

Tesis de Maestría  
PEDECIBA – Biología  
Biología molecular y celular



Validación experimental del supresor  
tumoral CHD5 como blanco de regulación  
por microARNs

Lic. Braulio Bonilla

Orientador:  
Dr. Alfonso Cayota

Tribunal:  
Dra. Mónica Marín  
Dra. María Ana Duhagon  
Dr. Pablo Oppezzo

*a Tiki*

## Índice

Agradecimientos.....	5
Resumen.....	6
Introducción.....	7
ARNs pequeños y microARNs.....	7
Biogénesis de los microARNs.....	7
Principios de la regulación de la expresión por microARNs.....	12
Función de los microARNs.....	15
Rol de los microARNs en el cáncer.....	16
Los microARNs como bio-marcadores y agentes terapéuticos en cáncer..	18
Antecedentes.....	19
CHD5.....	20
Rol de CHD5 en el cáncer.....	21
Hipótesis y objetivo.....	23
Materiales y métodos.....	24
Cultivos celulares.....	24
Obtención del ARN.....	24
Retro-transcripción del ARN.....	25
PCR de CHD5.....	26
Detección de CHD5 por <i>Northern blot</i> .....	27
Obtención de las proteínas.....	27
Detección de CHD5 por <i>Western blot</i> .....	28
PCR de los microARNs.....	29
Diseño de los oligorribonucleótidos sintéticos.....	30
Transfección de los oligorribonucleótidos sintéticos.....	30
Influencia de los microARNs sobre la proliferación celular.....	31
Influencia de los microARNs sobre el porcentaje de células apoptóticas....	32
Detección de $\beta$ -tubulina por <i>Western blot</i> .....	33
Detección de p53 por <i>Western blot</i> .....	33
Detección de GAPDH por <i>Western blot</i> .....	34
Inmunofluorescencia.....	34
Plásmidos para el ensayo de gen reportero.....	35
Ensayo de gen reportero.....	39
Resultados.....	40

1. Puesta a punto de la detección de CHD5 a nivel de ARNm y proteína. Identificación de líneas celulares como modelo experimental.....	40
2. Análisis de la expresión de los microARNs miR-1201, miR-1202 y miR-1203 en líneas de referencia (HeLa y SK-N-SH).....	41
3. Transfección de los oligorribonucleótidos sintéticos.....	42
4. Capacidad de los microARNs de regular a CHD5 a través de su 3'UTR...	44
5. Capacidad de los microARNs de modificar la expresión de CHD5.....	46
6. Capacidad de los microARNs de modificar la expresión de p53.....	52
7. Capacidad de los microARNs de modificar la proliferación y muerte apoptótica in vitro sobre células SK-N-SH.....	54
Discusión.....	57
Conclusiones.....	66
Perspectivas.....	67
Bibliografía.....	68
Apéndice.....	81
Líneas celulares utilizadas.....	81
Análisis bioestadístico y detalle de replicas biológicas y experimentales.....	81

## Agradecimientos

Dr. Alfonso Cayota. Por la confianza, las oportunidades brindadas y su sabia orientación.

Dra. María Catalina Güida. Sin su apoyo incondicional, conocimientos compartidos y trabajo incansable; no hubiera sido posible.

Lic. Fernanda Bangueses. Compañera inmejorable.

Laboratorio de Genómica Funcional del Institut Pasteur de Montevideo: Msc. María Rosa García, Msc. Juan Pablo Tosar, Lic. Florencia Cabrera y Lic. Julia Sanguinetti. Grandes compañeros, y amigos verdaderos.

Dr. Moshe Oren y el Departamento de Biología Molecular Celular del Instituto Weizmann, Israel.

Tribunal de tesis: Dra. Mónica Marín, Dra. María Ana Duhagon y Dr. Pablo Opezzo.

Instituciones, agencias y programas que brindaron apoyo: Institut Pasteur de Montevideo, Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) y The Pasteur-Weizmann Joint Research Program.

Ratón de laboratorio.

Mi familia y amigos.

## Resumen

Los microARNs son moléculas endógenas de ARN de 21 nucleótidos. Durante la última década han cobrado enorme relevancia como reguladores de la expresión génica a nivel post-transcripcional en la mayoría de los eucariotas. En mamíferos participan virtualmente en todos los procesos biológicos y su expresión está desregulada en todos los tipos de cáncer.

En investigaciones previas de nuestro grupo, se reportaron 4 nuevos microARNs a partir de muestras de células-B malignas de pacientes con Leucemia Linfóide Crónica. Mediante un análisis bioinformático identificamos al supresor tumoral CHD5 como uno de los potenciales blanco de regulación de 3 de estos microARNs (hsa-miR-1201, hsa-miR-1202 y hsa-miR-1203). CHD5 es un remodelador de la cromatina que regula a p53.

En esta tesis nos propusimos validar a CHD5 como blanco de estos microARNs y estudiar el potencial oncogénico de los mismos. Mediante el uso de oligorribonucleótidos sintéticos anti-sentido y sentido, en un sistema *in vitro*, simulamos la supresión de la expresión y la sobreexpresión de los miARNs. Luego, evaluamos la respuesta del sistema midiendo la expresión de CHD5, p53 y de un gen reportero con fragmentos del 3'UTR de CHD5; a su vez estudiamos la respuesta del sistema a nivel de procesos biológicos gobernados por p53.

A través de nuestros resultados reportamos la capacidad de estos 3 microARNs de regular a p53, a la vez que aportamos fuertes indicios de que hsa-miR-1202 actúa sobre la expresión de CHD5 mediante sitios específicos en su 3'UTR.

## Introducción

### ARNs pequeños y microARNs

Durante la última década, diversas familias de pequeños ARNs no codificantes han sido identificadas en la mayoría de los organismos eucariotas como los principales reguladores de la expresión génica a través de la degradación de ARN mensajeros (ARNm), inhibición de la traducción, formación de heterocromatina y regulando la integridad del genoma [1, 2]. Los mismos son definidos por su corta secuencia (20-35 nucleótidos) y su asociación con miembros de la familia Argonauta (Ago/Piwi) de proteínas. Basados en su origen, el subtipo de proteína Argonauta asociada, su biogénesis y mecanismos de acción, han sido agrupados en 3 principales familias: microARNs (miARNs), pequeños ARN de interferencia (siARNs) y ARNs asociados a proteínas Piwi (piARNs). Gracias al desarrollo de técnicas de secuenciación masiva, la clase de los pequeños ARNs se está ampliando constantemente, integrando ARNs reguladores derivados de ARN ribosomal (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), pequeños ARNs nucleares (snARNs), pequeños ARNs nucleolares (snoARNs) y vault ARNs (vARNs) [3].

Los miARNs son pequeñas moléculas endógenas de ARN de entre 19 y 22 nucleótidos (nt) [4-8]. Tienen la función de regular de la expresión génica a nivel post-transcripcional mediante inhibición de la traducción y/o degradación de ARNm blanco, uniéndose mediante apareamiento de bases a secuencias nucleotídicas en la región 3' no traducida (3'UTR, del inglés *3' untranslated region*) de los mismos [5, 9-12].

La primera descripción de un miARN data de 1993 y corresponde a lin-4 en *Caenorhabditis elegans*, desde ese momento, la regulación génica mediada por miARNs ha sido intensamente investigada [13, 14].

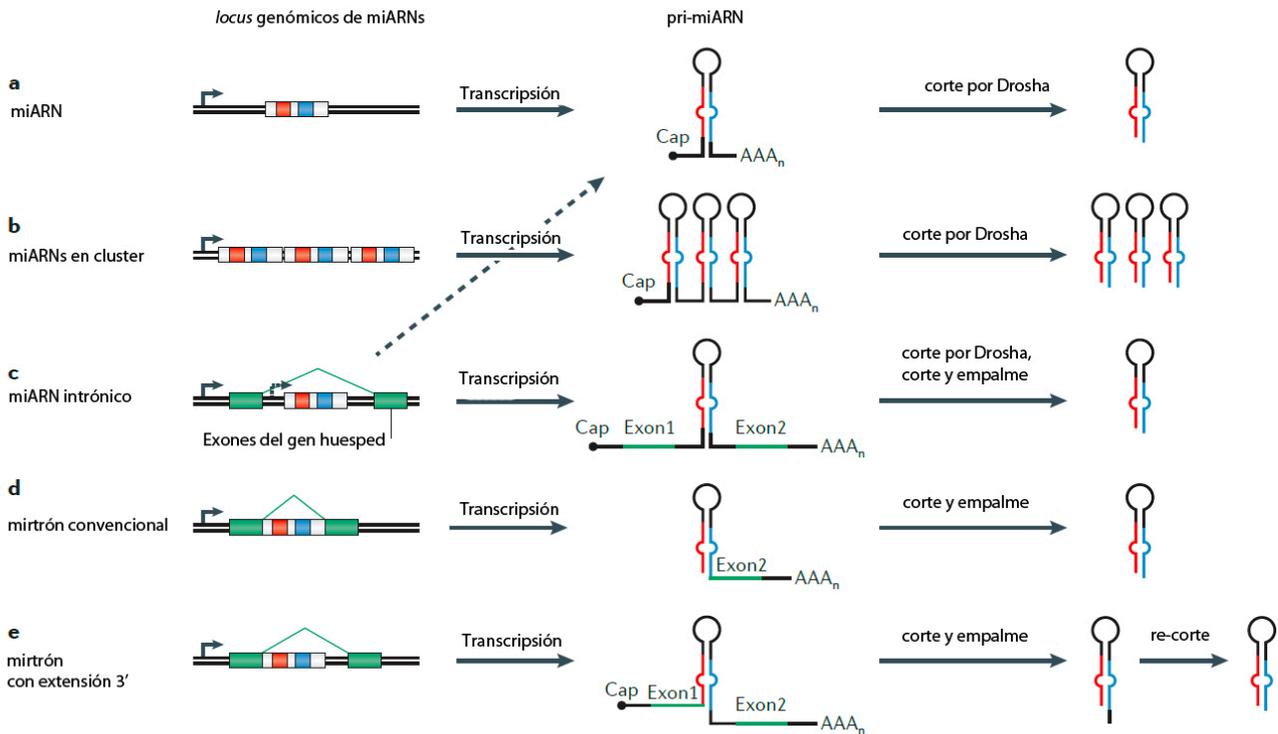
### Biogénesis de los microARNs

Los *loci* de los genes de miARNs (figura 1) pueden encontrarse en regiones inter-génicas o dentro de genes codificantes. Dentro de los genes se

ubican preferentemente en intrones, pudiendo carecer de promotor propio. De esta forma su expresión depende de la transcripción del gen huésped [5, 15-20].

Su biogénesis tiene lugar por medio de un proceso en etapas (figura2). La transcripción de los genes es llevada a cabo por la ARN polimerasa II, por lo que los transcriptos primarios poseen “caperuza 5’” y “cola de poli-adeninas 3’”. Una excepción la constituyen los genes de miARNs ubicados en elementos repetitivos Alu, para los que se utiliza la ARN polimerasa III [21-23].

Los transcritos primarios de los miARNs (pri-miARN) pueden dar lugar a un miARN o ser policistrónicos. Generan estructuras secundarias internas del tipo horquilla o *stem-loop*, debido a la presencia de una o más secuencias repetidas invertidas que constituyen el sustrato para los miARNs maduros [5]. Estas estructuras secundarias son reconocidas por un complejo proteico conocido como Microprocesador el cual está integrado por la ribo-nucleasa de tipo III, Drosha, y la proteína de unión a ARN de doble hebra (ARNdh), Di George Critical Region 8 (DGCR8) [24]. Este complejo realiza un corte en la molécula precursora precisamente a los 11 pares de bases (pb) de la base del *stem-loop*, liberando una estructura en horquilla de aproximadamente 70nt, conocida como pre-miARN [24-29]. En el caso de los miARNs codificados en intrones, la transcripción suele darse como parte de la del propio gen huésped, con el complejo microprocesador actuando posiblemente antes, o en conjunto con la acción del complejo de corte y empalme o *esplíceosoma* [30-34].



**Figura 1. Loci de miARNs y procesamiento de moléculas precursoras.** Se esquematiza la estructura de los distintos loci de miARNs. a) miARN codificado en una unidad transcripcional independiente. b) miARNs codificados en un *cluster* policistrónico. c) miARN alojado en un intrón, puede poseer promotor propio o depender de la transcripción del gen huésped. d) mirtrón, el gen del miARN abarca la totalidad del intrón y su procesamiento no depende de Droscha. e) mirtrón con extensión 3'. Su procesamiento no depende de Droscha y necesita un etapa adicional de corte para eliminar la extensión 3'. Extraído y modificado de Berezikov, E. (2011). "Evolution of microRNA diversity and regulation in animals." *Nature reviews. Genetics* 12(12): 846-860.

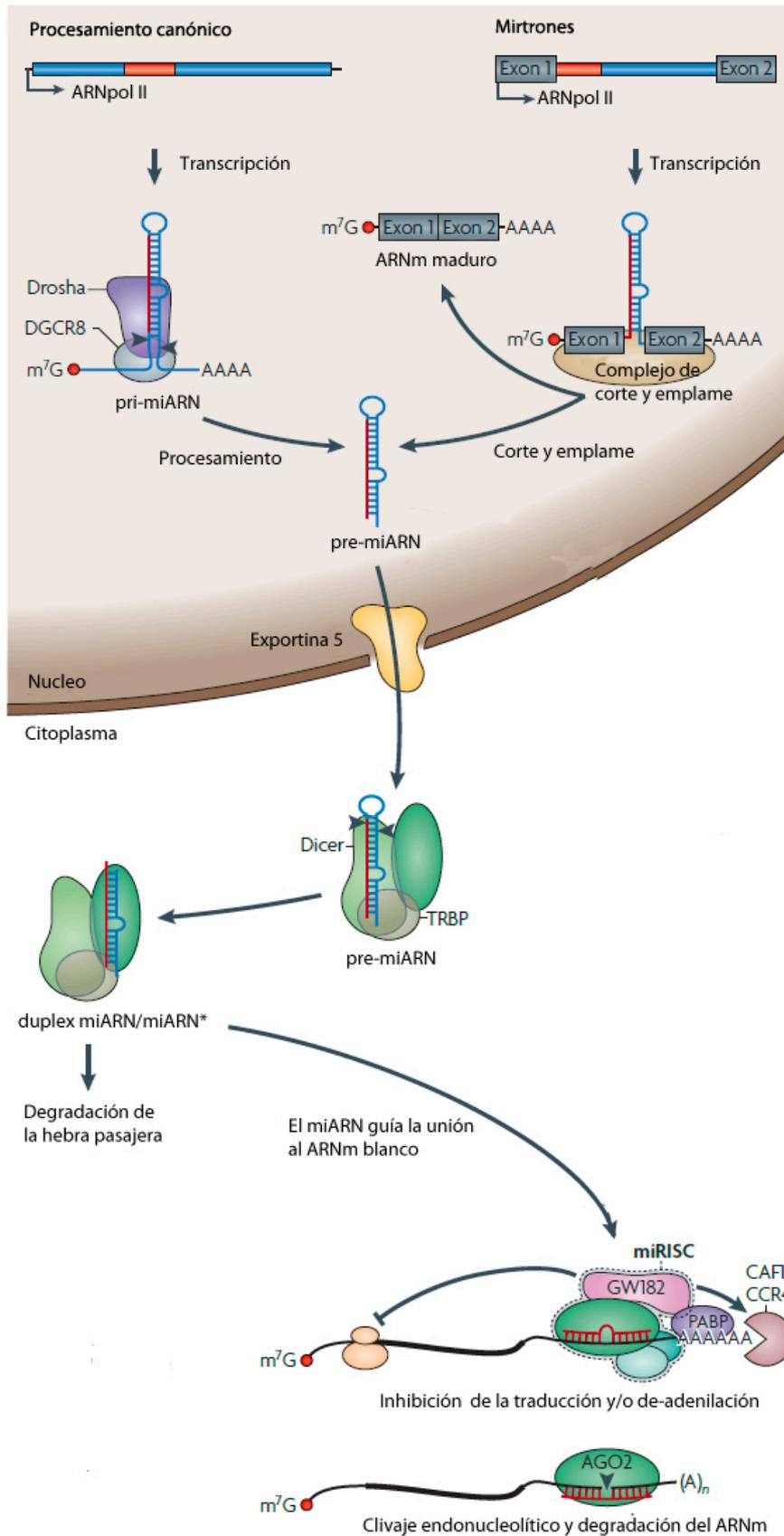
Las vías por las cuales se pueden originar miARNs, precursores o moléculas con funciones similares a miARNs, son diversas y en la actualidad se continúan reportando nuevas. Una situación particular se presenta en la biogénesis de los llamados mirtrones (figuras 1 y 2). Consisten en miARNs derivados de intrones que en su procesamiento sustituyen la acción del complejo Microprocesador por la del *espliceosoma* para producir directamente pre-miARNs [35-39]. En algunos casos, además del *espliceosoma*, también se requiere de la participación de un elemento que degrade ARN, como el exosoma (figura 1)[38, 40, 41]. Otro ejemplo que puede ser considerado, es el de los pequeños ARNs derivados de snoARNs, para los cuales se han descrito funciones de regulación del tipo de los miARNs [42-44]. Los miARNs derivados de precursores de ARNt, de pequeñas horquillas endógenas de ARN (endo-shRNAs) y los dependientes de tRNase-Z, son ejemplos adicionales, recientemente descritos, de miARNs originados mediante biogénesis no-canónica [45].

Posteriormente, los pre-miARNs son exportados al citoplasma por un mecanismo dependiente de la proteína nuclear de unión a guanósín trifosfato relacionada a Ras (Ran-GTP, sigla del inglés *guanosine triphosphate binding Ras-*

*related Nuclear protein*) y mediado por Exportina-5, la cual reconoce el extremo de la horquilla con 2nt 3' sobresalientes característico de estos precursores [37, 38, 46-48].

Una vez en el citoplasma, los pre-miARNs son cortados de forma tal que producen un dúplex de aproximadamente 22nt, con nucleótidos 3' sobresalientes en ambos extremos y conocido como miARN:miARN\*. En humanos, el complejo encargado de realizar este corte está formado por Dicer, una ribo-nucleasa de tipo III, y por las proteínas de unión a ARNdh, TRBP (sigla del inglés *human immunodeficiency virus Transactivating response RNA-Binding Protein*) y PACT (acrónimo del inglés *Protein ACTivator of the interferon-induced protein kinase*) [49-51].

TRBP recluta a una proteína de la familia de las argonautas (figura 2) y junto con Dicer conforman un complejo trimérico que inicia el ensamblaje del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, acrónimo del inglés *RNA-Induced Silencing Complex*) [52, 53]. De forma mayoritaria, la hebra de ARN del dúplex con menor energía termodinámica en su apareamiento de bases a nivel de su extremo 5' es seleccionada para incorporarse en el RISC y constituir el miARN maduro [54, 55]. La otra hebra (miARN\*), denominada "pasajera", es generalmente degradada, aunque en muchos casos puede ser también utilizada como miARN funcional e incluso se le han atribuido importantes roles en el funcionamiento celular normal así como en varias enfermedades [55-57]. El centro del RISC está compuesto por el miARN maduro unido a una proteína Argonata, y la proteína GW182 (del inglés, *glycine- tryptophan repeat-containing protein of 182 kDa*). El miARN guía al RISC mediante complementariedad de bases, permitiendo determinar la identidad del ARNm blanco; en tanto los componentes proteicos del complejo son los responsables de llevar a cabo la represión de la traducción [58, 59]. Los complejos RISC junto con los ARNm sometidos a regulación, suelen acumularse en los cuerpos-GW [11].



**Figura 2. Biogénesis de los miARNs.** Se detallan las vías de procesamiento canónica y de mirtrones, representando las principales proteínas efectoras y los intermediarios formados. De la misma forma, se muestra la incorporación del miARN maduro al RISC y su interacción con el ARNm blanco. Extraído y modificado de Krol, J., I. Loedige, et al. (2010). "The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay." *Nature reviews. Genetics* 11(9): 597-610.[60].

La expresión de los genes de miARNs está sometida a regulación transcripcional al igual que los genes codificantes, sin embargo también está gobernada post-transcripcionalmente a nivel de cada uno de los pasos de su biogénesis; existiendo, incluso, indicios de que cada miARN puede ser afectado independientemente [61, 62]. A su vez, la regulación de varias de estas instancias del procesamiento de los transcritos puede repercutir en la función del miARN e incluso en la evolución de su gen; tal es el caso de la variación en la precisión de los procesamientos realizados por Drosha y/o Dicer, a través de la cual se pueden generar las variantes llamadas isomiRs [20, 62, 63].

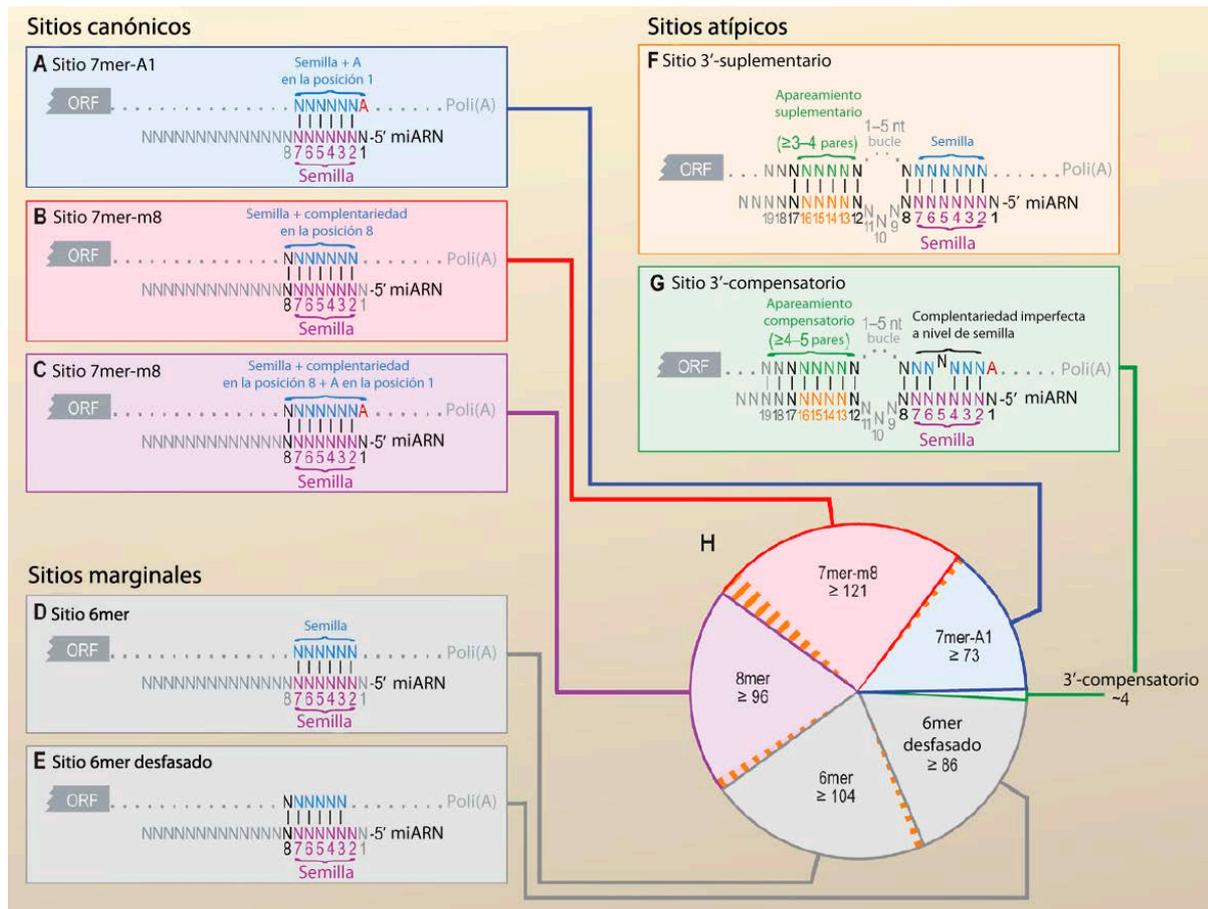
## Principios de la regulación de la expresión por microARNs

Cuando se presenta una alta complementariedad de bases entre el miARN y el ARNm, los miARNs de metazoarios pueden dirigir la degradación del ARNm blanco mediante el corte del mismo [51, 64]. Sin embargo, normalmente se observa una complementariedad de bases parcial, siendo el resultado de esta interacción, la represión transcripcional y/o la desestabilización del ARNm, mediada por inhibición del inicio y elongación de la traducción, de-adenilación y/o eliminación del capuchón 5' (en inglés, *decapping*) [10, 11, 65-81].

Sin embargo, recientemente han surgido indicios de que los mecanismos de acción de los miARNs podrían ser aun más diversos. En este sentido, debemos mencionar que se han reportado miARNs con la capacidad de unirse a regiones en el 5'UTR o en el marco abierto de lectura (ORF, acrónimo del inglés *Open Reading Frame*), y que incluso pueden provocar un aumento en la traducción de sus ARNm blancos [82-86]. Asimismo, se han detectado miARNs controlando la expresión génica a nivel transcripcional, uniéndose al ADN y dirigiendo el silenciamiento por mecanismos epigenéticos [87-89]. Además, puede considerarse que también se ha descrito a los cuerpos multi-vesiculares y endosomas como organelos celulares involucrados en la función de los miARNs o el recambio del RISC [90, 91].

