



TESINA DE GRADO

LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

Sistema inducible para el silenciamiento de un ARN largo no- codificante: ANRIL

FABIAN ALDUNATE CARAMORI

Tutor: Dr. Rubén Agrelo

Co-tutor: Miguel Arocena

Laboratorio de Epigenética del Cáncer y el Envejecimiento

Institut Pasteur de Montevideo

Montevideo, Uruguay

2015

“... good science as a way of life is sometimes difficult. It often is hard to have confidence that you really know where the future lies. We must thus believe strongly in our ideas, often to point where they may seem tiresome and bothersome (...) science does not stand by itself, but is the creation of very human people. We must continue to work in the humane spirit in which we were fortunate to grow up. If so, we shall help insure that our science continues and that our civilization will prevail.”

James Watson's speech at the Nobel Banquet in Stockholm, December 10, 1962

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Dr. Rubén Agrelo y Dr. Miguel Arocena por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por su paciencia, por sus enseñanzas e integrarme a la comunidad científica como investigador.

A mi familia y amigos, por el apoyo de siempre.

A Silvina, por su apoyo incondicional y compañía.

A mis compañeros de laboratorio, Valeria, Vanina, Miguel y Santiago, por su disposición e interés en el trabajo de todos los días.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	1
Objetivo.....	2
Introducción.....	3
ARN no codificantes	3
ARN largo no codificante, clasificación y su implicación en enfermedades	4
Clasificación de los ARNInc	5
Enfermedades asociadas a los ARNInc.....	7
ANRIL.....	7
Clúster INK4b-ARF-INK4a	10
Enfermedades asociadas a ANRIL	13
ARN de interferencia.....	14
Diseño de un ARNsh.....	16
Sistema Inducible de tetraciclina	17
Sistema TetR	17
Sistema pENTR H1/ TO.....	18
Estrategia experimental.....	18
Materiales y métodos	23
Elaboración del sistema inducible	23
Amplificación del vector pcDNA 6/Tr.....	23
PureYield™ Plasmid Miniprep System	23
PureYield™ Plasmid Midiprep System	24
Digestión con enzimas de restricción.	24
Electroforesis de ADN en gel de agarosa	25
Diseño del ARNsh	25
Diseño de oligos	25
Annealing de oligos.....	26
Ligación y clonado en el vector pENTR	27
Secuenciado	28
Línea celular	28
Transfección de los vectores.....	29
Extracción de proteínas	30
Western blot	30
Inmunofluorescencia	32

Ensayos Funcionales	33
Extracción de ARN.....	33
Transcripción reversa de ARN extraído.....	33
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
Primers y programas para PCR utilizados	34
Proliferación celular	35
Ciclo celular	36
Ensayo de β -Galactosidasa in situ para senescencia celular.....	36
RNA-FISH	37
Inmuno/Stellaris RNA FISH.....	38
Anticuerpos utilizados.....	38
Programas bioinformáticos utilizados	38
Resultados.....	40
Elaboración del sistema inducible	40
Amplificación del vector pcDNA 6/Tr.....	40
Diseño del constructo	¡Error! Marcador no definido.
Hibridación de los oligos	¡Error! Marcador no definido.
Secuenciado	41
Transfección de los vectores pcDNA 6/Tr y pENTR H1/TO	42
Ensayos Funcionales	43
RT- PCR.....	43
Western Blot	44
Proliferación celular	45
Ciclo celular	46
Ensayo de β -Galactosidasa in situ para senescencia celular.....	48
Localización subcelular	49
Stellaris RNA FISH.....	49
Inmunostaining/RNA FISH	51
Discusión	54
Elaboración del sistema inducible	54
Amplificación del vector pcDNA 6/Tr.....	54
Diseño del constructo	¡Error! Marcador no definido.
Hibridación de los oligos	¡Error! Marcador no definido.
Secuenciado	54

Transfección de los vectores pcDNA 6/TR y pENTR H1/TO	54
Ensayos Funcionales	55
RT- PCR / Análisis de transcritos	55
Western Blot /Análisis de proteínas	56
Proliferación celular	56
Ciclo celular	57
Ensayo de β -Galactosidasa in situ para senescencia celular.....	57
Localización subcelular	58
RNA FISH /inmunohistoquímica.....	58
Conclusión.....	59
Bibliografía	60
Abreviaturas.....	62
Apéndice: Recetas.....	64

Resumen

Los ARN de interferencia son utilizados como una herramienta para el silenciamiento de genes. Generar este silenciamiento mediante una expresión constitutiva o transitoria de un ARN interferente (ARNi) no siempre suele resultar efectivo si el gen en cuestión es esencial para la viabilidad o desarrollo celular. De este modo, el desarrollo de sistemas capaces de expresar ciertos ARNi de manera inducible ha ayudado para el estudio de genes importantes en la supervivencia celular.

ANRIL es un recién descubierto ARN largo no codificante (ARNlnc) que modula la expresión del clúster INK4, que codifica para los genes p14, p15 y p16, claves en la regulación del ciclo celular. ANRIL se encuentra involucrado en mecanismos de represión epigenética y se asocia a enfermedades cardiovasculares, diabetes y diversos tipos de cánceres. Por lo tanto, tener a disposición un sistema inducible contribuirá a un mejor entendimiento del modo de acción y de regulación de ANRIL, así como también el de otros ARN largos no codificantes.

Se planea elaborar un sistema inducible capaz de sintetizar un *ARN short hairpin* (ARNsh) con el fin de silenciar y modular los niveles de expresión de ANRIL. Para lograr este sistema nosotros usamos dos vectores plasmídicos: uno que contiene un operador de tetraciclina ($tetO_2$) sujeto al ARNsh de interés y otro que sintetiza constitutivamente una proteína conocida como represor de tetraciclina (tetR). Esta proteína se unirá al $tetO_2$ en el promotor del plásmido conteniendo al ARNsh, inhibiendo así la producción de este último. Al adicionar la droga tetraciclina, esta se unirá a la proteína tetR que se encuentra en el $tetO_2$ promoviendo la liberación del represor y por consiguiente la síntesis del ARNsh que se encontraba inhibida, esto provocaría el silenciamiento de ANRIL. En ausencia de tetraciclina los niveles de expresión de ANRIL no se verán afectados dado que el ARNsh no podrá ser sintetizado.

El trabajo realizado consistió en ensayos funcionales tales como proliferación celular, ciclo celular, análisis de transcritos por RT-PCR, western Blot y determinación de senescencia mediada por β -Galactosidasa, con lo que se pretendió evaluar el desarrollo del sistema inducible así como también los efectos de la inhibición de ANRIL. Por último se realizó el estudio de la localización subcelular de ANRIL y de proteínas asociadas en su rol biológico, como también su posible alteración al inducir el silenciamiento de ANRIL a partir de técnicas como RNA FISH y ensayos de inmunofluorescencia.

Objetivo

Objetivo general:

- Elaborar un sistema inducible para silenciar el ARN largo no codificante ANRIL.

Objetivos específicos:

- Ensayos para comprobar la funcionalidad del sistema en células transformadas derivada de fibroblastos de pulmón fetal.
- Localización de ANRIL así como de proteínas asociadas en estas células y su posible alteración al inducir su silenciamiento.

Introducción

El término “epigenética” fue introducido por Conrad Waddington en el año 1942 a partir de la observación que ciertos cambios ambientales causaban un cambio fenotípico en *Drosophila melanogaster*. De esta forma, definió a la epigenética como una marca que requiere ser heredable y que confiere la capacidad para ocasionar un cambio fenotípico en la ausencia de una modificación genotípica [1].

Después de décadas de descubrimientos científicos, la epigenética evolucionó a lo que hoy se define como un estudio que pone como objetivo el análisis de cambios heredados durante mitosis/meiosis, sin alterar la secuencia de ADN. Estos cambios epigenéticos ocurren de manera regular y natural en las células, pueden ser fruto de factores tales como la edad, factores ambientales o alimentación. Estas modificaciones también ocurren comúnmente en la diferenciación de celular, como por ejemplo: diferenciación a células del sistema nervioso, células de la piel y otros órganos [2]. Si bien éstas ocurren de manera natural, las modificaciones epigenéticas han sido asociadas a múltiples enfermedades, tal es el caso del cáncer que fue la primer enfermedad humana asociada a la epigenética [3].

La expresión de genes en mamíferos está regulada en muchos niveles epigenéticos. Las principales son los patrones de metilación de ADN, modificación de histonas, características conformacionales de la cromatina y ARNs no codificantes.

ARN no codificantes

Avances en la secuenciación del transcriptoma a través de secuenciación de última generación han llevado a desenmascarar lo que antes se pensaba que era “ADN basura”. Se ha encontrado que estas regiones son transcripcionalmente activas y que la mayoría de estos transcritos son ARN no codificante (ARNnc) [4].

Los ARNs no codificantes son una clase de transcritos que nunca se traducen a proteínas, a pesar de esto, los ARNnc tienen múltiples roles en diferentes funciones celulares entre las cuales se destacan la regulación de genes codificantes de proteínas, mantenimiento de la integridad del genoma, *splicing* e imprinting [2].

El proyecto ENCODE con el objetivo de anotar todos los elementos presentes en el genoma humano, sugiere que más del 80% del genoma contiene ADN que no codifica para proteínas pero tiene un rol asociado a una función, mientras que aproximadamente solo un 3% de genes codifican para proteínas[5], lo que indica la gran importancia que tiene el estudio de los ARNnc.

Existen diferentes tamaños de ARNnc, así se pueden clasificar según el número de pares de bases (pb) que posean, pudiendo ser ARNnc cortos (menor a 200 pb) o largos (mayor a 200 pb) [6, 7]. A pesar de que los ARNnc cortos como microARN (miARN) o ARN de interferencia pequeños (ARNsi) han sido ampliamente estudiados, la fracción mayor de los ARNnc está representada por los ARN largos no codificantes (ARNlnc), los cuales aún son poco estudiados y sus funciones no se encuentran bien caracterizadas[8].

ARN largo no codificante, clasificación y su implicación en enfermedades

Los ARNlnc habían sido considerados como ruido transcripcional debido a su baja expresión (baja en función a los genes codificantes de proteínas), funciones desconocidas y un nivel de conservación evolutivo bajo [2, 9].

Uno de los ARNlnc más conocidos fue también uno de los primeros en ser descubierto, este es el caso de *Xist* un transcripto no codificante de unos 17 kb que está implicado en el silenciamiento de uno de los cromosomas X en las hembras, proceso conocido como inactivación del gen X, con el objetivo de silenciar un cromosoma para evitar un desbalance en la actividad cromosómica[10, 11]. El descubrimiento de *Xist* así como el de otros ARNlnc reveló la gran importancia que podrían tener estos ARN en roles biológicos de las células.

El genoma de los organismos complejos codifica para una diversa cantidad de ARNlnc, que cumplen roles regulatorios en casi cada estado de la expresión génica y al igual que otros ARNnc juegan roles en la activación de genes, silenciamiento y en el mantenimiento de la integridad genómica. También interactúan con varios factores transcripcionales y enzimas remodeladoras de la cromatina para ayudar al reclutamiento en promotores de genes específicos o loci blancos y así modificar los estados epigenéticos de la cromatina [2, 9]. En

este trabajo nos enfocamos en la habilidad bien caracterizada de los ARNlnc para funcionar como moduladores epigenéticos.

El análisis transcripcional revela que la gran mayoría del genoma humano es transcrito de una manera dinámica y diferencial para producir una amplia variedad de ARNlnc [12]. Estos se diferencian de otros ARNnc al encontrarse localizados generalmente en los núcleos y en las regiones de cromatina en las células [4]. La mayoría de los ARNlnc ya caracterizados son generados por la misma maquinaria transcripcional que los ARNm, donde en el extremo 5' poseen un CAP de metilguanosa y a menudo sufren *splicing* y poliadenilación [4, 13].

Es beneficioso para la célula tener ARNlnc que posean funciones de regulación ya que estos se transcriben rápidamente sin tener que traducirse a proteína, lo que es favorable para la célula desde el punto de vista energético.

Una característica importante de los ARNlnc, es que son más propensos a plegarse en estructuras termodinámicamente estables, ya sea secundaria u otras con órdenes más complejos, siendo estas estructuras las que determinan su función [9].

Las proteínas de unión a ARN son una de las clases más abundantes de proteínas humanas. Las mismas poseen dominios de unión al ARN con regiones capaces de acomodar una gran diversidad de estructuras de ARN [14, 15]. Por otro lado, la determinación de la estructura secundaria, motivos de unión a proteína así como otras características en la secuencia primaria en los ARNlnc, podrían dar luz sobre las características funcionales de los mismos pudiendo brindar una herramienta predictiva para extrapolar las funciones de otros ARNlnc que contengan características similares [9].

Clasificación de los ARNlnc

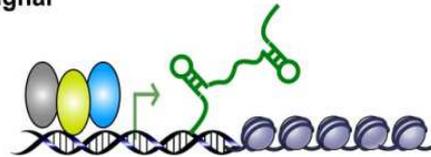
Debido a la amplia variedad de ARNlnc se pueden subclasificar de varias maneras, ya sea según su modo de acción, el rol que cumplen en las células, o su localización en el genoma respecto a los genes codificantes.

El modo de acción en el que estos ARNnc pueden actuar puede ser en *cis*/o *trans*. Los ARNnc que actúan en *cis*, pueden regular la expresión de un solo gen localmente o la expresión de múltiples genes (presente en un locus) al mismo tiempo abarcando una región cromosomal, inclusive pueden regular la expresión de un cromosoma entero, como es el caso del ARNnc *Xist*[9]. Los ARNnc que actúan en *trans* también regulan reclutando enzimas modificadoras de cromatina al igual que los que actúan en *cis*, pero estos operan regulando la expresión de genes en loci distantes en el genoma [16].

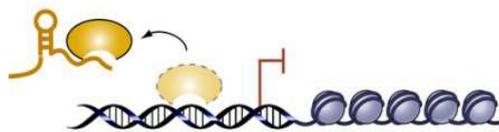
Los ARNnc se pueden clasificar también según la función que cumplen, que pueden ser de señalización, de “decoy”, guías o de scaffold (ver figura 1). Los de señalización están asociados a señales específicas, por lo que su expresión sirve como señal molecular. Los decoy, se unen a proteínas de unión a ARN con funciones tales como factores de transcripción y modificadores de la cromatina, donde su unión conduce a cambios en el transcriptoma celular ya sea positiva como negativamente. Estos ARNnc no cumplen ninguna otra función adicional [17]. Los ARNnc guías, se unen a complejos activos de regulación y lo dirigen a blancos específicos en promotores llevando a inducir una expresión o silenciamiento [17]. Los ARNnc scaffold actúan como plataforma, contienen diferentes dominios en donde interactúan con enzimas o factores modificadores de la cromatina llevando a una activación o represión transcripcional [17, 18].

Los ARNnc también se pueden clasificar en base a su localización relativa en el

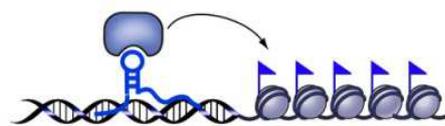
I. Signal



II. Decoy



III. Guide



IV. Scaffold

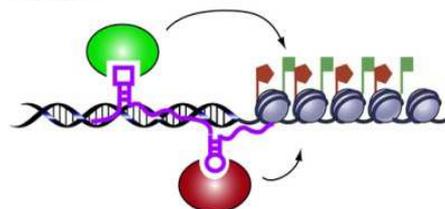


Figura 1. Categorización de los ARNnc según la función que estos cumplen. I) Señalización. II) Decoy. III) Guías. IV) Scaffold. Imagen obtenida de Wang, et al. 2011

genoma con respecto a los genes que codifican para proteínas. Estos pueden ser transcritos *sense-overlapping*, antisentido, intronicos o intergenicos [6, 8]. Los primeros está presente en los márgenes de los genes codificantes de proteínas y pueden contener exones de genes codificantes de proteínas [16]. Los ARNlnc antisentido son sintetizados en la hebra opuesta a la hebra que contiene los genes codificantes de proteínas y su secuencia puede superponerse de por lo menos un exón [16, 19]. Los terceros son originados de las regiones intronicas de genes que codifican para proteínas. Pueden originarse tanto en la hebra líder como en la complementaria y también pueden ser transcritos en dirección opuesta a los genes codificantes de proteínas [8] al igual que los ARNlnc intergenicos, salvo que los últimos poseen una separación transcripcional de los genes que codifican para proteínas [8].

Enfermedades asociadas a los ARNlnc

Los ARNlnc juegan un rol de regulación importante en el control de la actividad genómica, la expresión de genes codificantes de proteínas o de otros transcritos no codificantes. Ya que los ARNlnc son reguladores cruciales de la expresión de genes, es esperado que una desregulación pudiera derivar en funciones celulares anormales o defectos de crecimiento y por ende, ser responsable de diversas patologías. En este sentido, análisis de ARNlnc en una variedad de muestras de pacientes con cáncer evidencio que varios ARNlnc están desregulados en una amplia variedad de cánceres [2]. Expresión anormal de ARNlnc también se lo asocio en la respuesta al estrés, desordenes inmunológicos, y en distintas funciones neuronales [17].

ANRIL

ANRIL es un ARNlnc recientemente descubierta gracias al análisis en una familia francesa con historia clínica de melanoma y tumores en el sistema neural. ANRIL está localizado en el cromosoma 9p21 de humano y su nombre se origina por su siglas en inglés "Antisense Noncoding RNA in de INK4 Locus" el cual significa que es un ARNlnc que se transcribe en el sentido opuesto al clúster INK4b-ARF-INK4a (figura 2) [20].

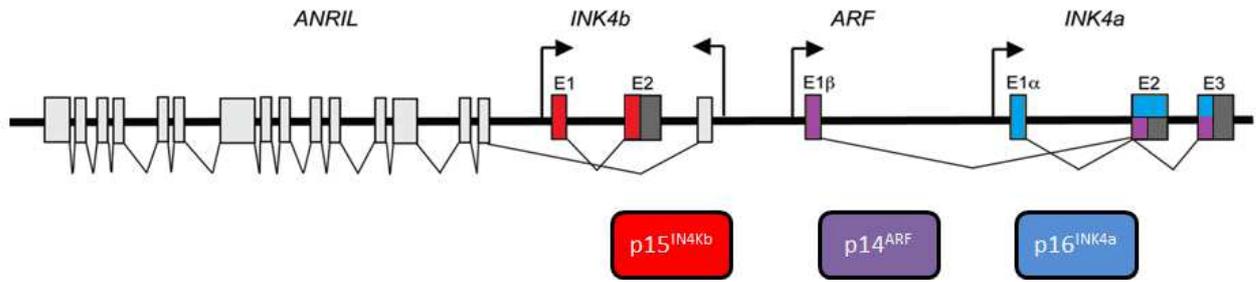


Figura 2. Organización del locus INK4b-ARF-INK4a. La región codificante es expresada en colores mientras que las regiones no codificantes están mostradas en blanco para ANRIL y gris oscuro para los otros genes del locus. La ilustración no está diseñada a escala y las posiciones son aproximadas.

