

ARN MENSAJEROS COMO INTERRUPTORES SINTÉTICOS PARA PURIFICAR CÉLULAS

*Ensayos con el microARN-Let7a para el desarrollo de
terapias celulares en Diabetes.*



Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino,.....



ARN MENSAJEROS COMO INTERRUPTORES SINTÉTICOS PARA PURIFICAR CÉLULAS

*Ensayos con el microARN-Let7a para el desarrollo de terapias
celulares en Diabetes.*

Trabajo Final de Grado

de la alumna

Lucía Ana Curti

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Co-Director

(Nombre y Apellido)
Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino,.....



INDICE

<u>Títulos</u>	<u>Página</u>
AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	
<i>Diabetes y terapias celulares</i>	10
<i>MicroARN y su función biológica</i>	12
<i>MicroARN en el contexto pancreático</i>	14
<i>Purificación celular y ARN interruptores sintéticos</i>	15
<i>Versión apoptótica de los ARN interruptores sintéticos</i>	19
<i>Impacto y originalidad de la propuesta</i>	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECIFICOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	
<i>Diseño y síntesis de los ARN sintéticos</i>	23
<i>Agregado de la cola PoliA por PCR a los fragmentos gBlocks</i>	24
<i>Reacción de transcripción in vitro (IVT)</i>	25
<i>Modelos celulares y cultivos in vitro</i>	27
<i>Lipofección de las líneas celulares con los ARN sintéticos</i>	27
<i>Prueba de funcionalidad y eficiencia de lipofección de los ARN sintéticos</i>	28
<i>Prueba de especificidad de los ARN interruptores sintéticos</i>	29
<i>Curvas de tolerancia al ARN miR-Let7a-BIM en HEK293 y MIN6</i>	29
<i>Modelo de simulación in vitro de purificación celular con HEK293T y MIN6</i>	30
<i>Análisis Estadístico</i>	31



RESULTADOS

<i>Amplificación por PCR y Transcripción in vitro (IVT) de las construcciones</i>	32
<i>Prueba de funcionalidad y eficiencia de lipofección de los ARN sintéticos</i>	33
<i>Prueba de especificidad de los ARN interruptores sintéticos</i>	35
<i>Curvas de tolerancia al ARN interruptor miR-Let7a-BIM en HEK293T y MIN6</i>	36
<i>Modelo de simulación in vitro de purificación celular con HEK293T y MIN6</i>	39
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	48
PERSPECTIVAS	49
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS	54



AGRADECIMIENTOS

La vida, como los procesos biológicos que se dan en la naturaleza, tiene un ciclo. Hoy, cerrando uno, me es inevitable no pensar cómo arranco.

Hace apenas un par de años, 15-16, recuerdo que llegaron a mis manos las primeras aproximaciones en el mundo de la ciencia. Mis papás solían comprarme la revista "Muy interesante", ya que por suerte, tuve el gusto por la lectura desde que conocí ese maravilloso mundo.

Recuerdo entonces estar leyendo sobre "células madre" y cómo criopreservarlas en nitrógeno (en ese momento para mí era sólo "guardarlas en un freezer"). Leía varios artículos y, fascinada, los comentaba en los almuerzos con mi familia. A su vez, leía libros de anatomía y toda enciclopedia que se me cruzara (sin dejar de lado mi adorada saga de Harry Potter).

A los 14 años, casi finalizando la primaria (en ese momento, era 9no año), mi profesora de biología traía al aula las primeras clases de genética; leyes de Mendel, problemas básicos de entrecruzamiento, algún pequeño acercamiento a la co-dominancia y epistasis por ahí. Desde ese momento supe lo que quería. Mi deseo fue instantáneo. Tenía que hacer algo con la "genética". El extraño mundo que me hacía preguntarme el por qué no tenía ojos verdes como mamá, por qué mi hermana tenía rulitos y yo no y el por qué de alguna enfermedad que apareciera en la familia.

Mi deseo se mantuvo intacto hasta el momento de empezar a elegir qué carrera iba a estudiar y dónde. Hacia el último año del Polimodal, incentivada por la misma profesora que había logrado que descubriera mi profesión, afronté el desafío de querer reproducir en mi casa las leyes de Mendel pero con hamsters, primer experimento (de tantos) que falló. Sin embargo, seguí sin dudar mi camino y en el año 2010 emprendí mi primer viaje a Pergamino a conocer lo que sería mi facultad, la UNNOBA.

Linda, cálida, con un toque de "pueblo" como diría yo, fue la institución que me acompañó, me formó, me dio miles de lecciones e hizo que conociera excelentes personas para transitar este camino desde los 17 años que tuve que irme de mi casa, de mi pueblo. Cursé mil horas, viví en la facultad, tuve asistencia perfecta a las peñas y me llevo mil anécdotas. Sin dudas la volvería a elegir!

Al final del camino, terminando el trayecto por la casa de estudio, hubo una nueva decisión que tomar. Y por eso fui, decidida, insistente, perseverante. Tenía un objetivo y debía cumplirlo. Este trabajo es el resumen y el fruto de todo este camino. Es la



esencia del desafío, de la curiosidad diaria, de la pasión por lo que elegí y perseguí hasta lograrlo.