Como se mencionó, en los metazoarios, la interacción entre el miARN y el ARNm blanco se da generalmente, por apareamiento imperfecto de bases. Este reconocimiento sigue un conjunto de normas que han sido definidas mediante análisis tanto bioinformáticos como experimentales [59]. En la mayor parte de los

sitios blanco para miARNs, tiene lugar un apareamiento de bases de tipo Watson-Crick e ininterrumpido, entre el ARNm y los nucleótidos en las posiciones 2 a 7 del extremo 5' del miARN; esta región es conocida como semilla [92-94]. La presencia en el ARNm, de una adenina (A) enfrentada a la posición 1 del miARN, la de una A o un Uracilo (U) frente a la posición 9 del miARN y un apareamiento del nucleótido en la posición 8 del miARN con su correspondiente en el ARNm, son elementos que favorecen la interacción. Los sitios que cumplen con estos requisitos se conocen como "canónicos", poseen elevada eficacia e incluyen a los llamados 7mer-A1, 7mer-m8 y 8mer [59, 93, 95-98]. Los llamados sitios "marginales" exhiben únicamente apareamiento a nivel de la semilla o en los nucleótidos en las posiciones 3 a 8 del extremo 5' del miARN; se los conoce respectivamente, como 6mer y *offset* 6mer, y presentan menor eficacia [59, 96-98]. Otra situación, aunque menos común, la constituyen la de los sitios en los que se observa un apareamiento imperfecto a nivel de la semilla y un apareamiento adicional entre los nucleótidos en las posiciones 13 a 16 del miARN y sus respectivos en el ARNm; estos sitios se conocen como "3' compensatorios" (figura 3) [59, 99].



**Figura 3. Tipos de sitios de miARNs.** Se representan los distintos tipos de sitios agrupados según sus características. Las líneas verticales indican un apareamiento de tipo Watson-Crick. A-C) Sitios canónicos. Presentan apareamiento continuo de 7 a 8 nt a nivel de la semilla. D-E) Sitios marginales. Tienen apareamiento en 6nt a nivel de la semilla. F-G) Sitios atípicos. Además de la interacción en el 5' del miARN, poseen apareamientos en la región 3' del miARN que pueden funcionar para suplementar o compensar los establecidos en el extremo 5'. H) Numero de sitios preferentemente conservados para un miARN altamente conservado. Extraído y modificado de Bartel, D. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell 136(2): 215-233.

Frecuentemente, se requiere que en el ARNm blanco existan varios sitios para el mismo o diferentes miARNs de forma de alcanzar una represión efectiva. Cuando los sitios se encuentran cercanos entre sí, tienden a funcionar cooperativamente [97, 100, 101]. La eficacia de cada sitio blanco también se encuentra fuertemente influenciada por el contexto que aporta el UTR en el que se aloja. Se han reportado varios casos en los que un idéntico sitio puede mediar la represión en ciertos UTRs pero no en otros [66, 92, 102]. En este sentido, se ha establecido que entornos de secuencia ricos en AU y el posicionamiento del sitio fuera de la región central de 3'UTRs largos y al menos a más de 15nt del codón de terminación, favorecen la eficacia del mismo [59, 95, 97, 103-105]. A su vez, muchos estudios han reportado vínculos funcionales entre proteínas de unión al

3'UTR y sitios blanco de miARNs, implicando incluso, la modulación del silenciamiento por miARN por parte de estas proteínas [106-116].

Dado que la relación entre el miARN y el ARNm blanco es guiada en gran parte por complementariedad de bases, es que la predicción de estas interacciones ha sido, desde el comienzo, accesible a las herramientas bioinformáticas. Su perfeccionamiento las ha hecho de gran utilidad a la hora de orientar los estudios de validación de blancos y comprender las normas de estas interacciones; a la vez, ha permitido mejorar la estimación acerca de la amplitud de la función regulatoria ejercida por estas moléculas[59]. Dentro de las herramientas informáticas de predicción de blancos se destaca TargetScan por ofrecer los resultados más robustos [117].

En los últimos años, los avances en las técnicas de secuenciado, han permitido incrementar la cantidad y el ritmo de identificación de nuevos miARNs. Actualmente, de acuerdo a la base de datos miRBase (v20), se conocen más de 30000 miARN en 206 especies [118]. En nematodos, moscas y mamíferos, se estima que constituyen entre el 1% y el 2% de los genes [119-121].

## Función de los microARNs

Dado que cada miARNs puede tener más de un ARNm blanco (incluso hasta cientos), se ha llegado a postular que estos agentes podrían regular la expresión de hasta el 30% de los genes en el genoma de los vertebrados, constituyendo así, la familia de reguladores más extensa [98, 122, 123]. En humanos, más de la mitad de los genes que codifican para proteínas parecen estar bajo selección positiva para conservar sitios blanco de miARNs en sus 3'UTR [124]. Más aún, si se considera el fenómeno evolutivo conocido como *anti-targeting*, por el cual muchos genes, especialmente los constitutivos (del inglés, *housekeeping*), acortan selectivamente sus 3'UTRs para evitar ser regulados por miARNs; puede establecerse, al menos para mamíferos, que los miARNs influyen sobre la expresión o la evolución de virtualmente todos los ARNm [59, 125, 126].

Esto demuestra el amplio alcance del rol de los miARNs en el mantenimiento de los patrones globales de la expresión génica. Muchos miARNs presentan patrones de expresión con alta especificidad espacial y temporal, a la vez que se vinculan con sus ARNm blanco en una relación de no superposición

[102, 125, 127-131]. Los ARNm tejido específicos tienen 3'UTRs más largos y con más sitios de unión para miARNs [125]. La expresión de los miARNs tiende a incrementarse y diversificarse con el desarrollo del embrión, a la vez que los 3'UTR de los ARNm suelen ser alargados por el uso de sitios de poli-adenilación alternativos [132, 133]. A su vez, desde un punto de vista filogenético, la diversidad del repertorio de miARNs en los genomas animales aumenta con el incremento de la complejidad del organismo [134, 135]. Estas observaciones permitieron sugerir el rol de los miARNs en el mantenimiento y la diferenciación de los tipos celulares, precisión en los programas expresión génica vinculados al desarrollo, soporte de las decisiones específicas de linaje celular y organización de las diferencias fisiológicas a lo largo del desarrollo [102, 125, 127-131, 136, 137].

Se ha observado que los miARNs se encuentran sobre-representados en los circuitos de regulación de la expresión génica [138, 139]. Una de las funciones específicas más reconocidas de los miARNs consiste en aportar robustez a dichos circuitos ya sea amortiguando o minimizando el ruido, actuando como un soporte a prueba de fallos, realizando ajustes finos, aguzando los patrones de expresión, actuando como interruptores, estableciendo umbrales, confiriendo precisión y uniformidad, o bien esculpiendo el perfil de la expresión de una proteína [59, 137, 140-142]. Estas capacidades están dadas en gran medida por la naturaleza *trans* de su accionar y porque el mismo tiene lugar en una de las etapas finales de la expresión de los genes (*i.e.* la traducción) [140].

Aunque los miARNs regulan moderadamente a sus blancos, su efecto puede llegar a ser fuerte y de amplio espectro, debido a la posibilidad de afectar varios genes y a que suelen ser parte de múltiples bucles de realimentación con otros reguladores de la expresión génica [143].

## Rol de los microARNs en el cáncer

Dada su condición de reguladores de la expresión génica de amplio espectro y al tipo de procesos en los que están involucrados, su implicancia en el cáncer no sorprende.

Actualmente, además de las funciones que hemos detallado, es aceptado que los miARNs actúan virtualmente en todos los procesos biológicos; muchos

de los cuales son de gran relevancia en el cáncer e incluyen a casi todos los que subyacen a las propiedades características de esta enfermedad. Se ha reportado que su participación se extiende a distintas etapas y diversos tipos de cáncer. Específicamente, se los ha vinculado al control del ciclo celular, migración celular, respuesta al estrés, respuesta al daño en el ADN, desarrollo de resistencia a quimioterapia y terapia dirigida, senescencia, crecimiento, metabolismo, diferenciación y proliferación celular; el desarrollo, apoptosis, la estructura cromosómica, invasión y metástasis, angiogénesis, respuesta inmune e inmortalización [15, 137, 143-148].

En la gran mayoría de las neoplasias malignas, el perfil de expresión de miARNs se encuentra sensiblemente alterado, observándose en general una disminución global de su nivel de expresión [149-152]. Se ha postulado que, dados sus roles en la diferenciación y conformación de la identidad celular, la pérdida de las funciones de los miARNs pueda repercutir en un incremento de la plasticidad celular, la de-diferenciación y una mayor predisposición a la transformación maligna [136, 153, 154]. Teniendo en cuenta estas observaciones, sumado a que aproximadamente el 50% de los miARNs humanos conocidos están en regiones cromosómicas asociadas a cáncer, es que se ha propuesto a los miARNs como buenos candidatos a mantener un balance entre supresores tumorales y oncogenes, pudiendo funcionar ellos mismos como tales [6, 122, 143, 150, 155-161].

La participación de los miARNs en el cáncer suele ser consecuencia de la desregulación de su expresión, la cual puede estar ocasionada por una amplia gama de factores. Algunos de ellos comprenden a: cambios epigenéticos (metilación del ADN, acetilación de histonas) en los genes de los miARNs, alteraciones genéticas en la secuencia de dichos genes (amplificaciones, traslocaciones, deleciones y mutaciones puntuales), modificaciones en la actividad de factores de transcripción responsables de regular la transcripción de los miARNs o en incluso alteraciones en los elementos responsables de la biogénesis de los miARN. A su vez, la acción de los miARNs puede estar afectada por variaciones a nivel del blanco de regulación de forma tal que les permita escapar a su regulación. Esto puede estar ocasionado por alteraciones genéticas en la secuencia del sitio blanco o en sus inmediaciones, o por la generación de 3'UTRs alterados por corte y empalme alternativo del ARNm o poli-adenilación

alternativa [145, 146, 149, 162]. Finalmente, el funcionamiento de los miARNs en cáncer puede verse alterado por la desregulación de ARNs endógenos competidores (ceARNs), los cuales secuestran a los miARNs controlando así su efecto; un ejemplo de este tipo de moléculas lo constituyen los ARNs circulares conocidos como circ-ARNs [163-171].

El primer reporte de miARNs actuando como supresores tumorales proviene del descubrimiento en Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) de la delección del *locus* de miR-15A y miR-16-1, miARNs responsables de regular negativamente la expresión del oncogen BCL2 [172]. Otro ejemplo lo constituye let-7, el cual posee como blanco al oncogen RAS y tiene disminuida su expresión en cáncer de pulmón [122, 173, 174]. El miR-127 y el miR-101 son otros ejemplos de miARNs supresores de tumor [175-177].

Contrariamente a lo que ocurre con los miARNs con funciones de supresor tumoral, los llamados oncomiRs suelen tener como blanco a genes involucrados en vías de inhibición del crecimiento y se encuentran generalmente sobre-expresados en las neoplasias. Ejemplos de miARNs actuando como oncogenes son el miR-21, sobre-expresado en glioblastoma humano [178], y el miR-155, que se encuentra sobre-expresado en cáncer de mama, pulmón y varias neoplasias hematopoyéticas [179].

## Los microARNs como bio-marcadores y agentes terapéuticos en cáncer

A través de estudios por micro-arreglos y secuenciado masivo, se ha observado que el análisis de los perfiles de expresión de los miARNs permite distinguir entre tejidos normales y cancerosos, entre distintos subtipos de un cáncer e incluso identificar sus tejidos de origen; alcanzando mayor precisión que los perfiles de ARNm [150, 152, 180-186]. Además, permite predecir la evolución de la enfermedad y su respuesta a la terapia o a drogas específicas [187-199].

De cara a su utilización como bio-marcadores, y a pesar de su inestabilidad, los miARNs han podido ser obtenidos a partir de tejidos fijados, embebidos en parafina o congelados. De hecho, se los ha detectado confiablemente a partir de diversas muestras como: sangre, plasma, exosomas

circulantes, orina, saliva y secreciones bronquiales [200-206]. Más aun, se ha reportado que el perfil de miARNs circulantes se correlaciona consistentemente con el patrón observado en los tejidos tumorales, lo que permite su análisis mediante técnicas no invasivas [207-218].

Estos aspectos posicionan a los miARNs como prometedores biomarcadores para el diagnóstico precoz, el pronóstico y el seguimiento del tratamiento del cáncer [146, 148, 219-221].

Los miARNs también representan un campo de intenso estudio dada su potencial gran utilidad en el tratamiento del cáncer tanto como blanco de terapias dirigidas, así como constituyendo herramientas en sí mismos. Su capacidad de regular moderadamente la expresión de varios genes, y muchas veces dentro de una misma vía, los hace más versátiles y en algunos casos más eficientes que los siARN, los cuales están limitados al silenciamiento y de forma individual [143, 219]. Esta diversidad regulatoria puede resultar ventajosa en ciertas circunstancias pero se debe ser extremadamente cuidadoso con los efectos que puedan generarse a través del resto de los blancos. En la medida que se avance en el perfeccionamiento de la predicción de blancos funcionales y de los efectos de la alteración de los niveles de los miARNs, podrá avanzarse más consistentemente en el desarrollo de terapias basadas en miARNs. Con la introducción de varias tecnologías para alterar expresión de los miARNs, como ser, “esponjas”, LNAs minúsculos, “señuelos”, miARNs “imitadores”, oligonucleótidos antagonistas y ácidos nucleicos peptídicos antagonistas; varias terapias han alcanzado la fase pre-clínica [222-225]. Sin embargo, su estabilidad y el lograr una entrega tejido-específica continúan siendo obstáculos para su completo desarrollo como herramientas terapéuticas [219, 226].

## Antecedentes

En trabajos previos de nuestro grupo, se realizó un análisis del perfil de expresión de miARNs a partir de muestras de células-B malignas de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica (LLC), en conjunto con una búsqueda de nuevos miARNs característicos de esta neoplasia. En este estudio se utilizaron *pool*es de muestras de 2 grupos de pacientes, discriminados de acuerdo al estatus mutacional de los genes de la región variable de la cadena pesada de las

inmunoglobulinas, en: mutados (M) y no mutados (NM). Ambos grupos de pacientes exhiben diferentes cursos de la enfermedad: los M tienen pronósticos favorables y cursos indolentes, mientras que los NM tienen pobres pronósticos y su enfermedad se desarrolla en forma agresiva. Este estudio reveló un perfil de miARNs característico de la LLC, junto con el hallazgo de 4 nuevos miARNs aún no descritos hasta el momento. Estos nuevos miARNs fueron denominados, hsa-mir-1200, hsa-miR-1201, hsa-miR-1202 (aislados del grupo de muestras de pacientes M) y hsa-miR-1203 (aislado del grupo NM); y sus secuencias fueron depositadas en bases de datos públicas (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>) [227].

Mediante el uso de algoritmos bioinformáticos, identificamos los posibles ARNm blanco para estos nuevos miARNs. Sorprendentemente, una proporción significativa de los posibles ARNm blanco se encuentra codificada en una pequeña región del brazo corto del cromosoma 1 (1p31-1p36). Originalmente reportada en neuroblastoma, la delección de esta región fue encontrada frecuentemente en neoplasias malignas humanas de origen epitelial, neuronal y hematopoyéticas como Leucemia Mieloide Aguda, Leucemia Mieloide Crónica y Linfomas [228-230]. Esto sugiere que la pérdida de un gen supresor de tumor codificado en esta región cromosómica constituye un evento crítico en la carcinogénesis. Dada la variedad de neoplasias que han sido asociadas con la delección 1p36, la pérdida o el silenciamiento de esta región podría ser un punto de partida para muchos tipos de cáncer [228]. Recientemente se ha reportado a la chromo-helicasa de unión al ADN 5 (CHD5) como un potente supresor tumoral codificado en esta región [228, 231, 232].

Las predicciones computacionales de ARNm blanco de los miARNs descritos en nuestro laboratorio indican a CHD5 como uno de los ARNm blanco más importante, siendo incluso compartido por tres de ellos (miR-1201, miR-1202 y miR-1203).

## CHD5

En humanos, el gen de CHD5 mapea en la región 1p36.31. Se extiende por 78218pb y está estructurado en 42 exones. El ARNm posee 9,6kb, con un 3'UTR

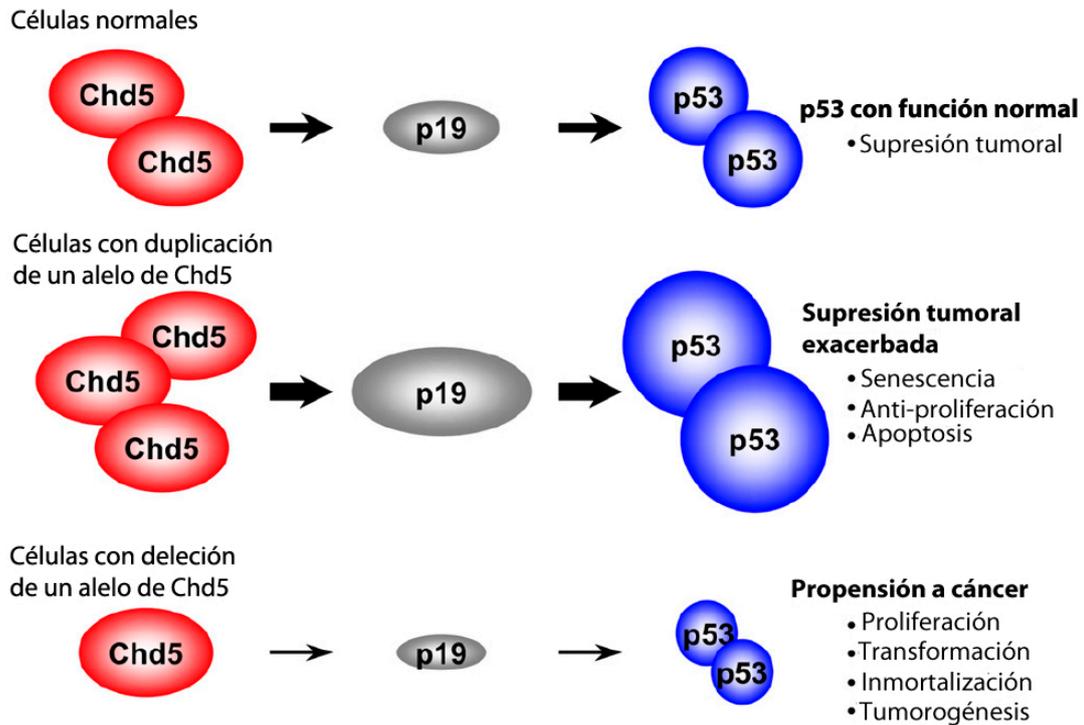
de aproximadamente 3,7kb. Su producto proteico tiene un peso molecular esperado de 223kDa [233].

La CHD5 humana (hCHD5) fue propuesta como un remodelador de la cromatina en base a su homología con otros miembros de la familia de las proteínas chromo-helicadas de unión al ADN (CHD) [233]. CHD5 es uno de los nueve miembros de esta familia, la cual debe su nombre al singular hecho de poseer los dominios: chromo (motivo organizador de la cromatina), helicasa y de unión al ADN. Esta familia puede subdividirse, y de acuerdo con esto, CHD5 conforma un subgrupo junto con CHD3 y CHD4 [234].

Sus funciones específicas están comenzando a develarse recientemente. Es fundamental en la etapa terminal de la diferenciación de las células neuronales [235]. Se ha reportado que forma parte de un complejo del tipo de remodelación de nucleosomas y de-acetilación de histonas, NuRD; y que sus dominios PHD (del inglés *plant homeodomain*) se unen a las histonas H3 sin modificaciones post-traduccionales [236, 237]. Sin embargo, también se ha indicado que sus dominios chromo se unen a la histona H3 con la tri-metilación en la lisina 27 (H3K27me3) [235].

## Rol de CHD5 en el cáncer

Actualmente, se conoce a través de un modelo murino, que Chd5 modula las vías p16<sup>Ink4a</sup>/Rb y p19<sup>Arf</sup>/p53, actuando sobre el *locus* Cdkn2a que codifica para p16 y p19; de esta forma controla la proliferación, apoptosis y senescencia. A su vez, también fue evidenciado que el detrimento del nivel de Chd5 no afecta la activación de p53 en respuesta al daño en el ADN, sugiriendo que son las vías inducidas oncogénicamente las que se encuentran comprometidas frente a la disminución de Chd5 (figura 4) [231]. Un reciente estudio, mediante inmunoprecipitación de cromatina, confirmó la conexión entre CHD5 y Cdkn2a en humanos; a la vez que reportaron un gran número de *loci* asociados al cáncer a los que CHD5 también se une [236]. Inclusive se ha demostrado que su expresión es un indicador favorable de supervivencia tras la terapia [238-242].



**Figura 4. Regulación de la expresión de p53 por parte de Chd5.** Modelo propuesto para el efecto del nivel de expresión de Chd5 sobre p53. Los tamaños de los elementos representan el nivel de expresión. Se detallan los efectos biológicos-Extraído y modificado de Bagchi, A., C. Papazoglu, et al. (2007). "CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36." Cell 128(3): 459-475.

En un comienzo se pensó que hCHD5 era específicamente expresada en el sistema nervioso [233], pero últimamente se la ha detectado en otros tejidos normales y se ha sugerido su rol en varias neoplasias de distintos orígenes [232, 243-251]. Más allá de los análisis basados en la homología de hCHD5 con otras proteínas remodeladoras de la cromatina y los datos acerca de su función, se posee escasa información en cuanto a la regulación de su expresión. Existe evidencia, además de los casos en los que se observan delecciones hemicigólicas de la región 1p36, que en cierta proporción de neoplasias, la expresión hCHD5 se encuentra epigenéticamente silenciada por hiper-metilación de su promotor [240, 244, 249-251].

A pesar de estos hallazgos aún existe una gran proporción de casos incluso en neuroblastoma, en los que la pronunciada deficiencia en la expresión de hCHD5 no puede ser explicada por ninguno de estos fenómenos. Esto sugiere que otros mecanismos de regulación de su expresión deben estar actuando [233, 250]. Un sustento de esta hipótesis surgió recientemente a través de un estudio en el que se demostró la supresión de CHD5 en cáncer colorrectal, mediante la regulación directa ejercida por el miARN miR-211 [252].

## Hipótesis y objetivos

Hipótesis:

hsa-miR-1201, hsa-miR-1202 y hsa-miR-1203 regulan a CHD5 lo que les confiere propiedades oncogénicas.

Objetivos:

Validar experimentalmente a CHD5 como blanco de hsa-miR-1201, hsa-miR-1202 y hsa-miR-1203.

Evaluar las propiedades oncogénicas de hsa-miR-1201, hsa-miR-1202 y hsa-miR-1203 a través de sus efectos sobre la expresión de p53.

Evaluar las propiedades oncogénicas de hsa-miR-1201, hsa-miR-1202 y hsa-miR-1203 a través de sus efectos sobre propiedades biológicas relevantes en cáncer.

Esto nos permitirá proponer un modelo en el cual la “deleción funcional” de hCHD5 mediada por miARNs, pueda tener un rol preponderante en el desarrollo de ciertas neoplasias malignas.

## Materiales y métodos

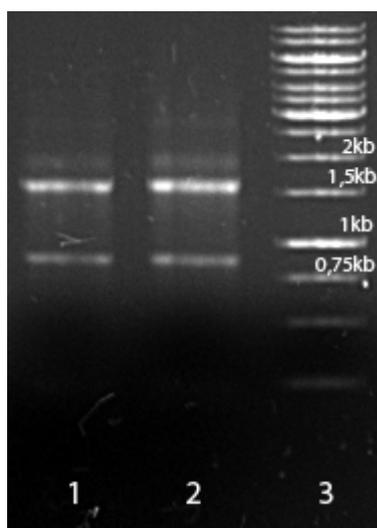
### Cultivos celulares

Los cultivos de todas las líneas celulares se realizaron en RPMI 1640 (RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™, Gibco®) suplementado con 10% suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum, Gibco®). Las células se expandieron durante al menos 3 pasajes antes de ser cosechadas o utilizadas en los ensayos.

Los pasajes y las cosechas se realizaron cuando los cultivos alcanzaron el 70% de confluencia y para estos se utilizó tripsina-EDTA (0.05% Trypsin-EDTA, Gibco®).

### Obtención del ARN

Las extracciones de ARN se realizaron a partir de  $5 \times 10^6$  células previamente lavadas con *buffer* fosfato salino (PBS) frío, utilizando Trizol (TRizol® Reagent, Ambion®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y conservándose en última instancia en agua. Controlamos la pureza del ARN a través de su espectro de absorción por Nano Drop (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific). Consideramos como aceptables, valores mayores de 2,0 tanto para la relación OD A260/A280 y como para la OD A260/A230. Evaluamos la integridad del ARN sometiéndolo a electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Almacenamos el material a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En la figura 5 se puede observar la electroforesis de una extracción de ARN de células HeLa y SK-N-SH.