ANRIL se extiende en unos 126.3 kb y es transcrito por la ARN polimerasa II en unos 3834 pb de ARNm aunque distintas variantes de splicing de ANRIL han sido reportadas, siendo los transcritos que contienen los exones externos los más abundantes (1 al 3 y del 13 al 19) y los exones internos los menos abundantes (del 4 al 12), existen también variantes de ANRIL que son circulares [18, 21]. La mayoría de las variantes se encuentran poliadeniladas excepto las variantes circulares [22]. A pesar de que muchas variantes han sido descritas y que muchas variantes son tejido específica, la caracterización de estas no está completa [22].

Su funcionalidad recae en una regulación epigenética, en la cual, este ARNnc posee la capacidad de reclutar proteínas modificadoras de la cromatina conocidas como complejos polycomb de represión. ANRIL actúa en *cis* interactuando con estos polycomb para formar una heterocromatinización del locus INK4b-ARF-INK4a llevando a su represión [21].

Los genes polycomb fueron primero identificados en *Drosophila melanogaster* como reguladores de la parte antero-posterior del cuerpo a través de la modulación de la expresión de genes *Hox* y fueron descritos como un grupo de proteínas envueltas en la represión de la transcripción. En mamíferos, existen proteínas polycomb altamente conservadas que forman dos complejos clasificados como: complejo polycomb de represión 1 y 2 (PRC1 y PRC2 respectivamente) en el cual la modificación de histonas afecta la estructura de la cromatina induciendo una compactación de la misma [21].

Se cree que ciertos ARNnc están físicamente vinculados con los complejos proteicos polycomb para direccionar a regiones específicas del genoma [21]. Muchos ARNnc tienen un

rol directo en el reclutamiento de PRC2 a un loci específico. Estos incluyen el RepA (secuencia con gran cantidad de repetidos del nucleótido adenosina) del ARNlnc *Xist* involucrado en la inactivación del cromosoma X, *Kcnq1ot1* relacionado con el *imprinting* de genes y HOTAIR envuelto en la represión de los loci HOX y promoviendo metástasis [18].

Aunque no se ha encontrado un motivo o una estructura secundaria característica en los ARNlnc que sirva para el reclutamiento de estas proteínas polycomb, existe evidencia que el reclutamiento sea llevado a cabo por patrones estructurales. Un ejemplo de esto, es el caso del ARNlnc *Xist* que contiene una estructura bien conservada de loops (bucles) conocido como RepA capaz de reclutar a PRC2 [22].

Los complejos multi-proteicos PRC1 y PRC2 están involucradas en la represión de genes vía dos tipos de modificaciones de histonas: metilación de la lisina 27 en la histona 3 y monoubiquitinación de la histona H2A [21]. El complejo PRC2 está encargado en el inicio de la represión, el mismo está compuesto por tres unidades: EED, SUZ12 y una metiltransferasa de histona EZH1/2 que cataliza una di-metilación y tri-metilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me2 y H3K27me3). El EZH1 del complejo PRC2 es también responsable de una monometilación general de la lisina 27 en la histona 3 (H3K27) a lo largo del genoma [21]. Mientras que el complejo PRC1 que incluye BMI1, mPh1/2, CBX y una ubiquitin ligasa E3 RING1 A/B participa en el mantenimiento de la represión gracias a que la H3K27me3 provee un sitio de reclutamiento para PRC1. Este reclutamiento es mediado por la proteína CBX que reconoce la H3K27 y estabiliza a PRC1 en la región donde la proteína RING1 monoubiquitina la lisina 119 en la histona 2 (H2AK119ub1) causando una compactación e impidiendo la acción de la ARNpolimerasa II [21]. Un punto crucial para entender la regulación del clúster INK4a-ARF-INK4b es saber cómo PRC1 y PRC2 son reclutados en esta región. Diversos estudios sugieren que ANRIL estaría reclutando al complejo PRC2 a través de la proteína SUZ12 al locus INK4 [18], donde luego de la metilación de la histona H3K27, el complejo PRC1 monoubiquitina la histona H2AK119 logrando un mantenimiento del silenciamiento del locus INK4 reprimiendo la transcripción del mismo (figura 3) [23].

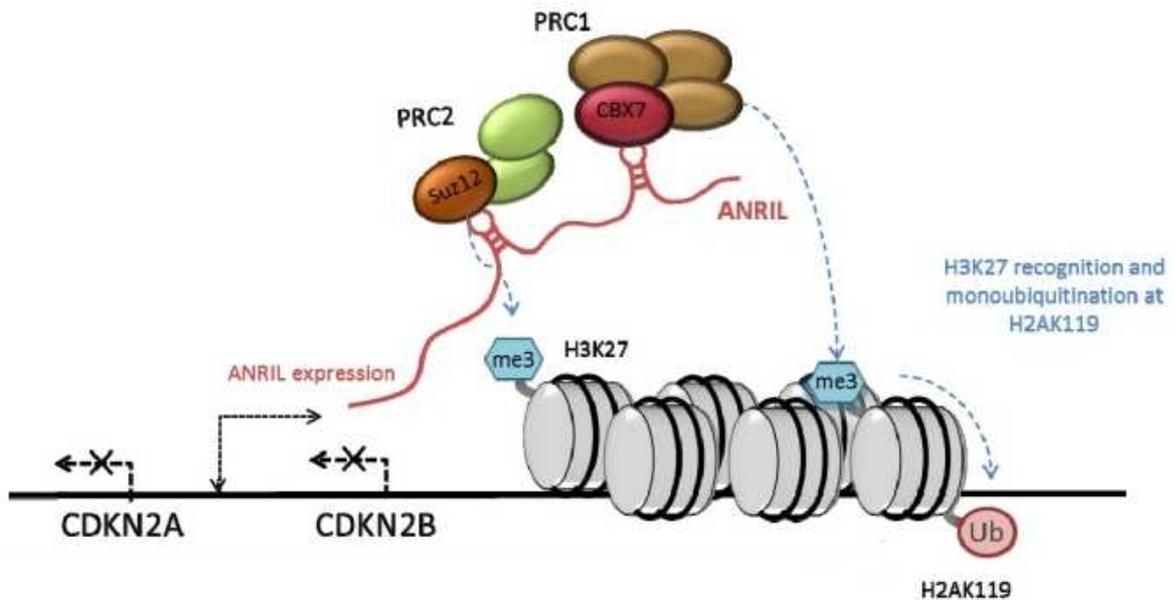


Figura 3. Representación ilustrativa del modo de actuación de ANRIL con los complejos proteicos PRC1 y PRC2 y su interacción con el locus INK4 para mediar la represión del mismo, donde PRC2 está involucrada en la iniciación del silenciamiento y PRC1 actúa en el mantenimiento de la represión. Figura obtenida de Congrains A. et al. 2013.

Clúster INK4b-ARF-INK4a

La implicancia de ANRIL con la represión del locus mediado por las proteínas PRC1 y PRC2, es que este clúster, que ocupa unos 42 kb en el cromosoma codifica para 3 proteínas importantes en la supresión de tumores; dos de ellas son dos inhibidores de ciclínas dependientes de kinasas (CDK): p15^{INK4b} y p16^{INK4a} y una codifica para un regulador de la vía de p53: p14^{ARF}. Estas proteínas juegan un rol central en la inhibición del ciclo celular, senescencia y estrés inducido por apoptosis limitando la progresión del tumor. Por lo que la expresión del locus de INK4b-ARF-INK4a está altamente controlada por ANRIL y los complejos polycomb para iniciar y mantener el estado silenciado [24, 25].

Estos genes supresores de tumores, también conocidos como CDKN2a (INK4a y ARF) y CDKN2b (INK4b) se encuentran parcialmente superpuesto con el gen que codifica para ANRIL y se sintetizan en dirección contraria a este transcripto no codificante [22]. CDKN2a codifica para la proteína p16^{INK4a} y p14^{ARF}, donde estas son dos variantes alternativas de splicing. El gen p14 es transcrito del exón 1β mientras que p16 es transcrito del exón 1α sin

embargo, estas dos proteínas comparten el segundo y tercer exón (ver figura 1). Aunque para p14^{ARF} el exón2 tiene un corrimiento en el marco de lectura del cual se origina su nombre: ARF; por “Alternative Reading Frame” (marco de lectura alternativo)[25]. Si bien p14^{ARF} y p16^{INK4a} son codificados por el gen CDKN2a, estos poseen rutas metabólicas distintas; p16 promueve senescencia, diferenciación y arresto del ciclo celular ya que controla la transición de ciclo G1 al S previniendo que se entre a la fase S por la ruta de la proteína retinoblastoma (Rb) al igual que la proteína p15 (codificada por CDKN2b o INK4b)[25-27]. Mientras que la proteína p14^{ARF} actúa en la ruta de p53 y Rb lo que conduce también en un arresto del ciclo celular, senescencia y apoptosis [20]. La senescencia celular es un estado irreversible del arresto celular en el que comprende varios cambios. Estos cambios incluyen desde agregación del retículo endoplasmático, cambio morfológico de las mitocondrias y mal funcionamiento lisosomal [24].

Visto que el ciclo celular está controlado por CDKs y estas son activadas por la unión de sus respectivas ciclínas (A, B, D y E) en distintas fases específicas del ciclo celular. Una vez activadas, generan una fosforilación de sus respectivas proteínas para permitir la progresión del ciclo celular. Las proteínas p15 y p16 se unen a las CDK 4/6 impidiendo la unión de estas kinasas a la ciclína de tipo D y como consecuencia inhibiendo a la CDK 4/6, previniendo que la misma fosforee Rb y por consiguiente, Rb va a permanecer unido al factor de transcripción E2F1 e imposibilitando la transcripción de genes necesarios para la transición G1/S (ver figura 4) [12;32;35]. Aunque p15^{INK4b} y p16^{INK4a} generalmente están expresados en tumores ya sea por metilaciones, mutaciones o deleciones, se cree que p15^{INK4b} estaría actuando como un respaldo para la proteína p16^{INK4a}[24].

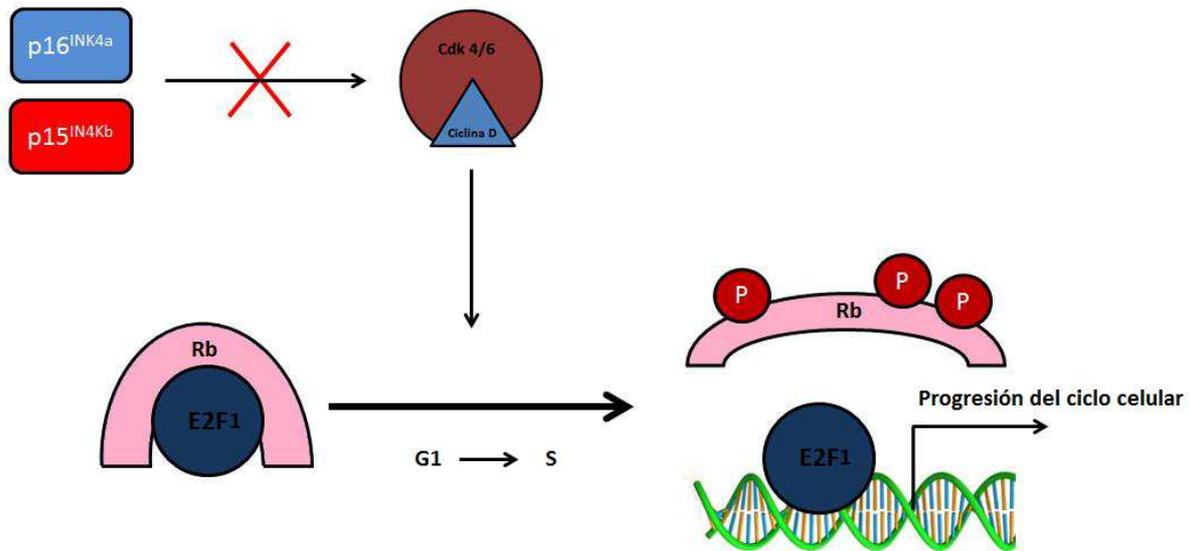


Figura 4. Ilustración de la ruta de p15 y p16. En su ausencia, no son capaces de inhibir la acción de las CDK 4/6 y por lo tanto las proteínas CDK van a promover la fosforilación de la proteína Rb y liberando al factor E2F, encargado de la transcripción de genes cruciales para transición G1/S.

La proteína p14^{ARF} activa al gen supresor de tumores p53 inhibiendo a la proteína ubiquitin ligasa Mdm2, esta proteína bloquea la activación transcripcional de p53 proporcionándole una poliubiquitinación y por ende una degradación proteosómica. La proteína p14 es capaz de unirse a la oncoproteína Mdm2 e inhibe su actividad ubiquitin ligasa por lo tanto p53 podrá inducir la expresión de genes como p21 que inhibe el complejo CDK-A/B y previniendo la progresión de la fase G2/metáfase aunque también genera un arresto del ciclo celular en las fases G1, dado que la proteína p21 evita la fosforilación de Rb. La proteína p14^{ARF} se relaciona con la ruta de p53 y Rb, por lo que esta promueve el inicio de un proceso de senescencia. A través de p53 también activa enzimas de reparación y se induce la muerte celular programada de la célula (figura 5) [24, 27].

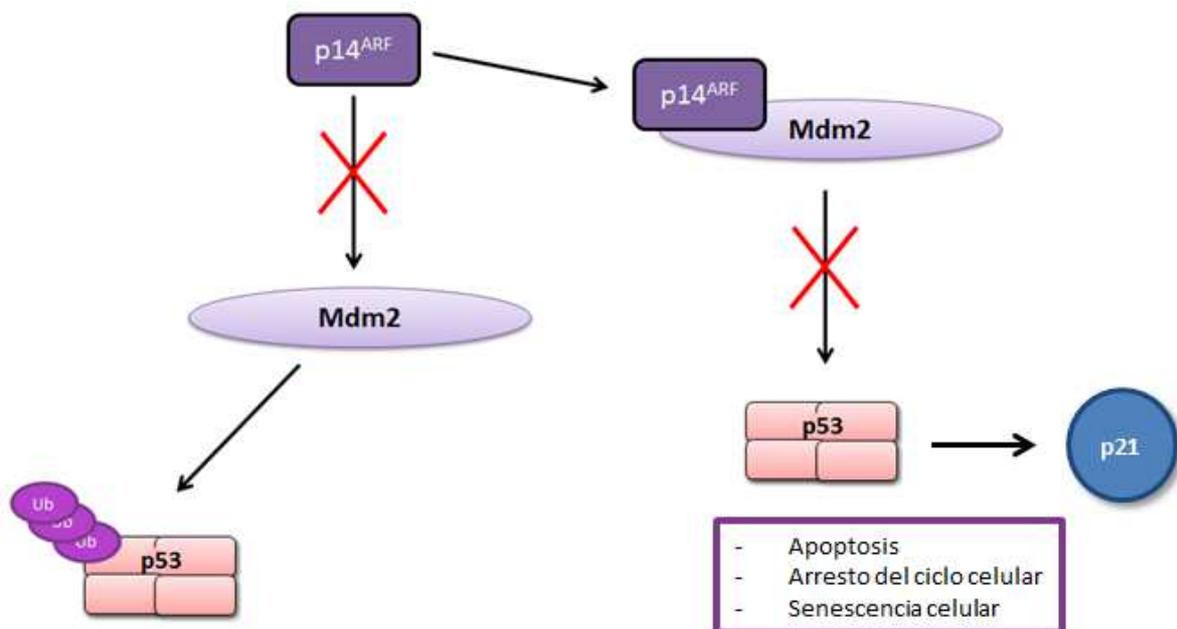


Figura 5. Representación del modo de acción de p14^{ARF}. Mdm2 ubiquitina a la proteína p53 para su degradación generando una progresión del ciclo celular. Cuando p14 se une a la oncoproteína Mdm2 impide su funcionamiento, por lo que la proteína p53 actúa activando a la proteína p21 que lleva a un arresto del ciclo celular, senescencia celular y apoptosis.

Estas proteínas supresoras de tumores p14, p15 y p16 son relativamente estables y su degradación no es particularmente importante en el control de los niveles celulares de las mismas[28]. Debido a esto, los genes del locus INK4 son principalmente regulados a nivel transcripcional, dando a entender la gran importancia que presenta ANRIL en la represión epigenética de las proteínas en cuestión.

Enfermedades asociadas a ANRIL

ANRIL está localizado en un locus con una susceptibilidad genética asociada con diversas patologías[21]. El clúster INK4A-ARF-INK4B está homocigóticamente deletado o su expresión silenciada en una amplia variedad de cánceres[22]. Se ha visto a ANRIL asociado a enfermedades coronarias y periodontitis. Además, ANRIL está relacionado a diabetes tipo 2, aneurisma intracraneal, endometriosis y también se encuentra asociado a la enfermedad de Alzheimer[29]. Se ha visto a ANRIL sobreexpresado en leucemia linfoblástica mientras que el gen CDKN2b mostraba una expresión opuesta; ANRIL también está sobreexpresado en cáncer

de próstata, glioma, melanoma, y otros tipos de cánceres[22].La expresión de ANRIL también está elevada en células epiteliales gingivales y fibroblastos gingivales durante la infección bacteriana, lo que sugiere el rol de ANRIL en la respuesta inflamatoria[22].ANRIL también está involucrado en respuesta a daño de ADN, donde es inducido en respuesta al mismo en el cual actúa regulando el ciclo, la apoptosis y reparación del daño.ANRIL también contribuye al mantenimiento de la respuesta al daño de ADN ya que la progresión tumoral a veces está acompañada de una inactivación de la respuesta al daño de ADN[30].Aunque una reducción de ANRIL reduce la proliferación debido a senescencia, que es un mecanismo para prevenir la tumorigénesis, su reducción también está implicada en disfunción endotelial[22].

ARN de interferencia

La interferencia por ARN (ARNi) es una herramienta molecular para el estudio de genes a nivel post-transcripcional así como también, una herramienta terapéutica para reducir o bloquear la expresión génica [31].Este mecanismo, que fue observado por primera vez en plantas en 1990 [23] fue un importantísimo paso para la biología moderna. A grandes rasgos existen dos clases de ARNi: los ARNsi y miARN. Muchos mecanismos de ARNi fueron desarrollándose con el tiempo, un método de ARNi involucra el uso de un ARNsh (por la palabra *short hairpin*-en inglés-). Los ARNsh consisten en dos secuencias de ARN complementarias de 19 a 22 pb unidas por un pequeño loop de 4 a 11 pb similar a los harpins encontrados naturalmente en los ARNmi[32].Al igual que los ARNsi, los ARNsh pueden ser transfectados en vectores plasmídicos y también pueden ser transfectados a través de vectores virales[32].Los ARNsh pueden ser transcritos tanto por ARNpol III; o por ARNpol II si es que contienen promotores modificados para la misma. A pesar de que los ARNsi y los ARNsh utilizan un mecanismo similar, la elección de cual método usar depende de diversos factores como tipo de célula, el tiempo que se disponga y la necesidad de que sea transitorio versus una integración estable.

El efecto del uso de ARNsi es corto y dependiente de las células que sufrieron la transfección. Esto es una desventaja considerable, ya que la célula al dividirse diluye la concentración celular del ARNsi, por lo que no es recomendado para generar una línea celular a largo plazo [32].Sin embargo, los vectores que generan una integración genómica,

como es el caso para losARNsh, logranproveer de una continua y heredable fuente de ARNi [33].El uso de ARNsh puede ser utilizado para generar una línea celular con un silenciamiento a largo plazo, eliminando la necesidad de tener que realizar varias rondas de transfecciones y por ende aumentar la reproducibilidad de los resultados. Aunque el desarrollo de una línea celular estable tiende a llevar más tiempo [32].

