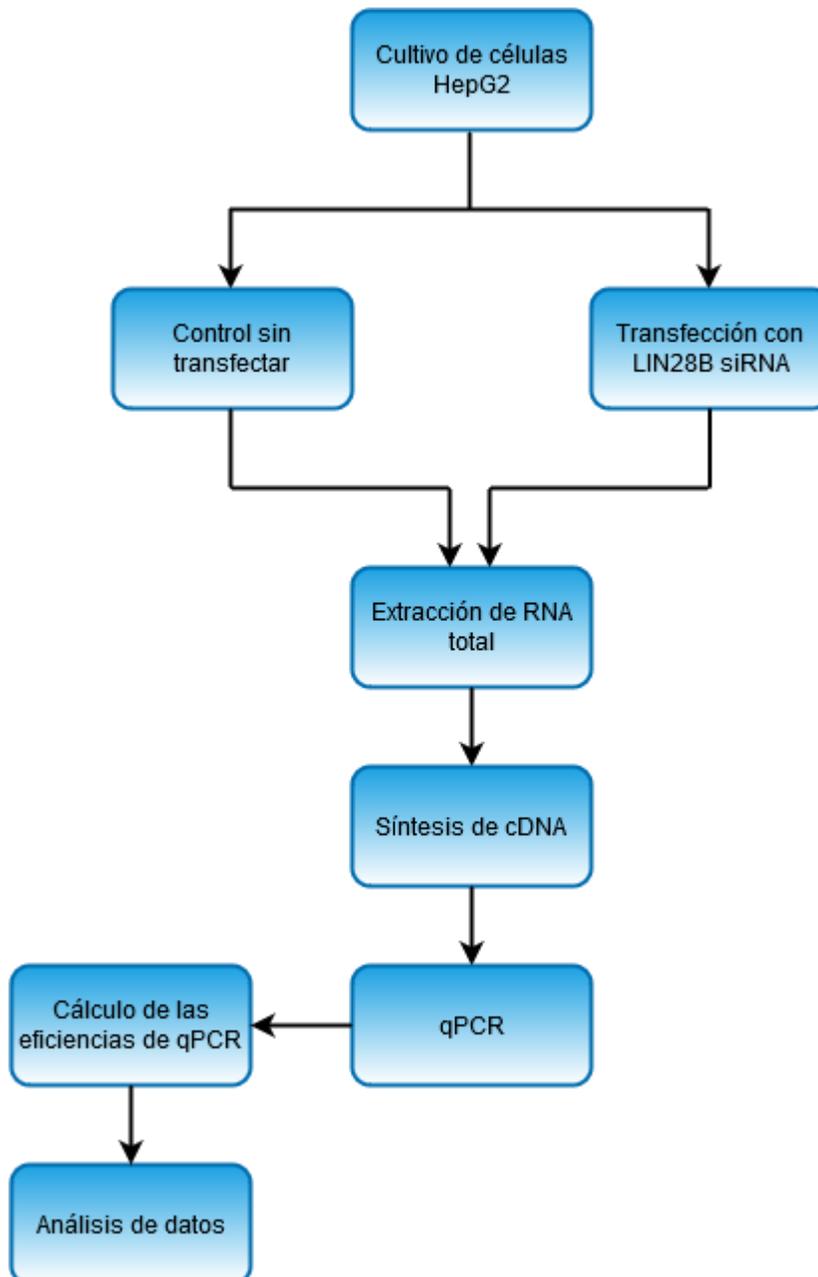
7.1 Objetivo General

Determinar el papel de LIN28B en la regulación postranscripcional del cluster hsa-miR-125a/let-7e/miR-99b.

7.2 Objetivos Específicos

- Calcular las eficiencias de las reacciones de qPCR.
- Cuantificar los niveles endógenos de miR-125a, let-7e, miR-99b y de sus precursores mediante RT-qPCR.
- Silenciar LIN28B y cuantificar los niveles de miR-125a, let-7e y miR-99b y sus respectivos precursores.

8. Diseño Experimental



9. Materiales y Métodos

9.1 Cultivo de células

Se trabajó con células HepG2 (ATCC® HB-8065) que son una línea proveniente de carcinoma hepatocelular y que expresa LIN28B y el cluster hsa-miR-125a/let-7e/miR99b (Piskounova *et al.*, 2011; Potenza, Panella, *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2015). Las células se crecieron en cajas de Petri de 100mm, utilizando medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 5% y antibióticos (100 µg/mL de penicilina/estreptomicina y 10 µg/mL de gentamicina). Las células fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂, cambiando el medio cada tercer día hasta alcanzar 80% de confluencia.

9.2 Extracción de RNA total

Se realizó la extracción de RNA total de las células al 80% de confluencia utilizando 1 mL del reactivo TRIzol (Thermo Scientific™) según las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido fue cuantificado mediante el aparato NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) y su calidad determinada en base a la relación de absorbancia 260/280; la integridad fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% identificando las bandas de 18S y 28S. Finalmente, el RNA fue tratado con 1 µL de DNAsa I (Invitrogen™) por µg de RNA para eliminar posible contaminación de DNA

genómico. La reacción fue incubada durante 30 min a 37°C. Para inactivar la enzima se añadió 1 µL de EDTA 50 mM y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. El RNA tratado fue precipitado en 1 mL de isopropanol e incubado toda la noche a -20°C, al día siguiente se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4°C se y lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 75% en dos ocasiones, el RNA obtenido se resuspendió en 15 µL de agua libre de nucleasas y se volvió a cuantificar.

9.3 Evaluación de la expresión de miRNAs y sus precursores mediante RT-qPCR

Para realizar el análisis de expresión de los tres miRNAs y sus precursores, así como del gen de referencia snRNA U6, se realizó una retrotranscripción de 100 ng de RNA utilizando la enzima SuperScript III (Invitrogen™) y el cebador correspondiente para cada miRNA o su precursor (Tabla 1), las temperaturas utilizadas fueron: 16°C por 5 min, 42°C por 30 min y 95°C por 10 min. Posteriormente, el cDNA obtenido fue amplificado y cuantificado mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando el kit comercial Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2x (Thermo Scientific™) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El ciclaje de temperaturas y la cuantificación se llevó a cabo en un termociclador RotorGene 3000 (Corbett Research), siendo el ciclaje el siguiente: 1 ciclo a 95°C por 3

min, 35 de ciclos de 95°C por 30 segundos seguido de 60°C por 30 segundos, para finalmente realizar un análisis de fusión donde se llevó a cabo un gradiente de temperatura de 50 a 90°C aumentando 1°C cada 5 segundos. Los cebadores utilizados para la qPCR se encuentran descritos en la Tabla 2. Cabe destacar que los cebadores utilizados tanto para la retrotranscripción como la qPCR para los miRNAs maduros fueron diseñados siguiendo el protocolo de Kramer (2011), mientras que los utilizados para los pre-miRNAs fueron reportados y validados previamente por Jiang, Lee, Gusev, & Schmittgen (2005).