En todo este ciclo, hubieron miles de protagonistas a quien les debo mucho.

Primero que nada a mi familia: mamá, papá, Sofi y los abuelos paternos y maternos. Son mi sostén diario y mi motivo para seguir avanzando. Gracias por la educación, el amor y la comprensión de siempre.

A mi gente de Caleufú por dejar un pedacito de cada uno en mi y acompañar siempre a la distancia.

A mis amigas de Pergamino, el grupo del inicio. Vivimos miles de experiencias, compartimos llantos, logros, malos momentos y muchos excelentes.

A mis amigos de la facultad, que me enseñaron el valor del compañerismo, la amistad en todo momento y que aprendí a admirar algo de cada uno.

A mis amigas del inmunogrupo, por el trabajo en equipo, la confianza, solidaridad, amistad y miles de valores más. Siempre estuvieron, hasta último momento. Con ustedes conocí el verdadero trabajo en equipo.

Gracias a Fede, mi director, por creer y confiar en mi. Apostaste muchas veces que ni yo creía en mí. Me diste alas y nunca dejás que toque tierra. Gracias a nuestro gurú, Rafa, por ser siempre un libro abierto y estar dispuesto a compartir tu conocimiento.

Gracias infinitas a Carla, mi compañera del equipo "bonnete", por integrarme y enseñarme tanto. No hubiera logrado tanto sin tu apoyo constante.

A mis compas del laboratorio ¡Gracias!. Hacen que mi estadía en la ciudad de la furia sea un poco más amena. Se divierten con mis historias, festejan mis logros y están ahí para las caídas, compartiendo siempre sobremesa o merienda científica.

Gracias a Fabiana, quien me acompañó todo este tiempo desde su lugar.

Gracias a la casa de estudios, a la UNNOBA, por dejarme crecer y terminar de formar mi personalidad. Estoy orgullosa de la formación académica que recibí.

Y por último, un GRACIAS enorme a Susana Pistorale, por hacer tanto por la carrera. Sos inigualable Su!

¡Gracias totales a todos! Nada sería igual sin el aporte de cada uno.

Cumplí el sueño!



RESUMEN

La Diabetes Tipo 1, es una de las enfermedades que más repercuten en la población mundial, y uno de los desafíos que se plantean para su abordaje es el desarrollo de terapias celulares mediante reprogramación celular hasta el fenotipo β pancreático para restituir la masa crítica de esa población en los pacientes. Sin embargo, las células reprogramadas resultantes presentan heterogeneidad, y los métodos de purificación no son eficaces. Intentando resolver esta problemática, Miki y col. (2015) desarrollaron un método de purificación que distingue y separa poblaciones celulares según la actividad de los microARN endógenos, que se denomina ARN interruptores sintéticos.

El objetivo de este Trabajo Final de Grado fue diseñar, sintetizar y purificar poblaciones celulares que contengan el miR-Let7a, un microARN relacionado con las células β pancreáticas

Para ello las construcciones de ARN sintético se diseñaron y sintetizaron como ADN y se convirtieron en ARN mediante transcripción *in vitro*. Posteriormente en distintos ensayos se evaluaron su funcionalidad, especificidad y tolerancia. Por último se desarrolló un modelo de simulación de células reprogramadas para probar la purificación *in vitro*.

Este proyecto pretende optimizar un método de purificación de células reprogramadas que alcance una eficiencia tal que permita aproximar los trasplantes celulares desde el laboratorio hasta los pacientes con Diabetes.



ABSTRACT

Type 1 Diabetes is one of the diseases that most affect the world population, and one of the challenges that arise for its approach is the development of cellular therapies by cell reprogramming to the pancreatic β phenotype to restore the critical mass of that population in patients. However, the resulting reprogrammed cell populations exhibit heterogeneity, and the purification methods are not effective. Trying to solve this problem, Miki et al. (2015) developed a purification method that distinguishes and separates cell populations according to the activity of endogenous microRNAs, which is called synthetic RNA switches.

The objective of this Final Degree Project was to design, synthesize and purify cellular populations containing the miR-Let7a, a microRNA related to pancreatic β cells, to perfect the cellular purification technique by means of synthetic RNA switches, both in the design and synthesis of the constructions, in cellular populations that express miR-Let7a; and check them functionally *in vitro*.

To this end, the synthetic RNA constructs were designed and synthesized as DNA and converted into RNA by *in vitro* transcription using a commercial kit. Subsequently in different assays we evaluated their functionality, specificity and tolerance in different cellular populations. Finally, we developed a simulation model of reprogrammed cells to test *in vitro* purification.

This project aims to optimize a method of purifying reprogrammed cells that achieves an efficiency that allows approximation in cell transplants from the laboratory to insurance for patients with diabetes.



ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

BFP: Proteína azul fluorescente

BIM: *BCL2 interacting mediator of cell death*. Proteína pro-apoptótica.

DT1: Diabetes Tipo 1.

gBlocks: fragmentos de ADN sintetizados *in vitro*.

GFP: Proteína verde fluorescente

IVT: Transcripción *in vitro*

mGFP: ARN mensajero de la proteína verde fluorescente

miARN: microARN

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: pares de bases.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

RISC: Complejo silenciador mediado por microARN

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling. Ensayo para visualización de apoptosis.