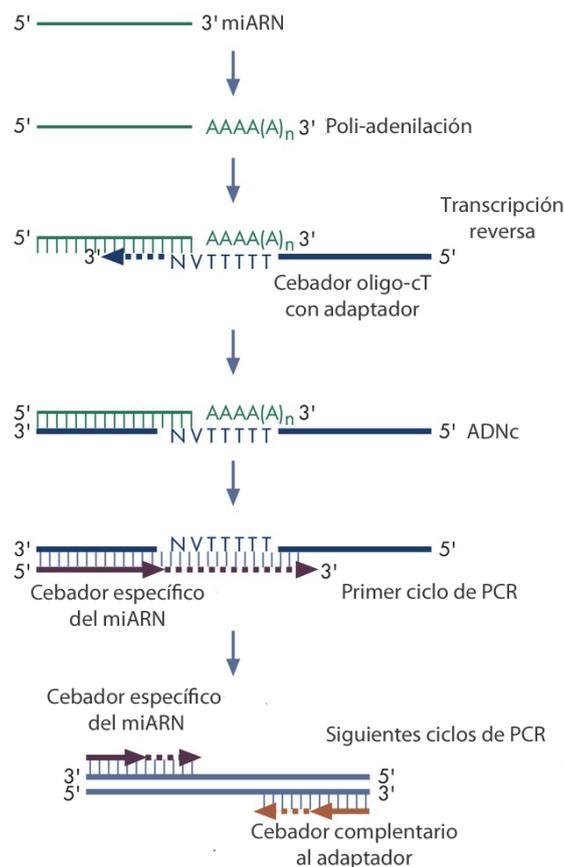


**Figura 5. ARN total de células HeLa y SK-N-SH.** Carriles: (1) 400ng ARN HeLa; (2) 600ng ARN SK-N-SH; (3) marcador de peso molecular, 1 $\mu$ l.

## Retro-transcripción del ARN

Para obtener el ADN copia (ADNc), molde de las PCR de CHD5, retro-transcribimos las muestras de ARN con la transcriptasa reversa SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Partimos de 2µg de ARN y utilizamos un oligonucleótido oligo-dT como cebador.

Para obtener el ADNc molde de las PCR de los miARNs partimos de 1µg de ARN y utilizamos miScript RT Kit (©QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. En este kit se poli-adenilan todas las formas de ARN de una muestra para luego retro-transcribirlas utilizando un cebador oligo-cT. Este cebador tiene la particularidad de poseer hacia su extremo 5' una prolongación de nucleótidos que permite la unión de un cebador específico en una subsecuente amplificación por PCR. En la figura 6 se esquematiza el proceso por el cual se genera este ADNc.



**Figura 6. Generación del ADNc y amplificación por PCR con miScript RT Kit (©QIAGEN).**

## PCR de CHD5

Para detectar el ARNm de CHD5 se optó por un sistema de *nested* PCR debido a su baja expresión. Los oligonucleótidos que utilizamos como cebadores se diseñaron específicamente a partir de las secuencias disponibles en la base de datos GeneBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF425231.1>). Se consideró que los mismos permitieran generar productos que abarcaran más de un exón para asegurar la amplificación a partir del ARNm. La homología con CHD3 y CHD4 fue especialmente tenida en cuenta para evitar la amplificación inespecífica. La secuencia nucleotídica de los cebadores, así como su ubicación en el ARNm de acuerdo a la secuencia de referencia, se detalla en la tabla 1.

**Tabla 1. Cebadores para CHD5.**

	Secuencia	Posición en el ARNm	Exón	Función
C5fe	5'- AAGTCCAGCGGATTCTACTGGAG-3'	1503:1527	10	Forward primer ciclado
C5re	5'- GTACCATGGCTGCTTGTGCGAACTTG-3'	2152:2176	14	Reverse primer ciclado
C5fi	5'- CTACGGCTCTGGGGATGAAGAC-3'	1765:1786	11	Forward segundo ciclado
C5ri	5'- CCTCTGGGCAGCCTGGTG-3'	2056:2074	13	Reverse segundo ciclado

En el primer ciclado se amplifica un producto de 673pb mientras que en el segundo se obtiene uno de 309pb. Para el primer ciclado utilizamos 2,0µl de ADNc para un volumen final de 20µl, mientras que en el segundo utilizamos 2µl de producto del primer ciclado. Para ambos, las condiciones de los reactivos fueron: 1X *buffer* taq, 0,3µM de cada cebador, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de cada dNTP y 0,5u de taq polimerasa (Taq DNA Polymerase, Recombinant, Fermentas). Las condiciones de ambos ciclados se detallan en la tabla 2. Los productos fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio. En todos los casos, la identidad de los productos fue confirmada por secuenciado.

**Tabla 2. Condiciones de ciclado de la *nested* PCR de CHD5.**

Primer ciclado			Segundo ciclado		
Temperatura (°C)	Tiempo	Repeticiones	Temperatura (°C)	Tiempo	Repeticiones
95	3'	1	95	3'	1
95	45''		95	45''	
55	40''	20	62	40''	20
72	1'		72	45''	
72	12'	1	72	12'	1

### Detección de CHD5 por Northern blot

Utilizamos 20µg de ARN total de cada muestra. El ARN fue sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida 5% desnaturalizante, en *buffer* 0,5X Tris-Borato-EDTA (TBE). Luego se transfirió a una membrana Amersham Hybond-N+ (Amersham Hybond-N+, GE Healthcare Life Sciences). Una vez realizada la transferencia, el ARN fue fijado por un tratamiento con 120mJ de UV (Stratagene, GE Healthcare) e incubado a 80°C durante 1hr.

La sonda fue generada a partir del producto purificado de una *nested* PCR de CHD5, mediante el marcado con T4 poli-nucleótido-kinasa (New England Biolabs), usando [32P]γ-ATP (>7000 Ci mmol<sup>-1</sup>, MP Biomedicals). Los nucleótidos marcados no incorporados fueron eliminados mediante centrifugación en columna (illustra MicroSpin G-25 Columns, GE Healthcare).

La membrana fue pre-hibridada a 40°C durante 2hr en *buffer* Church modificado (5% dodecilsulfato sódico [SDS], 0,5% leche descremada deshidratada, 1mM EDTA en *buffer* fosfato 0,25 M, pH 7,2). Luego, se agregó la sonda marcada y se continuó con la incubación durante toda la noche. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 20 minutos (min) a 42°C con *buffer* cloruro de sodio/ citrato de sodio (SSC) 0,1% SDS en los que se varió la concentración del *buffer* SSC, comenzando en 2X, siguiendo con 1X para finalizar en 0,5X. La membrana fue revelada con film fotográfico (Biomax MS X-ray film, Kodak).

### Obtención de las proteínas

Las extracciones de proteínas se realizaron a partir de 5x10<sup>6</sup> células previamente lavadas con PBS frío. Utilizamos *buffer* de lisis desnaturalizante (25mM Tris-Cl pH 6,8, 1% SDS, glicerol 10%) y posterior sonicación. Se verificó la integridad de las mismas mediante electroforesis en gel de poli-acrilamida 12%, en *buffer* tris-glicina-SDS (25mM Tris-Cl pH 8,3, 192mM glycine, 0,1% SDS), teñido con azul de Coomassie (0,025% Brilliant Blue Dye, 40% etanol, 7% ácido acético). La cuantificación de las muestras se realizó con ácido Bicinconinico (Bicinchoninic Acid Kit, Sigma-Aldrich). El material se almacenó a -80°C.

### Detección de CHD5 por *Western blot*

Las distintas muestras de proteínas fueron preparadas con *buffer* de carga reductor (Laemmli Sample Buffer: 50mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 12,5mM EDTA, 0,02% bromophenol blue) para luego ser sometidas a electroforesis en gel de poli-acrilamida 6%, en *buffer* tris-glicina-SDS. Posteriormente el material fue transferido a membranas de PVDF (Amersham Hybond-P PVDF Membrane, GE Healthcare Life Sciences) mediante transferencia húmeda, a 40V, durante 14hs, a 6°C, en *buffer* tris-glicina (*buffer* de transferencia: 25mM Tris-Cl pH 8,3, 192mM glicina, 0,03% SDS, 10% etanol). Para verificar la eficiencia de la transferencia, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y las membranas con solución rojo Ponceau (0,1% Ponceau S, 5% ácido acético).

Las membranas se bloquearon con sero-albúmina bovina (BSA) 5% en PBS, durante 1hr a 37°C. Luego, se lavaron con 0,05% Tween en PBS para proceder a la incubación con el anticuerpo anti-CHD5.

Para el anticuerpo ab66516 (Abcam plc) la incubación se realizó en 0,6% Tween, 0,1% BSA en PBS; con una dilución 1/2000 y durante 1hr a temperatura ambiente, con agitación. Posteriormente, lavamos el exceso de anticuerpo con 0,6% Tween en PBS, 6 veces durante 5min.

Para el anticuerpo CHD5 (H-185) (Santa Cruz Biotechnology, INC.), la incubación se realizó en 0,6% Tween, 0,1% BSA en PBS; con una dilución 1/4000 y durante 1hr a temperatura ambiente, con agitación. Posteriormente lavamos el exceso de anticuerpo con 0,6 % Tween en PBS, 6 veces durante 5min.

Como anticuerpo secundario utilizamos anti-conejo conjugado a peroxidasa (Goat Anti-Rabbit IgG [H+L], Horseradish Peroxidase Conjugate, Novex®, Invitrogen); diluido 1/50000 en 0,05% Tween, 0,1% BSA en PBS; durante 1hr a temperatura ambiente, con agitación. Posteriormente lavamos el exceso de anticuerpo con 0,05% Tween en PBS, 3 veces durante 5min.

Finalmente las membranas fueron incubadas con sustrato quimio-luminiscente para revelado con peroxidasa (ECL-Signal, ViVo Science), para luego ser expuestas a film fotográfico (Amersham® Hyperfilm® ECL™, GE Healthcare). Para los ensayos con CHD5 (H-185) (Santa Cruz Biotechnology, INC.) empleamos

exposiciones de 20min, mientras que para los realizados con ab66516 (Abcam plc) fueron de 1min.

### PCR de los microARNs

Para la detección de los miARNs se partió de 1µl del ADNc generado con miScript RT Kit (©QIAGEN). Como cebadores utilizamos un oligonucleótido complementario a la secuencia del adaptador y oligonucleótidos específicos del extremo 5' de cada miARN. Estos oligonucleótidos específicos fueron diseñados con algunas bases LNA (locked nucleic acid) para obtener una temperatura de *melting* adecuada (Exiqon, LNA™). Sus secuencias se detallan en la tabla 3.

**Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para amplificar los miARNs**

Oligonucleótido	Secuencia
LNA-1201	5' - C*CT*GA*TAAACACATGCT - 3'
LNA-1202	5' - *GT*GCCAGATGCAGTGG - 3'
LNA-1203	5' - CC*CGGAGCCAGGATG - 3'

\* Indica que el siguiente en la secuencia, es un nucleótido LNA.

Para todos los casos utilizamos un volumen final de 20µl y las condiciones de los reactivos fueron: 1X *buffer* taq, 0,3µM cebador LNA específico, 1X cebador universal (UP) miScript, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de cada dNTP y 0,5u taq polimerasa (Taq DNA Polymerase, Recombinant, Fermentas). Las condiciones de ciclado se detallan en la tabla 4. Los resultados fueron evaluados por electroforesis en gel de poliacrilamida 12% en buffer tris-borato-EDTA (TBE), teñido con bromuro de etidio.

**Tabla 4. Condiciones de ciclado para las PCR de los miARNs**

Temperatura (°C)	Tiempo	Repeticiones
95	3'	1
95	15''	35
55	30''	
72	30''	
72	12'	1

Verificamos la identidad de los amplicones por secuenciación, pero debido a su reducido tamaño, primero los integramos a un vector plasmídico. Para ello, sometimos a los productos de PCR a electroforesis en gel de poliacrilamida 12% en TBE, teñido con bromuro de etidio. Las bandas correspondientes a los amplicones de aproximadamente 55pb (que incluyen el miARN y el adaptador 3')

fueron escindidas del gel. Se realizó la elución del material y el mismo fue ligado en el vector pGEM®-T Easy (Promega Corporation). Los productos de ligación fueron electroporados en E. coli XL-1 blue electro-competentes, las cuales tras 1hr de incubación en 1ml de medio LB, a 37°C y 220rpm, fueron plaqueadas en medio LB-Agar con ampicilina, IPTG y X-Gal, y luego incubadas durante 20hs a 37°C. Se obtuvieron aproximadamente 20 colonias para cada una de las 3 muestras. Estos clones fueron expandidos en cultivos en LB y luego se extrajo su ADN plasmídico mediante mini-preparación por lisis alcalina. Este ADN plasmídico fue sometido a secuenciación empleando como cebadores, oligonucleótidos complementarios a regiones adyacentes al sitio de poli-clonado del vector.

### Diseño de los oligorribonucleótidos sintéticos

Para emular la sobre-expresión y supresión de los miARNs miR-1201, miR-1202 y miR-1203; diseñamos y utilizamos respectivamente, oligorribonucleótidos sentido (s), con la secuencia de cada miARN; y anti-sentido (as), con la secuencia complementaria a cada miARN. Estas moléculas fueron introducidas a las células por lipo-transfección. Sus secuencias, así como las modificaciones que se incluyeron para evitar su degradación (uniones fosforotioato y bases 2'-O-metiladas) y evaluar la eficiencia de su transfección (unión del fluoróforo Cy3), se detallan en la tabla 5 (Exiqon, LNA™).

**Tabla 5. Secuencias de los oligorribonucleótidos sintéticos**

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño
miR-1201s	mC*CmU*mGmAmUmUmAmAmAmCmAmCmAmUmGmCmUmC*mU*mG*mA/3Cy3Sp/	22nt
miR-1201as	mU*mC*mA*mGmAmGmCmAmUmGmUmGmUmUmUmAmAmUmC*mA*mG*mG/3Cy3Sp/	22nt
miR-1202s	mG*mU*mG* mCmCmA mGmCmU mGmCmA mGmUmG mGmGmG* mG*mA*mG /3Cy3Sp/	21nt
miR-1202as	mC*mU*mC*mCmCmCmCmAmCmUmGmCmAmGmCmUmGmG*mC*mA*mC/3Cy3Sp/	21nt
miR-1203s	mC*mC*mC*mGmGmAmGmCmAmGmGmAmUmGmCmA*mG*mC*mU*mC/3Cy3Sp/	21nt
miR-1203as	mG*mA*mG*mCmUmGmCmAmUmCmCmUmGmGmCmUmCmC*mG*mG*mG/3Cy3Sp/	21nt

\*: Indica una unión fosforotioato/ m: Indica una base 2'-O-metilada/ 3Cy3Sp: Señala la adición de Cy3 al extremo 3'

### Transfección de los oligorribonucleótidos sintéticos

La transfección de los oligorribonucleótidos sintéticos se utilizó como punto de partida para analizar los potenciales efectos de los miARNs sobre las tasas de proliferación y apoptosis de células SK-N-SH, sobre los niveles de expresión de CHD5 y p53 en células HeLa y SK-N-SH; y también para evaluar su acción sobre sitios específicos del 3'UTR de CHD5.

Para ello, tanto en frascos de cultivo de 75cm<sup>2</sup>, como en placas de 12, 24, 48 y 96 pocillos, cultivamos las células hasta una confluencia del 70%. Luego de un lavado con PBS, incubamos en medio de cultivo optimizado para la transfección (Opti-MEM®, Invitrogen) conteniendo lipofectamina (Lipofectamine® 2000 Reagent, Invitrogen) y los oligorribonucleótidos sintéticos, durante 4 horas a 37°C. Este medio de transfección fue previamente preparado, homogeneizado e incubado 20min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de lípidos y ácidos nucleicos. Los volúmenes utilizados para cada caso, se detallan en la tabla 6. Finalmente sustituimos el medio de transfección por medio completo y determinamos la eficiencia de transfección observando las células en microscopio de epi-fluorescencia.

**Tabla 6. Volúmenes de transfección.**

Superficie de cultivo	Volumen de transfección
0,32cm <sup>2</sup> (placa de 96 pocillos)	100 µl
0,94cm <sup>2</sup> (placa de 48 pocillos)	200 µl
1,9cm <sup>2</sup> (placa de 24 pocillos)	500 µl
3,8cm <sup>2</sup> (placa de 12 pocillos)	1000 µl
75cm <sup>2</sup> (frasco de cultivo)	6000 µl

Para determinar las condiciones óptimas de lipofectamina y oligos sintéticos en las cuales se alcanzara una mayor eficiencia de transfección sin alteración significativa de la “viabilidad celular” a los 30 min post-transfección, realizamos una puesta a punto ensayando distintas concentraciones de lipofectamina (2µl/ml, 4 µl/ml y 8 µl/ml) junto con distintas concentraciones de oligos sintéticos (10nM, 20nM y 50nM). Las mayores eficiencias de transfección sin alteración significativa de la viabilidad celular, para ambas líneas celulares, se alcanzaron con 2µl/ml de lipofectamina y 50nM de oligorribonucleótido. Para determinar la eficiencia de transfección, inmediatamente después de la incubación con lipofectamina, las células se observaron al microscopio de epi-fluorescencia.

Como control se utilizaron células sometidas al mismo proceso de transfección pero sin la inclusión de oligorribonucleótidos.

#### Influencia de los microARNs sobre la proliferación celular

Para evaluar el efecto de los miARNs sobre la proliferación celular, transfectamos células SK-N-SH en una placa de 96 pocillos con los oligorribonucleótidos sintéticos, por cuadruplicado. Luego, las fijamos para finalmente emplear la

técnica de Cristal Violeta. Este compuesto, solo es capaz de penetrar células que se encontraban vivas al momento de la fijación.

Las mediciones se realizaron a las 24, 48 y 72hs post-transfección. En cada caso, las células se lavaron con 1 PBS frío y luego se fijaron incubándolas 10min en 4% paraformaldehído. Inmediatamente, se las incubó en 0,2% Cristal Violeta en PBS (Crystal violet solution, Sigma) durante 10min, para luego lavarlas con agua y secarlas. Finalmente, se incubaron en 95% etanol durante 15min para disolver el colorante, y se procedió a la lectura de la densidad óptica a una longitud de onda de 559nm, en lector de placas. El ensayo completo se repitió una vez.

Como control adicional se utilizaron células transfectadas con oligorribonucleótidos con las mismas bases y modificaciones del miR-1202s pero con una secuencia aleatoria. Corroboramos mediante el algoritmo blast optimizado para secuencias cortas que la misma no presentara regiones de complementariedad extensivas con ningún ARNm o miARN humanos.

#### Influencia de los microARNs sobre el porcentaje de células apoptóticas

Para evaluar el efecto de los miARNs sobre la apoptosis, transfectamos células SK-N-SH en placas de 12 pocillos, con los oligorribonucleótidos sintéticos, por duplicado, y luego utilizamos Anexina V (Recombinant Human Annexin V, R-Phycoerythrin Conjugate, Invitrogen), que nos permitió medir el porcentaje de células apoptóticas en cada caso. La Anexina V es una proteína que se une a residuos de fosfatidilserina. En apoptosis, estos residuos se traslocan hacia la superficie exterior de la membrana celular, lo que los hace accesibles a la Anexina V. Al conjugarse esta proteína con un fluoróforo, permite su detección por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia.

Las mediciones se realizaron a las 72 horas post-transfección. Para ello cosechamos mediante tripsinización las células conservando el medio de cultivo y luego de centrifugar a 260xg durante 5min a 4°C, lavamos las células sedimentadas con PBS frío. Posteriormente, re-suspendimos en *buffer* de Anexina V (100mM HEPES, 140mM NaCl, 25mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4). Finalmente, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. El ensayo completo se repitió 2 veces.

Al igual que en la evaluación de la tasa de proliferación, como control adicional se utilizaron células transfectadas con oligorribonucleótidos con las mismas bases y modificaciones del miR-1202s pero con una secuencia aleatoria.

#### Detección de $\beta$ -tubulina por *Western blot*

Las muestras de proteínas fueron sometidas a electroforesis y transferidas a membrana en idénticas condiciones a las que se describieran para los *Western blot* de CHD5. Las membranas también se bloquearon en las mismas condiciones.

La incubación del anticuerpo primario (Mouse Anti-beta Tubulin antibody [3F3-G2], Abcam plc) fue de 1hr a temperatura ambiente, en agitación y en 0,05% Tween, 0,1% BSA, en PBS. La dilución utilizada fue de 1/500. Luego lavamos las membranas durante 5min, 3 veces, con 0,05% Tween en PBS.

Inmediatamente, realizamos la incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa (Goat/ Mouse Inmunoglobulins HRP, DAKO A/S), diluido 1/20000, durante 1hr, a temperatura ambiente, en agitación y en 0,05% Tween, 0,1% BSA en PBS. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante 3 lavados de 5min con 0,05% Tween en PBS.

Para el revelado utilizamos el mismo procedimiento que en el *Western blot* de CHD5. La exposición del film fotográfico fue de 15 segundos (seg).

#### Detección de p53 por *Western blot*

En este caso, las muestras proteicas fueron procesadas de igual manera al someterlas a electroforesis y posterior transferencia; con la salvedad de que utilizamos un gel de poli-acrilamida 10% y un *buffer* de transferencia con 20% etanol en lugar de 10%.

Verificamos la eficiencia de la transferencia como se detallara anteriormente. Luego, bloqueamos las membranas incubándolas con 5% BSA en PBS, durante 1 hora (hr), a temperatura ambiente y en agitación.

Como anticuerpo primario utilizamos un anticuerpo monoclonal anti-p53 producido en el laboratorio del Dr. Moshe Oren (Departamento de Biología Molecular Celular del Instituto Weizmann, Israel). Fue diluido 1/40 en

0,05% Tween, en PBS. La incubación de las membranas con el anticuerpo primario se realizó a 4°C, durante 8hs y en agitación. Posteriormente, realizamos 3 lavados de 5min con 0,05% Tween en PBS.

Como anticuerpo secundario, utilizamos una inmunoglobulina anti-ratón conjugada a peroxidasa (Goat/ Mouse Inmunoglobulins HRP, DAKO A/S). Las condiciones de dilución, incubación y posterior lavado, también fueron las mismas que en el ensayo de *Western blot* de  $\beta$ -tubulina.

Finalmente, se procedió al revelado, para el que se aplicó el mismo procedimiento que para el *Western blot* de CHD5, con la salvedad de que empleamos 15min de exposición.

#### Detección de GAPDH por *Western blot*

Para detectar la expresión de esta proteína, las muestras proteicas fueron sometidas al mismo procedimiento que utilizamos en los ensayos de *Western blot* de p53.

El anticuerpo primario (Anti-GAPDH antibody [ab9485], Abcam plc) fue diluido 1/3000 en 0,05% Tween, 0,1% BSA en PBS. La incubación se extendió durante 1 hora, a temperatura ambiente y en agitación. Inmediatamente, lavamos las membranas 3 veces, durante 5min, con 0,3% Tween en PBS.

Nuevamente, utilizamos el mismo anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa que se mencionó en el ensayo de *Western blot* de CHD5. Las condiciones de dilución, incubación y lavado también se mantuvieron.

De la misma forma que se describiera para el resto de los *Western blot*, posteriormente, incubamos las membranas con sustrato quimio-luminiscente para revelado con peroxidasa y luego las expusimos a films fotográficos. En este caso las exposiciones fueron de 10seg.

#### Inmunofluorescencia

Preparamos cultivos celulares de las líneas HeLa y SK-N-SH, en placas de 48 pocillos. Cuando alcanzaron el 70% de confluencia los sometimos a transfección en las condiciones mencionadas anteriormente. Una vez transcurridas las

72hs post-transfección procedimos a la detección de CHD5 por inmunofluorescencia indirecta.

Para ello, fijamos las células incubándolas durante 10min en 4% paraformaldehído. Luego de un lavado con PBS, realizamos una incubación con 1M glicina durante 10min. Inmediatamente después, y tras 2 lavados con PBS, incubamos las células durante 10min, con 0,2% Tritón en PBS.

El anticuerpo primario (CHD5 [H-185], Santa Cruz Biotechnology, INC.) fue diluido 1/100 en 5% BSA en PBS. La incubación con las células, se realizó durante 3 horas a temperatura ambiente, para luego retirar el exceso de anticuerpo mediante 4 lavados con 0,6% Tween en PBS.

Como anticuerpo secundario utilizamos un anti-conejo conjugado al fluoróforo Alexa fluor 488 (Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG [H+L], Invitrogen). Utilizamos una dilución de 1/1500 en 5% BSA en PBS, y una incubación durante 45min a temperatura ambiente. Luego, realizamos 4 lavados con 0,3% Tween en PBS, seguidos de 2 lavados con PBS.

Finalmente, realizamos el montaje cubriendo las células con 50% Glicerol, 300nM DAPI en PBS; y una vez transcurridos 5min, analizamos en microscopio de epi-fluorescencia.

#### Plásmidos para el ensayo de gen reportero

Para analizar la regulación específica que los miARN pueden ejercer sobre CHD5 a través de su 3'UTR, utilizamos un sistema de gen reportero en el que se introduce un fragmento del 3'UTR que incluya los sitios para los miARNs que se deseen evaluar, en un vector que expresa el gen de la Luciferasa de *Renilla reniformis* (psiCHECK™-2 Vector, PROMEGA). El sitio de poli-clonado del vector está ubicado de tal forma que permite que el fragmento insertado sea transcrito en el ARNm de la Luciferasa de *Renilla reniformis*, funcionando como su 3'UTR. En la figura 7 se esquematiza la estructura del vector.