Tabla 1. Cebadores utilizados para la retrotranscripción

Gen	Cebador para RT
snRNA U6	<i>5'-AAA ATA TGG AAC GCT TCA CGA ATT TG-3'</i>
miR-125a	<i>5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACT CAC AG-3'</i>
let-7e	<i>5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA ACT AT-3'</i>
miR-99b	<i>5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACC GCA AGG-3'</i>
pre-miR-125a	<i>5'-AAC CTC ACC TGT GAC CCT G-3'</i>
pre-let-7e	<i>5'-GAA AGC TAG GAG GCC GTA TAG-3'</i>
pre-miR-99b	<i>5'-CCA CAG ACA CGA GCT TGT GT-3'</i>

Tabla 2. Cebadores utilizados para qPCR

Gen	Forward	Reverse
snRNA U6	5'-CTC GCT TCG GCA GCA CAT ATA CT-3'	5'-ACG CTT CAC GAA TTT GCG TGT C-3'
miR-125a	5'-CGG TGT TCC CTG AGA CCC TTT-3'	5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG TA-3'
let-7e	5'-CGG CAC TGA GGT AGG AGG TTG-3'	5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG TA-3'
miR-99b	5'-GAT CCC ACC CGT AGA ACC GAC-3'	5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG TA-3'
pre-miR-125a	5'-GTC CCT GAG ACC CTT TAA CC-3'	5'-AAC CTC ACC TGT GAC CCT G-3'
pre-let-7e	5'-GAG GTA GGA GGT TGT ATA GTT GAG-3'	5'-GAA AGC TAG GAG GCC GTA TAG-3'
pre-miR-99b	5'-CCC ACC CGT AGA ACC GAC-3'	5'-CCA CAG ACA CGA GCT TGT GT-3'

9.4 Análisis estadístico

Con las curvas de amplificación obtenidas de la qPCR se determinó cual era el ciclo en el que se observa una elevación de la señal de aparición del amplicón por encima del límite mínimo de detección del equipo (C_T). Para representar los valores obtenidos de la cuantificación se utilizó el método de $2^{(-\Delta C_T)}$ en donde $\Delta C_T = C_T$ del gen de interés - C_T del gen de

referencia. Todas las cuantificaciones se realizaron con triplicados biológicos.

9.5 Cálculo de eficiencias de qPCR

La eficiencia de las reacciones de qPCR se determinó realizando 5 diluciones seriadas 10 veces menos concentradas que la anterior del cDNA obtenido de la retrotranscripción, con duplicado, y se amplificó y cuantificó el producto obtenido para cada dilución. Luego se graficó el C_T obtenido de la cuantificación (eje Y) contra la concentración de la dilución de cDNA (eje X). Después se calculó la pendiente de la recta y la eficiencia se obtuvo con la ecuación:

$$E = 10^{(-1/m)} - 1$$

donde E es la eficiencia y m es la pendiente obtenida de la recta.

10. Resultados

10.1 Eficiencias qPCR

Para validar que los niveles de expresión de los miRNAs cuantificados mediante qPCR eran confiables y que alguna posible diferencia de expresión entre los miRNAs sería debido a variaciones endógenas y no a diferentes eficiencias en las reacciones, se calculó la eficiencia de las reacciones de qPCR según lo descrito en el apartado de métodos. Se muestran las gráficas utilizadas para calcular las eficiencias de snRNA U6, pre-miR-125a, pre-let-7e y pre-miR-99b (Figura 7). En ellas se graficó el C_T promedio de las dos repeticiones para cada dilución contra el logaritmo de su concentración, obteniendo la ecuación de una recta para utilizar la pendiente en la fórmula de la eficiencia. Las eficiencias calculadas fueron 103.09% para snRNA U6, 101.35% para pre-miR-125a, 104.44% para pre-let-7e y 108.2% para pre-miR-99b.

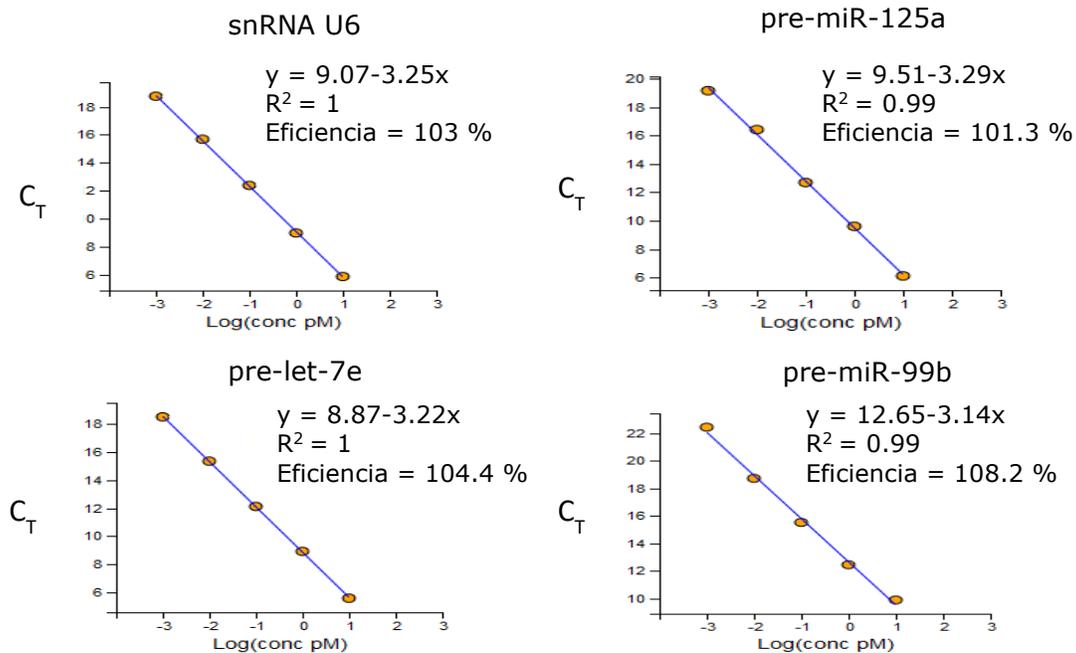


Figura 7. Gráficas de las rectas utilizadas para el cálculo de eficiencias de qPCR. Se graficó el C_T de cada dilución en función del logaritmo de la concentración para cada dilución, luego se obtuvo una ecuación lineal y se utilizó la pendiente para calcular la eficiencia con la fórmula $E = 10^{(-1/m)} - 1$.