UTR: Untranslated región. Región “no traducida” de los genes.



INTRODUCCIÓN

Diabetes y terapias celulares

La Diabetes mellitus engloba varios padecimientos crónicos que actualmente han ido en aumento y constituyen un serio problema de salud pública. En términos generales la Diabetes se clasifica en Tipo 1 y Tipo 2 y comparten como característica común la hiperglucemia, ya sea debido a una disminución y deterioro progresivo de la masa de células β del páncreas por una acción autoinmune, o a una disminución en la eficacia de los mecanismos de señalización de la insulina, respectivamente (Weir y col., 1990). Las complicaciones que manifiesta la cronicidad de la Diabetes incluyen un amplio abanico de patologías tanto a corto como a largo plazo, incluyendo nefropatías, neuropatías, retinopatías y enfermedades coronarias; las cuales deber ser controladas periódicamente.

El páncreas es una glándula mixta. Contiene una parte exocrina conformada por células acinares productoras de enzimas digestivas; y una parte endocrina compuesta por islotes de Langerhans. Dentro de los islotes las células productoras de insulina o células- β representan el 70% de la masa celular y son las encargadas de secretar insulina para regular la glucosa en sangre. La administración de insulina exógena, acompañada con el monitoreo continuo del nivel de glucosa en sangre, es el tratamiento en todos los pacientes con Diabetes Tipo 1. Si bien la administración de insulina es un excelente tratamiento, a largo plazo se asocia con las dificultades antes mencionadas (van Dijk y col., 2014).

Las terapias celulares mediante la utilización de células reprogramadas hasta células productoras de insulina, presenta un gran potencial terapéutico para restituir la masa crítica de células- β pancreáticas y restablecer así la normoglucemia en los pacientes con DT1. Nuestro grupo ha trabajado

recientemente explorando nuevas aproximaciones para lograr este objetivo (Pereyra-Bonnet y col., 2014; Gimenez y col., 2016). Sin embargo esta potencial estrategia terapéutica está actualmente en etapa de experimentación y se encuentra superando año tras año varios impedimentos técnicos para poder transformar estos ensayos en tratamientos clínicos seguros y eficaces.

Uno de los impedimentos técnicos aún no resuelto para tornar estas investigaciones en tratamientos seguros, es la heterogeneidad de las poblaciones celulares obtenidas luego de los procesos de reprogramación. Las células remanentes o refractarias a la reprogramación pueden traer diferentes problemas a la hora de pensar en los trasplantes en pacientes. Por ejemplo si la fuente de células a reprogramar son células madre, estas células no-reprogramadas pueden generar tumores luego de los trasplantes en pacientes (Figura 1). Es por ello que, hasta no lograr poblaciones en el laboratorio que permitan obtener células reprogramadas puras, los trasplantes celulares seguirán siendo inseguros y no podrán desembarcar a la clínica.

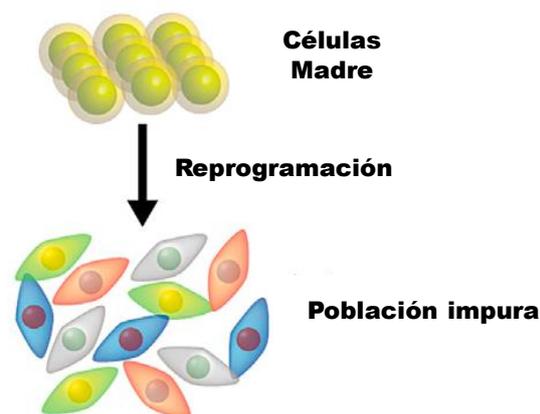


Figura 1. Los procedimientos de reprogramación de células *in vitro* resultan en una población heterogénea de células reprogramadas mezcladas con aquellas células sin reprogramar, e inclusive con células parcialmente reprogramadas. Hasta que no exista un procedimiento extremadamente eficiente para purificar



células reprogramadas, los trasplantes en pacientes seguirán siendo inseguros y no podrán desembarcar en la clínica.

Recientemente un grupo de investigación en Japón desarrolló un método de identificación y purificación celular donde reportaron eficiencias de purificación que van del 80 al 99 % (Miki y col., 2015). El método se basa en la identificación de la actividad de microARN endógenos característicos de un linaje celular o con un diferencial de expresión, por medio de ARN complementarios sintéticos acoplados a diferentes secuencias que codifican proteínas efectoras o de señalización. A lo largo de esta introducción se explicarán las bases moleculares y el funcionamiento de esta estrategia de identificación y purificación celular.

MicroARN y su función biológica

Los microARN, una clase de ARN no codificantes, fueron descubiertos en 1993 por Lee y col. en *C. elegans* como reguladores del desarrollo (R. C. Lee, 1993). Contienen de 19 a 22 nucleótidos aproximadamente y regulan la expresión génica post-transcripcional por unión complementaria a la región 3'UTR del ARN mensajero (ARNm) diana (Lagos-Quintana y col., 2001). Según el grado de complementariedad de secuencias, pueden conducir a represión de la transcripción o al clivaje del ARNm diana. Una perfecta complementariedad conduce al clivaje del ARNm blanco y su degradación. En cambio, una complementariedad imperfecta aumenta el silenciamiento del ARNm por distintos mecanismos que incluyen represión traduccional y secuestro en cuerpos de procesamiento citoplasmáticos (Roberts, 2015).