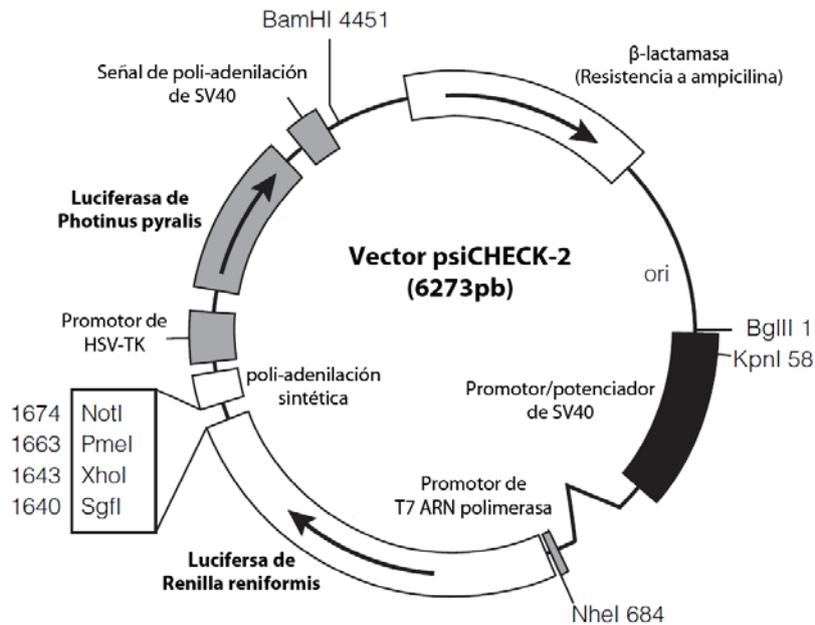


Figura 7. Vector psiCHECK™-2, PROMEGA. Esquema de la secuencia del vector en el que se integraron los distintos fragmentos del 3'UTR de CHD5. Se indican los elementos genéticos más relevantes.

Identificamos los sitios potencialmente más relevantes de los miARN miR-1201, miR-1202 y miR-1203, mediante análisis informático de la secuencia del 3'UTR de CHD5 con los programas TargetScan r6.2 ([http://www.targetscan.org/vert\\_61/](http://www.targetscan.org/vert_61/)), miRanda/mirSVR (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>). Evaluando conjuntamente los resultados obtenidos para cada programa, seleccionamos los sitios que fueron analizados. Su ubicación en el 3'UTR e interacción predicha con el miARN, se detallan en la tabla 7.

**Tabla 7. Sitios seleccionados; su ubicación en el 3'UTR, interacción predicha con el miARN y tipo de la misma**

Ubicación del sitio	Interacción predicha	Tipo de sitio	Puntaje Target Scan	Puntaje miRanda
CHD5 3'UTR (nt 1017-1023*) miR-1203	5' ...GCCUACCCUGCCCACCUCGGAG...3'       3' CUCGACGUAGGACCGAGGCC 5'	7mer-1A	-0,09	0,0002
CHD5 3'UTR (nt 1314-1338*) miR-1201	5' ACGGAG-ATGGGGAGCAGGTCAGGCC 3' :          :    3' AGTCTCGTACAC--AAATTAGTCCGA 5'	6mer/ 3' suplementario	**	-0,0002
CHD5 3'UTR (nt 1863-1869*) miR-1202	5' ...GCUCUGCGGUGCCUCCUGGCAA...3'       3' GAGGGGGUGACGUCGACCGUG 5'	7mer-1A	>-0,01	-0,0003
CHD5 3'UTR (nt 2087-2093*) miR-1201	5' ...CUGUGCGCCUCCUCUCAGGCAG...3'       3' AGUCUCGUACACAAAUAAGUCCGA 5'	7mer-1A	>-0,02	-0,0002
CHD5 3'UTR (nt 3020-3026*) miR-1202	5' ...UGGGUGGGGGCCGAGGUCGGCAC...3'       3' GAGGGGGUGACGUCGACCGUG 5'	7mer-m8	>-0,02	-0,0005
CHD5 3'UTR (nt 3448-3454*) miR-1202	5' ...CAGGCACAGCCCCAG---GCUGGCAA...3'           3' GAGGGGGUGACGUCGACCGUG 5'	8mer/ 3' suplementario	-0,33	-0,0005

\* Ubicación en el 3'UTR de CHD5

\*\* No predicho por este algoritmo

Una vez seleccionadas los sitios, delimitamos regiones del 3'UTR que los contuvieran y diseñamos cebadores que nos permitieron amplificar por PCR dichas regiones. En la tabla 8 se detalla la secuencia de los cebadores, el tamaño del fragmento que permiten amplificar y los sitios que contienen.

**Tabla 8. Fragmentos amplificados del 3'UTR**

Nombre/ Secuencia (5'-3')*	Largo (nt)	Posición en 3'UTR	Largo amplificado**	Sitios contenidos
<b>CHD5v1F (XhoI)</b> CCGCTCGAGAGGTGTGGTTAAGGGCAGTGAT	31	904-925	874pb	miR-1203 miR-1201
<b>CHD5v1R (NotI)</b> TTTTGGTTTTGCGGCCGCTCGGGCTGGCCTTGC	33	1736-1750		
<b>CHD5v2F (XhoI)</b> CCGCTCGAGTTCCTCTGGCGCATTCC	27	7658-7675	713pb	miR-1202 miR-1201
<b>CHD5v2R (NotI)</b> TTTTGGTTTTGCGGCCGCACCACTTTGGCAGAGATGACT	41	8329-8351		
<b>CHD5v3F (XhoI)</b> CCGCTCGAGCAGAAGCCAGATGGACTTGGTC	31	8888-8909	725pb	miR-1202 miR-1202
<b>CHD5v3R (NotI)</b> TTTTGGTTTTGCGGCCGCAAGGTGATTGTGGCTACAGC	41	9563-9585		

\* Los nucleótidos en naranja señalan el sitio de restricción

\*\* El largo amplificado refiere al largo del producto de PCR

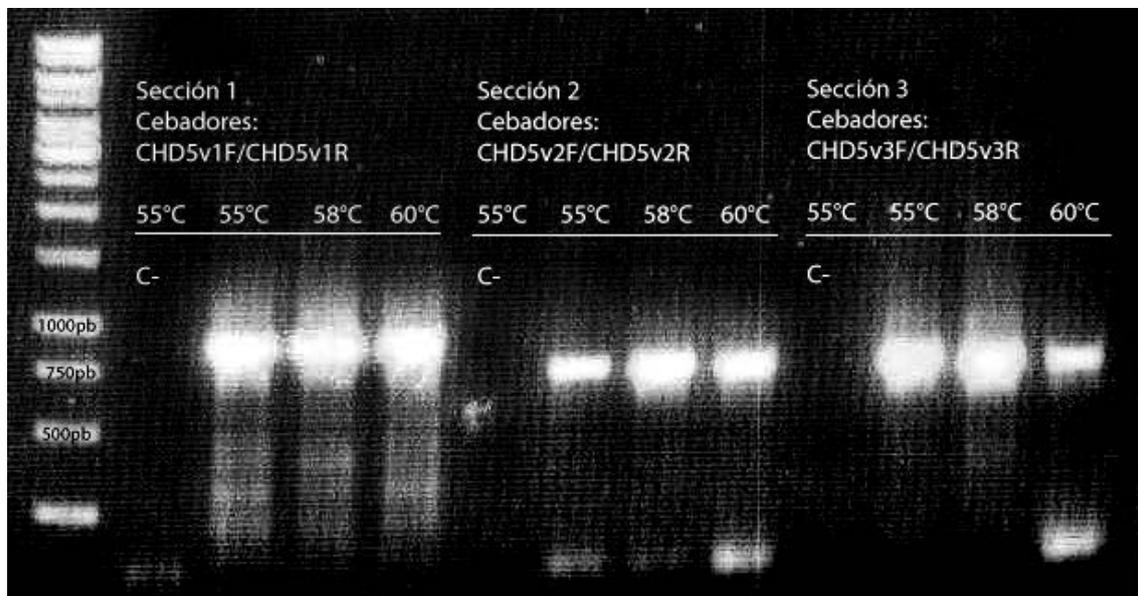
Para obtener los fragmentos, realizamos PCRs a partir de ADN genómico de células HeLa. La obtención de este material se realizó a partir de  $0,6 \times 10^6$  células HeLa cultivadas en las condiciones previamente detalladas. Utilizamos Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del

fabricante. Verificamos la pureza del material a través de su espectro de absorción por Nano Drop (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific). Consideramos como aceptable, un valor mayor de 1,7 para la relación OD A260/A280 y de 1,9 para la OD A260/A230. Evaluamos la integridad del ADN y la ausencia de ARN, sometiendo la muestra a electroforesis en gel de agarosa 0,7%. Almacenamos el material a -20°C.

En los ensayos de PCR utilizamos 0,4µg de ADN genómico en un volumen final de 50µl. Las condiciones de los reactivos fueron: 1X *buffer* taq, 0,3µM de cada cebador, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de cada dNTP y 0,5u de taq polimerasa (Taq DNA Polymerase, Recombinant, Fermentas). Las condiciones del ciclado se detallan en la tabla 9. Como vemos en la figura 8, los productos fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

**Tabla 9. Condiciones de ciclado para las PCR del 3'UTR de CHD5**

Temperatura (°C)	Tiempo	Repeticiones
95	5'	1
95	30''	
60	30''	35
72	1'	
72	5'	1



**Figura 8. PCRs del 3'UTR de CHD5.** PCR en gradiente de ADN genómico de células HeLa. Se utilizaron 10µl de cada reacción. Se indican los cebadores utilizados en cada caso, las temperaturas de *annealing* y los controles negativos (sin ADN molde).

A los efectos de permitir la inserción direccional de los fragmentos de 3'UTR en el vector, los cebadores fueron diseñados con sitios de restricción en sus extremos 5' (tabla 8). Los productos de PCR fueron purificados con QIAquick PCR

Purification Kit (Qiagen) y luego tratados con las enzimas de restricción XhoI (Thermo Fisher Scientific Inc.) y NotI (Thermo Fisher Scientific Inc.). Finalmente los fragmentos fueron ligados con T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific Inc.) al vector previamente tratado con las mismas enzimas.

Los plásmidos obtenidos fueron electroporados en *Escherichia coli* XL-1-Blue para su expansión y luego aislados mediante mini-preparación por lisis alcalina. Se verificó la correcta inserción de cada fragmento mediante tratamiento con la enzima de restricción KpnI (Thermo Fisher Scientific Inc.) y posterior electroforesis en gel de agarosa 1%.

#### Ensayo de gen reportero

Se co-transfectaron cultivos de células HeLa cultivadas en placas de 48 pocillos por duplicado, con cada oligorribonucleótido y cada uno de los 3 plásmidos generados como se describió en la sección anterior. El ensayo de transfección se llevó a cabo como se describiera anteriormente, con la salvedad de que en cada situación se utilizó 7,5pmol del correspondiente oligorribonucleótido sintético y 100ng del correspondiente plásmido.

A los efectos de normalizar los datos, el vector también codifica para la Luciferasa de *Photinus pyralis*. De esta forma los resultados obtenidos para cada situación representan el cociente entre los valores de las señales de ambas Luciferasas. La situación control para cada caso consistió en la transfección de cada vector sin la inclusión de los oligorribonucleótidos.

Una vez transcurridas las 24 horas post-transfección, las células fueron lavadas con PBS y lisadas con 65µl de *buffer* de lisis pasivo (Passive Lysis Buffer, Dual-Luciferase® Reporter Assay, PROMEGA). Para determinar la expresión del gen reportero y el gen normalizador, medimos la actividad de ambas Luciferasas utilizando Dual-Luciferase® Reporter Assay (PROMEGA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, en un luminómetro (LUMIstar OPTIMA, BMG LABTECH). Repetimos el ensayo completo 2 veces.

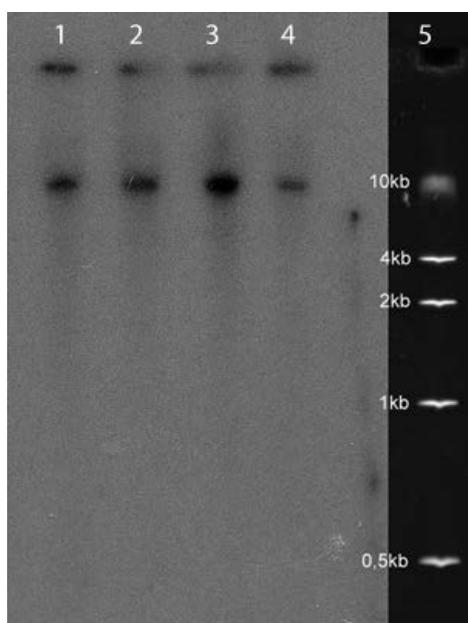
## Resultados

### 1. Puesta a punto de la detección de CHD5 a nivel de ARNm y proteína. Identificación de líneas celulares como modelo experimental.

Para definir las líneas celulares que empleamos como modelo, realizamos un análisis de la expresión de CHD5 dentro de un panel de líneas ya disponibles en nuestro laboratorio. Nos concentramos en las derivadas de tejido neural debido a que es allí donde se han reportado los mayores niveles de expresión de CHD5 [233].

Para la detección del ARNm recurrimos al *Northern blot* y a la amplificación por *nested PCR*.

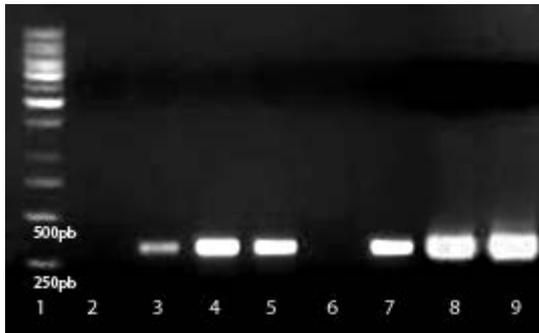
En los ensayos de *Northern blot* se utilizó ARN total de las líneas celulares HeLa, IMR-32, SK-N-SH y SK-N-BE[2]. En todas las muestras utilizadas detectamos una señal única correspondiente a 10kb aproximadamente, este tamaño se corresponde con el esperado para el transcrito. En la figura 9 se presenta el resultado de este ensayo.



**Figura 9. Northern blot del ARNm de CHD5.** Carriles: (1) HeLa; (2) IMR-32; (3) SK-N-SH; (4) SK-N-BE[2]; en el lugar correspondiente al carril 5 se acopló el resultado de una electroforesis en idénticas condiciones, de un marcador de peso molecular y cuya visualización se realizó con bromuro de etidio.

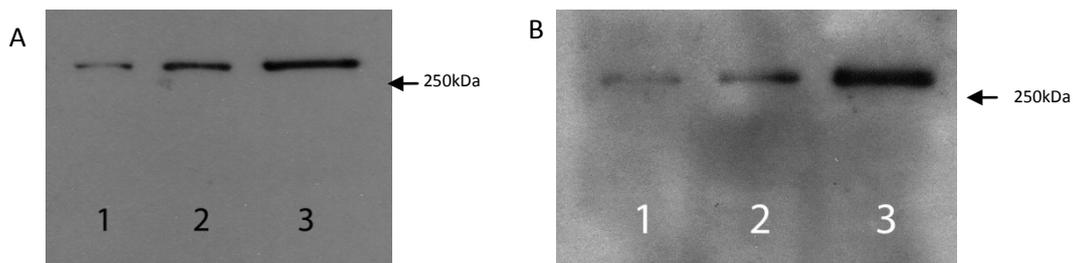
En los ensayos de *nested PCR* para la detección del ARNm de CHD5 se utilizó ADNc de las líneas celulares SK-N-AS, IMR-32, SK-N-SH, Jurkat, SK-N-BE[2], HeLa y Daudi. Se obtuvieron amplicones únicos y del tamaño esperado para todas las muestras de ADNc, con la excepción de Jurkat. En la figura 10 se

muestra una electroforesis de los productos de una *nested* PCR de CHD5. La identidad de los amplicones fue verificada por secuenciado.



**Figura 10. *Nested* PCR del ARNm de CHD5.** Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos del segundo ciclado de ensayos de *nested* PCR de CHD5. Se utilizaron 10 $\mu$ l de cada reacción. Carriles: (1) marcador de peso molecular, (2) control negativo, (3) SK-N-AS, (4) SK-N-IMR<sub>32</sub>, (5) SK-N-SH, (6) Jurkat, (7) SK-N-BE[2], (8) HeLa, (9) Daudi.

Para la detección de CHD5 a nivel proteico se realizaron ensayos de *Western blot* con varios anticuerpos comerciales. En la figura 11 vemos el resultado de dos de ellos en los que se aprecian bandas con un peso molecular aparente esperado.



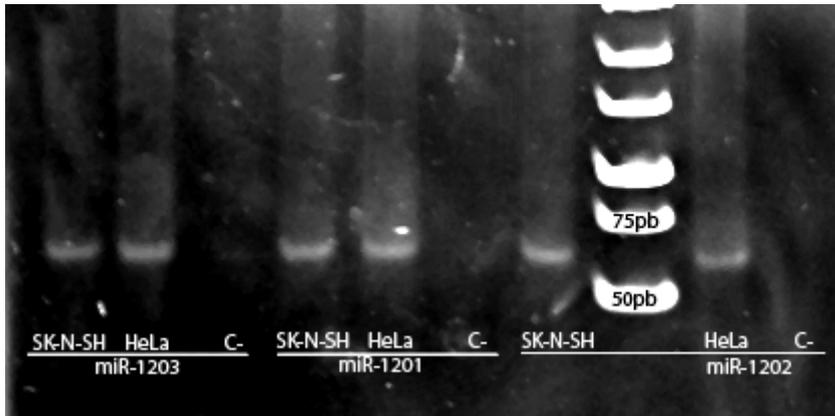
**Figura 11. *Western blot* de CHD5.** Se utilizaron extractos proteicos de cultivos de células SK-N-SH. A) Anti-CHD5, Abcam plc. (1) 15 $\mu$ g de extracto proteico, (2) 30 $\mu$ g, (3) 60 $\mu$ g. B) Anti-CHD5, Santa Cruz Biotechnology, Inc. (1) 15 $\mu$ g de extracto proteico, (2) 30 $\mu$ g, (3) 60 $\mu$ g.

A partir de los resultados de este análisis, seleccionamos como modelos experimentales a las líneas celulares HeLa y SK-N-SH, pues en ellas logramos la detección de CHD5 a nivel proteico. Esta última, es una línea celular tumoral humana derivada de tejido nervioso que fue aislada de un sitio metastásico en la médula ósea de un paciente con neuroblastoma, y no posee la delección 1p36[253].

## 2. Análisis de la expresión de los microARNs miR-1201, miR-1202 y miR-1203 en líneas de referencia (HeLa y SK-N-SH).

Realizamos la detección e identificación de los miARNs de interés por medio de su amplificación por PCR y el posterior secuenciado de los productos. En los ensayos de PCR para los miARNs miR-1201, miR-1202 y miR-1203; se obtuvieron amplicones mayoritarios cuyo tamaño se estimó en

aproximadamente 55pb. En la figura 12, podemos ver una electroforesis de los productos obtenidos.



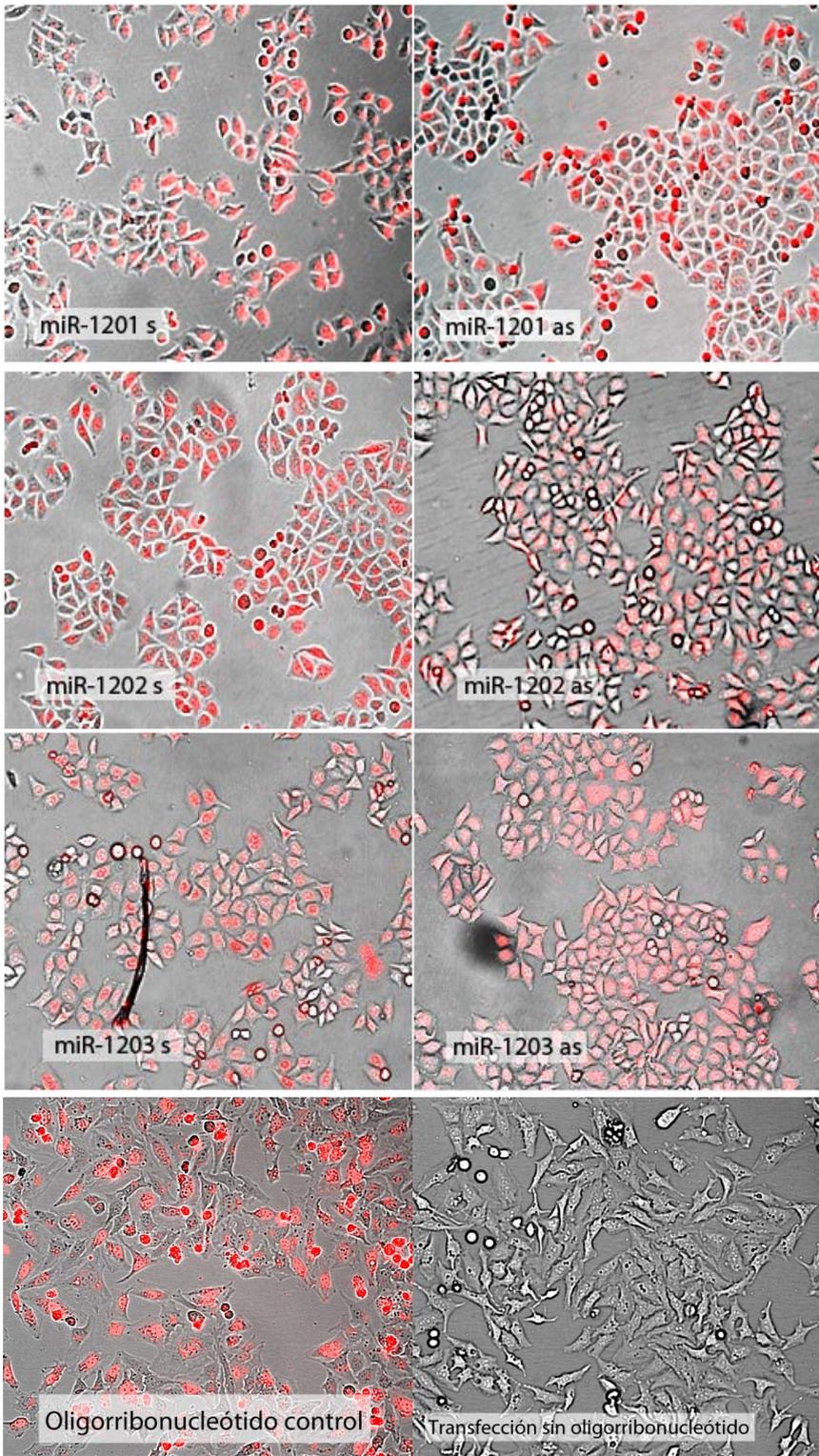
**Figura 12. PCR de los miARNs.** Electroforesis en gel de poliacrilamida 12% de los productos de PCR de los miARNs miR-1201, miR-1202 y miR-1203. Se usaron 10 $\mu$ l de cada reacción. En cada caso, se indica la línea celular del ADNc utilizado y el miARN amplificado; así como los controles negativos (C-).

Como se observa en la figura 12, los tres miARNs se expresan a niveles detectables tanto en HeLa como en SK-N-SH.

### 3. Transfección de los oligorribonucleótidos sintéticos

A lo largo de este estudio, investigamos el potencial oncogénico de los miARNs miR-1201, miR-1202 y miR-1203. Para ello, estudiamos en un sistema *in vitro*, el efecto de su expresión sobre uno de sus potenciales genes blanco (el supresor tumoral CHD5), sobre un supresor tumoral central (p53) y sobre propiedades celulares indicadoras de la oncogenicidad (las tasas de apoptosis y de proliferación). La estrategia utilizada como punto de partida para la mayoría de los ensayos, fue la de la alteración de los niveles de estos miARNs seguida de la evaluación de la respuesta del sistema. Para esto, transfectamos cultivos celulares con los oligorribonucleótidos sintético sentido y anti-sentido de forma tal de emular la sobreexpresión y la supresión de los miARNs respectivamente.

Como se observa en la figura 13 las condiciones experimentales permitieron lograr una eficiencia de transfección >80 % en todos los casos, sin afectación evidente de la morfología celular. De acuerdo a nuestra estimación realizada por simple observación, para el miR-1201 sentido (miR-1201s) se alcanzó una eficiencia del 90%; para el miR-1201 anti-sentido (miR-1201as), del 85%; para los oligosmiR-1202s, miR-1202as, miR-1203s y miR-1203as del 98%; mientras que para el oligorribonucleótido control fue del 85%.