La incorporación de la secuencia de un ARNsh que actúa como un miARN asegura una producción eficiente y reduce la toxicidad a diferencia de un agregado de ARNi exógenamenteel cual puede hacerle incorporar una cantidad elevada del mismo y dañar a la célula [33].Los ARNsh pueden actuar tanto en el citoplasma como en el núcleo a pesar de que el proceso biosintético está más dilucidado en el citoplasma. La ruta comienza cuando un ARN de doble cadena es procesado por la enzima DICER (familia de las ribonucleasas de tipo III) en ARN pequeños de unos 20 nucleótidos aproximadamente. Después, los ARNsi son incorporados a un complejo conocido como RISC (por sus siglas en inglés: complejo de silenciamiento inducido por ARNi), aunque no todos los ARNsi son incorporados al RISC con la misma eficacia. La incorporación del ARNsi al RISC está acoplada a la separación de las dos cadenas, donde sólo una, conocida como hebra líder, se mantiene asociada al complejo y sirve para identificar al ARNm con la secuencia complementaria. Cuando las moléculas de ARNm complementarias son encontradas, la interacción entre el ARNsi y elARNm conduce al clivaje del último. El clivaje del ARNm está dado por la proteína Argonauta (Ago) que es el centro catalítico de la proteína RISC el cual posee un dominio ARNasaH [33-35].

Como la actuación del mecanismo de acción de un silenciamiento depende de cierta homología y la secuencia es relativamente corta, no todas las secuencias son tan específicas[25]. Los potenciales *off-target* es un asunto a tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados. Con el uso de una herramienta así, en principio se podría utilizar para suprimir cualquier gen, sin embargo, al no conocerse bien los mecanismos de la ruta de inhibición y supresión de genes blanco, a menudo este proceso es impredecible y a veces no es tan eficiente como se cree[33].

Diseño de un ARNsh

Las características estructurales básicas de un ARNsh son, poseer una secuencia derivada de la secuencia del gen blanco, intercalada de unos pocos nucleótidos que actúan como loop y seguido de otra secuencia nucleotídica antisentido (reversa y complementaria de la secuencia blanco inicial). Estas secuencias resultan en una estructura de horquilla del cual deriva su nombre.

Para la realización del ARNsh hay que tener a consideración varios aspectos y aunque se tenga en cuenta estos aspectos, no existe garantía de lograr un silenciamiento efectivo para un ARNsi dado, hasta una vez de realizado el experimento[32]. Como primer enfoque es necesario realizar una búsqueda en las bases de datos para ver si se describen algunas secuencias de ARNsi de interés y que hayan sido previamente evaluadas experimentalmente e inclusive muchas se pueden adquirir comercialmente. Si ya existe un ARNsh del gen de interés ya sea validado comercialmente o en una publicación, es probable que sea útil usar el mismo sitio blanco ya que ARNsh que muestran eficacia de *knockdown* en una célula, probablemente sirva para otras células[32]. Previo al diseño del ARNsh, es necesario saber si el gen de interés tiene una o más variantes y si se quiere poner como blanco todas las potenciales formas del gen o ciertas variantes de splicing específicas. Para lograr esto, hay que seleccionar sitios blancos potenciales con el exón o exones de interés o con el 5' o 3' UTR dependiendo de lo que se desee silenciar. Hay que evitar que el ARNsh posea secuencias con corridas de cuatro o más adenosinas o timidinas si se está planeando que este vaya a ser expresado en un plásmido o un vector viral que estén bajo control de una ARN polimerasa 3. Estas secuencias podrían crear problemas potenciales con una terminación prematura durante la transcripción y eliminar sitios blancos potenciales en una región que se superpone con un SNP (single-nucleotide-polymorphiso)[32]. Se disponen en la actualidad de programas informáticos capaces de predecir posibles ARNsi efectivos para producir silenciamiento de una secuencia blanco determinada donde hay una amplia variedad de sitios comerciales y no comerciales.

Desde que es difícil predecir los efectos de la estructura secundaria del ARNm de interés, se recomienda el diseño de diferentes ARNsh con sitios blancos diferentes para el gen en cuestión[32].

Sistema Inducible de tetraciclina

Un sistema de expresión estable que resulta en un silenciamiento a largo plazo de cierto gen puede ser eficiente siempre y cuando el gen blanco a silenciar no resulte ser esencial para el crecimiento celular, viabilidad o desarrollo celular. Por lo que una expresión constitutiva o un silenciamiento transitorio de un ARNi no es apropiada para estas circunstancias. Para solucionar este problema se ha desarrollado la capacidad de expresar cierto ARNi inducibles o bajo condiciones específicas del medio y también para poder moderar la cantidad de silenciamiento deseado.

Un sistema inducible es capaz de inducir la expresión de cierto gen o silenciarlo, pudiendo ser esta expresión controlada por la administración de cierto agente inductor. Un sistema inducible de tetraciclina generalmente posea tres componentes individuales: un plásmido que provee una expresión constitutiva de un represor, en este caso tetR, un plásmido que permite la expresión inducible de un ARNsh por una vía dependiente de tetraciclina y por último de un inductor, la tetraciclina, que dependiendo de su presencia o no va a inducir la expresión del ARNsh de interés.

Sistema TetR

La resistencia a tetraciclina es una de las resistencias a antibióticos más comunes en bacterias. Los genes que determinan la resistencia a tetraciclina se encuentran comúnmente en transposones haciéndolos rápidos de transferir a otras bacterias. La expresión de genes de resistencia a tetraciclina en medios sin tetraciclina no es ventajoso a nivel metabólico por lo que proteínas represoras de tetraciclina reprimen la transcripción de genes de resistencia a tetraciclina en su ausencia. En E. coli la proteína represora de tet (tetR), regula negativamente los genes de la resistencia a tetraciclina a través del operón Tn10. TetR bloquea la transcripción de estos genes por la unión a una secuencia operadora conocida

como tetO en la ausencia de tetraciclina. TetR y tetO dieron la base biotecnológica de regulación e inducción para el uso de sistemas experimentales en mamíferos [36].

El vector pcDNA6/TR es un plásmido diseñado para el uso del sistema T-REXTM. Donde el vector expresa el represor de tetraciclina bajo el control del promotor humano de citomegalovirus (CMV) [37]. El gen TetR codifica para la proteína represora de unos 207 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 23 KDa [37].

La tecnología T-REX facilita la expresión de cierto gen regulada por tetraciclina en células de mamífero. La regulación de tetraciclina en el sistema T-REX está basada en la unión de la tetraciclina a la proteína represora de tetraciclina para liberar la represión que existía en el promotor que controla la expresión del gen de interés. El objetivo de este vector es lograr una expresión constitutiva y gen para obtener el represor de tetraciclina [38].

Sistema pENTR H1/TO

El vector pENTR H1/TO BLOCK-iTTM Inducible H1 RNAi Entry Vector Kit combina la tecnología BLOCK-iT y T-REX para lograr una expresión de un ARNsh regulada de una manera dependiente de tetraciclina [38]. El vector que en principio se encuentra linealizado con 4 nucleótidos sobresalidos en sus extremos (*sticky ends*), el cual permite una inserción dirigida del oligo doble hebra que codificara para el ARNsh de interés.

El constructo que se puede apreciar en la figura 24-b, contiene un promotor H1/TO humano para una transcripción dependiente de la ARN polimerasa 3 [39], el promotor H1/TO fue modificado para contener dos secuencias tetO₂ que sirven como un sitio de unión para el represor de tetraciclina y así modera la expresión del ARNsh en función de la droga tetraciclina. Seguido de la secuencia del inserto se encuentra una secuencia de seis residuos de timidinas que actúan como terminador de la transcripción [38].

Estrategia experimental

Para la elaboración del sistema se precisó diseñar varios ARNsh ya sea por una búsqueda bibliográfica de secuencias que puedan silenciar el transcripto de interés o por la

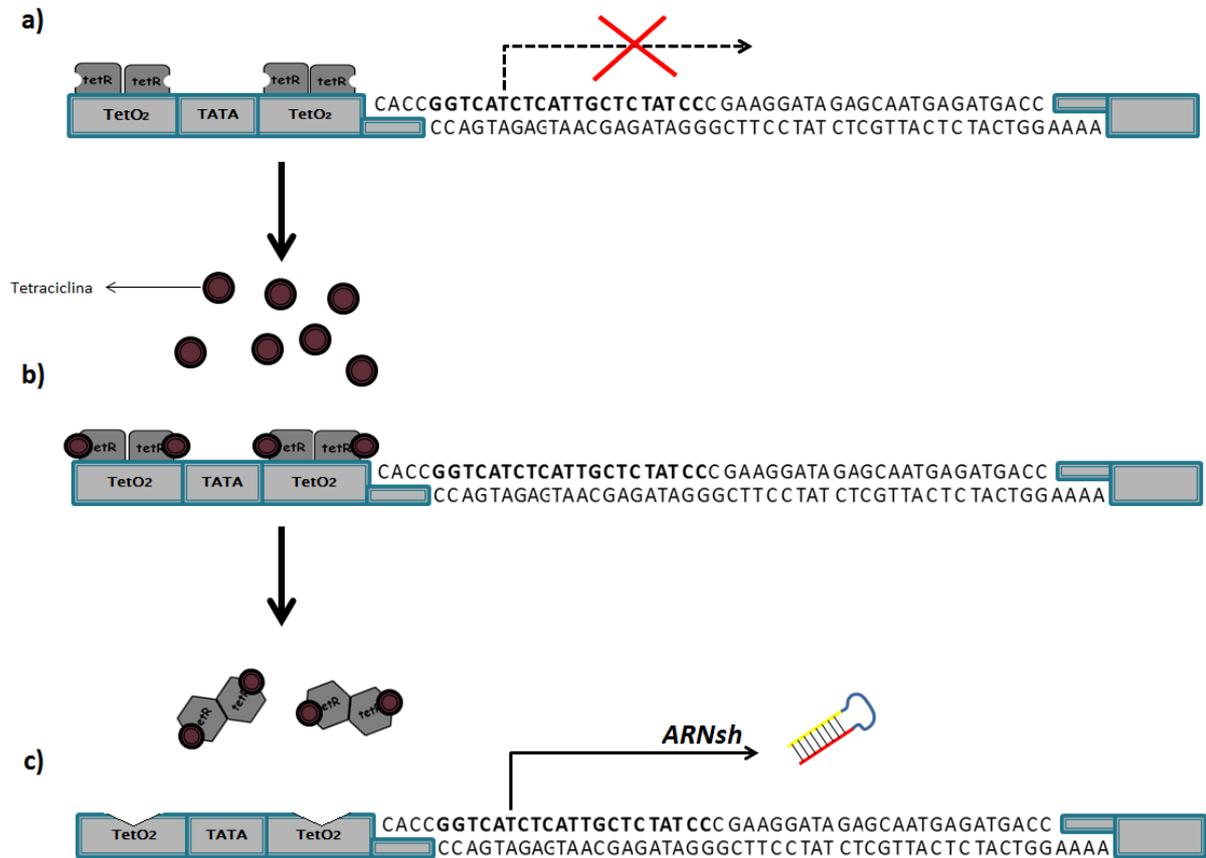


Figura 8. Ilustración de la acción del constructo en presencia o no de la droga tetraciclina. (a) En la ausencia de tetraciclina el ARNsh no podrá ser sintetizado ya que los homodimeros de tetR unidos a los operadores TetO₂ bloqueando su transcripción. (b) Cuando se le adiciona tetraciclina, esta se une a los operadores y causándole un cambio conformacional. (c) Este cambio estructural hace liberar a la proteína represora del operador y permitiendo la transcripción del ARNsh de interés.

El sistema inducible es llevado a cabo en una línea celular transformada que no posea ninguna mutación ni metilación en el clúster INK4, con el objetivo de analizar si existe una relación entre la expresión de ANRIL con las proteínas p14, p15 y p16 ya que existen indicios de una regulación negativa [18, 20, 29]. Para esto se estudiará la cantidad de transcritos y proteínas de los genes de este clúster en función del nivel de expresión de ANRIL.

Como ya se mencionó, las proteínas de este clúster estarían implicadas en un arresto del ciclo celular y en la progresión de senescencia por lo que se estudiará si la disminución de la expresión de ANRIL afectaría la tasa de crecimiento celular asociada a un arresto en G1 y si aumenta los niveles de senescencia celular [18, 20, 29].

A pesar de que ANRIL está siendo foco de investigación, no se ha podido evidenciar detalladamente su localización a nivel subcelular aunque existen indicios que posee una localización nucleolar. En este trabajo se intentará dilucidar la localización de ANRIL por RNA FISH. Dado que también diversos estudios indicarían que ANRIL recluta a los complejos PRC1 y PRC2 para llevar a cabo la represión del clúster INK4, se estudió la localización de proteínas asociadas a estos complejos y se la comparó con la localización de ANRIL.

Materiales y métodos

Elaboración del sistema inducible

Amplificación del vector pcDNA 6/Tr

Para obtener una cantidad considerable del vector se procedió a amplificarlo utilizando 1 μ l de pcDNA 6/TR en 4 μ l en buffer TE pH=8 donde posteriormente se la agregó a 50 μ l de la bacteria electro-competente E. coli (JM109) para después verterlo en una cuba para electroporación (previamente enfriada). La electroporación ocurrió en un Electroporator 2510Eppendorf®. Luego de la misma se le agrega 300 μ l de medio LB y después se plaquea 150 μ l en 2 placas de LB+AMP 100 μ g/ml. Se utilizó como control negativo 150 μ l de E coli (sin vector) en LB AMP 100 μ g/ml. Incubación a 37°C overnight (ON). Al día siguiente se picaron las colonias y se las pusieron en 3 ml de LB ampicilina (AMP) 100 μ g/ml también se dejó un tubo solo con LB AMP 100 μ g/ml como control negativo. Después de la incubación ON a 37°C se eligió uno de los tubos y se dejó crecer las bacterias en 200 ml de LB AMP 100 μ g/ml donde después de otra incubación ON a 37°C se realizó una Midi-prep según el protocolo: PureYield™ PlasmidMidiprepSystem- Promega. La cuantificación del ADN plasmidico fue realizada en el NanoDrop 1000 de ThermoScientific.

PureYield™ PlasmidMiniprepSystem

Se picaron las colonias de interés y se incubaron en 3 ml de medio LB ON a 37 °C en agitación constante. Al día siguiente se le agregó 600 μ l de cultivo de bacteria a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, posteriormente se le adiciono 100 μ l de CellLysis Buffer y se mezcló invirtiendo 6 veces. Después se le agregó 350 μ l de NeutralizationSolution (enfriado a 4 °C) y se mezcló. Se centrifugo a 10000 rpm por 3 minutos y se transfirió el sobrenadante a una mini-columna (PureYield™ Minicolumn). Se colocó la mini-columna en un tubo colector y se centrifugó a la misma velocidad por 15 segundos. Se descartó lo que quedó en el tubo colector y se colocó la mini-columna en el mismo tubo colector. Se le agregó 200 μ l de EndotoxinRemovalWash en la mini-columna y se centrifugó nuevamente por 15 segundos. Posteriormente se adicionó 400 μ l de ColumnWashSolution en la mini-columna para después centrifugar a 10000 rpm por 30 segundos. Luego se transfirió la mini-columna a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml limpio y se adicionó de 30 a 50 μ l de agua libre de

nucleasas. Se lo dejó 1 minuto a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a máxima velocidad por 15 segundos para que diluya el plásmido. El ADN plasmídico se guardó a -20 °C.

PureYield™ PlasmidMidiprepSystem

Se pica la colonia de interés y se las incubó en 200 ml de medio LB con antibiótico. Se incubó a ON a 37 °C en agitación constante. Al día siguiente se centrifugó a 5000g por 10 minutos. Se descató el medio y el pellet se resuspendió en 6 ml de CellResuspensionSolution. Se le agregó 6 ml de CellLysisSolution, luego se mezcló moderadamente y después se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionó 10 ml de NeutralizationSolution y se mezcló. Luego se centrifugó a unos 15000 g por 15 minutos. Paralelamente se ensambló la columna para la purificación de ADN colocando la columna de lavado (PureYield™ ClearingColumn) encima de la columna de unión (PureYield™ BindingColumn) y se la conectó a una bomba de succión. Se vertió el sobrenadante en la columna y se aspiró con la bomba hasta que todo el líquido pasó por el mismo. La columna de lavado es removida dejando solamente la columna de unión. A la misma se le agregó 5 ml de EndotoxinRemovalWash y se succionó la solución. Posteriormente se le agregó 20 ml de ColumnWashSolution y nuevamente se aspiró la solución. La columna se dejó que succione aire por 1 minuto con el objetivo de dejarla secar. Para finalmente colocar un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml en la base de un Eluator™ VacuumElutionDevice (Cat.# A1071) y ensamblar el Eluator™ VacuumElutionDevice para insertar la columna de unión en la bomba. Se le agregó 500 µl de agua libre de nucleasas a la columna de unión y se lo dejó hasta que todo el líquido haya pasado por la columna para luego remover el tubo de microcentrifuga del dispositivo y medir la concentración de ADN.

Digestión con enzimas de restricción.

Para verificar que se haya amplificado y purificado el vector pcDNA 6/TR se realiza una digestión con enzimas de restricción (ER). Para esta digestión se utilizaron 2 ER diferentes: *BamHI* y *HindIII* de Roche® en donde se realiza una mezcla con 5 µl de buffer provisto por el fabricante (buffer B), 4 µl de ER, 35 µl de agua ultra pura y 7 µl de ADN plasmídico (concentración 794.9 ng/µl). Se incubó ON a 4°C y se analiza por electroforesis de ADN en

gel de agarosa. El producto de pcDNA 6/TR incubado ON, es visualizado en un gel de agarosa 1%.

Electroforesis de ADN en gel de agarosa.

Para la electroforesis en geles de agarosa se utiliza la UltraPure™ Agarose de Invitrogen en buffer TAE (Tris-aceto/EDTA) 1.0X. Se realizan geles de 1%, 2% y 4% según las instrucciones del fabricante donde son preteñidos con 3ul de Bromuro de Etidio (BrEt) cada 50ml de buffer TAE y su visualización es bajo luz ultravioleta. Se utilizó un buffer de carga 6X y la migración se realiza a un voltaje constante de 100V en una cuba electroforética i-Mupid-Eurogentec. Los marcadores de peso molecular utilizado fueron el GeneRuler™ 1Kb DNA Ladder, ready-to-use, #SM0318, Fermentas LIFE SCIENCES para los geles de 1% de agarosa, el de 100 bp DNA Ladder de Invitrogen™ Life Technologies Cat. No. 15628-019 para los geles de 2% y 50bpLadderGeneRuler™, ready-to-use, #SM0373; Fermentas LIFE SCIENCES para el de 4%.

Diseño del ARNsh

Se realiza la construcción de 4 ARNsh distintos para el ARNinc ANRIL. Uno de los cuatro se elaboró a partir de la secuencia obtenida de Kotake et al. 2011 ([18]) donde solo fue dada la secuencia blanco, mientras que las otras tres fueron obtenidas del programa [invitrogen.com/rnaitomando](http://www.invitrogen.com/rnaitomando) las consideraciones planteadas en la introducción.