10.2 Niveles de expresión endógena de pre-miR-125a, pre-let-7e y pre-miR-99b

Para realizar las RT-qPCRs mediante las cuales se cuantificaron los niveles endógenos de los pre-miRNAs se realizó la extracción de RNA total de células en una caja P100 al 80% de confluencia. Se trabajó con triplicados biológicos utilizando los pasajes consecutivos de un cultivo de células HepG2. La integridad del RNA extraído fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 8A) donde se observaron claramente las bandas de 28S y 18S que se utilizaron como una referencia de la

integridad del RNA. También se midió la absorbancia 260/280 nm que es indicador de pureza del RNA. Para un RNA sin contaminaciones peptídicas se busca una relación de A260/A280 de ~ 2.0 , como se observa en la (Figura 8B) las tres muestras presentaron valores cercanos a 2; alternativamente también se puede usar la absorbancia A260/230, esperando valores entre 2.0-2.2.

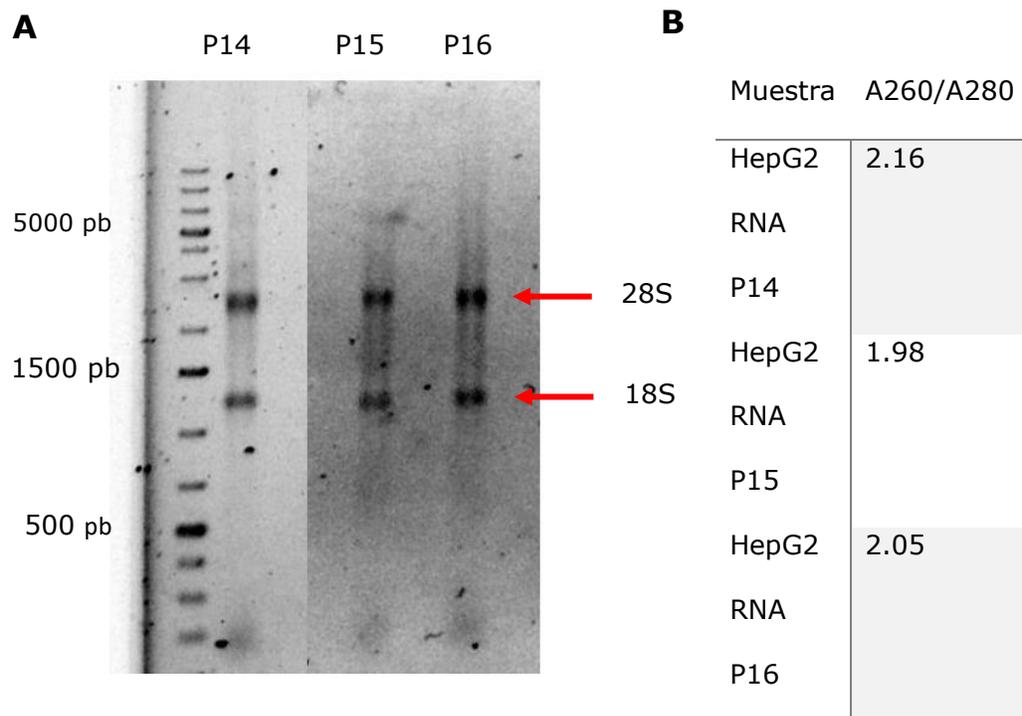


Figura 8. Indicadores de integridad y pureza del RNA para pre-miRNAs. A) Gel de agarosa al 1% para observar integridad del RNA. B) Relación de absorbancia 260/260 como indicador de pureza del RNA.

Ya sabiendo que la integridad y pureza del RNA eran las adecuadas, se procedió a hacer la retrotranscripción con los cebadores descritos en la Tabla 1, para posteriormente continuar con el análisis de expresión. En la Figura 9 se muestran las curvas de amplificación obtenidas para snRNA U6 (gen de referencia) así como las de los tres pre-miRNAs estudiados. En el diseño experimental se incluyeron tres replicados biológicos de pasajes celulares distintos para tratar de reducir la variación biológica inherente a los ensayos de expresión génica. También se incluyó un control RT- por cada muestra, que es un control al cual durante el paso de la retrotranscripción no se le añadió enzima retrotranscriptasa, por lo que no habría síntesis de cDNA y por lo tanto no debería amplificar en la qPCR, de igual manera se añadió un control NTC donde en la qPCR no se agregó molde, este control para asegurar que los reactivos no están contaminados y no hay formación de dímeros de cebadores. En ningún de los controles se produjo amplicón. Como se observa en las gráficas de amplificación, el snRNA U6 tuvo una aparición temprana en la curva de amplificación a comparación de los pre-miRNAs, estos últimos mostraron una baja expresión al presentar C_T cercanos a 30, y en el caso de pre-let-7e y pre-miR-99b las curvas se observaron dispersas entre los replicados.