Están codificados tanto en regiones de genoma no-codificantes (intrónicas o intergénicas), así como en zonas codificantes (exones). La vía canónica de su biogénesis involucra diversos pasos de procesamiento hasta lograr el microARN maduro y funcional. La secuencia del microARN primario

(pri-miARN) es transcrito por la Polimerasa II (o Polimerasa III) y es de una longitud mayor al tamaño del microARN maduro, ya que incluye dicha región y otra complementaria que permite su apareamiento y la formación de horquillas. Posteriormente el pri-miARN es cribado por el complejo microprocesador Drosha-DGCR8 en el núcleo y forma lo que se denomina el precursor de microARN (pre-miARN). Éste último es transportado desde el núcleo al citoplasma por la Exportina 5. Una vez en el citoplasma el pre-miARN es fragmentado por la enzima RNasa III Dicer en conjunto con la proteína de unión al ARN doble cadena TRBP, que lo corta hasta la longitud final de 22 nucleótidos aproximadamente (Y. Lee y col., 2003; Rui Yi, 2003; Chendrimada y col., 2005). Luego el microARN maduro se ensambla con la proteína Argonauta 2, para formar el complejo silenciador inducido por microARN – miRISC- el cual selecciona la cadena guía del ARNm blanco, quien es la responsable de dirigir su silenciamiento/degradación (Liu y col., 2005) (Figura 2)

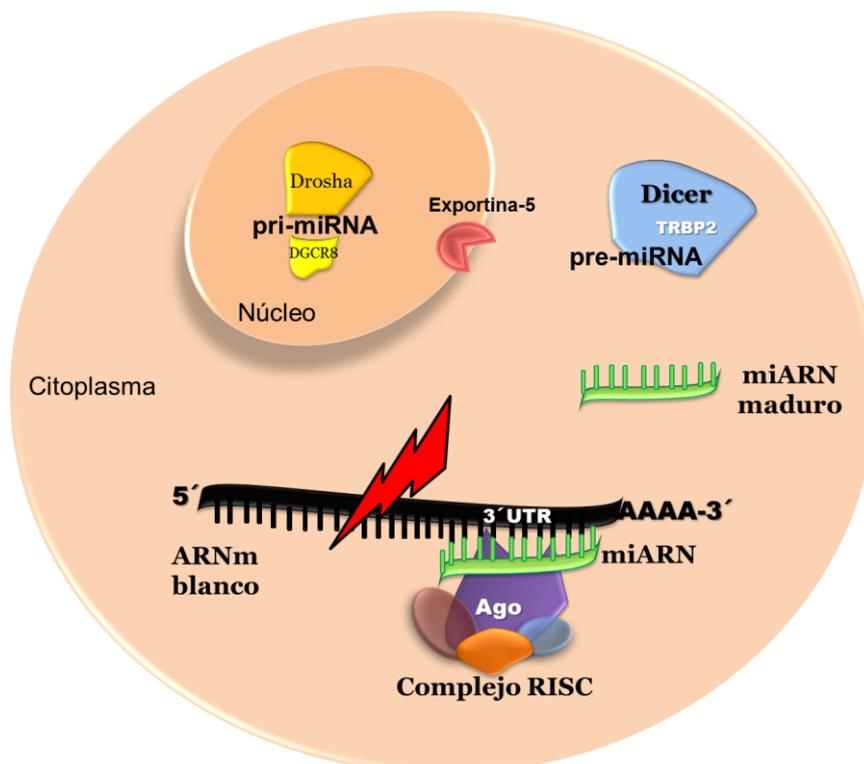


Figura 2: Esquema de la biosíntesis canónica de los microARN y su mecanismo para el silenciamiento génico (Adaptado: (Kim, 2005))



MicroARN en el contexto pancreático

Alrededor de 2.500 microARN maduros se han identificado en humanos y, considerando que pueden tener múltiples blancos, el número de genes y vías de señalización potencialmente afectadas es enorme. Muchos de estos microARN maduros están implicados en la diabetes y se ha descubierto que juegan un rol importante en los islotes pancreáticos y en las células β (Filios Y Shalev, 2015).

Uno de los microARN más abundantes y mejor estudiado en las células β e islotes pancreáticos es el **miR-375**. El miR-375 está involucrado en el correcto desarrollo y mantenimiento de éste linaje celular (Poy y col., 2009; Latreille y col., 2015; Nathan y col., 2015) y está altamente conservado durante la evolución (Matthew N. Poy, 2004). En las células β es requerido para la mantener la normoglucemia (Joglekar y col., 2009) y a nivel de islote pancreático, juega un rol importante en la compleja red de regulación pancreática (Li, 2014).