En la elaboración del mismo se efectúa una serie de pasos que comprenden: el diseño, anelring, ligación, clonado, secuenciado y su amplificación.

Diseño de oligos

Debido a que solo se sabía la secuencia blanco para el ARNsh obtenido Kotake et al. 2011 (5'GGTCATCTCATTGCTCTATCC 3'), se procedió a realizar una búsqueda en BLAST donde se encuentra en el exón 1 a los 179 pb (por lo que al ARNsh elaborado a partir de esta secuencia blanco se denomina sh179).

La hebra líder está compuesta por la secuencia blanco (ya dada), seguida por un loop y después por una secuencia antisentido de la hebra blanco. La hebra antisentido

fue **GGATAGAGCAATGAGATGACC** mientras que el loop elegido fue **CGAA**. A la hebra líder se le adiciona una secuencia previa a la de la secuencia blanco, requerida para la clonación: **CACC**. La hebra complementaria comprende de una secuencia reversa y complementaria sumado a una secuencia de cuatro adenosinas requerida para la clonación en el vector.

Por lo que la secuencias de oligos para la formación del sh179 son:

- Hebra líder: 5' CACCGGTCATCTCATTGCTCTATCCCGAAGGATAGAGCAATGAGATGACC - 3' y la hebra rezagada: 5' AAAAGTGGCCAGTAGAGTAACGAGATAGGGCTTCTATCTCGTTACTCTACTG G-3'

Las otras 3 secuencias obtenidas por el programa también están localizadas en el primer exón y denominadas según su ubicación en la secuencia de ANRIL:

- sh1553 hebra líder: 5' CACCGCCTATCATATAAGCCCAAATCGAAATTTGGGCTTATATGATAGGC -3' y la hebra rezagada: 5' AAAAGCCTATCATATAAGCCCAAATTTGATTTGGGCTTATATGATAGGC -3'.
- sh1607 hebra líder: 5' CACCGCCCAATTATGCTGTGGTAACCGAAGTTACCACAGCATAATTGGGC 3' y hebra rezagada a: 5' AAAAGCCCAATTATGCTGTGGTAACTTCGGTTACCACAGCATAATTGGGC 3'
- sh1682 hebra líder: 5' CACCGCACATATCCATCTATCATCTCGAAAGATGATAGATGGATATGTGC 3' y hebra rezagada: 5' AAAAGCACATATCCATCTATCATCTTTGAGATGATAGATGGATATGTGC 3'.

Los oligos de la hebra líder y la hebra rezagada 179, 1553, 1607 y 1682 fueron encargados a IDT® Standard Desalting

Annealing de oligos

Una vez obtenido los oligos simple hebra se procede a realizar el annealing de modo de generar los oligo-doble-hebra que serán utilizados para ligar al vector de interés. El annealing de los oligos se realiza según el protocolo: BLOCK-iT™ Inducible H1 RNAiEntry Vector Kit Invitrogen™. Donde en un tubo de micro centrífuga de 0.5 ml se le agregan los siguientes reactivos en orden de aparición para la preparación de los oligos doble hebra: 5 µl de hebra líder a 200 µM, 5 µl de hebra complementaria a 200 µM, 2 µl de 10X Oligo

annealingBuffer -suplementado en el kit- y 8 μl de Agua libre de DNasa y RNasa-suplementado en el kit-. Estos 20 μl se incubaron a 95°C por 4 minutos y después se deja que la reacción se enfríe a temperatura ambiente por 5-10 minutos, este es el periodo de tiempo en que los oligos simple hebra se van a hibridar para formar los oligos doble hebra. Luego se centrifuga por unos 5 segundos. En este mix se obtuvo una concentración de oligo doble hebra de 50 μM . Se toma 1 μl del mix de 50 μM (el resto se guarda a -20°C) y se le agrega 100 μl de agua libre de DNasa y RNasa para obtener una concentración de 500 nM.

En un tubo de microcentrifuga de 0.5 ml se le agrega: 1 μl del mix de 500nM (el resto se guarda a -20°C), 10 μl de 10X Oligo annealing Buffer, 89 μl de agua libre de DNasa y RNasa y se mezcla pipeteando 5-10 veces de modo de obtener una concentración de oligos doble hebra de 5 nM, donde se alícuota y se guarda a -20°C.

Ligación y clonado en el vector pENTR

La ligación y clonado se realizó según se plantea en el protocolo BLOCK-iT™ Inducible H1 RNAiEntry Vector Kit Invitrogen™. Para la ligación al vector pENTR™ H1/TO se utilizaron los siguientes reactivos en orden de aparición: 4 μl 5X Ligation Buffer, 2 μl de pENTR™ H1 /TO (0.75 ng/ μl), 5 μl de oligo doble hebra 5 nM, 8 μl de agua libre de DNasa/RNasa, 1 μl de T4 DNA Ligase (1 U/ μl) luego se incubó el mix de ligación por 2 horas a temperatura ambiente. Después se coloca el mix de ligación en hielo para realizar la transformación y el resto se guarda a -20°C.

Luego se procedió a hacer la transformación del vector pENTR™ H1 /TO con el inserto usando el procedimiento: TransformingOneShot® TOP10 Competent E. coli. Para realizar la transformación se agregó 2 μl del mix de ligación en un vial de OneShot® TOP10 E. coli químicamente competente y se mezcló levemente, se incubó en hielo por 5 minutos y se le da un shock térmico de calor a las células por 30 segundos a 42°C sin agitación. Inmediatamente después se transfirió el tubo a hielo y se le agregó 250 μl de medio S.O.C. Este se incubó a 37°C por 1 hora en agitación moderada. Luego se expandió y se seleccionó en una placa de LB pre-calentada a 37°C conteniendo 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Kanamicina. También se expandió una placa de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Kanamicina la bacteria E. coli usada para la transformación sin el vector como control negativo.

Secuenciado

Al día siguiente de la transformación con el vector pENTR™ H1 /TO con el inserto, se pican de 5-10 colonias resistentes a kanamicina y se las incuba en 3 ml de LB con 50 ug/ml de Kanamicina ON a 37°C. Para posteriormente realizar una Mini-prep del plásmido según el protocolo PureYield™ PlasmidMiniprepSystem.

La secuenciación fue realizada en la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo, donde se utilizó un secuenciador automático de cuatro capilares, modelo AB13130 (AppliedBiosystems) donde se utilizó el M13 reverse primingsite (ubicado a 202 pb de la ubicación del inserto) y su secuencia se analizó con el programa informático BioEdit.

Se secuenciaron 29 vectores con el posible inserto correspondiendo a 3 vectores con el sh179, 15 del sh1553, 5 del sh1607 y 6 del sh1682. Posteriormente se realizó un alineamiento con el constructo con el inserto doble hebra y se compara con la secuencia sin el inserto con el software MEGA 5.2. Luego se eligió una muestra de cada shARN y se realizó una Mini-prep según el protocolo: PureYield™ PlasmidMiniprepSystem con el fin de tener una cantidad considerable y una purificación mayor del constructo para la transfección.

Línea celular

Se trabajó con células transformadas derivada de fibroblastos de pulmón fetal del CORIELL INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH (AG10076). Estas fueron cultivadas a 37°C-5% de CO₂- usando como medio de cultivo MEM suplementado con 1% de L-glutamina, 1% de solución de penicilina-estreptomina y 10% de suero fetal bovino inactivado por calor.

Para los fibroblastos con el vector pcDNA 6/Tr se usó el medio de cultivo MEM suplementado con lo anterior mencionado y 5 µg/ml de Blastidina. Mientras que la línea con los vectores pcDNA 6/Tr y pENTR™ H1/TO se mantuvo con medio MEM y 5 µg/ml de blastidina y 250 µg/ml de Zeocina una vez que la línea celular se estabilizó.

La inducción fue realizada con 10µg/ml de tetraciclina –suplementada por el kit pENTR™ H1/TO- en el cual previo a los experimentos de funcionalidad, se realizó un ensayo de

toxicidad para verificar si la droga no afectaba a las células. El ensayo consistió en la adición de tetraciclina a células sin transfectar y se observó si cambiaba la morfología celular y la cantidad de células al día 6 días después de la adición de tetraciclina en comparación con células sin transfectar con tetraciclina.

Transfección de los vectores

Una vez obtenido los vectores pcDNA 6/TR y pENTR™ /H1 /TO con el inserto se procedió a la transfección usando el protocolo: Effectene® Transfection Reagent para células adherentes.

Primero se transfectó el plásmido pcDNA 6/TR, usando el protocolo mencionado en una placa de 100 mm. Donde las placas fueron transfectadas cuando se alcanzó un 60 a 80% de confluencia. Posteriormente se diluyó 2 µg de ADN en un volumen total de 300 µl de Buffer EC. Luego se le agrega 16 µl de Enhancer y se vortexea 1 segundo para luego dejar 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 60 µl de Effectene Transfection Reagent a la mezcla, se vortexeó 10 segundos y se deja 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo de transfección. Mientras el complejo de transfección se lleva a cabo, se aspira el medio de cultivo y se lava una vez las células con 4 ml PBS 1X y se le agrega 7 ml de medio MEM a las células. Se le agrega 3 ml de medio de cultivo al tubo conteniendo el complejo de transfección luego se mezcla y de inmediato se le agrega a la placa gentilmente se mezcla para permitir una distribución uniforme. A las 24 horas se lava con 4 ml de PBS 1X y se le cambia el medio a medio solo (MEM sin el complejo de transfección) para permitir que las células se recuperen. A las 24-48 hrs después de la transfección, se le agrega al medio 5 µg/ml de antibiótico blasticidina para su selección. También se realiza lo mismo a otra placa con las mismas células que no fue transfectado como control negativo. La obtención de colonias con el vector pcDNA 6/TR tarda 10 días después de comenzado la selección.

Una vez que la línea celular posee el vector pcDNA 6/TR se procedió a la transfección con el vector pENTR™ H1/TO con los shARN 179, 1553, 1607 y 1682 usando el protocolo: Effectene® Transfection Reagent para células adherentes para una placa de 60 mm. El protocolo de transfección fue similar al de la transfección con el vector pcDNA 6/TR salvo por las

cantidades de los reactivos como el volumen de 150 μ l de Buffer EC, 8 μ l de Enhancer, 25 μ l de EffectenetransfectionReagent. La dilución de 1 ml de medio en el tubo conteniendo el complejo de transfección y un volumen 4 ml de medio en la placa de 60 mm. El medio utilizado para la transfección con el vector pENTR™ H1/TO con el inserto fue MEM con con 5 μ g/ml de blasticidina (para que no se “pierda” el vector pcDNA 6/TR). A las 24 horas después de la transfección se remueve el medio con el complejo de transfección, se lava con PBS 1X y se sustituye con medio con blasticidina para permitir que las células se peguen y se recuperen. 48 horas después de la transfección se le agrega el antibiótico Zeocina 250 μ g/ml para su selección con el medio ya conteniendo blasticidina. La aparición de células estables resistentes a Zeocina duró de 10-15 días.

Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas se aspiró el medio de cultivo y se lavó con PBS 1X, se tripsinizó y se incubó 5 minutos a 37°C. Luego se centrifuga por 5 minutos a 1000 rpm, se removiél sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de PBS 1X frío para luego se vuelve a centrifugar por 5 minutos a 1000 rpm y se aspira el sobrenadante. El pellet se resuspende en 1 ml de PBS 1X frío y se pasa a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml en donde se centrifuga por 10 minutos a 1000 rpm (4°C). Se remueve el sobrenadante y se resuspende el pellet en 500 μ l de RIPA Buffer con inhibidores de proteasa para luego centrifugar por 25 minutos a 10000 rpm (4°C) y se extrae el sobrenadante.

La concentración proteica se mide por el método de Braddford haciendo una curva de calibración con BSA a distintas concentraciones donde las mediciones son realizadas en el nanodrop. La extracción de proteína se guarda a -20°C.

Western blot

La realización del Western Blot se basó en el protocolo obtenido de Leeb M, et al.[41]. Para la verificar la presencia de la proteína tetR se realizó un gel de poli(acrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

Para la realización de la corrida electroforéticase prepara un gel *destacking* de 3.9% depoliacrilamiday un gel de separación de 7% o de 10% con un rango de 50-500kDa y 20-300kDa respectivamente.Para esto se agregan los componentes detallados en el apéndice en orden de aparición y los geles fueron preparados con el sistema de Biorad utilizando vidrios de 1,5 mm.

Una vez preparado el gel de separación, se agrega 1 ml de isopropanol al gel para evitar que se evapore y se deja que la polimerización ocurra (aproximadamente 1 hora). Previo a verter el gel de *stacking*, se extrae el isopropanol del gel de separación. Se deja que se polimerice el gel *destacking*. Los geles son guardados en nylon y buffer de corrida a 4°C hasta el día de la corrida. Para la preparación de las muestras de proteínas para el Western Blot se tomaron 30ug. Luego se le agrega buffer de corrida en una dilución 1:5 de la muestra de colorante de carga y se calienta a 95°C por 5 minutos.

La corrida se realiza con un buffer de corrida Tris-gly a un voltaje constante de 90V y con un amperaje en el rango 0,02-0,03 A. Se utilizó 5µl de marcador de peso molecular #26634 Spectra Multicolor BroadRangeProteinLadder de ThermoScientific para el gel de 7% y 5µl del marcador de peso molecular PageRuler™ PrestainedProteinLadder #SM0671- Fermentas LIFE SCIENCES para el gel de 10%. Previo a realizarse la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se la sumerge en metanol por 1 minuto, después se lo sumerge por 3 minutos en agua destilada para luego sumergirlo en el buffer de transferencia en 20% de metanol.

Una vez terminado la corrida, se trata el gel por 5 minutos en buffer de transferencia y se monta el dispositivo para hacer una transferencia “semi-dry” con papeles Whatman de 8.5cm x 7.5cm mojados en buffer de transferencia. Tres papeles son puestos como base seguido del papel de transferencia, después el gel de poliacrilamida y finalizando con 3 papeles. Una vez montado el dispositivo se realiza la transferencia con un amperaje constante de 0.40 A por unos 30 minutos aproximadamente y el voltaje de la transferencia que no supere los 10V, que es un comprobante que se está transfiriendo correctamente. Cuando la transferencia finalizó se trata a la membrana de transferencia con metanol por 15 segundos (para favorecer la tinción posterior) y después 15 minutos con Ponceu para poder visualizar que hubo una correcta transferencia. Se hacen 3 lavados de 5 minutos con 0,1% Tween/PBS 1X (PBST) y después se hace un bloqueo por 30 minutos con

0.5% de leche en polvo descremada (Conaprole) en PBST. Luego del bloqueo se incubaba con anticuerpo primario con su respectiva dilución en solución de bloqueo y se incubaba ON a 4°C en rotación constante.

Al día siguiente se realiza 3 lavados de 5 minutos con PBST y se incubaba por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado a una peroxidasa en solución de bloqueo y continúa rotación. Seguido de la incubación del anticuerpo secundario se efectúan 3 lavados de 5 minutos con PBST y se lo trata por 5 minutos a temperatura ambiente con los reactivos de Lumigen® PS-3 detection reagent, con 2 ml de la *Solution A* y 50 µl de la *Solution B*. Después se expone la membrana tratada con la película fotográfica en completa oscuridad a distintos tiempos de exposición y se revela en máquina automática del Institut Pasteur de Montevideo.

Inmunofluorescencia

Para la realización de los immunostainings se pusó de 30×10^3 a 50×10^3 células en placas de pocillos de 35-mm con medio de cultivo adecuado hasta que se adhieran a la placa (2-3 días). Se lavó los portaobjetos con PBS 1X (2 veces por 1 minuto hasta que no queden restos de medio), luego se fija 10 minutos con PFA 4% después y se lavó 2 veces con PBS 1X. Posteriormente se permeabilizó 5 minutos con Citrato de Sodio - Triton 100x 0.1%. Se lavó 3 a 5 minutos con PBST para luego bloquearlo 30 minutos con PBST-5%BSA. Se incubó con el Ac primario en solución de bloqueo ON a 4°C en cámara húmeda y en oscuridad. Se lavó 3 a 5 minutos con PBST y con PBS 1X. Se incubó con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y en oscuridad. Se lavó 2 veces con PBST y se montó con solución de montaje VECTOS LABORATORIES: vectashield, mounting medium w/ Dapi.-Catalog. No. H1200. Concentración 1.5 µg/ml.

Las muestras fueron analizadas con Microscopio de Epifluorescencia Invertido Olympus IX 81 y Microscopio Confocal Leica Modelo DMI6000 TCS-SP5.

Ensayos Funcionales

Extracción de ARN

Para la extracción de ARN de las muestras se aspiró el medio de cultivo y se lavó con PBS 1X, se tripsinizó y se incubó 5 minutos a 37°C. Luego se centrifugó por 5 minutos a 1000 rpm, se removió el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de PBS 1X frío, se vuelve a centrifugar por 5 minutos a 1000 rpm y se aspiró el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1 ml de PBS 1X frío y se pasó a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml en donde se centrifugó por 10 minutos a 10000 rpm (4°C). El sobrenadante es removido y se resuspendió en 1 ml de Trizol. Se vortexeó y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente llevando a lisar las células, logrando que se desnaturalice y se solubilizan sus componentes (disociando los complejos nucleoproteicos e inactivando las RNAsas). Para luego agregar 200 µl de cloroformo, vortexear y centrifugar 3 minutos a 20000 rpm (4°C). La fase acuosa se extrajo y se la trató con 500 µl de isopropanol, se la incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se la centrifugó por 10 minutos 20000 rpm (4°C) de modo de precipitar el ARN. Al pellet, se le agregó 1 ml de EtOH 70% y se centrifugó nuevamente a la misma velocidad por 5 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se dejó secar el pellet donde una vez seco se resuspendió en 40 µl de agua DEPC para evitar que se degrade el ARN. El almacenaje de la muestra de ARN fue a -80°C. La concentración de ARN extraído se calcula en el nanodrop teniendo en cuenta las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 con un $\lambda=230$ nm.

Transcripción reversa de ARN extraído

Para generar ADN copia (ADNc) de las muestras de ARN extraídas se utiliza el kit comercial GoScript™ Reverse Transcriptase de Promega Corporation Cat. No. A5003. Para ello se toma 5 µg de ARN y se le agrega 0.5 µg de oligo d(T)₁₈ para luego tratar por 5 minutos a 70°C para desnaturalizar el ARN y después llevarlo a 4°C (según las indicaciones del fabricante). Luego se lo agrega a un mix que tiene 4 µl de GoScript™ 5X Reaction Buffer, 4 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de mix de dNTPs y 1 µl de GoScript™ Reverse Transcriptase. Se incubó por 5 minutos a

25°C para lograr el annealing, seguido de 1 hora a 42°C y a 70°C por 15 minutos (para inactivar a la enzima).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir del ADNc se procedió a la realización de la PCR según el protocolo indicado por el Kit utilizado (Onetaq® DNA Polymerase de NEW ENGLAND BioLabs). Para esto se realiza un mix de PCR usando 5µl 1X OneTaq® Standard Reaction Buffer, 0.5µl de 10 mM de dNTPs, 0.5µl de 10uM primer sense, 0.5µl de 10uM primer reverso, 16.375µl de agua libre de nucleasas, 0.125µl de OneTaqDNA polymerase y 2µl ADNc. Se incluyó un control negativo en todas las PCR realizadas que consta de todos los reactivos para la amplificación a excepción del ADNc que fue sustituido por agua. Para la verificación de la RT-PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa 2% para ANRIL y 4% para GAPDH, p14, p15 y p16 usando el marcador de peso molecular de 100 pbya mencionado.