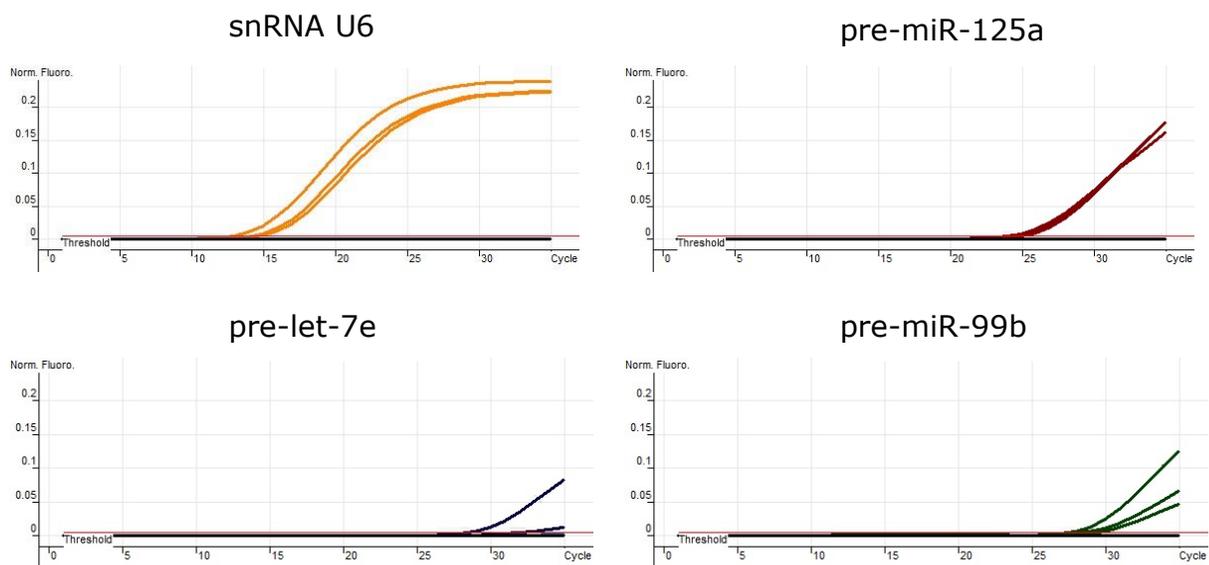


Figura 9. Curvas de amplificación por RT-qPCR para pre-miRNAs. Se muestran las curvas de amplificación obtenidas para snRNA U6, pre-miR-125a, pre-let-7e y pre-miR-99b, con triplicado biológico e incluyendo controles RT- y NTC que no amplificaron.

También se realizó un análisis de fusión para comprobar la especificidad de las reacciones. Para snRNA U6 y pre-miR-125a se observó un único pico demostrando así la especificidad (Figura 10A). Sin embargo, para pre-let-7e y pre-miR-99b no fue así en todos los triplicados, por lo que se procedió a analizar la muestras por electroforesis en gel de poliacrilamida, donde se observó una única banda de amplificación en el peso esperado para cada pre-miRNA, siendo 51 pb para pre-miR-125a, 65 pb para pre-let-7e y 57 pb para pre-miR-99b, así como de 96 pb para snRNA U6 (Figura 10B).

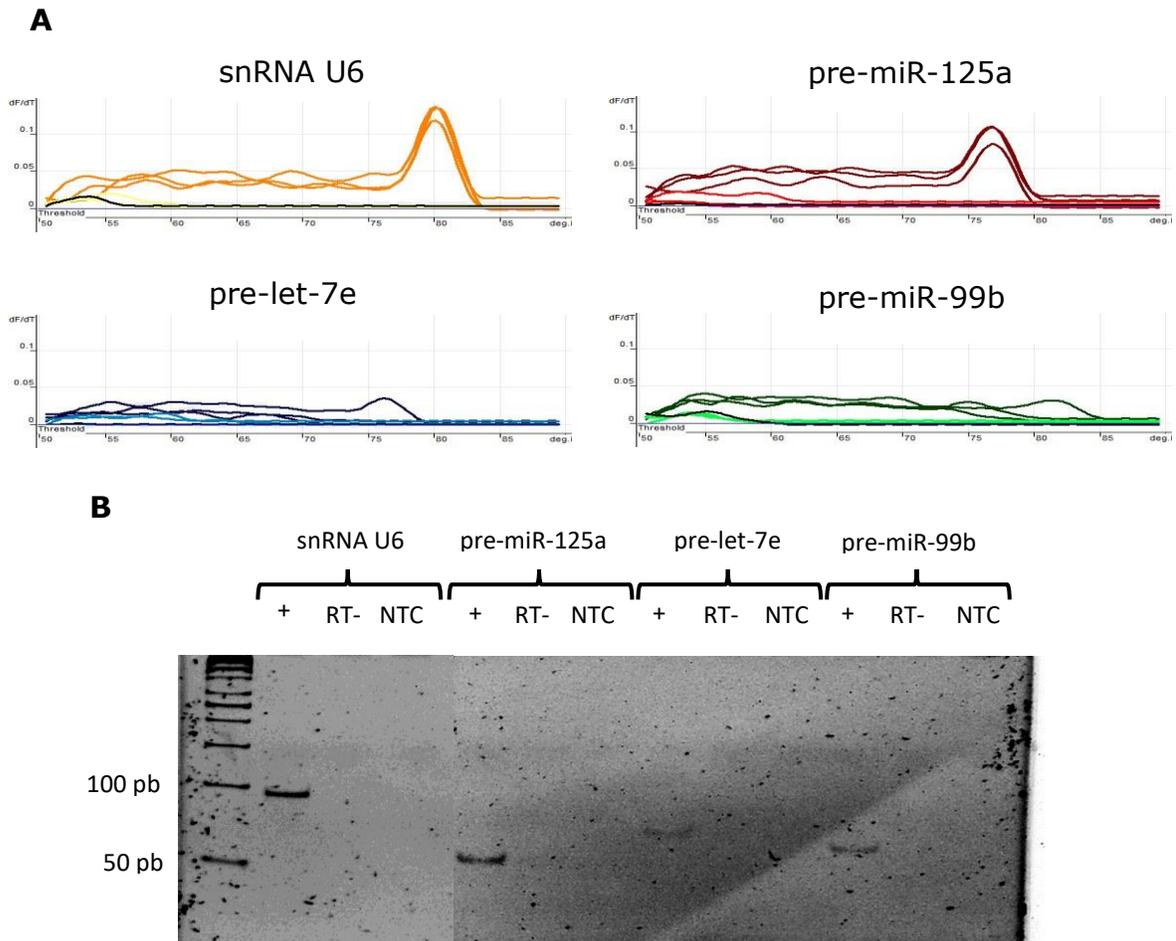


Figura 10. Especificidad de la RT-qPCR para pre-miRNAs. A) Análisis de fusión de la qPCR; snRNA U6 y pre-miR-125a presentan un único pico, pero en pre-let-7e y pre-miR-99b no hay presencia de un pico claro. B) Gel de poliacrilamida al 8% de los productos de qPCR, solo hay una banda del peso esperado de 96, 51, 65 y 57 pb para snRNA U6, pre-miR-125a, pre-let-7e y pre-miR-99b respectivamente, no hubo amplificación en los controles negativos.

10.3 Niveles de expresión endógena de miR-125a, let-7e y miR-99b

Se realizó el mismo diseño experimental para medir el nivel de expresión de los miRNAs maduros que como se hizo con los precursores, cambiando

solamente los cebadores utilizados (Tabla 1 y 2). Las curvas de amplificación resultaron más ajustadas entre replicados, indicando que había menos variación endógena entre réplicas. También fueron claros los mayores niveles de let-7e y miR-99b que de sus precursores, ya que se obtuvieron C_T s más bajos, aproximadamente 5 ciclos más temprano. Para snRNA U6 los C_T s fueron similares al experimento anterior, como se esperaba, y los niveles de miR-125a parecían ser similares a los de su precursor (Figura 11). Tampoco hubo amplificación en ninguno de los controles negativos utilizados.