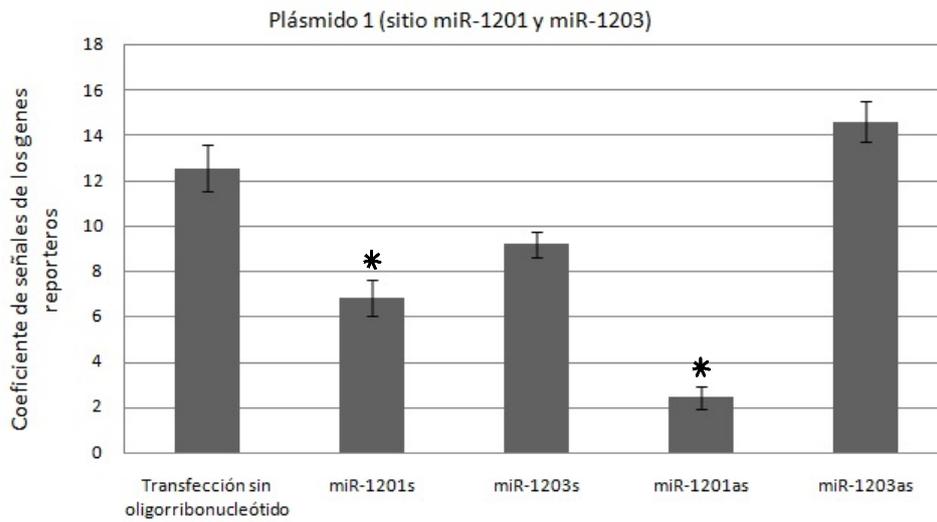


**Figura 13. Eficiencia de transfección de los oligorribonucleótidos.** Microscopía de epifluorescencia de células HeLa transfectadas con los oligorribonucleótidos sintéticos. Las imágenes fueron generadas de la superposición de una imagen de campo claro y una de la emisión de Cy3. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 10X.

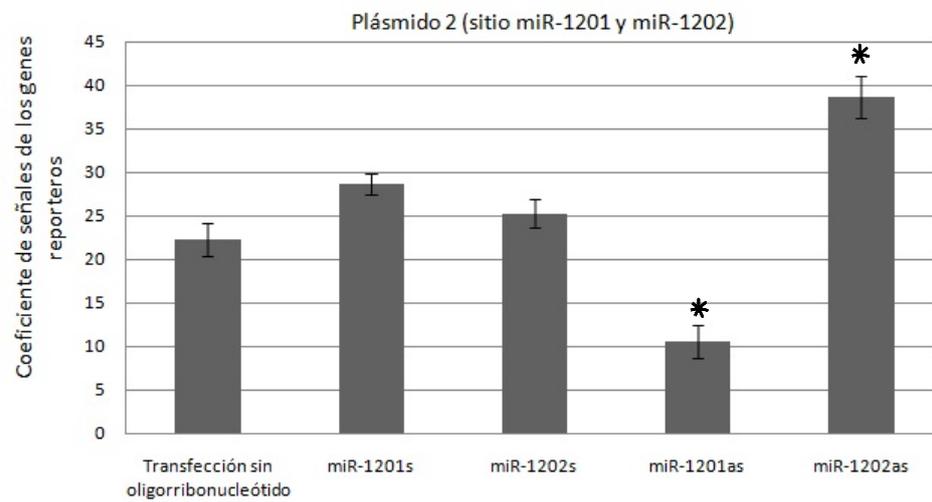
#### **4. Capacidad de los microARNs de regular a CHD5 a través de su 3'UTR.**

Para determinar la capacidad de los miARNs de regular la expresión de CHD5 a través de sitios de unión específicos en su 3'UTR, generamos, como se detallara anteriormente, 3 plásmidos que contienen como 3'UTR de un gen reportero, distintas regiones del 3'UTR de CHD5 que incluyen los distintos sitios de unión putativos de los miARNs en estudio. Al co-transfectar estos vectores con los oligorribonucleótidos sintéticos correspondientes y medir la expresión del gen reportero, pudimos testear el efecto de cada miARN sobre la expresión de CHD5. En la figura 15 se grafican todos los resultados del ensayo.

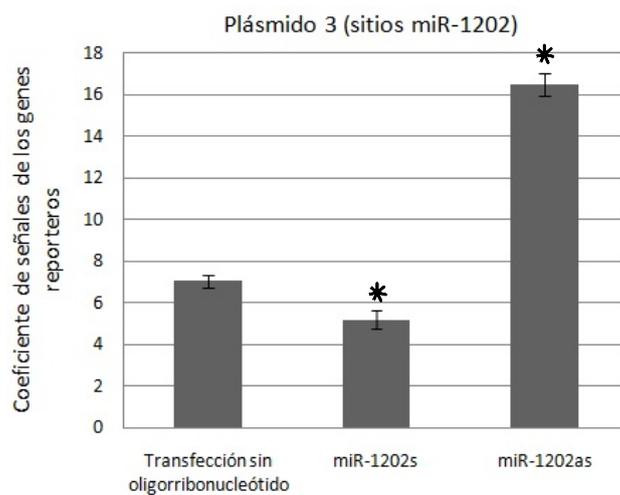
A



B



C



**Figura 15. Efecto de los miARN sobre el 3'UTR de CHD5.** Se grafica la relación de las señales de ambas Luciferasas, Luciferasa de *Renilla reniformis*/ Luciferasa de *Photinus pyralis*, para cada plásmido co-transfectado con cada oligo en células HeLa. Se indican los controles, cada oligo utilizado y el error típico en forma gráfica. A) Plásmido 1, B) Plásmido 2, C) Plásmido 3. \*: Indica una significancia con un p valor  $\leq 0,05$ , de acuerdo al test One-way ANOVA.

Para cada uno de los tres plásmidos, idealmente podemos esperar que los oligos sentido provoquen una disminución la señal del gen reportero al compararla con el respectivo control. En tanto, esperamos una respuesta opuesta frente a la co-transfección con los oligorribonucleótidos anti-sentido.

Como vemos en la figura 15-A, para el plásmido 1 (que abarca sitios para el miR-1201 y miR-1203), observamos una disminución de la señal en las situaciones en las que se utilizó el miR-1201s o el miR-1203s. Sin embargo, para los oligos anti-sentido, no observamos la respuesta esperada. En su lugar, el miR-1201as provocó una disminución de la señal y el miR-1203as no generó cambios significativos.

En el ensayo en el que utilizamos el plásmido 2 (que abarca sitios para el miR-1201 y miR-1202), no obtuvimos variaciones significativas en la señal cuando usamos miR-1201s o miR-1202s. Los resultados para los oligos anti-sentido fueron de una disminución para el miR-1201as y de un aumento para el miR-1202as. Estos datos se muestran en la figura 15-B.

Para el plásmido 3 (figura 15-C), el cual incluye 2 sitios para el miR-1202, los resultados obtenidos frente a la co-transfección con los oligos sentido o anti-sentido del miR-1202, fueron los esperados de acuerdo a nuestra hipótesis; ya que registramos una disminución de la señal para el miR-1202s y un aumento de la misma con el miR-1202as.

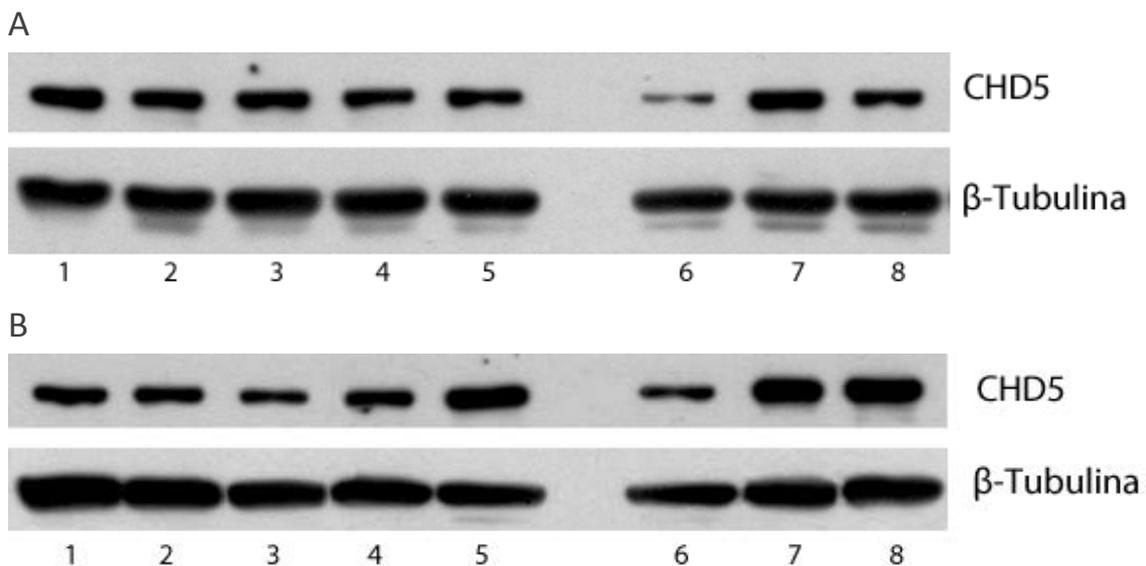
En resumen, los resultados obtenidos para el miARN miR-1202 indican que esta molécula puede ser capaz de actuar sobre ciertos sectores del 3'UTR de CHD5 provocando una regulación de la traducción del ARNm que la incluya. Los resultados para los miARNs miR-1201 y miR-1203 no son concluyentes pero tampoco permiten descartar, como se discute más adelante, la posibilidad de que puedan regular la expresión de este gen.

## **5. Capacidad de los microARNs de modificar la expresión de CHD5.**

Para evaluar la capacidad de los miARNs de modificar la expresión de CHD5, utilizamos nuevamente la transfección de los oligorribonucleótidos sintéticos en las condiciones detalladas anteriormente, para luego medir, por medio de *Western blot*, el nivel de CHD5. Los controles consistieron en cultivos celulares transfectados con el oligorribonucleótido control con las bases del miR-

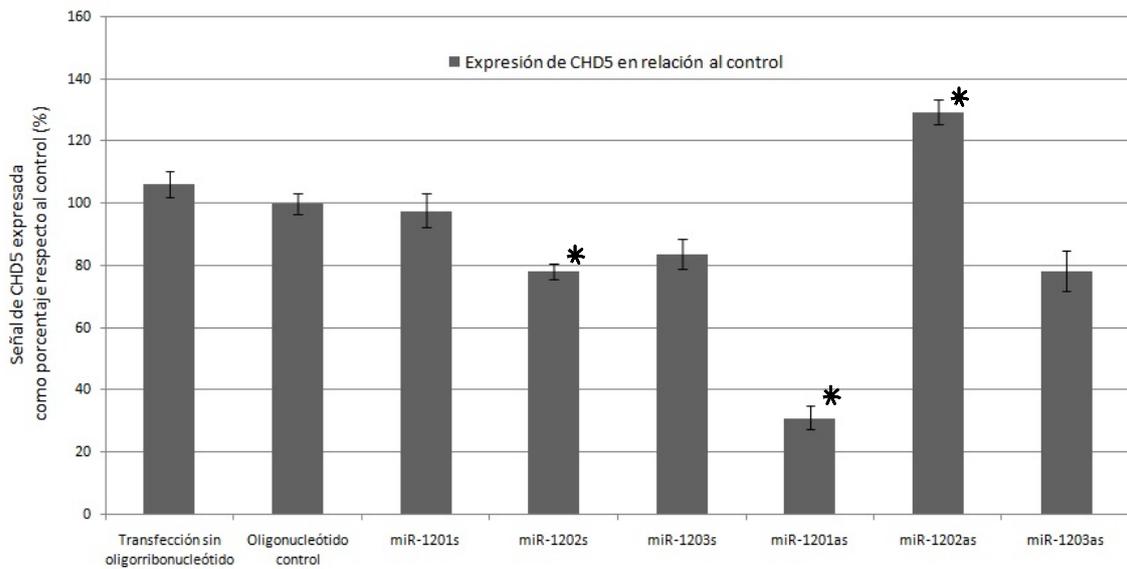
1202 en secuencia aleatoria y cultivos sometidos a transfección en la que no se incluyó oligorribonucleótido. En este caso, además de las células HeLa utilizamos SK-N-SH.

Las transfecciones se realizaron en frascos de cultivo de 75cm<sup>2</sup>, por triplicado. Luego de cultivarlas durante 72 horas para permitir su recuperación post-transfección, las mismas fueron cosechadas para luego evaluar la expresión de CHD5 por *Western blot* (figura 16). Como anticuerpo para el reconocimiento de CHD5, usamos ab66516 (Abcam plc). Como control de carga y para normalizar los datos, se utilizó la detección de la  $\beta$ -tubulina como gen de referencia. Como se ve también en la figura 16, la  $\beta$ -tubulina aparece con un peso molecular aparente esperado de 55kDa. La intensidad de las señales fue cuantificada mediante densitometría (GeneTools 3.07, Synoptics Ltd.) en valores relativos a la obtenida para la  $\beta$ -tubulina (figura 17).

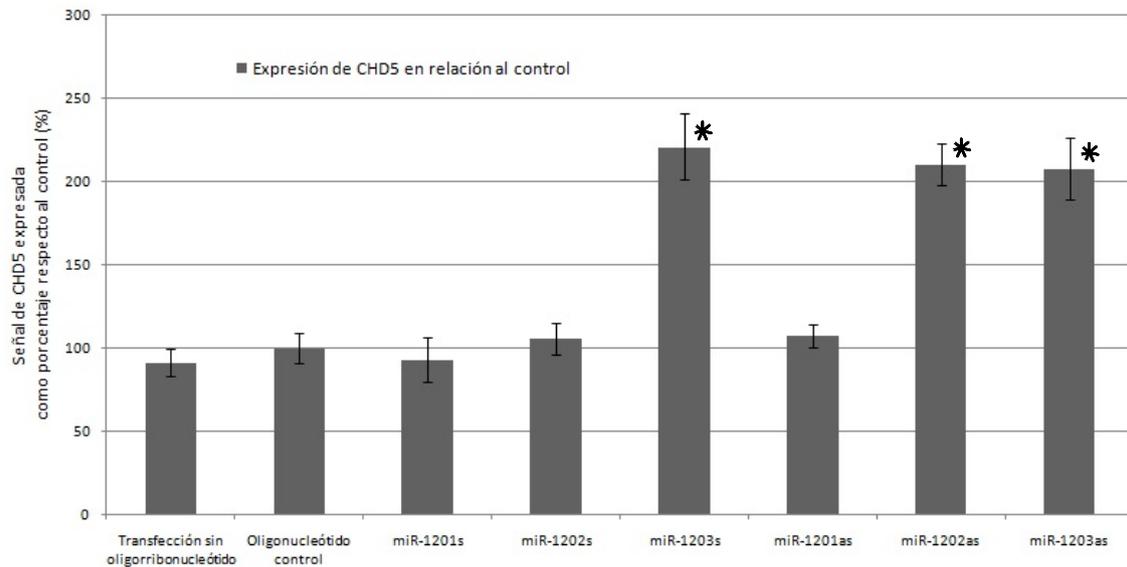


**Figura 16. Expresión de CHD5 y  $\beta$ -tubulina en células transfectadas con los oligorribonucleótidos sintéticos.** Utilizamos 60 $\mu$ g de proteína de cada muestra. A) Proteínas de células SK-N-SH. Carriles; 1) Control, transfección sin oligorribonucleótido; 2) Control, transfección del oligorribonucleótido control; 3) miR-1201s; 4) miR-1202s; 5) miR-1203s; 6) miR-1201as; 7) miR-1202as; 8) miR-1203as. B) Proteínas de células HeLa. Carriles; 1) Control, transfección sin oligorribonucleótido; 2) Control, transfección del oligorribonucleótido control; 3) miR-1201s; 4) miR-1202s; 5) miR-1203s; 6) miR-1201as; 7) miR-1202as; 8) miR-1203as.

A



B



**Figura 17. Densitometría de los *Western blot* para analizar la respuesta de CHD5 a la transfección con los oligorribonucleótidos sintéticos.** Se normalizaron los valores de acuerdo a la señal correspondiente a la expresión de  $\beta$ -tubulina. Se indica el oligorribonucleótido utilizado en cada caso. Los correspondientes valores de error típico también se representan para cada caso. A) Células SK-N-SH, B) Células HeLa. \*: Indica una significancia con un p valor  $\leq 0,05$ , de acuerdo al test One-way ANOVA.

En el análisis por densitometría del ensayo con las células SK-N-SH (figura 17-A), podemos observar cómo el oligo control no provoca cambios significativos en la expresión de CHD5 en comparación con el control de células transfectadas sin oligorribonucleótido. Como respuesta para los casos en los que utilizamos oligos sentido, esperamos una disminución de la expresión de CHD5. Este fue el resultado para el miR-1202s. El miR-1201s y el miR-1203s no generaron variación significativa. La respuesta que se esperaba para las situaciones en las que utilizamos los oligos anti-sentido es la de un aumento en la expresión de CHD5.

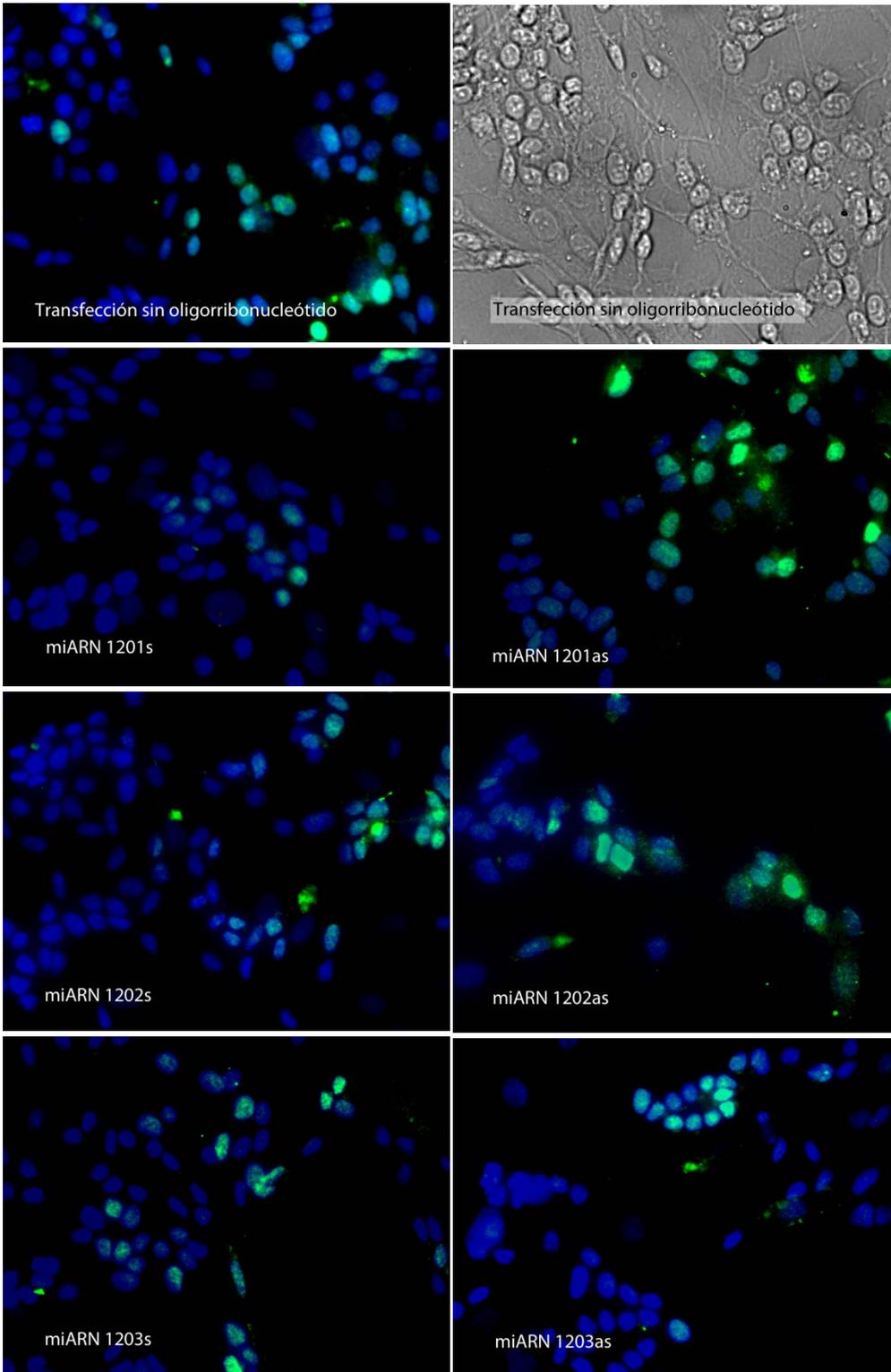
Este fue el resultado obtenido para el miR-1202as; en tanto, el miR-1201as y el miR-1203as generaron una disminución en la expresión.

Los resultados obtenidos en el análisis del ensayo en el que utilizamos células HeLa (figura 17-B), indican que, como esperamos, el oligorribonucleótido control tampoco provocó un cambio significativo en la expresión de CHD5. Para los oligos sentido, como se mencionó anteriormente, podemos esperar una disminución en la expresión de CHD5, sin embargo, el miR-1201s y el miR-1202s no provocaron cambios, y el miR-1203s generó un aumento de la expresión. Al utilizar los oligos anti-sentido buscamos generar un aumento del gen regulado, éste fue el resultado para el miR-1202as y para el miR-1203as, en tanto para el miR-1201as no detectamos diferencias significativas.

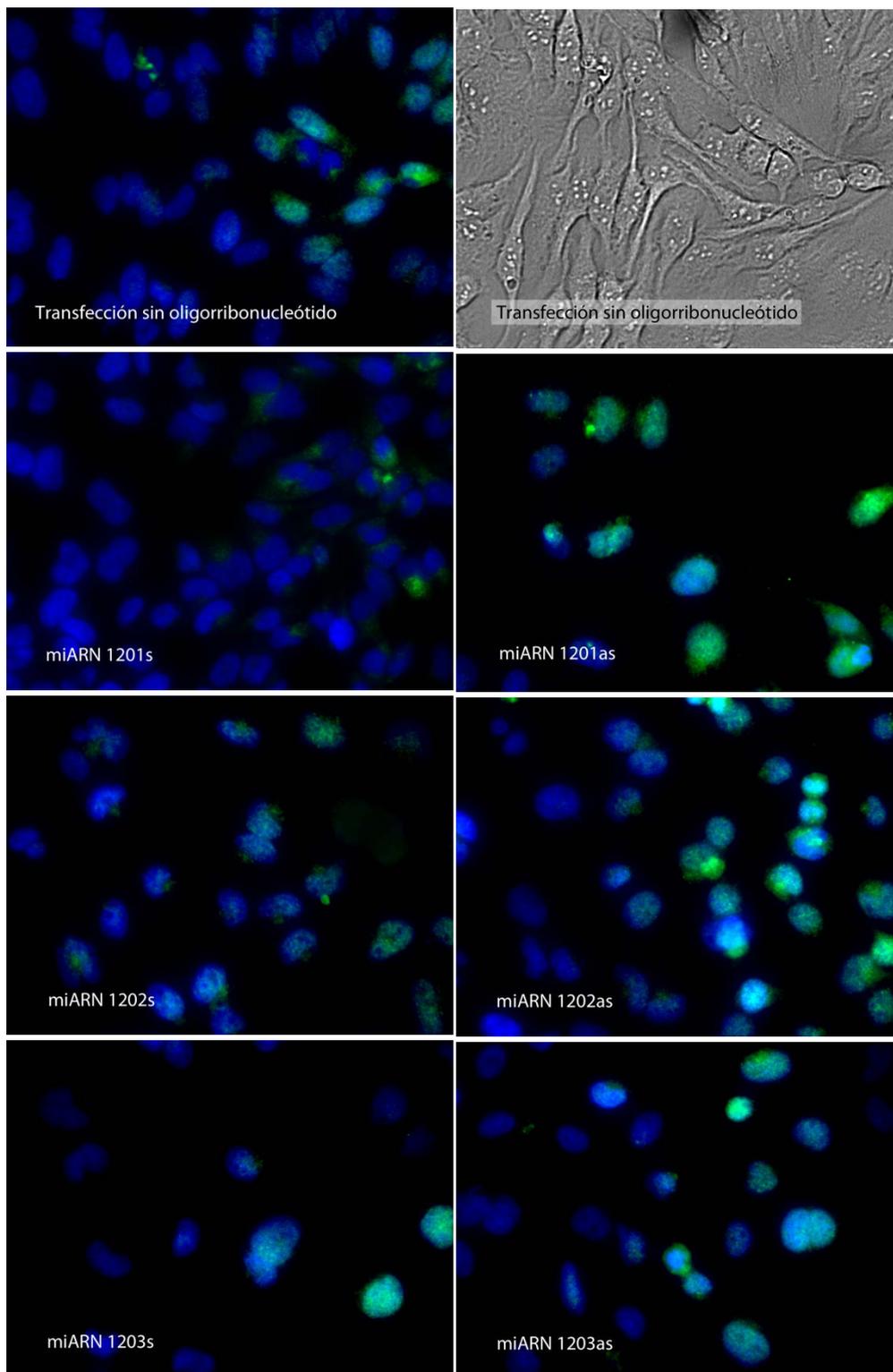
En suma, los resultados obtenidos para el miR-1202, coinciden con los efectos que se podría esperar para un miARN que posea como blanco al ARNm de CHD5.

Otra forma de medir la expresión de CHD5 como respuesta a la transfección de los oligorribonucleótidos sintéticos fue mediante inmunofluorescencia. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 18.