Primers y programas para PCR utilizados

Los primers utilizados de ANRIL fue obtenido de Kotake Y, et al. 2011[18]; los primers de GAPDH y p15 fueron obtenidos de Kotake Y, et al. 2007[42] y los primers para p14 y p16 fueron diseñados por el programa AlleleID 7.0

ANRIL: 5' TGCTCTATCCGCCAATCAGG Y 5' GGCCTCAGTGGCACATACC 3'

GAPDH: 5' AGGTGAAGGTCGGAGTCAAC 3' y 5' AGTTGAGGTCAATGAAGGGG 3'

P14: 5' AGGAGCCAGCGTCTAGGG 3' y 5' GCCGTGGAGCAGCAGCAG 3'

P15: 5' GGACTAGTGGAGAAGGTGCG 3' y 5' GGGCGCTGCCCATCATCATG 3'

P16: 5' GCCCAACGCACCGAATAGTTAC 3' y 5' GCCGTGGAGCAGCAGCAG 3'

Los programas para la amplificación siguen un ciclo de amplificación que comprende una temperatura de desnaturalización inicial, una temperatura de annealing seguido de una temperatura de extensión y una temperatura de extensión final. En la figura 9 se detalla una tabla con la temperatura y los tiempos utilizados así como también la cantidad de ciclos. La PCR de ANRIL fue realizada en el termociclador PC-100™ Programable thermal

controllerPelterEffectCycling mientras que para GAPDH, p14, p15 y p16 fue realizada en el termocicladorMjResearch PTC-200 PeltierThermalCycler.

	Temperatura (°C)	Tiempo
ANRIL	94	60 segundos
	63	60 segundos
	68	60 segundos
	(35 veces)	-
	68	5 minutos
GAPDH	94	60 segundos
P15	65	30 segundos
	68	30 segundos
	(33 veces)	-
	68	5 minutos
P14	94	60 segundos
P16	67	30 segundos
	68	30 segundos
	(33 veces)	-
	68	5 minutos

Figura 9. Tabla de los programas utilizados para la PCR que comprende los tiempos y la temperatura de cada etapa.

Proliferación celular

Para el ensayo de proliferación celular se sembraron 10000 células en placas de 60 mm con los vectores pcDNA 6/tR ypENTR™ H1/TO con el ARNsh 179. Se trabajó 2 veces por triplicado (n=6) donde se trató con 10 µg/ml de tetraciclina en medio conteniendo blasticidina y zeocina, y otras 3 placas solo conteniendo medio con los antibióticos blasticidina y zeocina a modo de control. Se contaron los días 2, 4, 6 y 8 en cámara de Neubauer (0.100 mm TiefeDepth). Los datos y graficas son realizados en con el programa SIGMAPLOT2

Ciclo celular

El ensayo del ciclo celular se realizó según un protocolo estandarizado para la determinación de ADN en el Laboratorio de Citometría de Flujo de la Unidad Celular del Institut Pasteur de Montevideo. Para poder determinar en qué fase del ciclo celular se encuentran las muestras se debe de marcar el ADN con colorantes para el mismo y analizar por citometría de flujo la cantidad de fluorescencia que va a estar relacionado a la cantidad de ADN con que fase del ciclo celular se encuentra.

Para lograr esto, la muestra de cultivo celular se trata de igual forma para la extracción de proteínas hasta el paso de la centrifugación por 10 minutos a 10000 rpm inclusive. Después, se descarta el sobrenadante y se resuspende vortexeando moderadamente en 1 ml del alcohol EtOH 70% frío (-20°C) con el fin de lograr la fijación y permeabilizar a las células así las mismas son capaces de teñirse con el colorante. Las muestras se guardan a -20°C hasta su posterior tinción para el análisis. Para el análisis, se centrifuga a 1000 rpm por 1 minuto a 4°C. Se descarta el sobrenadante y se le agrega sin resuspender 1 ml de PBS 1X. Se centrifuga a 1000 rpm nuevamente por 1 minuto a 4°C y se resuspende el pellet en 50 µl de PBS 1X para después agregar 150 µl de PBS 1X. Se le agrega 30 µl de 10 mg/ml de RNaseA y sufre una incubación por 30 minutos a 37°C. Luego se centrifuga a 1000 rpm por 1 minuto a 4°C y al pellet se lo resuspende en 300 µl de Ioduro de Propidio (IP) donde se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente previo a ser analizado por el citómetro. El análisis por el citómetro se realiza a un $\lambda=480$ nm para su excitación y se absorbe su fluorescencia a los 620 nm. Los espectros son analizados por el programa FCS Express 4 FlowResearchEdition.

Ensayo de β -Galactosidasa in situ para senescencia celular

Se realizó un ensayo de β -Galactosidasa in situ para senescencia celular comparando con células tratadas con 10 µg/ml de tetraciclina y sin tratar al día 6 para el ARNsh 179. Para esto se siguió el protocolo de *Stephen Jpnes, Ph.D b- Galactosidase in situ assay for cellular senescence* donde se precisa el lavado de las células con PBS 1X (2 veces), luego se fija las células con el **mix de fijación G/F**, se incuban las células a temperatura ambiente por 5 minutos. Se vuelve a lavar con PBS 1X (2 veces) para luego teñir las células con un **solución de teñido** fresco donde se incuba ON en oscuridad a 37°C. La reacción se

corta con agua deuterada y se visualiza y cuenta usando microscopio de luz (véase las recetas del mix de fijación y de solución de teñido en Apéndice).

RNA-FISH

Para la realización del Stellaris RNA FISH de BIOSEARCH TECHNOLOGIES para detectar ARN *in situ* se utilizan un set de pequeñas sondas fluorescentes complementarias al ARNinc ANRIL. Las sondas se diseñaron utilizando un software diseñado por el fabricante BIOSEARCH TECHNOLOGIES (secuencia de sondas de Stellaris RNA FISH en el apéndice). El protocolo realizado para este experimento fue basado del protocolo dado por el fabricante (BIOSEARCH TECHNOLOGIES) y por el protocolo de Leeb M, et al. 2007[41]. Para esto, se ponen de 30000-50000 células en el portaobjetos con medio de cultivo adecuado hasta que se adhieran a la placa, se lava dos veces con PBS 1X y se fija con PFA 4% por 10 minutos. Luego se hace un lavado con PBST por 5 minutos y se permeabilizar 5 minutos con Citrato de sodio-Triton-100X; 0.1% para después lavar nuevamente con PBSTpor 5 minutos. A continuación se realiza una extracción en donde se incuba con Cytobuffer por 30 segundos a temperatura ambiente, seguido por una incubación con Cytobuffer-Triton 0.5% y se finaliza la extracción con Cytobuffer nuevamente por 30 segundos a temperatura ambiente. Posteriormente se fija a las células con PFA 4% por 10 minutos, se lava con PBSTy con PBS 1X por 5 minutos (ordenados respectivamente) y se somete a la muestra a una deshidratación progresiva usando etanol en donde se incuba por 1 minuto con EtOH 70% (2 veces) seguido por incubaciones de 3 minutos con EtOH 80%, 95% y 100%. Una vez secado el portaobjeto se incuba con la sonda en su buffer de hibridación –previamente calentada por 5 minutos a 95°C y 30 minutos a 37°C) ON a 37°C en cámara húmeda con SSC 2X/50% formamida en oscuridad. Al día siguiente se hacen lavados de 5 minutos con SSC 2X/50% formamida a 37°C (3 veces), SSC 2X a 37°C (3 veces), seguido por un lavado de 10 minutos con SSC 1X a temperatura ambiente y 5 minutos con SSC 4X a temperatura ambiente. Luego se monta con solución de montaje con DAPI, se sellan los portaobjetos con cubreobjetos de vidrio y pintaúñas; y se visualiza inmediatamente o se guardan en oscuridad a 4°C. Las sondas se pueden visualizar en el infrarrojo cerca con una longitud de onda de absorción de 540 nm y una longitud de onda de emisión de 570 nm.

Inmuno/Stellaris RNA FISH

Para efectuar el ensayo de Inmuno/Stellaris RNA FISH se unió el protocolo ya descrito para inmunofluorescencia y después con el protocolo ya también descrito de Stellaris RNA FISH. En el cual, se efectuó sin cambios salvo por la excepción de que se diluye 1:100 de RNAsin en los pasos de incubación con el anticuerpo primario y secundario para evitar una degradación de ARN. La incubación con los anticuerpo primario: Nucleolina, Suz12, Bml1 fue de 1 hora a temperatura ambiente y la incubación del anticuerpo secundario de 40 minutos a misma temperatura.

Anticuerpos utilizados

Para la realización de inmunostainings se utilizaron los anticuerpos primarios: TetRabbitpoliclonal ab25845 (1:500), Nucleolina C-23 mouse monoclonal de Santa Cruz (1/100), Bml1 mouse (1:80) de Abcam ab1489, Suz12 (1:200). Como anticuerpos secundarios se utilizaron los anticuerpos: Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG A11029 de Invitrogen (1:200), Alexa fluor 488 Goat Anti-Rabbit A11034 de Invitrogen (1:200).

Los anticuerpos utilizados para western blot como anticuerpos primarios fueron: TetRabbitpoliclonal ab25845 (1:50) Beta- Actina Rabbit ab8227 (1/100), p14 ARF (C-18) sc-8613 Santa Cruz Biotechnology (1:200), p15 (DCS114.1): sc-65223 Santa Cruz Biotechnology (1:1000) y p16 y como anticuerpo secundario HorseradishPeroxidaseGoat anti mouse (1/5000) y HorseradishperoxidaseDonkey anti Rabbit de GE Healthcare (1/5000) y HorseradishperoxidaseRabbit anti goatIgG (H+L) Invitrogen #611620 (1:20000)

Programas bioinformáticos utilizados

Software	Dirección de Internet	Aplicación
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	Búsqueda homologías bases de datos
RNAi	http://www.invitrogen.com/rnai	Diseño de ARNsh
Sigma	http://www.oligoevaluator.com/Login.jsp	Calculo de temperatura de primers
Genosys	http://www.genosys.com/	

AlleleID 7	-	Diseño de primer
Adobe Photoshop CS6	-	Visualización y edición de imágenes
FCS Express 4 Flow Research Edition	-	Análisis del ciclo celular
SIGMAPLO T2	-	Análisis y edición de graficas
EndNote X6	-	Edición y manejo de citas bibliográficas
BioEdit	-	Editor de alineamiento de secuencias
MEGA5.2	-	Alineamiento de secuencias

Figura 10. Programas bioinformaticos utilizados. En la tabla se detalla el nombre del programa con su respectiva función y la dirección de internet, si corresponde.

Resultados

Elaboración del sistema inducible

Amplificación del vector pcDNA 6/Tr

Dado que se disponía de poca cantidad del vector pcDNA 6/TR se procedió a una amplificación del mismo por medio de una transformación a una cepa de *E. coli*, detallado en materiales y métodos. Después de una búsqueda de los diferentes sitios de corte que posee el vector, se eligió utilizar 2 enzimas de restricción (ER) que cortaba al vector en uno y dos sitios con el fin de verificar que el plásmido que se haya amplificado fuera el plásmido en cuestión.

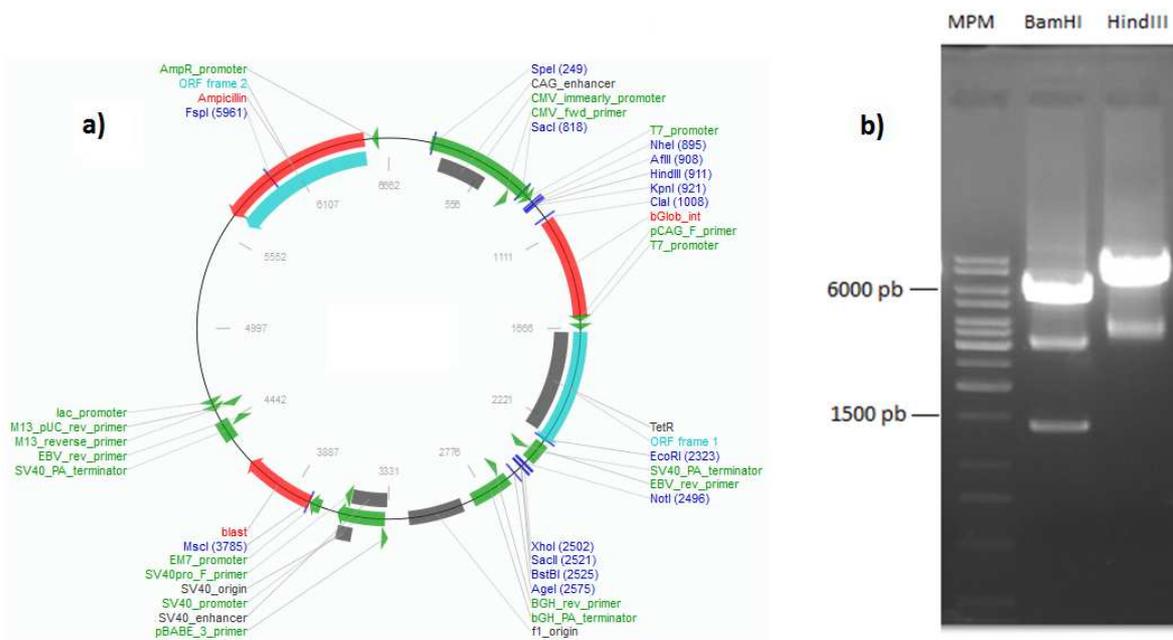


Figura 11. Análisis del vector pcDNA 6/TR. En a) se ilustra el mapa del vector con varios sitios de cortes para distintas enzimas de restricción y en b) producto de la amplificación del vector con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*.

La ER *HindIII* genera un único corte en la posición 912 logrando linealizar al vector (longitud del vector 6662 pb). Mientras que la ER *BamHI* genera cortes en las posiciones 927 y 2315 generando 2 fragmentos de 1388 y 5274 pb. Estas bandas se pueden observar en la figura 9-b, donde también es posible visualizar la presencia de otra banda en los dos carriles.

posibles ARNsh 179, 1553, 1607 y 1682), se pudo lograr secuenciar 24 de ellas. De las 24 secuencias obtenidas, 18 poseen efectivamente el inserto.

Transfección de los vectores pcDNA 6/TR y pENTR H1/TO

Como ya se mencionó en la introducción y en materiales y métodos, se eligió construir el sistema inducible en una línea de fibroblasto transformado. En la cual primero se transfectó con el vector pcDNA 6/TR, para luego poder transfectar con el constructo pENTR H1/TO con el inserto que posee el ARNsh. El crecimiento de células transfectadas con el vector pcDNA 6/tR en un medio de cultivo conteniendo la droga blasticidina, se debe a que el vector en cuestión posee un gen que le confiere resistencia al mismo, y la muerte total de las células que no fueron transfectadas cuando se suministró la droga, en principio es un indicativo que las células transfectadas posean el vector y por consiguiente que se encuentre la proteína que codifica este vector: tetR.

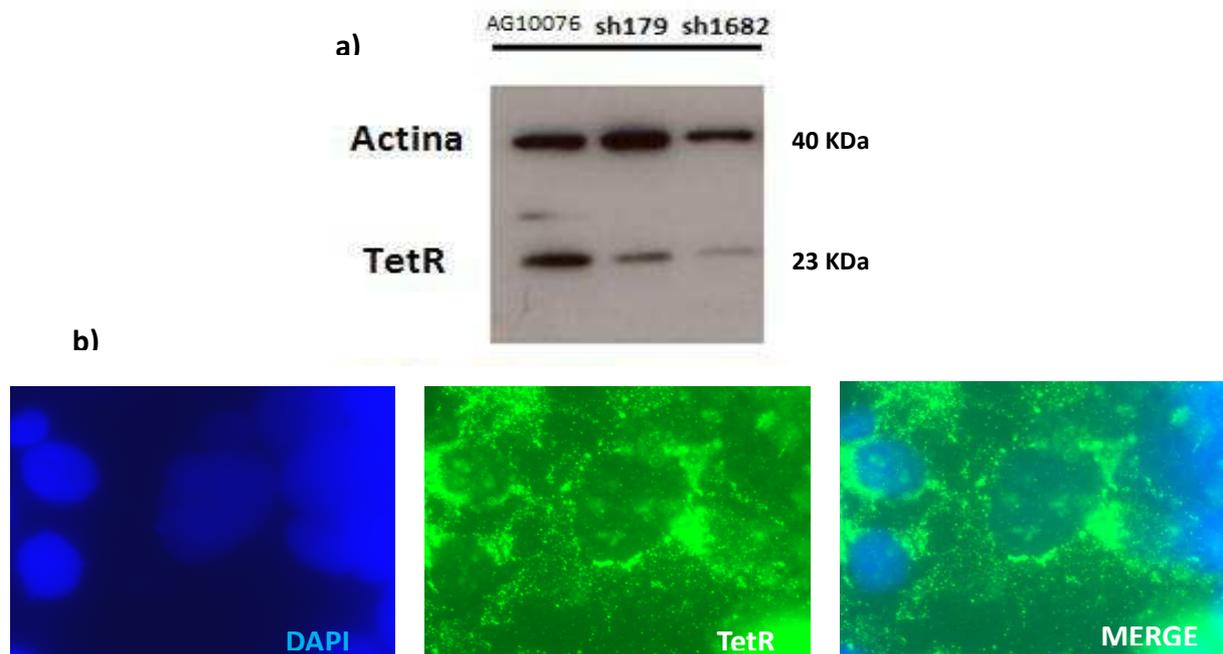


Figura 13. Análisis de la presencia del inserto pcDNA 6/TR en la línea de fibroblasto a estudiar. En a) se muestra un Western blot para ver la presencia de la proteína TetR, en la línea recién transfectada (AG10076) y las líneas ya transfectadas con los vectores pcDNA 6/TR y pENTR H1/TO. En b) se muestra un inmunotinción de la línea AG10076 recién transfectada donde en azul se observa el DAPI y en verde la proteína TetR.

Para verificar que la línea celular transfectada con el vector pcDNA 6/TR expresa el represor de tetraciclina realiza un análisis de proteínas por Western Blot (figura 13-a), donde se

intentó comprobar la presencia de la proteína tetR. Para esto se extrajeron proteínas de la línea celular recién transfectada con el vector pcDNA 6/TR y también se extrajo proteínas de la línea celular transfectada con los vectores pcDNA6/TR y pENTR H1/TO con los ARNsh 179 y 1682. Mientras que en la figura 12b se observa una inmunotinción para la comprobación y localización de la proteína tetR en la célula recién transfectada con el vector pcDNA6/TR.