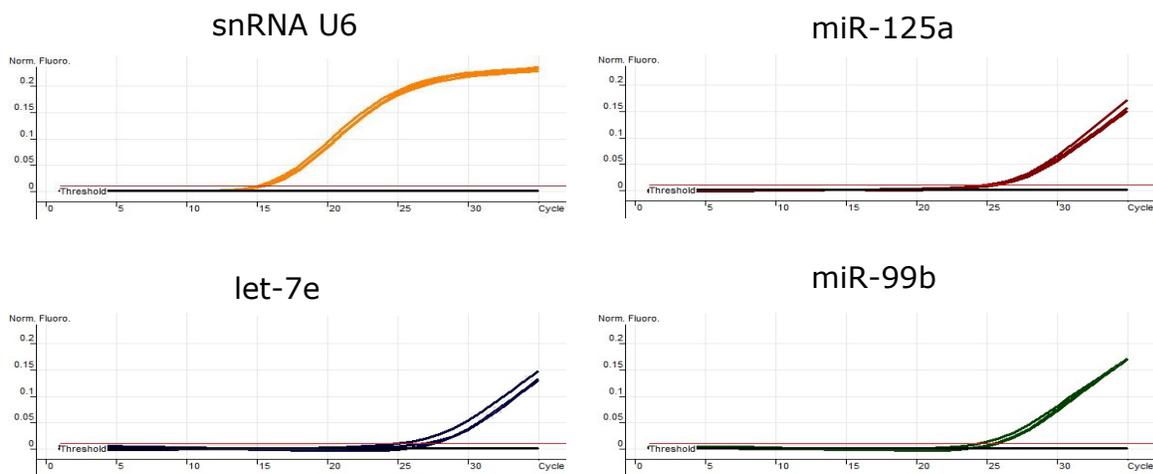


Figura 11. Curvas de amplificación por RT-qPCR para miRNAs maduros. Se muestran las curvas de amplificación obtenidas para snRNA U6, pre-miR-125a, pre-let-7e y pre-miR-99b, con triplicado biológico e incluyendo controles RT- y NTC que no amplificaron. Los resultados fueron más homogéneos entre replicas que con los precursores

De igual manera que con los precursores, se analizó la especificidad de las reacciones de qPCR a través de un análisis de fusión y luego se resolvieron los productos obtenidos de la amplificación por electroforesis

en gel de poliacrilamida. En esta ocasión si hubo un solo pico claro para los cuatro genes estudiados, y las bandas mayoritarias observadas en el gel corresponden a los pesos de 96, 67, 65 y 64 pb para snRNA U6, miR-125a, let-7e y miR-99b, respectivamente (Figura 12A). Sin embargo, aparece una banda ligeramente visible cercana a los 50 pb en los carriles de miR-125a y let-7e que podría ser un exceso de cebador (Figura 12B).

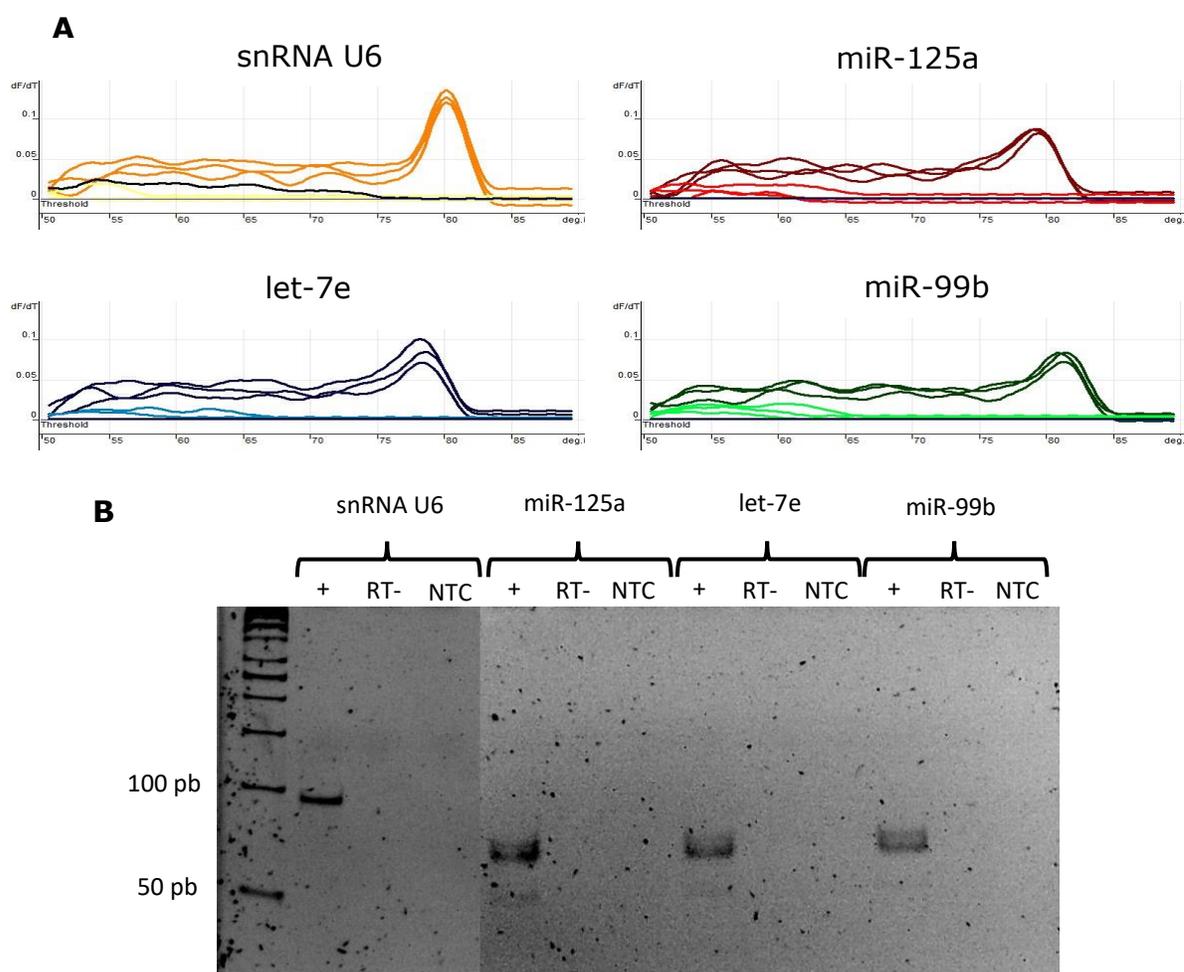


Figura 12. Especificidad de la RT-qPCR para miRNAs maduros. A) Análisis de fusión de la qPCR, todos los análisis presentan un único pico claro, correspondiente al producto de amplificación. B) Gel de poliacrilamida al 8% de los productos de qPCR; se observa una banda del peso esperado de 96, 67, 65 y 54 pb para snRNA U6, miR-125a, let-7e y miR-99b respectivamente, en los carriles de miR-125 y let-7e se observa una sombra a los 50 pb. No hubo amplificación en los controles negativos.