Otro de los microARN importantes en el contexto pancreático, y de nuestro particular interés en el presente trabajo, es el **miR-Let7a**. Los mir-Let7 son una familia de 12 miembros diferentes que se expresan en humanos (let-7a-1, 7a-2, 7a-3, 7b, 7c, 7d, 7e, 7f-1, 7f-2, 7g, 7i, y mir-98) (Roush Y Slack, 2008). Frost y Olson (Frost Y Olson, 2011) demostraron que el miR-Let7 tiene como diana al receptor de insulina (INSR), el cual es responsable de la acción de la insulina en tejidos periféricos. Zhu y col. (Zhu y col., 2011) demostraron que el miR-let7 regula el metabolismo de la glucosa en múltiples órganos mediante el eje lin28/let-7. Ambos componentes son reguladores antagonistas involucrados en la homeostasis de la glucosa. Juegan un rol específico y altamente regulado en la modulación del metabolismo de la glucosa en mamíferos. Asimismo, el laboratorio de la Dra. Sander (UCSD-EUUU) encontró



que las células madre reprogramadas hasta células productoras de insulina contienen altos niveles del miR-Let7a en cantidades similares al miR-375 (comunicación personal).

Los ejemplos descritos anteriormente resaltan no solo el hecho que los microARNs son poderosos reguladores de la biología de las células- β sino que son marcadores de linaje. Como se describirá más adelante, esta última característica es fundamental para el uso de estos microARN como blancos para la estrategia de separación celular.

Purificación celular y ARN interruptores sintéticos

Como se mencionó anteriormente, frente al desafío del abordaje clínico para la Diabetes con terapias celulares, es de suma importancia la obtención de poblaciones celulares puras para luego ser trasplantadas en el paciente. Si bien las estrategias de aislamiento y purificación de poblaciones celulares son variadas y muchas de ellas están en vigencia actualmente, los porcentajes de eficiencias son muy variados y dependen de los laboratorios donde se apliquen.

Los métodos más utilizados incluyen: anticuerpos contra marcadores de membrana, citometría de flujo acoplada a selección celular y gradientes de densidad. Por ejemplo, uno de los marcadores de superficie de membrana utilizados para seleccionar células- β es la Nestina. Sin embargo las neuronas y las células de los islotes comparten muchas propiedades fenotípicas, incluso comparten la expresión de Nestina; con lo cual se dificulta su utilización en protocolos de aislamiento (Olvera-Granados, 2008). Otro de los marcadores usados que tropiezan con el mismo inconveniente es el antígeno carbohidrato 19-9 , seguido de la selección positiva de la molécula de adhesión neural, PSA-NCAM (Banerjee Y Otonkoski, 2009). A su vez, ha sido reportado que el uso



de anticuerpos de superficie para la separación celular, resultaron inmunogénicos durante trasplantes en modelos animales (Dubois y col., 2011).

Para la purificación otra estrategia utilizada, es el aislamiento por gradiente de Ficoll-Hypaque luego de una digestión enzimática-mecánica del tejido pancreático (Shapiro y col., 2017). No obstante, se sobreestima el porcentaje de purificación en la mayoría de los casos y los registros no superan el 70% de pureza.

Como técnicas de identificación y aislamiento también existe las técnicas de tinción de los gránulos de Zinc asociados a la insulina, una de las características principales de las células- β . Las principales moléculas de tinción son la ditizona y el Newport Green®, ambas moléculas quelantes se asocian al Zinc. La ditizona tiñe a las células- β de fucsia permitiendo su identificación y separación bajo lupa estereoscópica con Micropipetas. Por su parte el Newport Green®, emite una fluorescencia verde cuando es observado bajo luz azul y permite la separación de las células insulina positiva mediante el uso de Citometría de Flujo acoplada a un separador celular (Lukowiak y col., 2001). Sin embargo, estos sistemas alcanzan como máximo el 80% de eficiencia de purificación.

Atendiendo a ésta necesidad se desarrolló una nueva herramienta basada en detectar y distinguir poblaciones celulares según su contenido de microARN denominada ARN interruptores sintéticos o “RNA-switches” en inglés (Miki y col., 2015). En la Figura 3 puede verse un esquema donde el agregado de los ARN interruptores sintéticos permite purificar una población celular heterogénea.