A



B



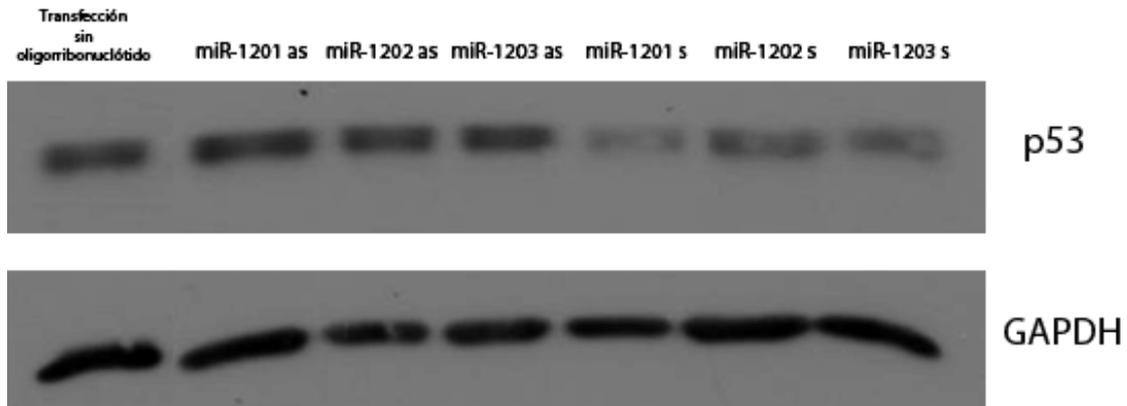
**Figura 18. Inmunofluorescencia de CHD5 de células transfectadas con los oligorribonucleótidos.** Microscopía de epi-fluorescencia. Aumento de 40X. Se combina la imagen tomada para la tinción con DAPI (azul) con la imagen de la señal de CHD5 (verde). También se muestra una imagen de campo claro correspondiente al control. En cada caso se indica el oligorribonucleótido utilizado. A) Células SK-N-SH. B) Células HeLa.

Como corresponde a lo reportado y a su función, CHD5 produce una señal nuclear, la cual se aprecia en la co-localización de la señal del fluoróforo Cy3 (verde) y la del DAPI (azul) [237, 254]. De acuerdo a los resultados obtenidos (figura 18), para ambos casos y comparando con el respectivo control; los oligos sentido provocaron una disminución tanto en la intensidad de la señal de CHD5, como en el porcentaje de células positivas. A su vez, los oligos anti-sentido provocaron un aumento en la expresión de CHD5, el cual se manifestó, de igual forma, en la intensidad de la señal y en el porcentaje de células positivas. De la misma manera que para los ensayos de *Western blot*, estos son los resultados que podríamos esperar para miARNs cuyo blanco sea CHD5.

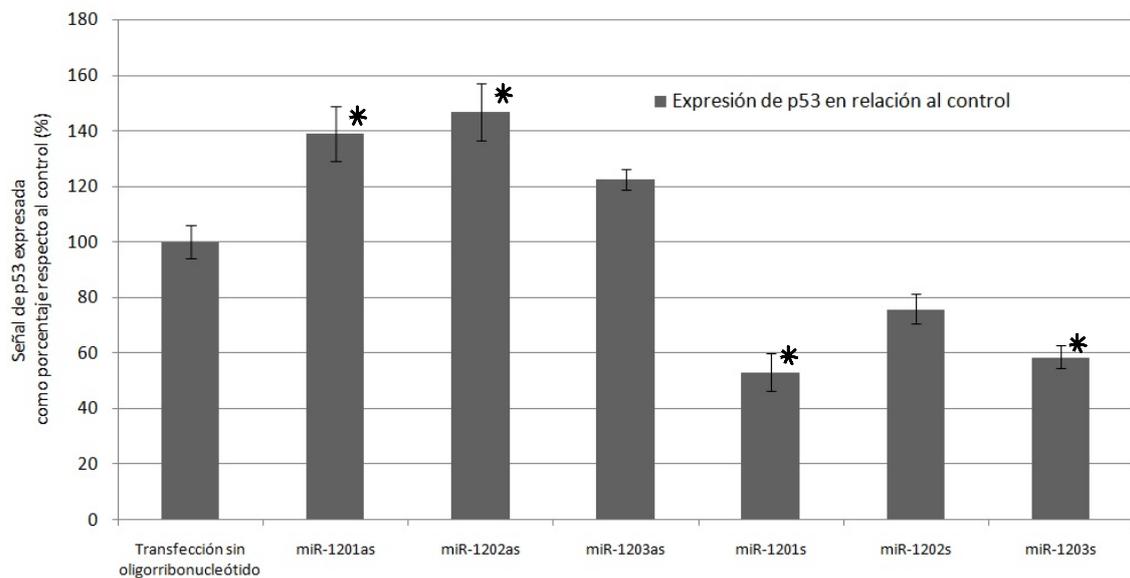
## **6. Capacidad de los microARNs de modificar la expresión de p53.**

Otra forma de investigar el potencial oncogénico de los miARNs, es evaluar su efecto sobre la expresión de un supresor tumoral clave, como lo es p53. A su vez, como mencionamos anteriormente, se ha propuesto a CHD5 como regulador de la expresión de este gen. Entonces, una alteración de los niveles de p53, frente a sobreexpresión o supresión de los miARNs miR-1201, miR-1202 y miR-1203, sería esperable bajo estos escenarios.

Para investigar esta posibilidad, realizamos transfecciones de los oligos sintéticos en células SK-N-SH cultivadas en frascos de 75cm<sup>2</sup>, por triplicado, para luego cosecharlas a las 72 horas post-transfección y aislar sus proteínas totales. Como control utilizamos células transfectadas sin oligorribonucleótidos. Finalmente, medimos el nivel de expresión de p53 por *Western blot*, normalizando los datos con la expresión de GAPDH. Como se observa en la figura 19, para el caso de p53 obtuvimos bandas de un peso molecular aparente de 53kDa, mientras que para GAPDH también logramos una banda única del peso molecular esperado, en este caso 37kDa. La intensidad de las señales fue cuantificada, nuevamente, mediante densitometría (GeneTools 3.07, Synoptics Ltd.) en valores relativos a la obtenida para la GAPDH (figura 20).



**Figura 19.** Expresión de p53 y GAPDH en células SK-N-SH transfectadas con los oligorribonucleótidos sintéticos. Utilizamos 60µg de proteína de cada muestra. Se indica la situación control, así como el oligorribonucleótido utilizado en cada caso.



**Figura 20.** Densitometría de los *Western blot* de la respuesta de p53 a la transfección con los oligorribonucleótidos sintéticos. Se normalizaron los valores de acuerdo a la señal correspondiente a la expresión de GAPDH. Se indica el oligorribonucleótido utilizado en cada caso. Los correspondientes valores error típico también se representan para cada caso. \*: Indica una significancia con un p valor <= 0,05, de acuerdo al test One-way ANOVA.

Podemos esperar que el aumento de la expresión de un miARN con potencial oncogénico, y cuyo blanco se encuentre dentro de una vía de regulación de la expresión de p53, provoque una disminución de la expresión de este supresor. A su vez, al suprimir su expresión utilizando su anti-sentido, esperamos un aumento en la expresión de p53. Como observamos en la figura 20, nuestros resultados, tanto para los oligo sentido como para los anti-sentido, coinciden plenamente con esta situación.

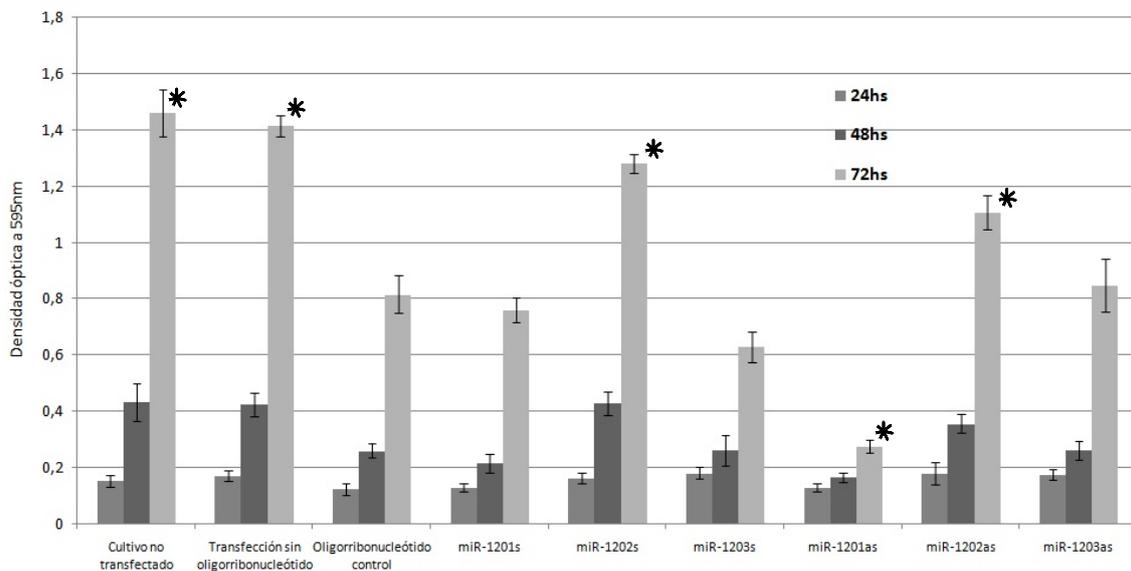
De acuerdo a estos indicios, podemos especular sobre la posibilidad de que los miARNs miR-1201, miR-1202 y miR-1203, actúen como oncomiRs

regulando la expresión de p53 a través de CHD5 u otro gen dentro de las vías que controlan la expresión de p53, por ejemplo p14ARF.

## 7. Capacidad de los microARNs de modificar la proliferación y muerte apoptótica *in vitro* sobre células SK-N-SH.

Ampliamos el estudio de los efectos de la sobreexpresión o supresión de los miARNs miR-1201, miR-1202 y miR-1203; transfectando los oligonucleótidos sintéticos en células de la línea SK-N-SH para luego evaluar su potencial oncogénico a través de las tasas de apoptosis y de proliferación.

Investigamos la influencia de los miARNs en la proliferación celular utilizando la técnica de Cristal Violeta. Como se puede ver en la figura 21, las mediciones a las 24 horas no mostraron diferencias significativas en su densidad óptica, mientras que las realizadas a las 48 horas exhibieron leves diferencias que se acentuaron a las 72 horas. El análisis de los resultados de este ensayo fue realizado a partir de los valores obtenidos a las 72 horas.



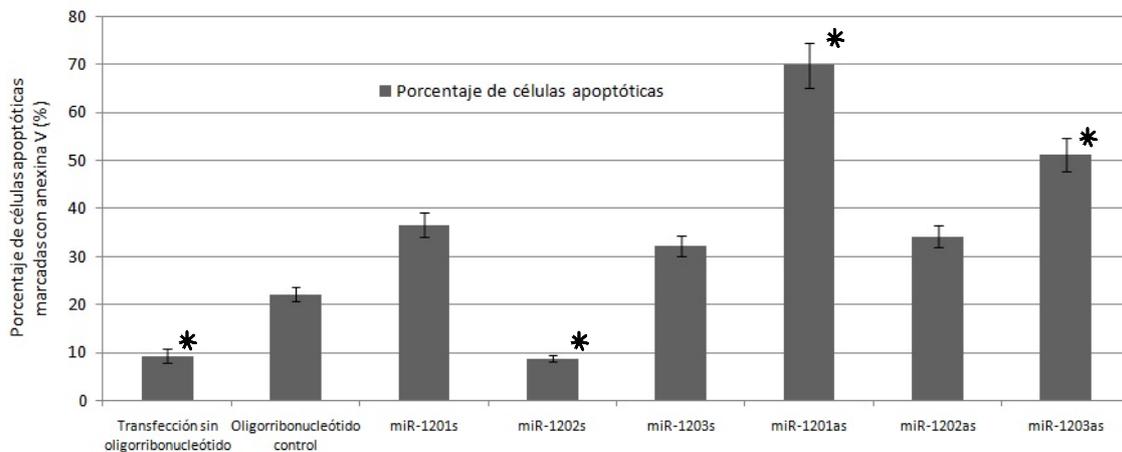
**Figura 21. Respuesta a nivel de la proliferación celular por Cristal Violeta.** Se grafica el valor D.O. a 595nm con su correspondiente error típico, obtenido para de cada muestra transcurrido cada tiempo. \*: Indica una significancia con un p valor  $\leq 0,05$ , de acuerdo al test One-way ANOVA.

Observando los resultados obtenidos para la transfección con el oligorribonucleótido control, y comprándolos con los correspondientes al control sin oligorribonucleótido, vemos que la introducción de este material genera una disminución significativa de la proliferación, la cual consideramos como

inespecífica, por lo que los resultados tienen como referencia a los valores de esta situación.

De acuerdo a las respuestas esperadas para los oligos sentido (aumento de la proliferación) sólo el miR-1202s mostró un aumento significativo, mientras que el miR-1201s no evidenció variaciones significativas y el miR-1203s indujo un leve descenso en los valores. La respuesta esperada para un oligo anti-sentido es la de una disminución en la proliferación. En nuestros resultados, el miR-1201as fue el único que provocó una variación en ese sentido. El miR-1202as generó un aumento en la proliferación, mientras que el miR-1203as no causó alteraciones.

Para evaluar la influencia de los miARNs en la apoptosis, se transfectaron nuevamente los oligonucleótidos sintéticos en cultivos de la línea SK-N-SH para luego realizarse una marcación con Anexina V conjugada a ficoeritrina. La detección en este ensayo se realizó mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se grafican en la figura 23.



**Figura 22. Respuesta a nivel de apoptosis por Anexina V.** Se grafica el valor del porcentaje de células apoptóticas con su correspondiente error típico, observado para cada muestra. \*: Indica una significancia con un p valor  $\leq 0,05$ , de acuerdo al test

Al comparar los valores obtenidos en la situación en la que se utilizó el oligorribonucleótido control con la situación en la que no se incluyó material genético, vemos que la introducción de este material genera un leve pero significativo aumento en la tasa de apoptosis. De la misma forma que para el análisis de los resultados del estudio de proliferación celular, los valores del resto de las muestras fueron considerados en relación a ésta.

En el caso de los oligos sentido, esperamos una disminución del porcentaje de células apoptóticas. Este fue el resultado para el miR-1202s; en tanto, para el miR-1201s y miR-1203s no se observaron diferencias significativas.

La respuesta esperada para un oligo anti-sentido es la del aumento en la tasa de apoptosis. En nuestro ensayo pudimos observar este efecto para los 3 oligos anti-sentido.

En conjunto, estos resultados aportan indicios que apoyan la hipótesis de que estos miARNs poseen potencial oncogénico; destacándose nuevamente, los obtenidos para el miR-1202, los cuales sugieren que su potencial oncogénico podría estar mediado al menos en parte por CHD5.

## Discusión

En un trabajo previo de nuestro grupo se reportaron 4 nuevos miARNs asociados a células-B de pacientes con LLC [227]. Las condiciones de su hallazgo abrió la interrogante de si estos miARNs podrían tener un rol en LLC u otras neoplasias. A través de un análisis bioinformático preliminar se determinaron sus posibles ARNm blanco. Llamativamente, buena parte de los ARNm obtenidos mapeó en la región cromosómica 1p31-1p36, la cual está frecuentemente *deletada* en numerosas neoplasias [227, 228].

Si bien esto es consecuente con la posibilidad de que los mencionados miARNs posean propiedades oncogénicas, es necesario investigar su potencial oncogénico así como establecer el mecanismo subyacente. Para esto es indispensable indagar detalladamente en la identidad de sus potenciales blancos y validar experimentalmente su relación. CAMTA1, TNFRSF25, HES2, HES3, RUNX3, PRDM16 y CHD5 son ejemplos de estos potenciales blancos ubicados en la mencionada región asociada al cáncer. La desregulación de cada uno de estos 7 candidatos ha sido vinculada al cáncer; incluso, CAMTA1, TNFRSF25 y HES2 son candidatos a supresores tumorales, por lo que la demostración de un nuevo mecanismo mediante el cual puedan estar siendo inactivados sería de gran relevancia [232, 255-259]. Sin embargo, como mencionamos, el rol de CHD5 como supresor tumoral y bio-marcador es ampliamente aceptado y se manifiesta en un gran número de neoplasias [231, 239, 242, 260]; a la vez que es un potencial blanco compartido por 3 de nuestros miARNs (miR-1201, miR-1202 y miR-1203) [227]. Más allá de su rol en neoplasias de diversos orígenes, CHD5 presenta un perfil de expresión tejido-específico, siendo esta una típica característica de los genes regulados por miARNs. A su vez, el 3'UTR del ARNm de CHD5 es notablemente extenso, lo cual es otro indicio de que pueda estar sometido a este tipo de regulación [59].

Es así que tomando estos elementos en conjunto, nos propusimos explorar la hipótesis de que los antedichos miARNs poseen la capacidad de regular la expresión de CHD5, como primera etapa de la caracterización de los mismos.

En primer lugar analizamos un panel de líneas celulares para evaluar la expresión de CHD5 y así seleccionar nuestros modelos experimentales.

Logramos detectar a CHD5 a través de su ARNm mediante *Northern blot* y/o PCR en HeLa, IMR-32, SK-N-SH, SK-N-BE[2], Daudi y SK-N-AS; a la vez que la detectamos a nivel proteico en HeLa y SK-N-SH. La expresión en HeLa y SK-N-SH ya había sido reportada en estudios previos aunque en niveles escasos [233, 254]. En uno de dichos estudios los autores no lograron detectar el ARNm de CHD5 en las líneas SK-N-BE[2] y SK-N-AS [233]. Esta discrepancia puede explicarse por la metodología utilizada, ya que los autores de dicho trabajo realizaron PCR mientras que en nuestro laboratorio implementamos *nested* PCR, la cual posee mayor sensibilidad.

En una siguiente instancia de determinación y caracterización de nuestros modelos de trabajo, logramos detectar la expresión de los miARNs de interés en las líneas HeLa y SK-N-SH. De esta forma reportamos nuevos sistemas en los que estos miARNs están presentes. Esto es importante dado que hasta el momento han sido escasamente estudiados y sólo se los ha reportado mediante la investigación realizada en nuestro laboratorio en células B de pacientes con LLC y en un estudio de secuenciado masivo de pequeños ARNs en distintos tipos de cáncer cervical y cuello uterino normal [227, 261].

Seleccionamos como modelo de estudio a las líneas celulares HeLa y SK-N-SH pues en ellas detectamos a CHD5 a nivel proteico y a nuestros miARNs. A su vez, HeLa es un modelo ampliamente utilizado para la co-transfección de plásmidos y pequeños ARNs; mientras que SK-N-SH es una línea derivada de neuroblastoma, neoplasia en la que CHD5 tiene un rol clave [253, 262-264]. Otra ventaja de la línea SK-N-SH es que en ella la vía de p53 es funcional, permitiéndonos analizar las propiedades oncogénicas de los miARNs mediante el estudio los niveles de dicha proteína y las propiedades celulares gobernadas por la misma.

Mediante los ensayos de gen reportero estudiamos la funcionalidad y la eficacia de varios de los sitios que posee el 3'UTR de CHD5 para los miARNs miR-1201, miR-1202 y miR-1203 los cuales fueron predichos informáticamente.

Mediante el uso del plásmido 1, intentamos probar un sitio de tipo 7mer-1A para el miR-1203 y un sitio 6mer 3'suplementario para el miR-1201 que solo fue predicho por el algoritmo miRanda.

Con el oligorribonucleótido miR-1201s obtuvimos una disminución de la señal del reportero de un 46% con respecto a la situación en la que se transfecta únicamente el plásmido 1. Esta respuesta es consecuente con la funcionalidad de este sitio. Sin embargo, no detectamos un aumento esperable de la señal con la transfección del miR-1201as.

Similares resultados obtuvimos para la situación en la que sometimos a prueba el sitio para el miR-1203 mediante la transfección con los oligos miR-1203s o miR-1203as. En este caso tampoco tuvimos indicios favorables a la funcionalidad del mismo, ya que si bien el oligo sentido provocó una disminución de la señal (27%), el oligo anti-sentido no generó un aumento significativo de la señal respecto a la situación en la que utilizamos solo el plásmido 1.

El plásmido 2 contiene un fragmento del 3'UTR de CHD5 en el que se predijo un sitio 7mer-1A para el miR-1201 y otro del mismo tipo para el miR-1202. La transfección tanto del oligo miR-1201s como de su anti-sentido provocó cambios que contradicen la posibilidad de que el sitio predicho sea funcional. Al utilizar el miR-1202as registramos un aumento del 78% de la expresión del gen reportero con respecto a la situación en la que solo se utilizó el plásmido. Este resultado es un indicio en favor de la actividad del miR-1202 a través del sitio incluido. Aunque la transfección del oligo sentido no produjo cambios significativos en la expresión del reportero, esto puede deberse a que la regulación esté limitada por los niveles del miR-1202 endógeno.

En el fragmento de 3'UTR con el que construimos el plásmido 3, están incluidos 2 sitios para miR-1202, uno del tipo 7mer-8m y otro 8mer. La co-transfección de este plásmido con el oligo miR-1202s provocó una disminución de la señal del 26% respecto a la del plásmido 3. A su vez, cuando utilizamos el oligo miR-1202as observamos un aumento de la expresión del gen reportero del 134%. Si bien hasta el momento no podemos discriminar el aporte de cada uno de estos sitios, ambos resultados sustentan la posibilidad de que al menos uno sea funcional. Estos datos concuerdan con las predicciones bioinformáticas, ya que de todos los sitios para nuestros miARNs en el 3'UTR de CHD5, los incluidos en el plásmido 3 son los que tienen mejor puntaje en las predicciones de los algoritmos TargetScan y miRanda (tabla 7).

Estos resultados aportan más indicios acerca de la posible funcionalidad y eficacia de los sitios estudiados, sin embargo no permiten confirmarla o descartarla. Esto se debe a que, de acuerdo a nuestro diseño, al generar nuestros plásmidos decidimos, debido a su gran longitud y para minimizar la posibilidad del enmascaramiento de los resultados por la influencia de otros miARNs, utilizar fragmentos del 3'UTR de CHD5. Esto puede dar lugar a la alteración de la actividad sobre los sitios a través de la modificación de estructuras secundarias del ARNm y/o simplemente el cambio en la posición relativa al largo del 3'UTR[59].

Otro aspecto que debemos tener en cuenta de cara a la confirmación de la funcionalidad de estos sitios, es la demostración de que la respuesta generada en el gen reportero se debe a la interacción directa con la molécula del miARN. Esto puede lograrse contrastando los resultados con los obtenidos con un plásmido en el que se incluya la misma secuencia pero con mutaciones a nivel específico de la secuencia de cada sitio [262].

Finalmente, a la hora de interpretar los resultados obtenidos para los oligos sentido, debe considerarse que actualmente existen métodos más eficientes a la hora de simular la sobreexpresión de un miARN que la que seleccionamos en nuestro diseño. Se ha observado por ejemplo, la incorporación de ARN simple hebra al complejo miRISC de forma muy ineficiente, limitando el alcance de esta técnica [265-269]. Esto pudo repercutir en una sub-estimación del efecto de los oligos sentido sobre sus sitios blanco. En la mayor parte de las investigaciones se utilizan shARNs, miARNs imitadores, o plásmidos que expresen los precursores de los miARNs [270, 271].

Para profundizar en el análisis de la relación de los miARNs miR-1201, miR-1202 y miR-1203 con la expresión de CHD5, sumamos otras aproximaciones experimentales. Partiendo de la alteración de los niveles de los miARNs por medio de la transfección de los oligorribonucleótidos sintéticos, como ya describiéramos, analizamos la respuesta en la expresión de CHD5 mediante *Western blot* e inmunofluorescencia. A su vez, ampliamos nuestro modelo de estudio incluyendo la línea celular SK-N-SH.

A través del *Western blot* y en relación al miR-1202, obtuvimos resultados que concordaron con los indicios observados en los ensayos de gen reportero. El

oligorribonucleótido miR-1202s provocó una disminución del 22% en la expresión de CHD5 en SK-N-SH y no modificó la expresión en el caso de HeLa. A su vez, con el oligo anti-sentido miR-1202as, registramos un aumento de la expresión de CHD5 respecto al control, del 29% en SK-N-SH y del 110% en HeLa.

La diferencia entre la magnitud de las respuestas entre ambas líneas celulares puede estar dada por diferencias tanto de los niveles de expresión del miR-1202 endógeno como por los de los demás ARNm blanco que puedan competir. En tanto, las diferencias con respecto a la respuesta en los ensayos del gen reportero pueden tener origen, como ya mencionamos, en las alteraciones que puede ocasionar incluir fragmentos parciales del 3'UTR. Esto también implica, y puede ser relevante para este caso, que en un sistema en el que participa el 3'UTR en toda su extensión, todos los sitios se encuentran disponibles permitiendo la sumatoria de su efecto [59].

Más allá de las diferencias, la intensidad de los cambios en la expresión provocados por los oligos miR-1202s y miR-1202as en ambas aproximaciones experimentales, se encuentra dentro los niveles esperables para una regulación por miARNs. Típicamente, un miARN ocasiona una disminución de la proteína del 30% [96].