10.4 Cuantificación de los niveles de pre-miRNAs y miRNAs maduros

Para realizar la cuantificación de los niveles de los miRNAs maduros y sus precursores se utilizó el método de $2^{(-\Delta CT)}$ descrito en la metodología. Como gen de referencia se utilizó a snRNA U6. Se compararon los niveles de expresión promedio (n=3) mediante un análisis ANOVA de una vía para ver si la expresión era significativamente distinta. Para los precursores pre-miR-125a presentó un nivel de expresión distinta ($p=0.024$) con relación a los otros dos precursores (Figura 13A). Para los miRNAs maduros no hubo una expresión significativamente diferente entre los tres miRNAs estudiados (Figura 13B).

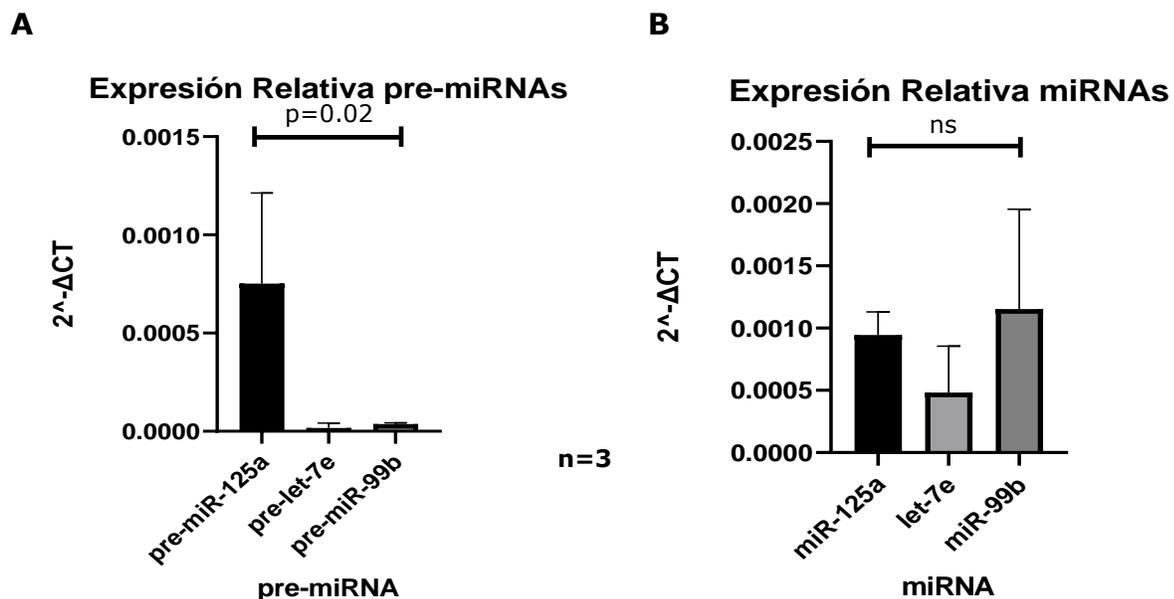


Figura 13. Perfil de expresión de precursores y miRNAs maduros. A) Expresión relativa de pre-miR-125a, pre-let-7e y pre-miR-99b. pre-miR-125a presenta una expresión significativamente distinta a los otros dos pre-miRNAs ($P=0.024$). B) Expresión relativa de miR-125a, let-7e y miR-99b. No hubo una diferencia significativa entre los tres miRNAs estudiados ($p=0.34$). El valor alfa en ambos casos fue $p<0.05$ y $n=3$.

11. Discusión

En los últimos años se han realizado múltiples estudios dedicados a la identificación y cuantificación de la expresión de diversos miRNAs, mostrando que su abundancia está regulada estrictamente durante el desarrollo y a través de diferentes tejidos. Éstos resultados han demostrado que la expresión aberrante de miRNAs está relacionada con condiciones patológicas, siendo el cáncer la que presenta los cambios más significativos.

Se ha reportado que el cluster de hsa-miR-99b/let-7e/miR-125a responde a un único factor de transcripción (Potenza *et al.*, 2017); sin embargo, se ha observado una expresión diferencial de estos tres miRNAs (Endale Ahanda *et al.*, 2015) esto implica que hay alguna regulación postranscripcional afectando los niveles relativos de los miembros de este cluster.

Si bien este trabajo se enfocó en miR-99b, let-7e y miR-125a, el interés surgió inicialmente sobre la regulación postranscripcional que podría tener miR-125a, ya que se han presentado reportes sobre la posible implicación de LIN28B en la regulación de este miRNA (Panella *et al.*, 2018; Takashima *et al.*, 2016). Es por esto, y a falta de un trabajo que analizara el efecto de LIN28B sobre los tres miRNAs del cluster, que surgió el enfoque de este estudio.

Los resultados obtenidos nos permitieron cuantificar los niveles de expresión basal de pre-miR-125a, pre-let-7e y pre-miR-99b y realizar un análisis estadístico en el cual se observó que pre-miR-125a tuvo una expresión significativamente mayor con relación a pre-let-7e y pre-miR-99b, esto pudiendo ser explicado por una regulación diferencial en su vía de maduración (Schmittgen et al., 2008).

De igual forma, se pudo realizar la cuantificación y el análisis estadístico con los miRNAs maduros miR-125a, let-7e y miR-99b, solo que en este caso no se encontró una diferencia significativa entre la expresión de estos miRNAs.

En general estos resultados indicarían que hay un punto en el que se está suprimiendo la maduración de pre-miR-125a, por lo que vemos la acumulación del precursor. No obstante, si se está evitando su maduración los niveles de miR-125a no deberían ser tan altos en comparación, por ejemplo, a miR-99b, que no tiene una regulación postranscripcional conocida. Para aclarar que podría estar sucediendo, se tendrían que realizar más repeticiones y observar si éste comportamiento persiste.