En el western blot se puede apreciar una banda superior correspondiente a la banda de Actina que fue utilizado como un control de carga (40KDa). Mientras que la banda inferior corresponde a la proteína tetR (23KDa), en él se observa que la línea recién trasfectada posee mayor cantidad de proteína TetR en comparación a las transfectadas con los ARNsh, también es posible observar que la línea con el constructo ARNsh 179 posee una banda más intensa tanto para la banda de Actina como para la de tetR. En el análisis de inmunotinción se puede visualizar la presencia de un patrón que correspondería a la de la proteína tetR donde se observa tanto a nivel citoplasmático como a nivel del núcleo.

Ensayos Funcionales

RT- PCR

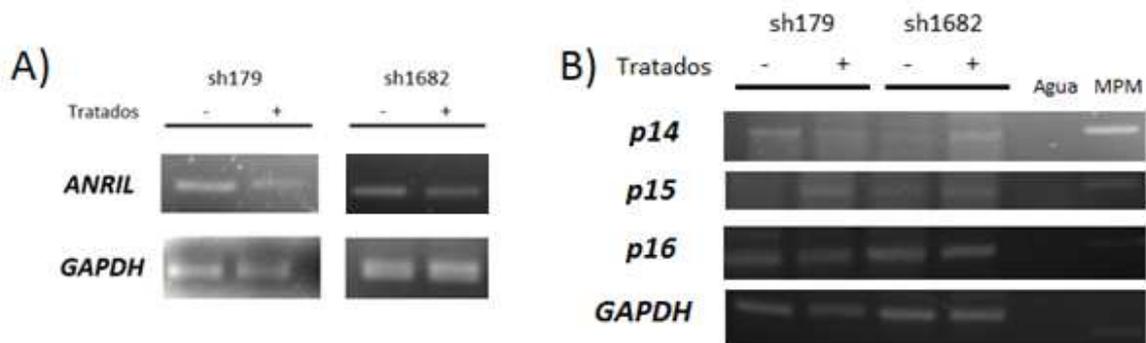


Figura 14. Gel electroforético de las RT-PCR. Obtenido de ARN extraído de células con los ARNsh 179 y ARNsh 1682 a los 8 días de tratar con tetraciclina y sin tratar. Se realizó una RT-PCR de ANRIL (A) y de p14, p15 y p16 (B) con sus correspondientes controles de carga (GAPDH).

Para demostrar si existe una disminución de la expresión de ANRIL usando los ARNsh 179 y 1682 se precedió a analizar la presencia de ANRIL a través de una RT-PCR. El resultado obtenido de la RT-PCR de ANRIL se la comparo con la expresión GAPDH que permanece constante a pesar de la adición de tetraciclina y por lo tanto es un control de carga. En los geles, los niveles de GAPDH son relativamente constantes para la línea con el

ARNsh 179 y para la línea con el ARNsh 1682 aunque se observa que hay una cantidad un poco menor en las bandas tratadas con tetraciclina. Observando la banda correspondiente al fragmento amplificado de ANRIL se puede decir que si existe una disminución en la expresión de ANRIL en las células tratadas con tetraciclina para los dos ARNsh aunque se ve una mayor disminución de ANRIL para el ARNsh 179.

También se realizó una RT-PCR para el análisis de los transcritos p14, p15 y p16. Para las bandas correspondientes a la línea del ARNsh 179 se observa que en p14 hubo una pequeña disminución comparando con el no tratado, aunque también se puede apreciar que la banda de GAPDH es menor en la tratada con tetraciclina. Para p16 no se puede apreciar algún cambio aparente entre la tratada vs la no tratada mientras que, se observa un aumento considerable del nivel de transcritos de p15 para el ARNsh179. Para las bandas que corresponden con el constructo de ARNsh 1682, se observa un pequeño aumento en la banda de p14 y de p16, y un aumento apreciable en la banda para p15.

Western Blot

A pesar de analizar la cantidad de los transcritos de p14, p15 y p16, no se puede anticipar cuanto de ese ARNm se traducirá a proteínas por lo que es necesario evaluar si la cantidad de proteína varía en función de la adición de tetraciclina. También se realizó con el objetivo de verificar si los resultados observados en las RT-PCR se asemeja con los Western Blot, para esto se trabajó con proteínas al día 8 de la inducción con tetraciclina usando como controles muestras sin tratar.



Figura 15. Western Blot de extracción proteína al día 8 de la inducción con tetraciclina usando como controles muestras sin tetraciclina para esos días. Las proteínas que se observan son p14, p15 y p16 y la actina como control de carga.

En los western Blot de la extracción de proteínas de la línea correspondiente a la línea con el ARNsh 179 se observa un aumento de la cantidad de proteína p15 y en menor medida de

p16, mientras que para p14 permanece invariable. Para las muestras delARNsh 1682tambiense puede observar un pequeño aumento en la expresión de p15 y de p16 pero sin embargo, no se puede apreciarninguna variación para las proteínas p14. El control de carga de actina permanece constante para todos los casos.

Proliferación celular

Dada que la capacidad proliferativa de las células que expresan ANRIL esta aumentada debido a la supresión de las proteínas supresoras de tumores p15 y p16. Estas células poseen una capacidad aumentada en comparación a células que tienes estas proteínas supresoras de tumores. Por lo que si se disminuye la expresión de ANRIL, se debería disminuir la tasa de crecimiento celular ya que como se mencionó en la introducción, estas proteínas generarían arresto del ciclo células y senescencia.

A partir de esta hipótesis, se dispuso a suministrar tetraciclina a las células que poseen el constructo ARNsh 179 ya quedemostró una mejor eficiencia que para el ARNsh 1682, con el objetivo de observar si sedisminuye el crecimiento celular en comparación a las mismas células sin administrarle la droga.

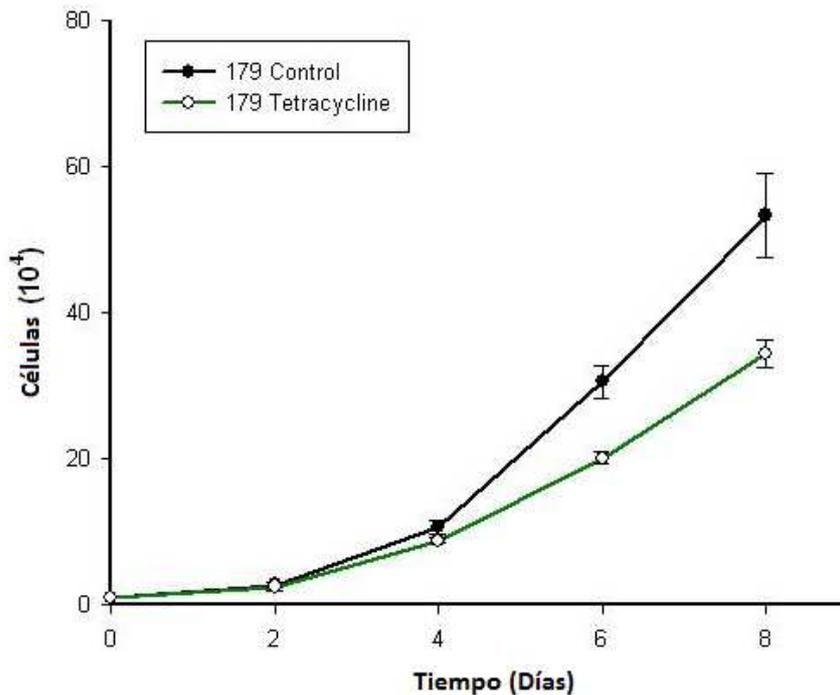


Figura 16. Gráfico de la proliferación celular en función del tiempo (días) de células con el ARNsh 179 tratados con tetraciclina y sin tratar. En el experimento se cuenta a los días 0, 2, 4, 6 y 8.

En la gráfica de proliferación celular de las células con el ARNsh179 (figura 16) se puede ver que a partir del día 4 comienza una tendencia de disminución de la cantidad de células viables, mientras que a los días 6 y 8 ya se puede observar que existe una diferencia en comparación con el no tratado. La diferencia de la cantidad de células comparadas con células sin adicionarle la droga es de un 34.4% en el día 6 y de un 35.5% en el día 8 donde se realizó un test estadístico t-student resultando en una diferencia significativa para los días 6 y 8 ($P=0.0015$ y $P=0.0059$ respectivamente).

Ciclo celular

La cuantificación del contenido de ADN permite determinar la distribución de una población celular a lo largo de las distintas fases del ciclo celular (G_0/G_1 ; S; G_2/M). En donde la distribución celular de una población se analiza por citometría de flujo utilizando colorantes de ADN que se unen de forma estequiométrica al mismo, y dado que la cantidad de ADN varía a lo largo de las fases del ciclo siendo la cantidad de fluorescencia recogida proporcional a la cantidad de ADN encontradas en las células.

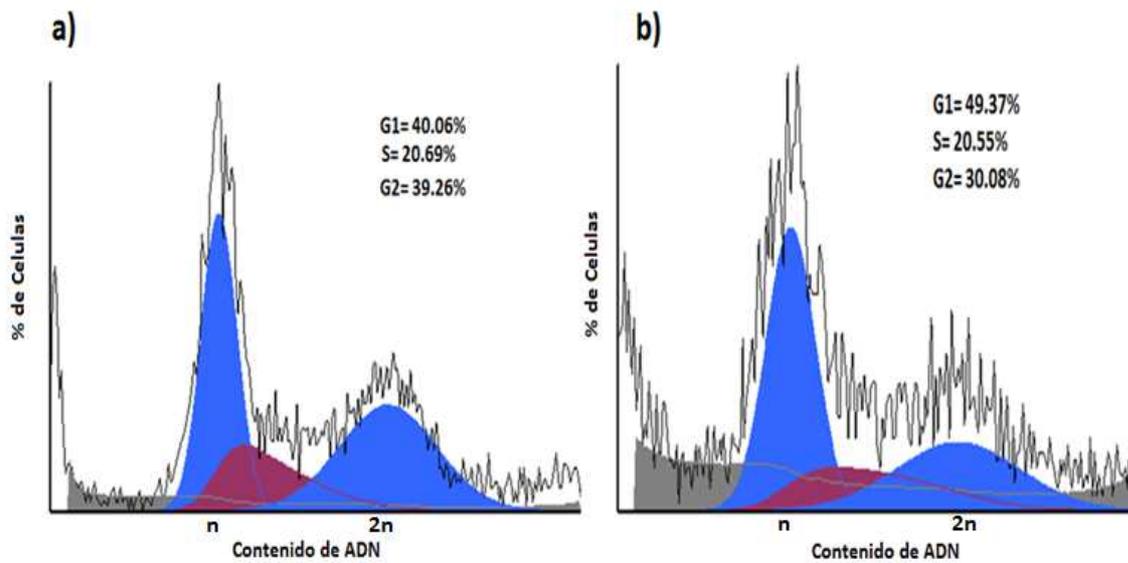


Figura 17. Ciclo celular de células con el constructo ARNsh179. Células tratadas con tetraciclina (b) y células sin tratar como control (a). Muestras tomadas al día 6 después de la inducción con tetraciclina

En el ensayo de ciclo celular se pretendió evaluar si cambiaba la relación en que se encuentran las fases del ciclo celular comparando muestras tratadas con tetraciclina y sin tratar. En el gráfico se puede observar un aumento del estado G1 en las células tratadas con tetraciclina (figura 18-a) en comparación con las células sin tratar. Mientras que los valores para la fase S permanece constante para los tratados y no tratados, también se puede ver una disminución en el estado G2.

Ensayo de β -Galactosidasa in situ para senescencia celular

Como la adición de tetraciclina provoca un aumento en la expresión de las proteínas

supresoras de tumores p15 y p16 demostrado a nivel de ARN y proteína además de observar un arresto en G1, se procedió a estudiar si a partir de la disminución de la expresión de ANRILgeneraría un aumento a nivel de la senescencia celular.

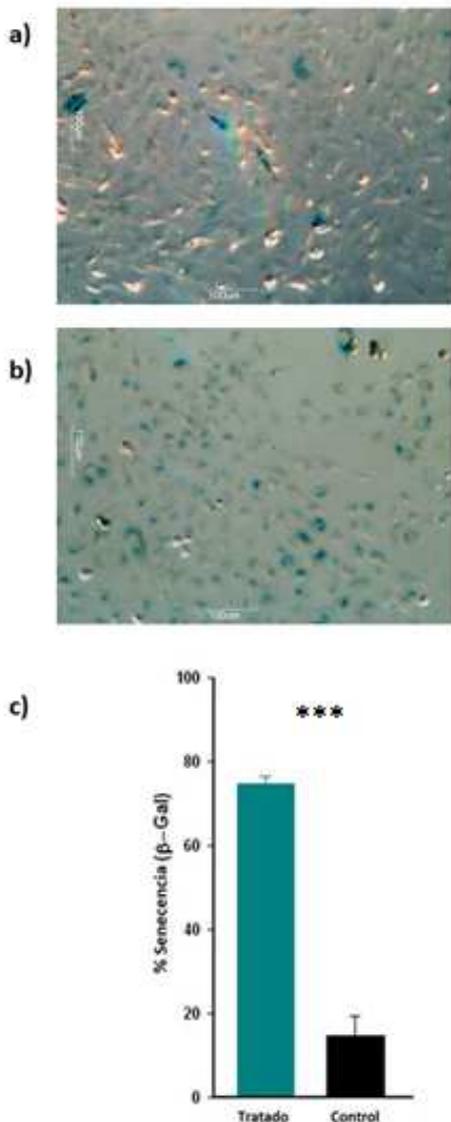


Figura 18. Células teñidas para detectar la expresión de β -Galactosidasa. a) Imágenes de las células tratadas sin tratar a modo de control. b) Imágenes de células tratadas con tetraciclina. c) Se muestran valores estadísticos del porcentaje de células que muestran expresión en relación a células sin tratar.

El ensayo de β -Galactosidasa es uno de los marcadores de senescencia más usado a nivel de experimentación. El aumento en los niveles de β -Galactosidasa se debe a ciertos cambios en el organelo lisosomal los que comprende un aumento de su tamaño, lo que incrementa los niveles enzimáticos a un punto en el que la actividad de β -Galactosidasa puede ser detectada. Otro indicador que presenta una célula senescente es tener un fenotipo distorsionado, estos cambios también incluyen la agregación del retículo endoplasmático, cambio morfológico de las mitocondrias.

En el experimento de la tinción para β -Galactosidasa se muestra una mayor cantidad de células teñidas en comparación a las células no

tratadas(figura 18-a y 18-b). Otra particularidad que se puede evidenciar es en el número de células, en el cual hay un mayor número de células en el control en comparación a la cantidad de células tratadas con tetraciclina.

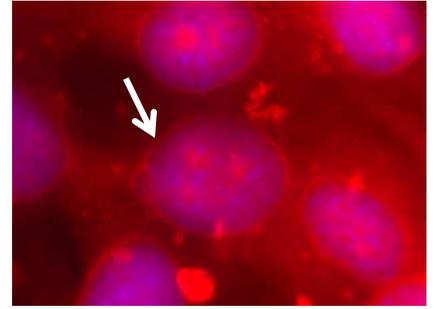
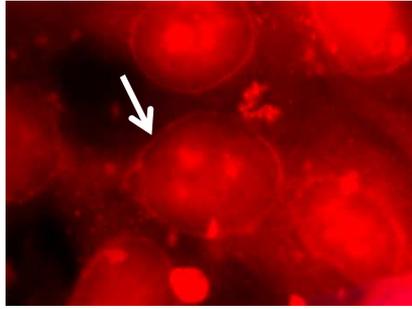
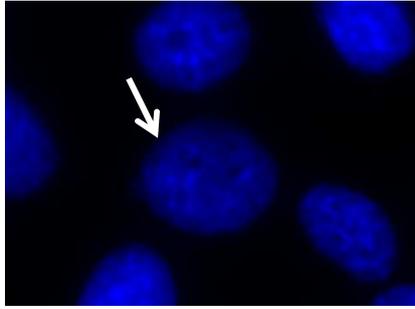
El recuento de la cantidad de células que presenta esta tinción en función de las células control es muy significativo ya que se realizó un test estadístico t-student para comparar medias y se puede decir que hay aproximadamente un 60% más de células que dan positivo para β -Galactosidasa cuando se le adiciona tetraciclina ($P < 0.0001$).

Localización subcelular

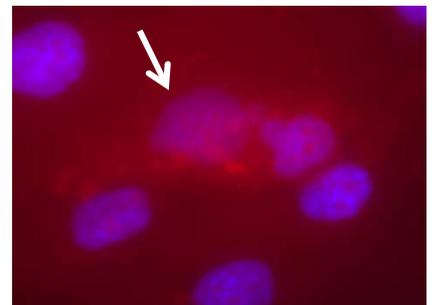
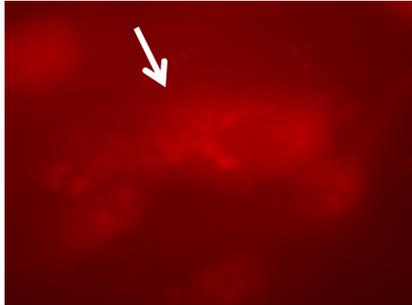
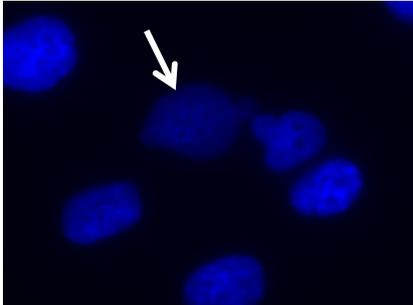
Stellaris RNA FISH

El Stellaris RNA FISH es un método de visualización que comprende múltiples oligos con diferentes secuencias que se hibridan al ARN de interés, cada uno con un marcador fluorescente, por lo que se puede entender como un conjunto de sondas. Este método no solo permite la detección y localización de ARN a nivel subcelular, sino que también es capaz de lograr una cuantificación del ARN de interés, esto se debe a que la intensidad emitida por la sonda es proporcional a la cantidad de ARN de interés que posee la muestra. Por lo que en los experimentos no solo se intenta detectar la localización de ANRIL en la célula sino que se utilizó para evaluar la cantidad de ARN que posee a fin de evaluar si existió una disminución de ANRIL al adicionar tetraciclina. Para la cuantificación de la cantidad de ANRIL se recomienda el uso del microscopio de epifluorescencia ya que al contrario del microscopio confocal, este toma la intensidad de todos los planos y así la intensidad emitida es proporcional a la cantidad de todas las sondas que se hayan hibridado independientemente del plano en que se encuentran.

N
o
tr
at
ad
as



Tr
at
ad
as



DAPI

ARN ANRIL

MERGE

Figura 19. RNA FISH realizado de células no tratadas con tetraciclina y tratadas con tetraciclina. Se visualiza DAPI en azul, el ANRIL en rojo y la combinación de los dos (MERGE). Imágenes obtenidas por microscopio de epifluorescencia.

En las células es posible visualizar al núcleo gracias a la tinción con DAPI, también en él se observan marcas oscuras y redondas que corresponderían al nucléolo. En la tinción con RNA FISH se puede observar que hay un patrón nucleolar como un patrón bordeando al núcleo (*nuclear envelope*). En cuanto a las células tratadas con tetraciclina se puede apreciar una señal más difuminada y menos intensa en comparación a la no tratada.