En este ensayo, los oligorribonucleótidos sentido y anti-sentido de los miR-1201 y miR-1203, generaron datos discordantes entre ambas líneas y con respecto al ensayo del gen reportero. Estos efectos podrían estar dados por interacciones con otros ARNm blanco pero no sustentan la posibilidad de que los sitios predichos sean funcionales. La situación del oligo miR-1201as es particular pues consistentemente provocó disminución tanto del gen reportero como de CHD5 en ambas líneas celulares. Si bien se trata de una respuesta opuesta a la esperada para un oligo antagonista de un miARNs, hemos buscado posibles sitios de interacción en los fragmentos de 3'UTR seleccionados pero no los hemos encontrado. Una posible explicación puede estar dada por el fuerte efecto en la viabilidad que genera, el cual si bien comienza a manifestarse fenotípicamente en horas más avanzadas post-transfección, es posible que altere los patrones globales de expresión de forma tan profunda que provoque este tipo de artefacto en los resultados.

Otra estrategia que podría abordarse para esclarecer aun más la vinculación entre estos miARNs y CHD5 es analizar la respuesta a nivel de la estabilidad de su ARNm. Tradicionalmente se aceptó que en animales, el efecto de la regulación por parte de miARNs era el de la inhibición de la traducción sin degradación del ARNm. Sin embargo, en los últimos años ha aumentado la evidencia en torno a que, si bien no es común el corte del mensajero a nivel del sitio blanco, la desestabilización del ARNm con una correspondencia en los niveles de proteína podría ser un fenómeno ampliamente extendido [11].

Los resultados obtenidos evaluando la respuesta de CHD5 mediante inmunofluorescencia para el miR-1202 fueron concordantes con los de las restantes aproximaciones tanto en la línea HeLa como en SK-N-SH. Incluso en la línea HeLa el miR-1202s produjo una disminución de la señal de CHD5. Si bien esto implica una discrepancia con lo observado en el *Western blot*, la misma puede deberse a la diferencia de sensibilidad de estas técnicas sumado a que ninguna de las dos es enteramente cuantitativa.

Si bien los resultados obtenidos mediante este ensayo con los restantes oligos (sentido y anti-sentido de miR-1201 y miR-1203) agregan indicios a favor de una posible regulación de CHD5, debemos medirlos con cautela por su discrepancia con los generados en las demás experiencias.

A su vez, dada la potencial relevancia de los niveles de expresión de los miARNs endógenos, creemos que la transferencia de estos ensayos a un modelo celular en el que se exprese CHD5 pero no se detecte la expresión de los miARNs endógenos podría contribuir a esclarecer los resultados.

Posteriormente investigamos la respuesta de p53 frente a los cambios en los niveles de los miARNs. p53 es regulado positivamente por CHD5 por lo que un cambio en su nivel de expresión aportaría mayor evidencia a favor de la regulación que estos miARNs ejercen sobre CHD5 o al menos de su potencial oncogénico[231, 260]. Utilizamos la línea SK-N-SH pues HeLa no expresa p53 de manera estable y funcional.

Respecto al control, cuando transfectamos cada oligo sentido registramos una disminución en la expresión de p53, mientras que medimos un aumento de la misma en los casos que utilizamos cada oligo anti-sentido. Con miR-1201s,

miR-1202s y miR-1203s registramos aumentos de p53 del 39%, 47% y 22% respectivamente; mientras que para miR-1201as, miR-1202as y miR1203as obtuvimos disminuciones del 47%, 24% y 41% respectivamente. Estos resultados son esperables para moléculas con potencial oncogénico.

De acuerdo a nuestros resultados tomados en conjunto, miR-1202 podría actuar sobre p53 a través de CHD5. Sin embargo, no podemos aportar elementos respecto al mecanismo subyacente a los efectos de miR-1201 y miR-1203. De acuerdo a los análisis mediante TargetScan y miRanda, p53 no es blanco directo de ninguno de los 3 miARNs y tampoco identificamos dentro de la lista de potenciales blancos ningún otro gen que hasta el momento haya sido descrito como regulador de p53 río arriba. Sin embargo, la regulación directa de p53 por parte de estos miARNs no debe ser descartada, ya que puede estar mediada por mecanismos no considerados en los algoritmos utilizados y que en los últimos años están cobrando relevancia, como la que tiene lugar por sitios no convencionales como los llamados “centrales” o los sitios en el ORF [59, 97, 272-274]. Dada la potencial relevancia de este efecto, sería de gran interés profundizar el análisis explorando las posibilidades mencionadas junto con las que impiden descartarlos como reguladores de CHD5 y que se establecieron anteriormente.

En una etapa final, abordamos directamente el estudio del potencial oncogénico de los miARNs miR-1201, miR-1202 y miR-1203. Evaluamos la posibilidad de que las alteraciones en los niveles de los mismos en células SK-N-SH, puedan tener efectos en las tasas de apoptosis y/o proliferación. La aproximación que elegimos para modificar los niveles de los miARNs fue la misma que hemos descrito para los demás ensayos. Incorporamos, como control, un oligorribonucleótido con la misma composición de bases que el miR-1202 pero en secuencia aleatoria.

En el análisis de la respuesta a nivel de la tasa de la proliferación, para el oligo miR-1202s, detectamos un aumento del 57% respecto a la situación en la que utilizamos el oligorribonucleótido control y una disminución no significativa respecto a la situación en la que no utilizamos oligorribonucleótidos. Esta respuesta es la que podríamos esperar para un miARN con propiedades oncogénicas. Sin embargo, para el miR-1202as obtuvimos un aumento del 36%

respecto al oligo control; este valor aunque menor a los obtenidos para las situaciones en la que no se utilizó oligo y la que se utilizó el miR-1202s, no es concordante con los esperados para la disminución del efecto de un miARN con propiedades oncogénicas. Las posibles explicaciones de esta respuesta no son claras y podría deberse a efectos inespecíficos o interacciones no convencionales del oligo miR-1202as o el oligo control con otros blancos. Esto podría dilucidarse utilizando adicionales moléculas control con nuevas secuencias aleatorias y/o practicar la disminución del miR-1202 endógeno mediante otros mecanismos como las “esponjas” de miARNs o “señuelos”, por ejemplo el sistema TuD (acrónimo del inglés *Trick Decoy*) [275, 276]. Estos mecanismos se basan en el hecho de que la interacción miARN-ARNm es altamente dependiente de la concentración [277]. Consisten en transcritos artificiales que poseen sitios para los miARNs que se desea analizar, estos transcritos compiten por el repertorio de RISC cargados con miARNs capaces de interactuar con esos sitios de forma tal que los “secuestran”, logrando efectos similares a los de una supresión pero sin saturar la maquinaria de silenciamiento [262, 278, 279].

Con el oligorribonucleótido miR-1201as registramos una disminución de la tasa de proliferación del 66% respecto al valor obtenido para el oligo control. Sin embargo, para el miR-1201s no detectamos diferencias significativas; y aunque esta situación en particular podría explicarse por elevados niveles del miR-1201 endógeno, no sería concordante con los demás resultados obtenidos para esta molécula. Para los restantes oligos obtuvimos respuestas no esperadas (disminución del 23% para miR-1203s) y ausencias de variaciones significativas (miR-1203as).

En los ensayos en los que evaluamos el efecto de los miARNs sobre la tasa de apoptosis, obtuvimos, para el oligo miR-1202s, una disminución del 60% de la tasa de apoptosis respecto al valor del oligo control. A su vez, con el miR-1202as registramos un aumento del 54% de la misma. Ambos resultados son los esperables si consideramos al miR-1202 como un miARN con propiedades oncogénicas.

Con miR-1201as y miR-1203as también registramos aumentos en la tasa de apoptosis comparadas a la situación con el oligo control (216% y 131%

respectivamente). Sin embargo, los casos correspondientes con los oligos sentido miR-1201s y miR-1203s también produjeron un aumento, aunque no significativo y no tan pronunciado. Estos resultados no son los esperados ya que al menos podrían obtenerse valores de tasas de apoptosis, para los oligos sentido, de la misma magnitud que para el oligo control. De la misma forma que con el ensayo de evaluación de la tasa de proliferación, podemos especular sobre un efecto inespecífico del oligorribonucleótido control el cual provoque valores de tasa de apoptosis artefactualmente bajos. Nuevamente este efecto podría dilucidarse utilizando adicionales oligos control, de forma de determinar la influencia en la tasa de apoptosis, tanto de la simple inclusión de estas cantidades de ARN simple hebra, como de este hipotético efecto específico.

No podemos perder de vista que las líneas celulares inmortalizadas no constituyen el modelo ideal para los estudios de las propiedades oncogénicas de los miARNs pues suelen poseer profundas alteraciones en sus vías de regulación de, justamente, el ciclo celular, el ingreso a la apoptosis, entre otras. Esta situación, nuevamente, obliga a tomar los resultados de estos ensayos con cautela.

## Conclusiones

Ampliamos el repertorio de sistemas en los que se reporta la expresión del ARNm de CHD5 (IMR-32, SK-N-BE[2], Daudi y SK-N-AS) y CHD5 a nivel proteico (SK-N-SH).

Ampliamos el repertorio de sistemas en los que se reporta la expresión de los miARNs hsa-miR-1201, hsa-miR-1202 y hsa-miR-1203 a las líneas celulares HeLa y SK-N-SH.

Reportamos fuertes indicios acerca de la capacidad de los miARNs hsa-miR-1201, hsa-miR-102 y hsa-miR-1203 de regular la expresión de p53.

Aportamos fuertes indicios de que hsa-miR-1202 puede regular la expresión de p53 actuando sobre CHD5 a través de sitios específicos en su 3'UTR.

### Perspectivas:

Confirmación de CHD5 como blanco de miR-1202. Realizar un ensayo de gen reportero en el que se incluyan controles con sitios de interés mutados y oligos "scramble". Utilizar un modelo que no exprese el miR-1202 de forma endógena y emplear otra estrategia para sobre-expresarlo. Extender el ensayo de gen reportero a la línea SK-N-SH.

Analizar el efecto de distintas cantidades de oligos en los ensayos de gen reportero.

Eventualmente, evaluar la relevancia de la interacción entre mi-1202 y CHD5 (medir los niveles de miR-1202 y CHD5 estudiando su posible correlación; en tejidos normales y tumores, especialmente tejido nervioso y neuroblastoma).

Extender los ensayos de respuesta de la expresión de CHD5 midiendo los niveles de ARNm.

Extender los ensayos de respuesta de la expresión de los genes blanco (CHD5 y p53) a distintos tiempos experimentales.

Medir la respuesta de p14ARF a nivel de ARNm.

Confirmar el efecto de los miARNs 1201, 1202 y 1203 sobre p53 extendiendo los ensayos a modelos celulares no transformados. Elucidar el mecanismo subyacente.

Extender el análisis del efecto sobre las propiedades biológicas relevantes en cáncer. Realizar ensayos clonogenicidad, migración y protección frente a la apoptosis; preferentemente en modelos celulares no transformados.

Explorar la validación de otros blancos de estos miARNs. Por ejemplo: CAMT1A, Wnt3, TNFRSF25, HES2, HES3, RUNX3, PRDM16.

## Bibliografía

1. Ghildiyal, M. and P. Zamore, *Small silencing RNAs: an expanding universe*. Nature reviews. Genetics, 2009. **10**(2): p. 94-108.
2. Farazi, T., S. Juranek, and T. Tuschl, *The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members*. Development (Cambridge, England), 2008. **135**(7): p. 1201-1214.
3. Tuck, A. and D. Tollervey, *RNA in pieces*. Trends in genetics : TIG, 2011. **27**(10): p. 422-432.
4. Ambros, V., et al., *A uniform system for microRNA annotation*. RNA, 2003. **9**(3): p. 277-9.
5. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
6. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 259-69.
7. Lagos-Quintana, M., et al., *New microRNAs from mouse and human*. RNA, 2003. **9**(2): p. 175-9.
8. Lee, R.C. and V. Ambros, *An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 862-4.
9. Fabian, M.R., N. Sonenberg, and W. Filipowicz, *Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs*. Annu Rev Biochem, 2010. **79**: p. 351-79.
10. Eulalio, A., E. Huntzinger, and E. Izaurralde, *Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing*. Cell, 2008. **132**(1): p. 9-14.
11. Filipowicz, W., S. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nature reviews. Genetics, 2008. **9**(2): p. 102-114.
12. Liu, J., *Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs*. Current opinion in cell biology, 2008. **20**(2): p. 214-221.
13. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
14. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
15. Stefani, G. and F.J. Slack, *Small non-coding RNAs in animal development*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 219-30.
16. He, L., et al., *A microRNA polycistron as a potential human oncogene*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 828-33.
17. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. Genome research, 2004. **14**(10A): p. 1902-1910.
18. Saini, H., A. Enright, and S. Griffiths-Jones, *Annotation of mammalian primary microRNAs*. BMC genomics, 2008. **9**: p. 564.
19. Griffiths-Jones, S., *Annotating noncoding RNA genes*. Annual review of genomics and human genetics, 2007. **8**: p. 279-298.
20. Berezikov, E., *Evolution of microRNA diversity and regulation in animals*. Nature reviews. Genetics, 2011. **12**(12): p. 846-860.
21. Cai, X., C. Hagedorn, and B. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. RNA (New York, N.Y.), 2004. **10**(12): p. 1957-1966.
22. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. The EMBO journal, 2004. **23**(20): p. 4051-4060.

23. Borchert, G.M., W. Lanier, and B.L. Davidson, *RNA polymerase III transcribes human microRNAs*. *Nat Struct Mol Biol*, 2006. **13**(12): p. 1097-101.
24. Gregory, R., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. *Nature*, 2004. **432**(7014): p. 235-240.
25. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. *Nature*, 2003. **425**(6956): p. 415-419.
26. Han, J., et al., *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex*. *Cell*, 2006. **125**(5): p. 887-901.
27. Denli, A., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. *Nature*, 2004. **432**(7014): p. 231-235.
28. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. *Genes & development*, 2004. **18**(24): p. 3016-3027.
29. Landthaler, M., A. Yalcin, and T. Tuschl, *The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis*. *Current biology : CB*, 2004. **14**(23): p. 2162-2167.
30. Baskerville, S. and D. Bartel, *Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes*. *RNA (New York, N.Y.)*, 2005. **11**(3): p. 241-247.
31. Kim, Y.-K. and V. Kim, *Processing of intronic microRNAs*. *The EMBO journal*, 2007. **26**(3): p. 775-783.
32. Monteys, A., et al., *Structure and activity of putative intronic miRNA promoters*. *RNA (New York, N.Y.)*, 2010. **16**(3): p. 495-505.
33. Kataoka, N., M. Fujita, and M. Ohno, *Functional Association of the Microprocessor Complex with the Spliceosome*. *Molecular and Cellular Biology*, 2009. **29**.
34. Liang, Y., et al., *Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues*. *BMC genomics*, 2007. **8**: p. 166.
35. Berezikov, E., et al., *Mammalian mirtron genes*. *Molecular cell*, 2007. **28**(2): p. 328-336.
36. Westholm, J. and E. Lai, *Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing*. *Biochimie*, 2011. **93**(11): p. 1897-1904.
37. Okamura, K., et al., *The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila*. *Cell*, 2007. **130**(1): p. 89-100.
38. Ruby, J., C. Jan, and D. Bartel, *Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing*. *Nature*, 2007. **448**(7149): p. 83-86.
39. Chong, M., et al., *Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery*. *Genes & development*, 2010. **24**(17): p. 1951-1960.
40. Flynt, A., et al., *MicroRNA biogenesis via splicing and exosome-mediated trimming in Drosophila*. *Molecular cell*, 2010. **38**(6): p. 900-907.
41. Babiarz, J., et al., *Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs*. *Genes & development*, 2008. **22**(20): p. 2773-2785.
42. Röther, S. and G. Meister, *Small RNAs derived from longer non-coding RNAs*. *Biochimie*, 2011. **93**(11): p. 1905-1915.
43. Taft, R., et al., *Small RNAs derived from snoRNAs*. *RNA (New York, N.Y.)*, 2009. **15**(7): p. 1233-1240.
44. Ender, C., et al., *A human snoRNA with microRNA-like functions*. *Molecular cell*, 2008. **32**(4): p. 519-528.
45. Miyoshi, K., T. Miyoshi, and H. Siomi, *Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production*. *Molecular genetics and genomics : MGG*, 2010. **284**(2): p. 95-103.
46. Okada, C., et al., *A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery*. *Science (New York, N.Y.)*, 2009. **326**(5957): p. 1275-1279.

47. Bohnsack, M., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. RNA (New York, N.Y.), 2004. **10**(2): p. 185-191.
48. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science (New York, N.Y.), 2004. **303**(5654): p. 95-98.
49. Chendrimada, T., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 740-744.
50. Lee, Y., et al., *The role of PACT in the RNA silencing pathway*. The EMBO journal, 2006. **25**(3): p. 522-532.
51. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. Science (New York, N.Y.), 2001. **293**(5531): p. 834-838.
52. Gregory, R., et al., *Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing*. Cell, 2005. **123**(4): p. 631-640.
53. Maniataki, E. and Z. Mourelatos, *A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA*. Genes & development, 2005. **19**(24): p. 2979-2990.
54. Tomari, Y. and P. Zamore, *Perspective: machines for RNAi*. Genes & development, 2005. **19**(5): p. 517-529.
55. Schwarz, D., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.
56. Du, T. and P. Zamore, *microPrimer: the biogenesis and function of microRNA*. Development (Cambridge, England), 2005. **132**(21): p. 4645-4652.
57. Bhayani, M., G. Calin, and S. Lai, *Functional relevance of miRNA sequences in human disease*. Mutation research, 2012. **731**(1-2): p. 14-19.
58. Fabian, M. and N. Sonenberg, *The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC*. Nature structural & molecular biology, 2012. **19**(6): p. 586-593.
59. Bartel, D., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-233.
60. Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz, *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*. Nature reviews. Genetics, 2010. **11**(9): p. 597-610.
61. Siomi, H. and M. Siomi, *Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals*. Molecular cell, 2010. **38**(3): p. 323-332.
62. Yates, L., C. Norbury, and R. Gilbert, *The long and short of microRNA*. Cell, 2013. **153**(3): p. 516-519.
63. Wheeler, B., et al., *The deep evolution of metazoan microRNAs*. Evolution & development, 2009. **11**(1): p. 50-68.
64. Yekta, S., *MicroRNA-Directed Cleavage of HOXB8 mRNA*. Science, 2004. **304**.
65. Behm-Ansmant, I., et al., *mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes*. Genes & development, 2006. **20**(14): p. 1885-1898.
66. Giraldez, A., et al., *Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs*. Science (New York, N.Y.), 2006. **312**(5770): p. 75-79.
67. Jackson, R. and N. Standart, *How do microRNAs regulate gene expression?* Science's STKE : signal transduction knowledge environment, 2007. **2007**(367).
68. Wu, L., J. Fan, and J. Belasco, *MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(11): p. 4034-4039.
69. Wang, B., A. Yanez, and C. Novina, *MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(14): p. 5343-5348.

70. Humphreys, D., et al., *MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(47): p. 16961-16966.
71. Thermann, R. and M. Hentze, *Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation*. Nature, 2007. **447**(7146): p. 875-878.
72. Mathonnet, G., et al., *MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F*. Science (New York, N.Y.), 2007. **317**(5845): p. 1764-1767.
73. Pillai, R., et al., *Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells*. Science (New York, N.Y.), 2005. **309**(5740): p. 1573-1576.
74. Pillai, R.S., S.N. Bhattacharyya, and W. Filipowicz, *Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?* Trends Cell Biol, 2007. **17**(3): p. 118-26.
75. Nottrott, S., M. Simard, and J. Richter, *Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes*. Nature structural & molecular biology, 2006. **13**(12): p. 1108-1114.
76. Petersen, C., et al., *Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells*. Molecular cell, 2006. **21**(4): p. 533-542.
77. Olsen, P. and V. Ambros, *The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation*. Developmental biology, 1999. **216**(2): p. 671-680.
78. Maroney, P., et al., *Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells*. Nature structural & molecular biology, 2006. **13**(12): p. 1102-1107.
79. Chen, C.-Y.A., et al., *Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps*. Nature structural & molecular biology, 2009. **16**(11): p. 1160-1166.
80. Rehwinkel, J., et al., *A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing*. RNA (New York, N.Y.), 2005. **11**(11): p. 1640-1647.
81. Chekulaeva, M. and W. Filipowicz, *Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells*. Current opinion in cell biology, 2009. **21**(3): p. 452-460.
82. Vasudevan, S., Y. Tong, and J. Steitz, *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation*. Science (New York, N.Y.), 2007. **318**(5858): p. 1931-1934.
83. Lytle, J., T. Yario, and J. Steitz, *Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(23): p. 9667-9672.
84. Moretti, F., R. Thermann, and M.W. Hentze, *Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame*. RNA, 2010. **16**.
85. Ørom, U., F. Nielsen, and A. Lund, *MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation*. Molecular cell, 2008. **30**(4): p. 460-471.
86. Qin, W., et al., *miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells*. PLoS One, 2010. **5**(2).
87. Kim, D., et al., *MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(42): p. 16230-16235.
88. Gonzalez, S., D. Pisano, and M. Serrano, *Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by siRNAs and miRNAs*. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 2008. **7**(16): p. 2601-2608.
89. Khraiwesh, B., et al., *Transcriptional control of gene expression by microRNAs*. Cell, 2010. **140**(1): p. 111-122.

90. Gibbings, D., et al., *Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity*. Nature cell biology, 2009. **11**(9): p. 1143-1149.
91. Lee, Y., et al., *Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking*. Nature cell biology, 2009. **11**(9): p. 1150-1156.
92. Brennecke, J., et al., *Principles of microRNA-target recognition*. PLoS biology, 2005. **3**(3).
93. Lewis, B., C. Burge, and D. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
94. Lewis, B., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787-798.
95. Nielsen, C., et al., *Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs*. RNA (New York, N.Y.), 2007. **13**(11): p. 1894-1910.
96. Baek, D., et al., *The impact of microRNAs on protein output*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 64-71.
97. Grimson, A., et al., *MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing*. Molecular cell, 2007. **27**(1): p. 91-105.
98. Selbach, M., et al., *Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 58-63.
99. Vella, M.C., *The C. elegans microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR*. Genes & development, 2004. **18**.
100. Doench, J. and P. Sharp, *Specificity of microRNA target selection in translational repression*. Genes & development, 2004. **18**(5): p. 504-511.
101. Saetrom, P., et al., *Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity*. Nucleic Acids Research, 2007. **35**.
102. Farh, K.K.H., *The Widespread Impact of Mammalian MicroRNAs on mRNA Repression and Evolution*. Science, 2005. **310**.
103. Gu, S., et al., *Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs*. Nature structural & molecular biology, 2009. **16**(2): p. 144-150.
104. Gaidatzis, D., et al., *Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis*. BMC bioinformatics, 2007. **8**: p. 69.
105. Majoros, W. and U. Ohler, *Spatial preferences of microRNA targets in 3' untranslated regions*. BMC genomics, 2007. **8**: p. 152.
106. Bhattacharyya, S., et al., *Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress*. Cell, 2006. **125**(6): p. 1111-1124.
107. Glorian, V., et al., *HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis*. Cell death and differentiation, 2011. **18**(11): p. 1692-1701.
108. Kim, H., et al., *HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression*. Genes & development, 2009. **23**(15): p. 1743-1748.
109. Kundu, P., et al., *HuR protein attenuates miRNA-mediated repression by promoting miRISC dissociation from the target RNA*. Nucleic Acids Research, 2012. **40**(11): p. 5088-5100.
110. Meisner, N.-C. and W. Filipowicz, *Properties of the Regulatory RNA-Binding Protein HuR and its Role in Controlling miRNA Repression*. Advances in experimental medicine and biology, 2011. **700**: p. 106-123.
111. Tominaga, K., et al., *Competitive regulation of nucleolin expression by HuR and miR-494*. Molecular and Cellular Biology, 2011. **31**(20): p. 4219-4231.
112. Young, L., et al., *The mRNA stability factor HuR inhibits microRNA-16 targeting of COX-2*. Molecular cancer research : MCR, 2012. **10**(1): p. 167-180.