En el caso de pre-miR-99b y pre-let-7e su expresión pasó de ser apenas detectable, a niveles aproximadamente 30 veces mayores en su forma madura. Respecto a let-7e se sabe que es regulado por LIN28B

(Viswanathan et al., 2008), pero en resultados obtenidos en nuestro grupo de trabajo por el M. en C. Urquijo-Franco se observó que LIN28B tiene una afinidad baja por let-7e, en comparación de otros miembros de la familia de let-7, por lo que podría escapar parcialmente al bloqueo de la maduración y explicar la falta de inhibición del miRNA maduro. Respecto a miR-99b no se sabe de alguna regulación postranscripcional por lo que no había alguna expectativa sobre los resultados.

La transcripción de un cluster de miRNAs permite una expresión coordinada de sus miRNAs maduros individuales, sin embargo, cada paso de la biogénesis de un miRNA puede ser modulado, por lo que la expresión de los miRNAs maduros puede ser modificada en respuesta a diferentes contextos biológicos. Es por esto que si los miRNAs del cluster miR-99b/let-7e/miR-125a presentan una regulación diferencial esto podría significar que estos miRNAs cumplen funciones distintas, o son requeridos en momentos distintos del ciclo celular, lo que explicaría que en determinado momento pueda haber una mayor expresión de uno de esos tres miRNAs.

Lamentablemente por la pandemia de COVID-19 no fue posible llevar este trabajo hasta su conclusión final, por lo que resulta complicado dar un análisis a los resultados obtenidos. Teniendo en cuenta que solo se pudo llegar hasta la cuantificación basal de los miRNAs y sus precursores antes

del silenciamiento de LIN28B, no es posible determinar cuál es su efecto final tiene sobre la maduración de estos miRNAs, sin embargo si se observó una acumulación de los niveles del pre-miR-125a, lo que indicaría que hay un punto de regulación que está suprimiendo su maduración.

12. Conclusiones

La línea celular HepG2 es un modelo adecuado para estudiar el papel de LIN28B en la regulación del cluster hsa-miR-99b/let-7e/miR-125a ya que expresa tanto la proteína, como al cluster, y sus miRNAs maduros individuales pueden ser detectados por RT-qPCR.

miR-125a parecería estar sufriendo un bloqueo de su maduración en las células HepG2, ya que se encontró una acumulación de los niveles de su precursor, aunque por el momento no es posible atribuir alguna causa para este fenómeno.

13. Perspectivas

- Silenciar LIN28B en la línea celular HepG2 y cuantificar los niveles de miR-125a, let-7e, miR-99b y sus precursores tras el silenciamiento.
- Secuenciar los pre-miRNAs y miRNAs amplificados para confirmar su identidad.
- Realizar ensayos de afinidad entre LIN28B y los miRNAs del cluster como análisis complementario.

14. Referencias

- Bi, Q., Tang, S., Xia, L., Du, R., Fan, R., Gao, L., ... Fan, D. (2012). Ectopic expression of MiR-125a inhibits the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting MMP11 and VEGF. *PloS One*, 7(6), e40169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040169>
- Chang, T. C., Perteza, M., Lee, S., Salzberg, S. L., & Mendell, J. T. (2015). Genome-wide annotation of microRNA primary transcript structures reveals novel regulatory mechanisms. *Genome Research*, 25(9), 1401–1409. <https://doi.org/10.1101/gr.193607.115>
- Coppola, N., de Stefano, G., Panella, M., Onorato, L., Iodice, V., Minichini, C., ... Russo, A. (2017). Lowered expression of microRNA-125a-5p in human hepatocellular carcinoma and up-regulation of its oncogenic targets sirtuin-7, matrix metalloproteinase-11, and c-Raf. *Oncotarget*, 8(15), 25289–25299. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15809>
- Endale Ahanda, M. L., Bienvenu, T., Sermet-Gaudelus, I., Mazzolini, L., Edelman, A., Zoorob, R., & Davezac, N. (2015). The hsa-miR-125a/hsa-let-7e/hsa-miR-99b cluster is potentially implicated in Cystic Fibrosis pathogenesis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 14(5), 571–579. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.02.011>
- Eulalio, A., Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2008). Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell*, 132(1), 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.024>
- Gascoigne, D. K., Cheetham, S. W., Cattenoz, P. B., Clark, M. B., Amaral, P. P., Taft, R. J., ... Mattick, J. S. (2012). Pinstripe: A suite of programs for integrating transcriptomic and proteomic datasets identifies novel proteins and improves differe. *Bioinformatics*, 28(23), 3042–3050. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts582>
- Guan, H., Fan, D., Mrelashvili, D., Hao, H., Singh, N. P., Singh, U. P., ... Nagarkatti, M. (2013). MicroRNA let-7e is associated with the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *European Journal of Immunology*, 43(1), 104–114. <https://doi.org/10.1002/eji.201242702>
- Guo, Y., Chen, Y., Ito, H., Watanabe, A., Ge, X., Kodama, T., & Aburatani, H. (2006). Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. *Gene*, 384(1–2), 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.07.011>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>

- Iliopoulos, D., Hirsch, H. A., & Struhl, K. (2009). An Epigenetic Switch Involving NF- κ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 Links Inflammation to Cell Transformation. *Cell*, 139(4), 693–706. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.014>
- Jiang, J., Lee, E. J., Gusev, Y., & Schmittgen, T. D. (2005). Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Research*, 33(17), 5394–5403. <https://doi.org/10.1093/nar/gki863>
- Jin, B., Wang, W., Meng, X. xin, Du, G., Li, J., Zhang, S. zhe, ... Fu, Z. hao. (2016). Let-7 inhibits self-renewal of hepatocellular cancer stem-like cells through regulating the epithelial-mesenchymal transition and the Wnt signaling pathway. *BMC Cancer*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2904-y>
- Kong, L., Du, X., Hu, N., Li, W., Wang, W., Wei, S., ... Li, C. (2016). Downregulation of let-7e-5p contributes to endothelial progenitor cell dysfunction in deep vein thrombosis via targeting FASLG. *Thrombosis Research*, 138(1055), 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2015.12.020>
- Kramer, M. F. (2011). Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Current Protocols in Molecular Biology*, (SUPPL. 95), 1–15. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1510s95>
- Lai, E. C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nature Genetics*, 30(4), 363–364. <https://doi.org/10.1038/ng865>
- Lee, H., Han, S., Kwon, C. S., & Lee, D. (2016). Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein and Cell*, 7(2), 100–113. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0212-y>
- Li, W., Chang, J., Wang, S., Liu, X., Peng, J., Huang, D., ... Li, J. (2015). miRNA-99b-5p suppresses liver metastasis of colorectal cancer by down-regulating mTOR. *Oncotarget*, 6(27). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4423>
- Liu, J., Rivas, F. V., Wohlschlegel, J., Yates, J. R., Parker, R., & Hannon, G. J. (2005). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nature Cell Biology*, 7(12), 1161–1166. <https://doi.org/10.1038/ncb1333>
- Lorenzetti, D., Poirier, C., Zhao, M., Overbeek, P. A., Harrison, W., & Bishop, C. E. (2014). A transgenic insertion on mouse chromosome 17 inactivates a novel immunoglobulin superfamily gene potentially involved in sperm-egg fusion. *Mammalian Genome*, 25(3–4), 141–148. <https://doi.org/10.1007/s00335-013-9491-x>