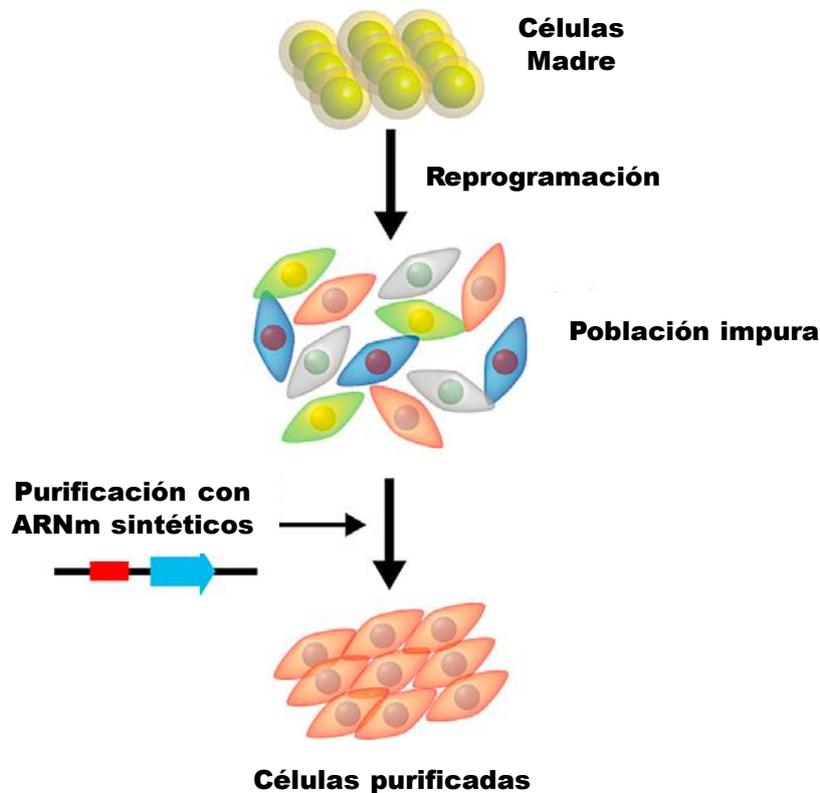


Figura 3. Los procedimientos de reprogramación de células *in vitro*, resultan en una población heterogénea/impura de células. Utilizando ARN interruptores sintéticos se pueden lograr células puras con el fenotipo deseado con una eficiencia superior a los métodos de purificación existentes.

¿Cómo funcionan los ARN interruptores sintéticos? Como primer paso se construye un ARN mensajero que contiene una secuencia complementaria al microARN de interés característico de la célula a purificar. Como base para su diseño, los ARN interruptores sintéticos contienen características en su secuencia para su óptima traducción. En general las secuencias incluyen una región promotora (por ejemplo SP6 o T7), una región 5'UTR con la secuencia complementaria al microARN endógeno de interés, rio abajo una secuencia codificante para una proteína en particular (por ejemplo para una proteína marcadora como GFP o BFP), la región 3'UTR y una cola PoliA.

Una vez diseñados estos ARN interruptores sintéticos, son introducidos en las células por medio de lipofección u otro sistema de “entrega”. Una vez dentro de la célula, los ARN interruptores sintéticos tienen dos destinos posibles. En caso que se encuentre el microARN endógeno de interés éste se posiciona en el complejo RISC y por complementariedad con la secuencia del ARNm sintético; lo degradará evitando así la expresión de la proteína codificada (Figura 4).

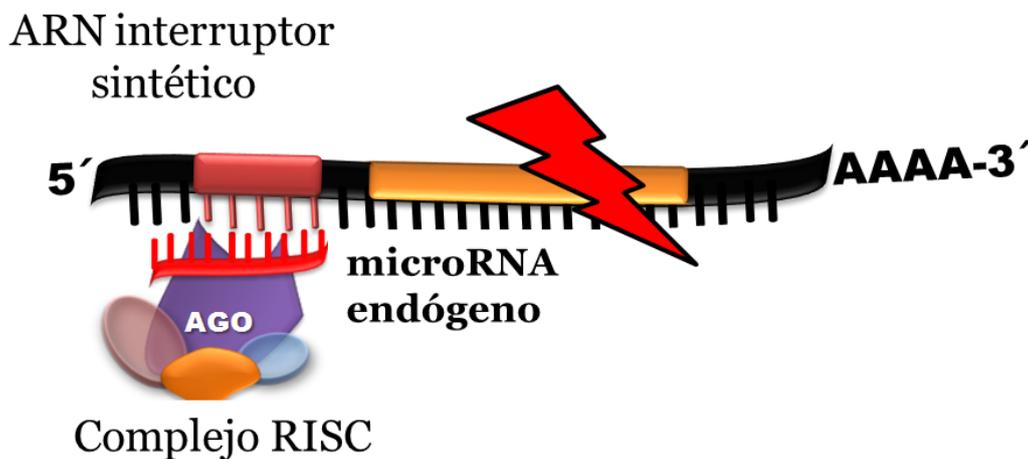


Figura 4. Esquema del mecanismo de silenciamiento de los ARN interruptores sintéticos por el complejo RISC. En el caso donde el tipo celular contenga el microARN complementario (células de fenotipo deseado) se formará un ARN doble cadena que será reconocido por el complejo RISC y degradado, impidiendo la expresión de la proteína codificada en el ARN interruptor sintético.

En caso contrario, en ausencia del microARN endógeno no se formará el ARN doble cadena, el ARN interruptor sintético no será degradado por el complejo RISC y por lo tanto se expresará la proteína codificada (Figura 5).



Figura 5. Esquema de los ARN interruptores sintéticos cuando no son reconocidos por el complejo RISC. En el caso de que las células no contengan el microARN de interés, no se formará la doble cadena y el ARN interruptor sintético no será degradado por el complejo RISC, por lo que se expresará la proteína codificada en el mismo.

Si la proteína codificada es, por ejemplo, una proteína fluorescente; finalmente las poblaciones celulares podrán ser separadas por citometría acoplada a un separador celular basado en la presencia/ausencia de fluorescencia.

En resumen, los ARN interruptores sintéticos están diseñados para que su traducción sea dependiente de la actividad de los microARN endógenos más abundantes o específicos de las células blanco.