113. Mishima, Y., et al., *Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430*. *Current biology : CB*, 2006. **16**(21): p. 2135-2142.
114. Kedde, M., et al., *RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA*. *Cell*, 2007. **131**(7): p. 1273-1286.
115. Nolde, M., et al., *The Caenorhabditis elegans pumilio homolog, puf-9, is required for the 3'UTR-mediated repression of the let-7 microRNA target gene, hbl-1*. *Developmental biology*, 2007. **305**(2): p. 551-563.
116. Kedde, M., et al., *A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3' UTR controls miR-221 and miR-222 accessibility*. *Nature cell biology*, 2010. **12**(10): p. 1014-1020.
117. Daehyun, B., et al., *The impact of microRNAs on protein output*. *Nature*, 2008. **455**.
118. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data*. *Nucleic Acids Research*, 2010. **39**.
119. Ruby, J., et al., *Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in C. elegans*. *Cell*, 2006. **127**(6): p. 1193-1207.
120. Landgraf, P., et al., *A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing*. *Cell*, 2007. **129**(7): p. 1401-1414.
121. Ruby, J.G., et al., *Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of Drosophila microRNAs*. *Genome research*, 2007. **17**.
122. Berezikov, E., et al., *Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes*. *Cell*, 2005. **120**(1): p. 21-4.
123. Lim, L., et al., *Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs*. *Nature*, 2005. **433**(7027): p. 769-773.
124. Friedman, R., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. *Genome research*, 2009. **19**(1): p. 92-105.
125. Stark, A., et al., *Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution*. *Cell*, 2005. **123**(6): p. 1133-1146.
126. Bartel, D. and C.-Z. Chen, *Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs*. *Nature reviews. Genetics*, 2004. **5**(5): p. 396-400.
127. Wienholds, E., et al., *MicroRNA expression in zebrafish embryonic development*. *Science (New York, N.Y.)*, 2005. **309**(5732): p. 310-311.
128. Kloosterman, W., et al., *Cloning and expression of new microRNAs from zebrafish*. *Nucleic Acids Research*, 2006. **34**(9): p. 2558-2569.
129. Ason, B., et al., *Differences in vertebrate microRNA expression*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(39): p. 14385-14389.
130. Aboobaker, A., et al., *Drosophila microRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(50): p. 18017-18022.
131. Sood, P., et al., *Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(8): p. 2746-2751.
132. Thomson, J., et al., *Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer*. *Genes & development*, 2006. **20**(16): p. 2202-2207.
133. Ji, Z., et al., *Progressive lengthening of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation during mouse embryonic development*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009. **106**(17): p. 7028-7033.
134. Lee, C.-T., T. Risom, and W. Strauss, *Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny*. *DNA and cell biology*, 2007. **26**(4): p. 209-218.

135. Heimberg, A.M., et al., *MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(8): p. 2946-2950.
136. Hornstein, E. and N. Shomron, *Canalization of development by microRNAs*. Nature genetics, 2006. **38 Suppl**: p. 4.
137. Bushati, N. and S. Cohen, *microRNA functions*. Annual review of cell and developmental biology, 2007. **23**: p. 175-205.
138. Tsang, J., J. Zhu, and A. van Oudenaarden, *MicroRNA-mediated feedback and feedforward loops are recurrent network motifs in mammals*. Molecular cell, 2007. **26**(5): p. 753-767.
139. Martinez, N., et al., *A C. elegans genome-scale microRNA network contains composite feedback motifs with high flux capacity*. Genes & development, 2008. **22**(18): p. 2535-2549.
140. Ebert, M. and P. Sharp, *Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes*. Cell, 2012. **149**(3): p. 515-524.
141. Herranz, H. and S. Cohen, *MicroRNAs and gene regulatory networks: managing the impact of noise in biological systems*. Genes & development, 2010. **24**(13): p. 1339-1344.
142. Levine, E., P. McHale, and H. Levine, *Small regulatory RNAs may sharpen spatial expression patterns*. PLoS computational biology, 2007. **3**(11).
143. Di Leva, G., D. Briskin, and C. Croce, *MicroRNA in cancer: new hopes for antineoplastic chemotherapy*. Upsala journal of medical sciences, 2012. **117**(2): p. 202-216.
144. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
145. Ruan, K., X. Fang, and G. Ouyang, *MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer*. Cancer Lett, 2009. **285**(2): p. 116-26.
146. Jansson, M. and A. Lund, *MicroRNA and cancer*. Molecular oncology, 2012. **6**(6): p. 590-610.
147. Williams, A., *Functional aspects of animal microRNAs*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2008. **65**(4): p. 545-562.
148. Iorio, M. and C. Croce, *microRNA involvement in human cancer*. Carcinogenesis, 2012. **33**(6): p. 1126-1133.
149. Croce, C., *Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer*. Nature reviews. Genetics, 2009. **10**(10): p. 704-714.
150. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
151. Munker, R. and G. Calin, *MicroRNA profiling in cancer*. Clinical science (London, England : 1979), 2011. **121**(4): p. 141-158.
152. Volinia, S., et al., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(7): p. 2257-2261.
153. Kumar, M., et al., *Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis*. Nature genetics, 2007. **39**(5): p. 673-677.
154. Peter, M., *Let-7 and miR-200 microRNAs: guardians against pluripotency and cancer progression*. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 2009. **8**(6): p. 843-852.
155. Stahlhut Espinosa, C. and F. Slack, *The role of microRNAs in cancer*. The Yale journal of biology and medicine, 2006. **79**(3-4): p. 131-140.
156. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 457-63.
157. Giannakakis, A., et al., *miRNA genetic alterations in human cancers*. Expert Opin Biol Ther, 2007. **7**(9): p. 1375-86.

158. Zhang, W., J.E. Dahlberg, and W. Tam, *MicroRNAs in tumorigenesis: a primer*. Am J Pathol, 2007. **171**(3): p. 728-38.
159. Zhang, B., et al., *microRNAs as oncogenes and tumor suppressors*. Developmental biology, 2007. **302**(1): p. 1-12.
160. Gartel, A. and E. Kandel, *miRNAs: Little known mediators of oncogenesis*. Seminars in cancer biology, 2008. **18**(2): p. 103-110.
161. Voorhoeve, P. and R. Agami, *Classifying microRNAs in cancer: the good, the bad and the ugly*. Biochimica et biophysica acta, 2007. **1775**(2): p. 274-282.
162. Iorio, M. and C. Croce, *Causes and consequences of microRNA dysregulation*. Cancer journal (Sudbury, Mass.), 2012. **18**(3): p. 215-222.
163. Hansen, T., et al., *Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges*. Nature, 2013. **495**(7441): p. 384-388.
164. Memczak, S., et al., *Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency*. Nature, 2013. **495**(7441): p. 333-338.
165. Jeck, W., et al., *Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats*. RNA (New York, N.Y.), 2013. **19**(2): p. 141-157.
166. Taulli, R., C. Loretelli, and P. Pandolfi, *From pseudo-ceRNAs to circ-ceRNAs: a tale of cross-talk and competition*. Nature structural & molecular biology, 2013. **20**(5): p. 541-543.
167. Poliseno, L., et al., *A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology*. Nature, 2010. **465**(7301): p. 1033-1038.
168. Johnsson, P., et al., *A pseudogene long-noncoding-RNA network regulates PTEN transcription and translation in human cells*. Nature structural & molecular biology, 2013. **20**(4): p. 440-446.
169. Salmena, L., et al., *A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?* Cell, 2011. **146**(3): p. 353-358.
170. de Giorgio, A., et al., *Emerging roles of ceRNAs in cancer: insights from the regulation of PTEN*. Molecular and Cellular Biology, 2013.
171. Su, X., et al., *microRNAs and ceRNAs: RNA networks in pathogenesis of cancer*. Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu, 2013. **25**(2): p. 235-239.
172. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(39): p. 13944-13949.
173. Ventura, A. and T. Jacks, *MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way*. Cell, 2009. **136**(4): p. 586-91.
174. Johnson, S., et al., *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. Cell, 2005. **120**(5): p. 635-647.
175. Varambally, S., et al., *Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer*. Science (New York, N.Y.), 2008. **322**(5908): p. 1695-1699.
176. Friedman, J.M., et al., *The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2*. Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2623-9.
177. Saito, Y., et al., *Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells*. Cancer Cell, 2006. **9**(6): p. 435-43.
178. Chan, J.A., A.M. Krichevsky, and K.S. Kosik, *MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6029-33.
179. Kluiver, J., et al., *The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies*. Leukemia, 2006. **20**(11): p. 1931-6.
180. du Rieu, M., et al., *MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions*. Clinical chemistry, 2010. **56**(4): p. 603-612.

181. Rosenfeld, N., et al., *MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin*. Nature biotechnology, 2008. **26**(4): p. 462-469.
182. Calin, G. and C. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nature reviews. Cancer, 2006. **6**(11): p. 857-866.
183. Creighton, C., J. Reid, and P. Gunaratne, *Expression profiling of microRNAs by deep sequencing*. Briefings in bioinformatics, 2009. **10**(5): p. 490-497.
184. Farazi, T., et al., *MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing*. Cancer research, 2011. **71**(13): p. 4443-4453.
185. Wyman, S., et al., *Repertoire of microRNAs in epithelial ovarian cancer as determined by next generation sequencing of small RNA cDNA libraries*. PLoS One, 2009. **4**(4).
186. Ferracin, M., et al., *MicroRNA profiling for the identification of cancers with unknown primary tissue-of-origin*. The Journal of pathology, 2011. **225**(1): p. 43-53.
187. Pena, J., et al., *miRNA in situ hybridization in formaldehyde and EDC-fixed tissues*. Nature methods, 2009. **6**(2): p. 139-141.
188. Calin, G., et al., *A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia*. The New England journal of medicine, 2005. **353**(17): p. 1793-1801.
189. Yanaihara, N., et al., *Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis*. Cancer Cell, 2006. **9**(3): p. 189-198.
190. Li, X., et al., *Survival prediction of gastric cancer by a seven-microRNA signature*. Gut, 2010. **59**(5): p. 579-585.
191. Caramuta, S., et al., *MicroRNA expression profiles associated with mutational status and survival in malignant melanoma*. The Journal of investigative dermatology, 2010. **130**(8): p. 2062-2070.
192. Schetter, A., et al., *MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 2008. **299**(4): p. 425-436.
193. Giovannetti, E., et al., *MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity*. Cancer research, 2010. **70**(11): p. 4528-4538.
194. Zhou, M., et al., *MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression*. The Journal of biological chemistry, 2010. **285**(28): p. 21496-21507.
195. Dillhoff, M., et al., *MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival*. Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract, 2008. **12**(12): p. 2171-2176.
196. Miller, T., et al., *MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(44): p. 29897-29903.
197. Zhao, J.-J., et al., *MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(45): p. 31079-31086.
198. Rao, X., et al., *MicroRNA-221/222 confers breast cancer fulvestrant resistance by regulating multiple signaling pathways*. Oncogene, 2011. **30**(9): p. 1082-1097.
199. Iorio, M., et al., *microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer*. Cancer research, 2009. **69**(6): p. 2195-2200.
200. Mitchell, P., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(30): p. 10513-10518.
201. Taylor, D. and C. Gercel-Taylor, *MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer*. Gynecologic oncology, 2008. **110**(1): p. 13-21.

202. Hanke, M., et al., *A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer*. *Urologic oncology*, 2010. **28**(6): p. 655-661.
203. Michael, A., et al., *Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers*. *Oral Diseases*, 2010. **16**.
204. Park, N., et al., *Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2009. **15**(17): p. 5473-5477.
205. Xie, Y., et al., *Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer*. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 2010. **67**(2): p. 170-176.
206. Lei, Y., et al., *Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers*. *International Journal of Cancer*, 2010. **127**.
207. Lawrie, C., et al., *Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma*. *British journal of haematology*, 2008. **141**(5): p. 672-675.
208. Heneghan, H.M., et al., *Systemic miRNA-195 Differentiates Breast Cancer from Other Malignancies and Is a Potential Biomarker for Detecting Noninvasive and Early Stage Disease*. *The Oncologist*, 2010. **15**.
209. Zhaohui, H., et al., *Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer*. *International Journal of Cancer*, 2010. **127**.
210. Xing, L., et al., *Early detection of squamous cell lung cancer in sputum by a panel of microRNA markers*. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 2010. **23**(8): p. 1157-1164.
211. Sun, Y., et al., *Identification of circulating microRNAs as biomarkers in cancers: what have we got?* *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, 2012. **50**(12): p. 2121-2126.
212. Redova, M., J. Sana, and O. Slaby, *Circulating miRNAs as new blood-based biomarkers for solid cancers*. *Future oncology (London, England)*, 2013. **9**(3): p. 387-402.
213. Sita-Lumsden, A., et al., *Circulating microRNAs as potential new biomarkers for prostate cancer*. *British journal of cancer*, 2013. **108**(10): p. 1925-1930.
214. Selth, L., et al., *Circulating microRNAs predict biochemical recurrence in prostate cancer patients*. *British journal of cancer*, 2013. **109**(3): p. 641-650.
215. Pigati, L., et al., *Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells*. *PLoS One*, 2010. **5**(10).
216. Cortez, M., et al., *MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers*. *Nature reviews. Clinical oncology*, 2011. **8**(8): p. 467-477.
217. Weiland, M., et al., *Small RNAs have a large impact: circulating microRNAs as biomarkers for human diseases*. *RNA biology*, 2012. **9**(6): p. 850-859.
218. Allegra, A., et al., *Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review)*. *International journal of oncology*, 2012. **41**(6): p. 1897-1912.
219. Iorio, M. and C. Croce, *MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review*. *EMBO molecular medicine*, 2012. **4**(3): p. 143-159.
220. Fabbri, M., *miRNAs as molecular biomarkers of cancer*. *Expert review of molecular diagnostics*, 2010. **10**(4): p. 435-444.
221. Van Roosbroeck, K., J. Pollet, and G. Calin, *miRNAs and long noncoding RNAs as biomarkers in human diseases*. *Expert review of molecular diagnostics*, 2013. **13**(2): p. 183-204.
222. Obad, S., et al., *Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs*. *Nature genetics*, 2011. **43**(4): p. 371-378.

223. Uchino, K., T. Ochiya, and F. Takeshita, *RNAi therapeutics and applications of microRNAs in cancer treatment*. Japanese journal of clinical oncology, 2013. **43**(6): p. 596-607.
224. Fabbri, M., *MicroRNAs and cancer: towards a personalized medicine*. Current molecular medicine, 2013. **13**(5): p. 751-756.
225. Broderick, J. and P. Zamore, *MicroRNA therapeutics*. Gene therapy, 2011. **18**(12): p. 1104-1110.
226. Nana-Sinkam, S. and C. Croce, *Clinical applications for microRNAs in cancer*. Clinical pharmacology and therapeutics, 2013. **93**(1): p. 98-104.
227. Marton, S., et al., *Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis*. Leukemia, 2008. **22**(2): p. 330-8.
228. Bagchi, A. and A.A. Mills, *The quest for the 1p36 tumor suppressor*. Cancer Res, 2008. **68**(8): p. 2551-6.
229. Melendez, B., et al., *Coincidental LOH regions in mouse and humans: evidence for novel tumor suppressor loci at 9q22-q34 in non-Hodgkin's lymphomas*. Leuk Res, 2003. **27**(7): p. 627-33.
230. Mori, N., et al., *Chromosome band 1p36 contains a putative tumor suppressor gene important in the evolution of chronic myelocytic leukemia*. Blood, 1998. **92**(9): p. 3405-9.
231. Bagchi, A., et al., *CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36*. Cell, 2007. **128**(3): p. 459-75.
232. Okawa, E.R., et al., *Expression and sequence analysis of candidates for the 1p36.31 tumor suppressor gene deleted in neuroblastomas*. Oncogene, 2008. **27**(6): p. 803-10.
233. Thompson, P.M., et al., *CHD5, a new member of the chromodomain gene family, is preferentially expressed in the nervous system*. Oncogene, 2003. **22**(7): p. 1002-11.
234. Marfella, C.G. and A.N. Imbalzano, *The Chd family of chromatin remodelers*. Mutat Res, 2007. **618**(1-2): p. 30-40.
235. Egan, C., et al., *CHD5 Is Required for Neurogenesis and Has a Dual Role in Facilitating Gene Expression and Polycomb Gene Repression*. Developmental cell, 2013. **26**(3): p. 223-236.
236. Paul, S., et al., *Chd5 requires PHD-mediated histone 3 binding for tumor suppression*. Cell Rep, 2013. **3**(1): p. 92-102.
237. Potts, R.C., et al., *CHD5, a brain-specific paralog of Mi2 chromatin remodeling enzymes, regulates expression of neuronal genes*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24515.
238. Du, X., et al., *Decreased expression of chromodomain helicase DNA-binding protein 5 is an unfavorable prognostic marker in patients with primary gallbladder carcinoma*. Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico, 2013. **15**(3): p. 198-204.
239. Garcia, I., et al., *Expression of the neuron-specific protein CHD5 is an independent marker of outcome in neuroblastoma*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 277.
240. Koyama, H., et al., *Mechanisms of CHD5 Inactivation in neuroblastomas*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(6): p. 1588-97.
241. Wong, R.R., et al., *CHD5 Downregulation Associated with Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer*. Gynecol Obstet Invest, 2011. **72**(3): p. 203-7.
242. Wang, L., et al., *Downregulation of chromatin remodeling factor CHD5 is associated with a poor prognosis in human glioma*. J Clin Neurosci, 2013. **20**(7): p. 958-63.
243. Gorringer, K.L., et al., *Mutation and methylation analysis of the chromodomain-helicase-DNA binding 5 gene in ovarian cancer*. Neoplasia, 2008. **10**(11): p. 1253-8.
244. Wang, X., et al., *CHD5 is down-regulated through promoter hypermethylation in gastric cancer*. J Biomed Sci, 2009. **16**: p. 95.

245. Lang, J., E.S. Tobias, and R. Mackie, *Preliminary evidence for involvement of the tumour suppressor gene CHD5 in a family with cutaneous melanoma*. *Br J Dermatol*, 2011. **164**(5): p. 1010-6.
246. Agrawal, N., et al., *Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1*. *Science (New York, N.Y.)*, 2011. **333**(6046): p. 1154-1157.
247. Berger, M., et al., *The genomic complexity of primary human prostate cancer*. *Nature*, 2011. **470**(7333): p. 214-220.
248. Jones, S., et al., *Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma*. *Science (New York, N.Y.)*, 2010. **330**(6001): p. 228-231.
249. Mokarram, P., et al., *Distinct high-profile methylated genes in colorectal cancer*. *PLoS One*, 2009. **4**(9).
250. Mulero-Navarro, S. and M. Esteller, *Chromatin remodeling factor CHD5 is silenced by promoter CpG island hypermethylation in human cancer*. *Epigenetics*, 2008. **3**(4): p. 210-5.
251. Zhao, R., et al., *CHD5, a tumor suppressor that is epigenetically silenced in lung cancer*. *Lung Cancer*, 2012. **76**(3): p. 324-31.
252. Cai, C., et al., *MicroRNA-211 expression promotes colorectal cancer cell growth in vitro and in vivo by targeting tumor suppressor CHD5*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e29750.
253. Gilbert, L. and J. Wachsman, *Characterization and partial purification of the plasminogen activator from human neuroblastoma cell line, SK-N-SH. A comparison with human urokinase*. *Biochimica et biophysica acta*, 1982. **704**(3): p. 450-460.
254. Yoshimura, S., et al., *A rat monoclonal antibody against the chromatin remodeling factor CHD5*. *Hybridoma (Larchmt)*, 2010. **29**(1): p. 63-6.
255. Jiang, G. and S. Huang, *The yin-yang of PR-domain family genes in tumorigenesis*. *Histology and histopathology*, 2000. **15**(1): p. 109-117.
256. Bae, S.-C. and Y. Lee, *Phosphorylation, acetylation and ubiquitination: the molecular basis of RUNX regulation*. *Gene*, 2006. **366**(1): p. 58-66.
257. Tracey, W. and N. Speck, *Potential roles for RUNX1 and its orthologs in determining hematopoietic cell fate*. *Seminars in cell & developmental biology*, 2000. **11**(5): p. 337-342.
258. Mochizuki, N., et al., *A novel gene, MEL1, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the MDS1/EVI1 gene and is transcriptionally activated in t(1;3)(p36;q21)-positive leukemia cells*. *Blood*, 2000. **96**(9): p. 3209-3214.
259. Kuang, S.-Q., et al., *Epigenetic inactivation of Notch-Hes pathway in human B-cell acute lymphoblastic leukemia*. *PLoS One*, 2013. **8**(4).
260. Mallette, F.A. and S. Richard, *JMJD2A promotes cellular transformation by blocking cellular senescence through transcriptional repression of the tumor suppressor CHD5*. *Cell Rep*, 2012. **2**(5): p. 1233-43.
261. Witten, D., et al., *Ultra-high throughput sequencing-based small RNA discovery and discrete statistical biomarker analysis in a collection of cervical tumours and matched controls*. *BMC biology*, 2010. **8**: p. 58.
262. Ritchie, W., J. Rasko, and S. Flamant, *MicroRNA target prediction and validation*. *Advances in experimental medicine and biology*, 2013. **774**: p. 39-53.
263. Li, H., et al., *Genistein demethylates the promoter of CHD5 and inhibits neuroblastoma growth in vivo*. *Int J Mol Med*, 2012. **30**(5): p. 1081-6.
264. Fujita, T., et al., *CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas*. *J Natl Cancer Inst*, 2008. **100**(13): p. 940-9.
265. Lima, W., et al., *Human Dicer binds short single-strand and double-strand RNA with high affinity and interacts with different regions of the nucleic acids*. *The Journal of biological chemistry*, 2009. **284**(4): p. 2535-2548.

266. Haringsma, H., et al., *mRNA knockdown by single strand RNA is improved by chemical modifications*. Nucleic Acids Research, 2012. **40**(9): p. 4125-4136.
267. Martinez, J., et al., *Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi*. Cell, 2002. **110**(5): p. 563-574.
268. Schwarz, D., et al., *Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways*. Molecular cell, 2002. **10**(3): p. 537-548.
269. Chorn, G., et al., *Single-stranded microRNA mimics*. RNA (New York, N.Y.), 2012. **18**(10): p. 1796-1804.
270. Xiao, J., et al., *Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4*. Journal of cellular physiology, 2007. **212**(2): p. 285-292.
271. Chang, K., S. Elledge, and G. Hannon, *Lessons from Nature: microRNA-based shRNA libraries*. Nature methods, 2006. **3**(9): p. 707-714.
272. Shin, C., et al., *Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing*. Molecular cell, 2010. **38**(6): p. 789-802.
273. Lal, A., et al., *miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements*. Molecular cell, 2009. **35**(5): p. 610-625.
274. Schnall-Levin, M., et al., *Unusually effective microRNA targeting within repeat-rich coding regions of mammalian mRNAs*. Genome research, 2011. **21**(9): p. 1395-1403.
275. Haraguchi, T., Y. Ozaki, and H. Iba, *Vectors expressing efficient RNA decoys achieve the long-term suppression of specific microRNA activity in mammalian cells*. Nucleic Acids Research, 2009. **37**(6).
276. Ebert, M. and P. Sharp, *MicroRNA sponges: progress and possibilities*. RNA (New York, N.Y.), 2010. **16**(11): p. 2043-2050.
277. Mukherji, S., et al., *MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression*. Nature genetics, 2011. **43**(9): p. 854-859.
278. Kuhn, D., et al., *Experimental validation of miRNA targets*. Methods (San Diego, Calif.), 2008. **44**(1): p. 47-54.
279. Carè, A., et al., *MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy*. Nature medicine, 2007. **13**(5): p. 613-618.

## Apéndice

### Líneas celulares utilizadas

	Tejido de origen de línea	Tipo celular	Morfología	Enfermedad	Obtención por parte del laboratorio	Pasaje
<b>SK-N-AS</b>	Cerebro. Sitio metastásico (médula ósea)	Neuroblasto	Epitelial	Neuroblastoma	Cedida del Laboratorio de Oncología Molecular (IPMON)	Desconocido
<b>SK-N-IMR<sub>32</sub></b>	Cerebro. Sitio metastásico (masa abdominal)	Neuroblasto	Fibroblasto/ Neuroblasto	Neuroblastoma	Cedida del Laboratorio de Oncología Molecular (IPMON)	Desconocido
<b>SK-N-SH</b>	Cerebro. Sitio metastásico (médula ósea)	-	Epitelial	Neuroblastoma	Cedida del Laboratorio de Oncología Molecular (IPMON)	Desconocido
<b>Jurkat</b>	Sangre perisférica	Linfocito T	Linfoblasto	Lucemia aguda de células T	Cedida de Unidad de Biología Molecular (IPMON)	Desconocido
<b>SK-N-BE[2]</b>	Cerebro. Sitio metastásico (médula ósea)	Neuroblasto	Neuroblasto	Neuroblastoma	Cedida del Laboratorio de Oncología Molecular (IPMON)	Desconocido
<b>HeLa</b>	Cervix	Epitelial	Epitelial	Adenocarcinoma	Cedida de Unidad de Biología Molecular (IPMON)	Desconocido
<b>Daudi</b>	Sangre perisférica	Linfoblasto B	Linfoblasto	Linfoma de Burkitt	Cedida de Unidad de Biología Molecular (IPMON)	Desconocido

### Análisis bioestadístico y detalle de replicas biológicas y experimentales

Ensayo	N° de réplicas biológica (repetición del ensayo completo)	N° de réplica experimental (diferente medida del mismo ensayo)
Detección de CHD5 por <i>Northern blot</i>	-	-
Influencia de los microARNs sobre la proliferación celular (cristal violeta)	2	4
Influencia de los microARNs sobre el porcentaje de células apoptóticas (Anexina V)	3	2
Ensayo de gen reportero	3	2
Capacidad de los microARNs de modificar la expresión de CHD5 ( <i>Western blot</i> )	3	-
Capacidad de los microARNs de modificar la expresión de CHD5 (inmunofluorescencia)	-	-
Capacidad de los microARNs de modificar la expresión de p53 ( <i>Western blot</i> )	3	-

Los errores típicos fueron calculados del cociente entre el Desvío estándar y la Raíz cuadrada de N.

Para todos los análisis estadísticos de significancia se utilizó el test "One-Way ANOVA", pues nos permitió comparar más de dos grupo de datos (muestras experimentales). En todos los casos consideramos como estadísticamente significativas a las relaciones con un p valor  $< \alpha = 0,05$ .