- MacRae, I. J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A. N., Cande, W. Z., ... Doudna, J. A. (2006). Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science*, *311*(January), 195–200. <https://doi.org/10.1126/science.1121638>
- Nam, Y., Chen, C., Gregory, R. I., Chou, J. J., & Sliz, P. (2011). Molecular basis for interaction of let-7 MicroRNAs with Lin28. *Cell*, *147*(5), 1080–1091. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.020>
- Newman, M. A., Thomson, J. M., & Hammond, S. M. (2008). Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *Rna*, *14*(8), 1539–1549. <https://doi.org/10.1261/rna.1155108>
- Panella, M., Mosca, N., Di Palo, A., Potenza, N., & Russo, A. (2018). Mutual suppression of miR-125a and Lin28b in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *500*(3), 824–827. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.167>
- Piskounova, E., Polytarchou, C., Thornton, J. E., Lapierre, R. J., Pothoulakis, C., Hagan, J. P., ... Gregory, R. I. (2011). Lin28A and Lin28B inhibit let-7 MicroRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell*, *147*(5), 1066–1079. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.039>
- Potenza, N., Mosca, N., Zappavigna, S., Castiello, F., Panella, M., Ferri, C., ... Russo, A. (2017). MicroRNA-125a-5p Is a Downstream Effector of Sorafenib in Its Antiproliferative Activity Toward Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Journal of Cellular Physiology*, *232*(7), 1907–1913. <https://doi.org/10.1002/jcp.25744>
- Potenza, N., Panella, M., Castiello, F., Mosca, N., Amendola, E., & Russo, A. (2017). Molecular mechanisms governing microRNA-125a expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11418-3>
- Potenza, N., & Russo, A. (2013). Biogenesis, evolution and functional targets of microRNA-125a. *Molecular Genetics and Genomics*, *288*(9), 381–389. <https://doi.org/10.1007/s00438-013-0757-5>
- Reinhart, B., FJ, S., M, B., AE, P., JC, B., AE, R., ... GB, R. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *403*, 901–906.
- Roush, S., & Slack, F. J. (2008). The let-7 family of microRNAs. *Trends in Cell Biology*, *18*(10), 505–516. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.07.007>

- Ruby, J. G., Jan, C., Player, C., Axtell, M. J., Lee, W., Nusbaum, C., ... Bartel, D. P. (2006). Large-Scale Sequencing Reveals 21U-RNAs and Additional MicroRNAs and Endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell*, 127(6), 1193–1207. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.040>
- Russo, A., & Potenza, N. (2018). Antiproliferative Activity of microRNA-125a and its Molecular Targets. *MicroRNA*, 8(3), 173–179. <https://doi.org/10.2174/2211536608666181105114739>
- Sakurai, K., Amarzguioui, M., Kim, D. H., Alluin, J., Heale, B., Song, M. S., ... Rossi, J. J. (2011). A role for human Dicer in pre-RISC loading of siRNAs. *Nucleic Acids Research*, 39(4), 1510–1525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq846>
- Schmittgen, T. D., Lee, E. J., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., Elton, T. S., & Chen, C. (2008). Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods*, 44(1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.09.006>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 1479–1486. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609383200>
- Sun, X., Jiao, X., Pestell, T. G., Qin, S., Mirabellei, E., Ren, H., & Pestell, R. G. (2014). MicroRNAs and cancer stem cells: the sword and the shield. *Oncogene*, 33(42), 4967–4977. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.492>
- Takashima, Y., Terada, M., Udono, M., Miura, S., Yamamoto, J., & Suzuki, A. (2016). Suppression of lethal-7b and miR-125a/b Maturation by Lin28b Enables Maintenance of Stem Cell Properties in Hepatoblasts. *Hepatology*, 64(1), 245–260. <https://doi.org/10.1002/hep.28548>
- Turcatel, G., Rubin, N., El-Hashash, A., & Warburton, D. (2012). Mir-99a and mir-99b modulate TGF- β induced epithelial to mesenchymal plasticity in normal murine mammary gland cells. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031032>
- Viswanathan, S. R., Daley, G. Q., & Gregory, R. I. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science*, 320(5872), 97–100. <https://doi.org/10.1126/science.1154040>
- Wang, Li, Chang, L., Li, Z., Gao, Q., Cai, D., Tian, Y., ... Li, M. (2014). MiR-99a and -99b inhibit cervical cancer cell proliferation and invasion by targeting mTOR signaling pathway. *Medical Oncology*, 31(5). <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0934-3>

- Wang, Longfei, Nam, Y., Lee, A. K., Chen, C., Ransey, E. M., Sliz, P., ... Ransey, E. M. (2017). LIN28 Zinc Knuckle Domain Is Required and Sufficient to Induce let-7 Oligouridylation Article LIN28 Zinc Knuckle Domain Is Required and Sufficient to Induce let-7 Oligouridylation. *CellReports*, 18(11), 2664–2675. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.044>
- Wu, L., & Belasco, J. G. (2005). Micro-RNA Regulation of the Mammalian lin-28 Gene during Neuronal Differentiation of Embryonal Carcinoma Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 25(21), 9198–9208. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.21.9198>
- Wulczyn, F. G., Smirnova, L., Rybak, A., Brandt, C., Kwidzinski, E., Ninnemann, O., ... Nitsch, R. (2007). Post-transcriptional regulation of the *let-7* microRNA during neural cell specification. *The FASEB Journal*, 21(2), 415–426. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6130com>
- Yang, J., Liu, X., Yuan, X., & Wang, Z. (2015). MiR-99b promotes metastasis of hepatocellular carcinoma through inhibition of claudin 11 expression and may serve as a prognostic marker. *Oncology Reports*, 34(3), 1415–1423. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4104>
- Zamora-Contreras, A. M., & Alvarez-salas, L. M. (2018). Let-7 miRNA Precursors Co-express with LIN28B in Cervical Cells MicroRNA. *MicroRNA*, (7), 62–71. <https://doi.org/10.2174/2211536607666180115143014>