Versión apoptótica de los ARN interruptores sintéticos

Una de las ventajas en el uso de los ARN interruptores sintéticos es la versatilidad del marco de lectura abierto usado en la secuencia del ARN mensajero. Por ejemplo, se puede incorporar la secuencia de casi cualquier proteína deseada para controlar el fenotipo o destino de las células en base a la actividad de los microARN endógenos. Por lo tanto, si se agrega al marco de lectura la secuencia codificante para una proteína pro-apoptótica, es posible purificar poblaciones celulares; enriquecidas solo las células del fenotipo deseado que expresen el microARN de interés. Con esta variante de los ARN

interruptores sintéticos se pueden purificar poblaciones celulares evitando el uso de citometría acoplada a un separador celular.

La familia de las proteínas BCL2 son reguladoras de la muerte celular y consisten en miembros tanto pro-apoptóticos como anti-apoptóticos. La proteína BIM (*BCL2 interacting mediator of cell death*) pertenece a la familia de las BCL2 del tipo pro-apoptótica y está altamente conservada en diversas especies de mamíferos. Puede atraer y secuestrar a muchas proteínas anti-apoptóticas y permeabilizar la membrana mitocondrial, convirtiéndose así en una proteína pro-apoptótica altamente eficiente. A su vez, su pequeño tamaño también la convierte en una proteína interesante para usarla dentro de los ARN interruptores sintéticos (Miki y col., 2015).

En la Figura 6 se muestra un esquema de cómo actúa el sistema de ARN interruptores sintéticos codificando a la proteína pro-apoptótica BIM.

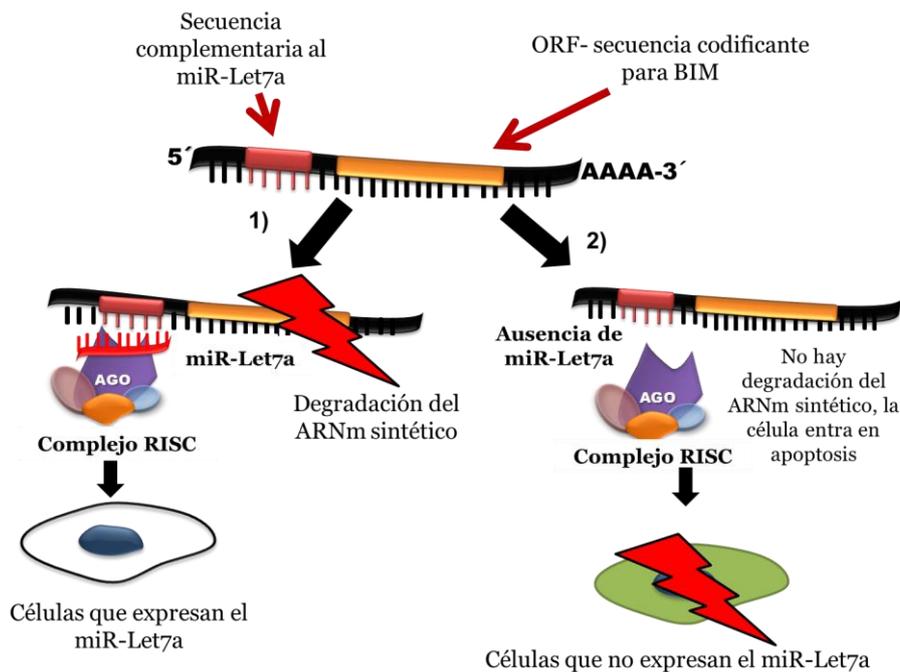


Figura 6. Esquema de purificación celular con ARNs interruptores sintéticos por apoptosis inducida con BIM evitando el uso de citometría acoplada a seleccionador celular.



Impacto y originalidad de la propuesta

La diabetes es una enfermedad que afecta a 400 millones de personas en el mundo y aproximadamente al 9% de la población en Argentina (OMS). Las tendencias, lejos de reducirse, van en aumento debido a la mala alimentación y a los actuales hábitos sedentarios. Cualquier desarrollo para acercar a la clínica las investigaciones en terapia celular en Diabetes, puede tener un impacto en el área tanto local como global.

Este trabajo final de grado pretende utilizar un método de purificación de células que basado en la utilización de ARN sintéticos. Según nuestros conocimientos al día de hoy no existe ningún reporte a nivel mundial que haya trabajado con ARN-sintéticos para identificar y separar células que expresen el miR-Let7a.



HIPÓTESIS

Los ARN interruptores sintéticos son capaces de purificar células que expresan el miR-Let7a.

OBJETIVO GENERAL

Utilizar ARN interruptores sintéticos para purificar células que expresan el miR-Let7a.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Diseñar y sintetizar construcciones de ARN interruptor sintético contra el miR-Let7a.
- 2) Comprobar la funcionalidad y especificidad de los ARN interruptores sintéticos diseñados.
- 3) Detectar diferencias en la expresión del miR-Let7a en distintas líneas celulares por medio de los ARN interruptores sintéticos.
- 4) Probar la capacidad de los ARN interruptores sintéticos para purificar células que expresan el miR-Let7a en un modelo de reprogramación *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y síntesis de los ARN sintéticos

Los ARN sintéticos fueron diseñados por Miki y colaboradores (Miki y col., 2015) con algunas modificaciones que corresponden al protocolo de Warren y colaboradores (Warren y col., 2010). En todos los casos, para el diseño de las construcciones se utilizó el software “Benchling” (<https://benchling.com>) usando como referencia las bases de datos del NCBI.