Immunostaining/RNA FISH

Visto que las proteínas polycomb son responsables en la represión del clúster INK4 mediada por ANRIL, se quiso evaluar; si existía una colocalización entre la proteína BMI1 (PRC1) y SUZ12 (PRC2); y si una disminución en la cantidad de ANRIL afectaría la posición de los mismos. Las colocalizaciones se realizan con un recuento de células en el microscopio confocal ya que es capaz de visualizar en un mismo plano focal y por lo tanto ver si colocalizan.

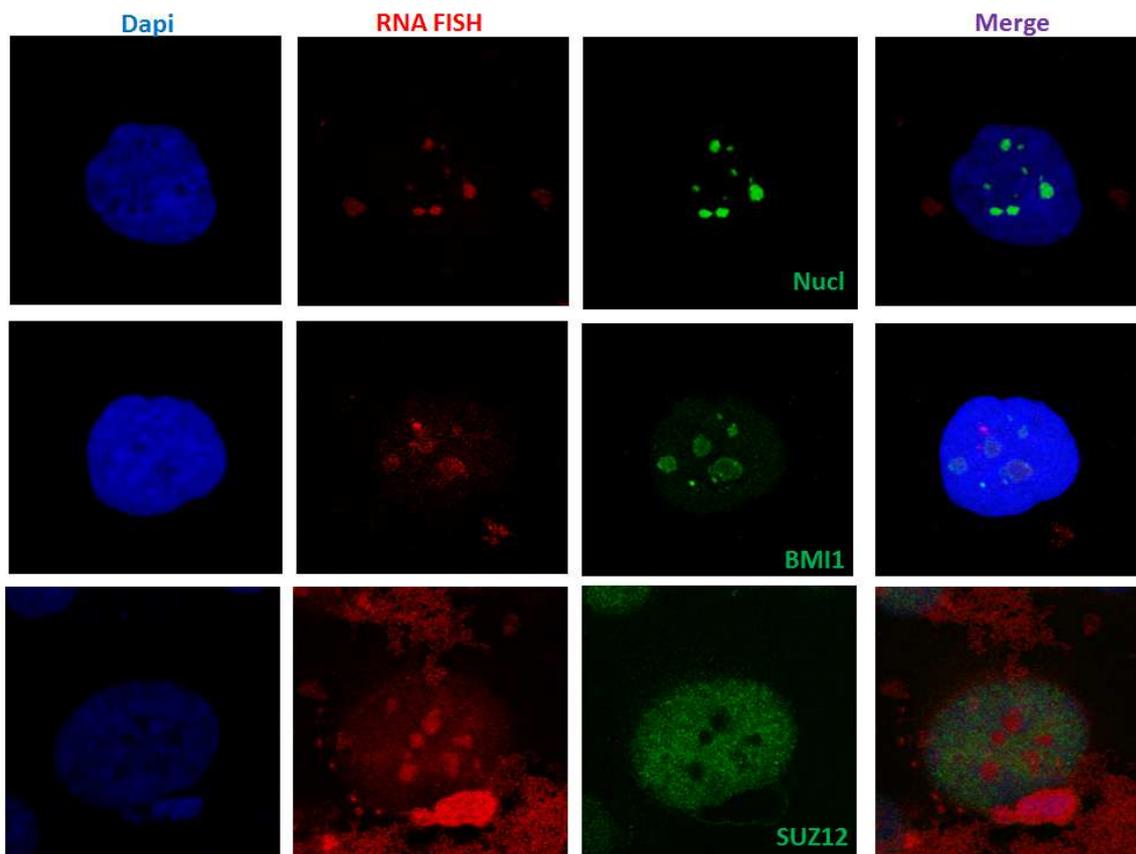
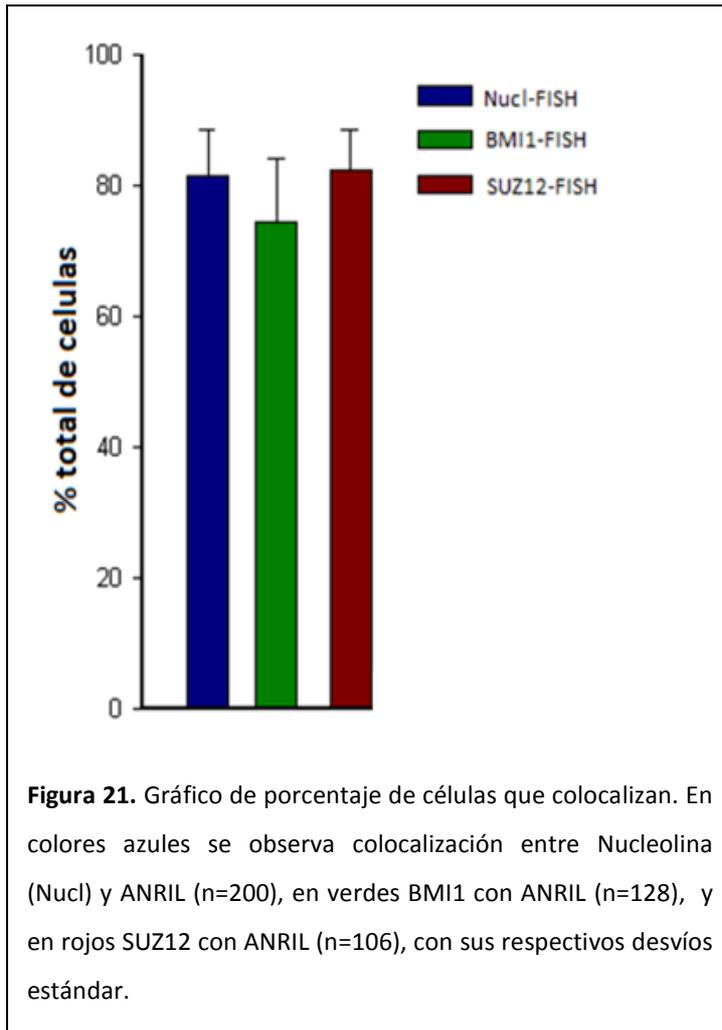


Figura 20. Inmunotinción con RNA FISH en células sin tratar. En azul se observa el Dapi, en rojo la nucleolina y en verde se observa la nucleolina (Nucl), BMI1 y SUZ12. Imágenes obtenidas de microscopía confocal.

Para comprobar que ANRIL tiene una posición nucleolar se procedió a observarlo en función de un marcador nucleolar, la nucleolina. Como se puede ver en la figura 20, los patrones de la nucleolina coinciden con la localización de la señal de ANRIL. Según un recuento celular, estos colocalizan en un 82% aproximadamente (figura 21).



En cuanto a la proteína BMI1 se observa que esta colocaliza con la señal de ANRIL en un 77% y cuando se induce con tetraciclina se puede detallar que la morfología de la marca de BMI1 se vio un poco afectada, en el cual se puede apreciar que el patrón de BMI1 se ve un poco más difuminado, en cambio para la proteína SUZ12, esta se encuentra rodeando el nucléolo y el recuento de células con dicho patrón es de un 82%. Dada la observación del patrón de la proteína SUZ12, no se puede apreciar que haya algún cambio al adicionar tetraciclina.

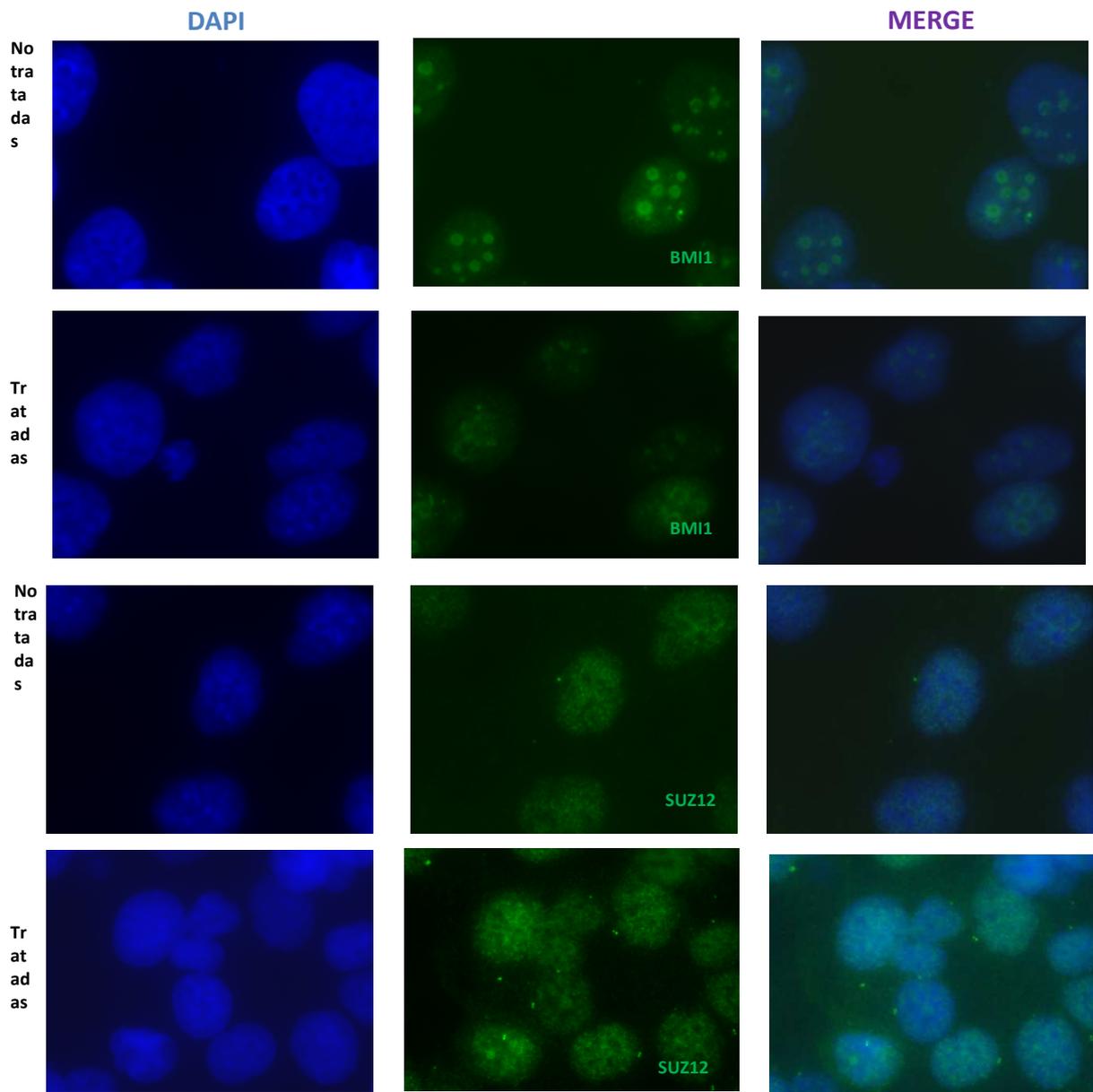


Figura 22. Inmunotinciones de células tratadas y sin tratar. En Azul se visualiza el núcleo mientras que en verde se puede observar a BMI1 y a SUZ12. Imágenes obtenidas por microscopio de epifluorescencia.

Discusión

Elaboración del sistema inducible

Amplificación del vector pcDNA 6/Tr

El objetivo del experimento fue corroborar si la extracción obtenida de ADN plasmídico de la cepa de *E. coli* extraída era efectivamente el vector pcDNA 6/TR. A partir de este resultado, se pudo decir que el producto fue amplificado con éxito por lo que se pudo utilizar al vector obtenido para poder transfectarlo a la línea eucariótica de interés.

En el gel de agarosa se observa la aparición de la banda adicional en el gel, que se cree que fue producto de una digestión incompleta, por lo que la banda observada podría ser el plásmido en una conformación enrollada y así migrar más que el plásmido en estado lineal. Cabe destacar, que no se realizó una corrida del plásmido sin ningún corte con ER por lo que no se puede afirmar que lo observado sea el plásmido en cuestión en un estado enrollado. Una posible solución al problema de la digestión incompleta sería haber puesto una menor cantidad ADN a ser cortada por las ER o haberlo sometido a un mayor periodo la incubación del ADN plasmídico con las enzimas.

Secuenciado

El hecho de que no se pudo secuenciar un 100% de los plásmidos, pudo deberse a que la estructura del loop no permitía que se continuase la secuenciación y en algunos cromatogramas en la región correspondiente al loop, se daba una leída sin identificar a que nucleótido correspondía (N), esto es debido a que el loop que se forma es una estructura secundaria relativamente fuerte y difícil de leer por la estructura que estos forman lo que genera una disminución de la señal cuando entra a leer la horquilla.

Transfección de los vectores pcDNA 6/TR y pENTR H1/TO

En el Western Blot se observó que hay una mayor cantidad de proteína tetR en la línea recién transfectada comparándola con las que también poseen el constructo del ARNsh, lo que podría indicar que con el tiempo hubo una pérdida del vector o de la capacidad de la producción de la proteína tetR pese a que nunca se dejó de seleccionar con blastidina a fin de evitar la pérdida del mismo. Tampoco es posible afirmar si la línea con el ARNsh 1682

posee menos expresión de proteína tetR ya que el control de carga también es menor en comparación con el del ARNsh 179.

Mientras que una vez transfectado con el vector pcDNA6/TR y seleccionado con blasticidina, durante el tiempo que correspondía, se transfectó con los constructos pENTR H1/TO con los ARNsh 179 y 1682. Estas células fueron seleccionadas con la droga Zeocina y pese a que las células que crecieron con esta droga es un comprobante que posee el vector, los constructos se pudieron haber perdido en la transfección. Un método para comprobar que poseen el inserto es realizar ensayos funcionales donde se analiza en función de la administración de tetraciclina.

Ensayos Funcionales

RT- PCR / Análisis de transcriptos

En relación a los resultados obtenidos, comparando las bandas amplificadas sin tratar vs. las tratadas y en función de las bandas de GAPDH como control de carga se podría decir que hubo una disminución de la cantidad de ANRIL en las células para los dos ARNsh utilizados, aunque para el ARNsh 179 se ve una disminución mayor. Por lo que se podría decir que el sistema inducible usando el ARNsh 179 fue más efectivo ya que el silenciamiento fue en mayor magnitud. También esto es un indicio que corroboraría que el sistema inducible pudo haberse logrado en la línea celular.

A partir de los valores obtenidos del análisis de las RT-PCR para intentar evidenciar la influencia con los transcriptos de p14, p15 y p16. Se obtuvo que la disminución de los niveles de expresión de ANRIL influyen los niveles de expresión de los transcriptos de p15 y p16 mientras que p14 permanece casi invariable para el ARNsh 179 y hubo un aumento para el ARNsh 1682. En los geles se pone de manifiesto que una disminución de ANRIL, hace aumentar en mayor medida los niveles de p15 mientras que, para el caso de p16 parecería haber solo un leve aumento. Para el caso de p14 no se puede ver un cambio representativo ya que el ARNsh 179 no muestra un cambio de expresión y en el ARNsh 1682 si lo hubo. Para p14 no se esperaría que ocurriese ningún cambio esto puede deberse a que el primer exón del gen de ANRIL está localizado 300 pb corriente arriba del sitio de inicio de

transcripción del gen de p14, lo que se puede pensar que esos 2 genes podrían compartir un promotor o compartir una isla CpG [21]. El resultado obtenido al observar las bandas de los transcritos para p14, p15 y p16 demuestra que el sistema inducible se encuentra funcionando y que una disminución de ANRIL induce un aumento de la cantidad de transcritos de p15, lo que coincide con trabajos ya publicados que a través de la reducción de ANRIL se promueve la expresión del gen p15 dramáticamente y la de p16 moderadamente, y sin efecto en p14[18].

La realización de este experimento, era en una primera instancia observar por RT-PCR si existió cambios en la expresión de p14, p15 y p16, pero con la intención de poner a punto las condiciones y la efectividad de los *primers*, para poder en experimentos futuros realizar una medición cuantitativa por Real Time PCR y comparar con mayor precisión la variación de la cantidad de transcritos de interés.

Western Blot /Análisis de proteínas

En los Western Blot se observa un aumento en la cantidad de proteína p15 y p16 para la línea celular con el ARNsh 179 lo que significa y comprueba nuevamente que el sistema inducible para este constructo está funcionando con mayor eficiencia en comparación con el sistema conteniendo el ARNsh 1682.

A partir de estos resultados se puede decir que ANRIL estaría vinculado con la expresión de las proteínas p15 y p16. En condiciones que ANRIL se está expresando normalmente (sin la adición de tetraciclina), se observa una cantidad baja de expresión de estas proteínas, mientras que al disminuir la expresión de ANRIL se promueve un aumento de la expresión de p15 y p16 aunque para p15 en mayor medida. Estos resultados demostrarían que ANRIL al ser transcrito en el mismo clúster al de las proteínas analizadas estaría actuando en *cis* lo que se menciona en varios trabajos científicos al igual que la regulación negativa de ANRIL y las proteínas p15 y p16.[18, 23, 29, 30]

Proliferación celular

En función del resultado obtenido se observa una disminución en la tasa proliferativa cuando se adiciona tetraciclina, lo que corresponde en una disminución de ANRIL según los experimentos de RT-PCR. Esta disminución de la tasa proliferativa al disminuir la expresión

de ANRIL corrobora trabajos ya realizados [18, 29, 30]. Según los datos obtenidos, se podría afirmar que las células que expresan ANRIL poseen una capacidad proliferativa mayor comparadas con células que tienen una baja expresión de ANRIL lo que vincularía la expresión de ANRIL con ciertos cánceres.

Ciclo celular

Visto que la adición de tetraciclina promovería la síntesis de ARNsh y generaría una disminución de ANRIL, esta reducción produciría un aumento de las proteínas supresoras de tumores p15 y p16 como ya se vio en los experimentos ya mencionados. Todo esto, conllevaría a un arresto en la fase G1 y por consiguiente una disminución en la tasa de crecimiento de estas células tumorales, lo que también pudo observarse en el ensayo de proliferación celular. En el ensayo de ciclo celular ocurrió un aumento en G1, lo que fue a expensas de una disminución de la fase G2 de las células, ya que el porcentaje de las células en estado S se mantuvo constante. A partir de este experimento se podría confirmar nuevamente que el sistema estaría funcionando visto que, el resultado obtenido fue congruente con la hipótesis que se había planteado. El resultado de un aumento en la fase G1 por la disminución de la expresión de ANRIL es confirmado por experimentos ya realizados [30], lo que estaría confirmando la relación de ANRIL con el clúster INK4 y la ruta del mismo en la regulación del ciclo celular.

Ensayo de β -Galactosidasa in situ para senescencia celular

El resultado obtenido fue de acuerdo a la hipótesis planteada lo que da luz a que el sistema inducible para la línea con el ARNsh 179 funciona. Este experimento demuestra también que la disminución de ANRIL provoca un fenotipo senescente este resultado se respalda en el experimento de Kotake Y, et al. 2011. donde afirman que el locus INK4 está implicado en la regulación de la senescencia celular. Estos reportes sugieren que la participación de ANRIL no solo actúa en la proliferación celular sino en la supresión de senescencia gracias al reclutamiento de PRC1 y PRC2 en el locus INK4 [18, 23]. También se observó que hay una disminución en el número de células cuando se le adicionó la tetraciclina, esto coincide y corrobora el experimento de proliferación celular realizado previamente.

Localización subcelular

RNA FISH /inmunohistoquímica

En función al patrón observado de ANRIL a partir del RNA FISH, se puede evidenciar que el mismo se localiza en la periferia nuclear y en la región nucleolar. A partir del ensayo de inmunohistoquímica-RNA FISH se pudo verificar que ANRIL se ubica en el nucleolo. Además se pudo comprobar que las proteínas BMI1 y SUZ12 de PRC1 y PRC2 respectivamente se encuentra colocalizando con ANRIL. Dado que BMI1 y SUZ12 colocaliza con ANRIL y a su vez este colocaliza con la nucleolina, por transitiva BMI1 y SUZ12 se encuentra ubicado en el nucleolo.

Hasta la fecha, no existe ninguna evidencia de la localización de ANRIL a nivel visual salvo por un RNA FISH de Yap KL et al. 2010 ([23]), donde no es posible visualizar un patrón definido de ANRIL. Por lo que este experimento sugiere un gran aporte en cuanto a la localización que presenta este ARN largo no codificante y corrobora estudios de su relación con las proteínas polycombs, estos resultados son respaldados por trabajos ya publicado de la vinculación de ANRIL con estas proteínas[18, 23].

Conclusión

A partir de los resultados obtenidos se pudo afirmar que se logró la construcción de un sistema inducible que disminuye la expresión del ARNinc ANRIL. Esta disminución se dio tanto para ARNsh 179 como para el ARNsh 1682.

Se demostró que ANRIL está vinculado con la expresión de las proteínas supresoras de tumores p15 y p16 donde se corrobora una regulación negativa de los mismos, ya que la expresión de ANRIL determina una baja expresión de las proteínas p15 y p16 y la disminución de los niveles de ANRIL aumenta la expresión de estas proteínas, sin embargo no se advirtieron cambios en la expresión de p14. También se observó que ANRIL otorga una capacidad proliferativa aumentada a las células, y que al disminuir su expresión se genera un arresto en G1 y un fenotipo senescente, lo que se presume que sea mediado gracias a las proteínas p15 y p16. Gracias a la relación de estas proteínas con ANRIL, se verificó que el mismo estaría actuando en *cis* ya que su presencia o ausencia se refleja en la expresión de las proteínas de clúster INK4 donde ANRIL es transcrito al igual que para las proteínas p14, p15 y p16.

Hasta el momento no existía casi evidencia a nivel visual de la localización de ANRIL en las células. En este trabajo se pudo ubicar a ANRIL en la región de la periferia nuclear y en la región nucleolar. A su vez, se vio que ANRIL se encuentra colocalizado con BMI1 y SUZ12, corroborando trabajos publicados que vinculan la función de ANRIL con las proteínas polycombs [18, 23, 42].

Los ARNinc están siendo foco de investigación y hasta la fecha, existe un amplio rango de funciones que se atribuyen a los mismos. Hasta hace poco se pensaba que estos ARN no tenían una función relevante en fisiología celular, sin embargo investigaciones actuales les han adjudicado nuevas funciones como por ejemplo activación de genes, mantenimiento de la integridad genómica, entre otros [2]. Por otro lado la amplia cantidad y diversidad de ARNinc impone un gran desafío para su caracterización. Se cree que los ARNinc podrían estar actuando bajo un mismo sistema de regulación por lo que entender los factores que controlan la organización de la cromatina son piezas claves para estudiar tanto la patogénesis de cáncer a nivel molecular como el desarrollo de otras enfermedades. Tener a disposición un sistema inducible para ANRIL permitirá continuar el estudio del mismo y quizás los mecanismos que controlan su función pudieran ser extrapolables a otros ARNinc.

Bibliografía

1. Craig, J.W., N. C. , *Epigenetics: A Reference Manual*. ilustrada ed. 2011: Caister Academic Press. 499.
2. Bhan, A. and S.S. Mandal, *Long noncoding RNAs: emerging stars in gene regulation, epigenetics and human disease*. ChemMedChem, 2014. 9(9): p. 1932-56.
3. Feinberg, A.P.V., B., *Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts*. Nature, 1983. 301: p. 89-92.
4. Derrien, T., et al., *The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression*. Genome Res, 2012. 22(9): p. 1775-89.
5. Consortium, E.P., *An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome*. Nature, 2012. 489(7414): p. 57-74.
6. Esteller, M., *Non-coding RNAs in human disease*. Nat Rev Genet, 2011. 12(12): p. 861-74.
7. Cao, J., *The functional role of long non-coding RNAs and epigenetics*. Biol Proced Online, 2014.
8. Batagov, A.O., et al., *Role of genomic architecture in the expression dynamics of long noncoding RNAs during differentiation of human neuroblastoma cells*. BMC Syst Biol, 2013. 7 Suppl 3: p. S11.
9. Mercer, T.R. and J.S. Mattick, *Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation*. Nat Struct Mol Biol, 2013. 20(3): p. 300-7.
10. Agrelo, R., *X inactivation and progenitor cancer cells*. Cancers (Basel), 2011. 3(2): p. 2169-75.
11. Gendrel, A.V. and E. Heard, *Noncoding RNAs and epigenetic mechanisms during X-chromosome inactivation*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014. 30: p. 561-80.
12. Carninci, P., et al., *The transcriptional landscape of the mammalian genome*. Science, 2005. 309(5740): p. 1559-63.
13. Guttman, M., et al., *Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals*. Nature, 2009. 458(7235): p. 223-7.
14. Lunde, B.M., C. Moore, and G. Varani, *RNA-binding proteins: modular design for efficient function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. 8(6): p. 479-90.
15. Reiter, N.J., C.W. Chan, and A. Mondragon, *Emerging structural themes in large RNA molecules*. Curr Opin Struct Biol, 2011. 21(3): p. 319-26.
16. Ma, L., V.B. Bajic, and Z. Zhang, *On the classification of long non-coding RNAs*. RNA Biol, 2013. 10(6): p. 925-33.
17. Wang, K.C. and H.Y. Chang, *Molecular mechanisms of long noncoding RNAs*. Mol Cell, 2011. 43(6): p. 904-14.
18. Kotake, Y., et al., *Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene*. Oncogene, 2011. 30(16): p. 1956-62.
19. He, Y., et al., *The antisense transcriptomes of human cells*. Science, 2008. 322(5909): p. 1855-7.
20. Pasmant, E., et al., *Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF*. Cancer Res, 2007. 67(8): p. 3963-9.
21. Aguilo, F., M.M. Zhou, and M.J. Walsh, *Long noncoding RNA, polycomb, and the ghosts haunting INK4b-ARF-INK4a expression*. Cancer Res, 2011. 71(16): p. 5365-9.
22. Congrains, A., et al., *ANRIL: Molecular Mechanisms and Implications in Human Health*. Int J Mol Sci, 2013. 14(1): p. 1278-92.

23. Yap, K.L., et al., *Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a*. *Mol Cell*, 2010. 38(5): p. 662-74.
24. Gil, J.P., G., *Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all*. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2006: p. 667-677.
25. Popov, N. and J. Gil, *Epigenetic regulation of the INK4b-ARF-INK4a locus: in sickness and in health*. *Epigenetics*, 2010. 5(8): p. 685-90.
26. Rayess, H., M.B. Wang, and E.S. Srivatsan, *Cellular senescence and tumor suppressor gene p16*. *Int J Cancer*, 2012. 130(8): p. 1715-25.
27. Al-Kaabi, A., et al., *p16INK4A and p14ARF gene promoter hypermethylation as prognostic biomarker in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review*. *Dis Markers*, 2014. 2014: p. 260549.
28. Kitagawa, M., et al., *Cell cycle regulation by long non-coding RNAs*. *Cell Mol Life Sci*, 2013. 70(24): p. 4785-94.
29. Bochenek, G., et al., *The large non-coding RNA ANRIL, which is associated with atherosclerosis, periodontitis and several forms of cancer, regulates ADIPOR1, VAMP3 and C11ORF10*. *Hum Mol Genet*, 2013. 22(22): p. 4516-27.
30. Wan, G., et al., *Long non-coding RNA ANRIL (CDKN2B-AS) is induced by the ATM-E2F1 signaling pathway*. *Cell Signal*, 2013. 25(5): p. 1086-95.
31. Correa de Adjounian, M.F.e.a., *Silenciamiento de genes mediante RNA interferencia. Consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores*. 2008.
32. Moore, C.B., et al., *Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown*. *Methods Mol Biol*, 2010. 629: p. 141-58.
33. Fellmann, C. and S.W. Lowe, *Stable RNA interference rules for silencing*. *Nat Cell Biol*, 2014. 16(1): p. 10-8.
34. Verdel, A., et al., *Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways*. *Int J Dev Biol*, 2009. 53(2-3): p. 245-57.
35. Li, Z. and T.M. Rana, *Molecular mechanisms of RNA-triggered gene silencing machineries*. *Acc Chem Res*, 2012. 45(7): p. 1122-31.
36. *Tet-Off® and Tet-On® Gene Expression Systems User Manual*, 2012, Clontech Laboratories, Inc.
37. *pcDNA™6/TR A regulatory vector designed for use with the T-REx™ System*, L.T. Corporation, Editor 2011.
38. *User Manual: BLOCK-iT Inducible H1 RNAi Entry Vector Kit*, I. Corporation, Editor 2010.
39. Paule, M.R. and R.J. White, *Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III*. *Nucleic Acids Res*, 2000. 28(6): p. 1283-98.
40. Hillen, W. and C. Berens, *Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance*. *Annu Rev Microbiol*, 1994. 48: p. 345-69.
41. Leeb M, W.A., *Ring1B is crucial for the regulation of developmental control genes and PRC1 proteins but not X inactivation in embryonic cells*. *J Cell Biol.*, 2007.
42. Kotake Y, C.R., Viatour P, Sage J, Zhang Y, Xiong Y., *pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene*. *Genes Dev.*, 2007.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

Ago: proteína Argonauta

AMP: ampicilina

ARF: AlternativeReading Frame (marco de lectura alternativo)

ARN pol I: ARN polimerasa I

ARN: ácido ribonucleico; **m**: mensajero

ARNi: ARN de interferencia

ARNi: ARN interferente

ARNInc: ARN largo no-codificante

ARNnc: ARN no codificante

ARNnc: ARN no-codificante

ARNsh: pequeños ARN de horquilla

ARNsi: ARN de interferencia pequeños

ARNsi: pequeños ARN de interferencia

CDK: ciclínas dependientes de kinasas

CMV: citolomegalovirus

EtOH - Alcohol etílico

H2AK119ub1: monoubiquitina de la lisina 119 en la histona 2

H3K27me3: tri-metilación de la lisina 27 de la histona H3

INK4: clúster INK4b-ARF-INK4a

LB: Luria-Bertani

ON: overnight

PAF: Paraformaldheído

Pb: par(es) de base(s)

PBS: Buffer Fosfato Salino

PRC1: complejo polycomb de represión 1

PRC2: complejo polycomb de represión 2

SDS: dodecilsulfato sódico

SNP: single-nucleotide-polymorphiso

TetO2: operador de tetraciclina

TetR: tetrepressor / represor de tetraciclina

Apéndice: Recetas

Medio LB:

- Peptona 10 g/l
- Extracto de levadura 5 g/l
- NaCl 10 g/l
- Esterilizar por autoclave 15'
- Conservar a 4 °C

Medio LB Agar:

- Peptona 10 g/l
- Extracto de levadura 5 g/l
- NaCl 10 g/l
- Agar 15 g/l
- Esterilizar por autoclave
- Preparar las placas de Petri y dejar solidificar
- Conservar a 4 °C

PBS 20X (pH 7.4)

- -160,0g NaCl 0,20 M
 - -4,0 g KCl 5,0 mM
 - -28,8 g Na₂HPO₄ 36 mM –
 - 4,8 g KH₂PO₄ 6,0mM
- En 800 mL de H₂O destilada -ajustar pH a 7,4 con HCl

PBS 1X (pH 7.4):

- 475 ml de dH₂O
- 25 ml de PBS 20X

PBST 1X (0,1% Tween/PBS 1X)

- 475 ml de dH₂O

- 25 ml de PBS 20X
- 0.5 ml de tween 20

Electroforesis en gel de agarosa

Buffer de corridaTAE:

- Tris 40 mM
- EDTA 1.0 mM
- Ácido acético 30 mM (0.175% v/v)

Buffer de carga 6X:

- Glicerol 30% (v/v)
- Azul de bromofenol 0.25% (p/v)
- Conservar a 4 °C

Vectores utilizados

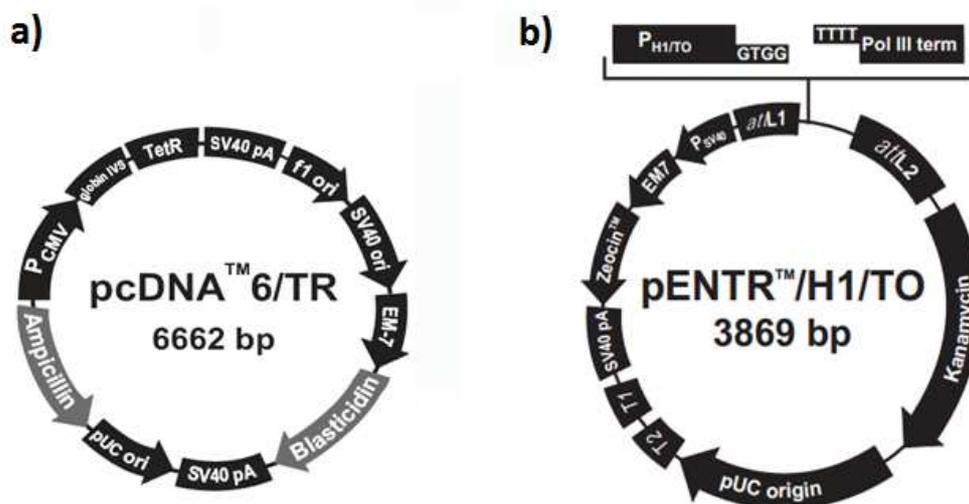


Figura 23. Vectores utilizados para el desarrollo del trabajo de tesis. En a) pcDNA 6/TR y en b) pENTR /H1/TO

Extracción de proteínas

RIPA buffer

- 50 mM Tris-Cl pH 8

- 150 mM NaCl -1% Tritón X100
- 0,5% Desoxicolato de Sodio
- 0,1% SDS

Llevar a 250 mL de H₂O destilada

Western Blot

Gel de separación	10%	7%
dH₂O	3.75 ml	4.65 ml
4x SDS/Tris-Cl pH 8.8	2.25 ml	2.25 ml
Acrilamida/Bis-acrilamida (30%/0.8% w/v)	3.0 ml	2.1 ml
Persulfato de amonio (APS) 10% (w/v)	90 ul	90 ul
N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina TEMED	10 ul	10 ul

Gel de stacking	3.9%
<u>dH₂O</u>	<u>4.6 ml</u>
4x SDS/Tris-Cl pH 6.8	<u>1.9 ml</u>
Acrilamida/Bis-acrilamida (30%/0.8% w/v)	<u>0.975 ul</u>
Persulfato de amonio (APS) 10% (w/v)	<u>75 ul</u>
TEMED	<u>7.5 ml</u>

Buffer de corrida

- 2 g SDS
- 1,56 g Tris Base
- 94 g Glicina

Llevar a 1L en dH₂O

Buffer de transfer

- 5,86 g Glicina

- 11,62 g Tris
- 3,75 mL SDS 20%

Llevar a 1600 mL de dH₂O; Agregar 20% Metanol previo a su uso

Buffer de bloqueo WB

5% leche descremada en polvo en PBST 1X

Ciclo celular

Mix de fijación G/F

- 40 ul de 50% de una solución stock de glutaraldehído (guardada a -20C)
- 500 ul de una solución stock de 37% formaldehído
- 10 ml de PBS

Solución de teñido

Añadir a 10 ml de buffer Citrate/Sodiumphosphate:

- 250 ul de ferricianuro de potasio (stock= 3.3g/50ml) (concentración final: 5mM)
- 250 ul de ferrocianuro de potasio (stock=4.2g/50ml) (concentración final: 5mM)
- 100 ul de MgCl₂ 200mM (stock= 2g/50ml) (concentración final: 2mM)
- 250 ul de NaCl 6M (stock=17.5 g/50ml) (concentración final: 150mM)
- 200 ul de 50 mg/ml de X – gal en DMSO (concentración final: 1 mg/ml) (disolver X-Gal en DMSO para tener un stock de 50mg/ml, guardar a -20C en oscuridad)

Buffer Citrate/Sodiumphosphate para solución de teñido (40mM, pH6)

- 39.4 ml de 0.1 ácido cítrico (19.2 g/l, M.W. 192)
- 60.6 ml de 0.2 M de fosfato de sodio (53.6 g/l heptahidratado, M.W. 268)
- 100 ml de agua desionizada

Inmuno/ RNA FISH

4% PFA en 1X PBS pH 7.4

- 20g Paraformaldehido
- 100 ul 10 N NaOH
- 50 ml PBS 10X
- 400 mL dH₂O

Solucion de bloqueo

- 5% BSA en PBST 1x

Buffer citrate

- 0.1% Na-Citrate (0.5g)
- 0.5% Triton 100X (2.5ml)
- Llevar a 500 ml de H₂O

Cytobuffer(4°C)

- 10 ml NaCl 5M
- 51.35 g Sucrose
- 1.5 ml MgCl₂ 1M
- 5 ml Pipes pH 6.8
- Llevar a 500 ml
- Filtrar a través de Nalgenefilter (0.2 um)

Cytobuffer + Triton 100X

- Igual que el Cytobuffer + 0.5 % triton 100X
- Filtrar a través de Nalgenefilter (0.2 um)

Sondas marcadas de 5' – 3'; 48 sondas

aatggaagactttcgacgagcaatgagatgacctcgctttgacattcagcctcctgattgccaaatctagaagaggagcgcgtgca
 gcggttagtttaaatgtcgtggcaaatagtcgcaatcatcacagcatggacaaccacaaagaaagtcatggccaagacagca
 agtggtattaatccctgcaggaaaaatcattattccacatgcccagtgccctggtgtagtgaagagaatattcactacactagggcc
 aactgggcatgaggaaataaagctcaaattctggcttcatcaaaagggacacttagctgtatatctggtggccagaaaactaaca

gtgatgcttgaaccctactgactcgggaaaggattccccggtttcttctagaaacctctgatggtttcttggcgttcattggagaga
ctgtcgtgccttcatgcttggatccattgtcctgtgtaggtaggctcattgtcaaacctagttagttctcgtaggcttctcagaaa
agcagtctccatgtaggttagctcattactccagagtgttactgcactgaacataccatagtcgtaggctcatggattgagc
actgtgccagtttaatcactgtgctccaatctaagtcactggccagcaatgttcttgccatggtagaacgtagaactcgggata
gagcttcgtatcccaatttactccaagtctggacttgaattgctctgagctaacggatcacagaccatacttgcatttcaactt
gctgtctgtcctcaatagctcatgcctccatgtagcagaaagctgataaatcttgactctggccatttgcaaaaacagctgac
cagtatctccatgctctcagtagctcacaaggaaacacacaccagaaagacatatgccaattgtctgagcccagtttat