Brevemente todas las construcciones de ARN interruptores sintéticos constan de las siguientes partes: la mínima porción del promotor SP6 antecedido por dos bases para ganar estabilidad; una región 5' UTR interrumpida por la secuencia complementaria al miR-Let7a, seguida por la secuencia que codifica la proteína fluorescente azul (BFP) o la proteína proapoptótica BIM, terminando con la región 3'UTR. En todos los casos las construcciones fueron sintetizadas como fragmentos de ADN por la empresa IDT (<https://www.idtdna.com/>) en forma de gBlocks. La principal característica de los fragmentos gBlocks es que están sintetizados como fragmentos lineales de ADN, es decir que no están insertos en un esqueleto plasmídico. En la figura 7 se esquematiza los fragmentos gBlocks diseñados y en el Anexo 1 se detalla las secuencias.

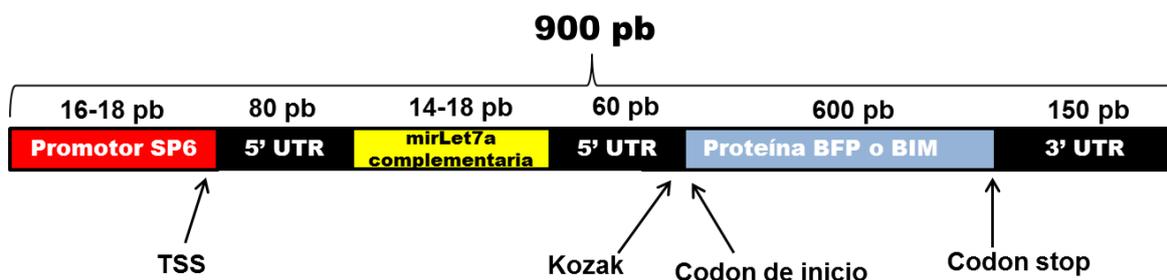


Figura 7. Esquema de los fragmentos diseñados y sintetizados como gBlocks para la obtención de los ARN interruptores sintéticos.

Para los ensayos finales se diseñó y sintetizó como gBlock un ARN interruptor sintético con la región complementaria al miR-375. Para todos los casos como control de eficiencia de lipofección se diseñó y sintetizó, también en forma de gBlock, el molde de ADN para el ARNm de la proteína verde fluorescente (ARNm-GFP). A diferencia de los moldes para los ARN interruptores, el molde para el ARNm-GFP no contiene la región complementaria a ningún microARN de interés interrumpiendo el fragmento 5' UTR, como se esquematiza en la figura 8. La secuencia completa de todos los fragmentos se puede encontrar en el Anexo I.

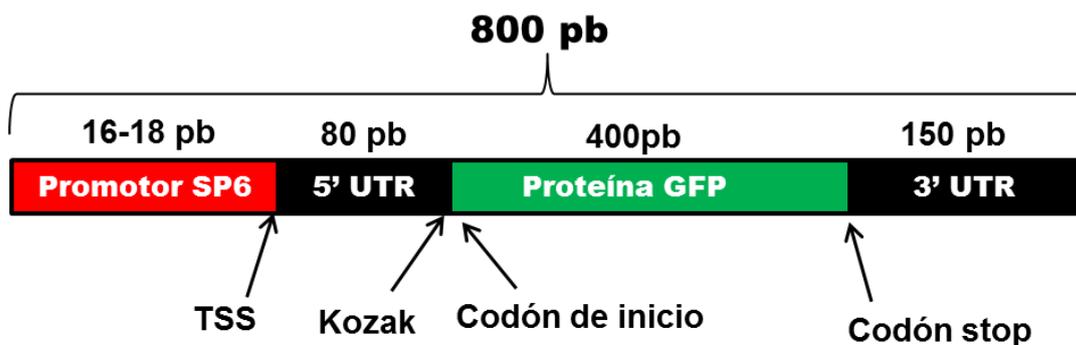


Figura 8. Esquema del fragmento de ADN diseñado y sintetizado como qBlock para la obtención del ARNm de la proteína verde fluorescente.

Agregado de la cola PoliA por PCR a los fragmentos gBlocks

Para obtener el molde que finalmente se usó en la transcripción *in vitro* de todos los ARN sintéticos, se añadió a los fragmentos gBlock la secuencia de una PoliA de 80 pares de bases mediante PCR. Esta cola de PoliA fue necesario agregarla posteriormente ya que no fue factible su síntesis *in vitro*. Para ello, se diseñaron dos cebadores. El cebador “F” complementario al promotor SP6 y el cebador “R” complementario al fragmento 3' UTR con la mínima cantidad de “T” para conferirle estabilidad a la secuencia de ARN resultante según analiza Warren y colaboradores (Warren y cols., 2010). La amplificación se realizó utilizando una polimerasa de alta fidelidad (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Thermo scientific) en un termociclador Veriti®

(Applied Biosystems, Thermo Fisher). La secuencia de los cebadores utilizados y las condiciones de la PCR se detallan en el Anexo I.

Los productos de PCR fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, a fin de chequear la presencia de la única banda del tamaño esperado. En la figura 9 se esquematiza la construcción final que fue utilizada como molde para la obtención de los ARN sintéticos maduros para su transcripción *in vitro*.

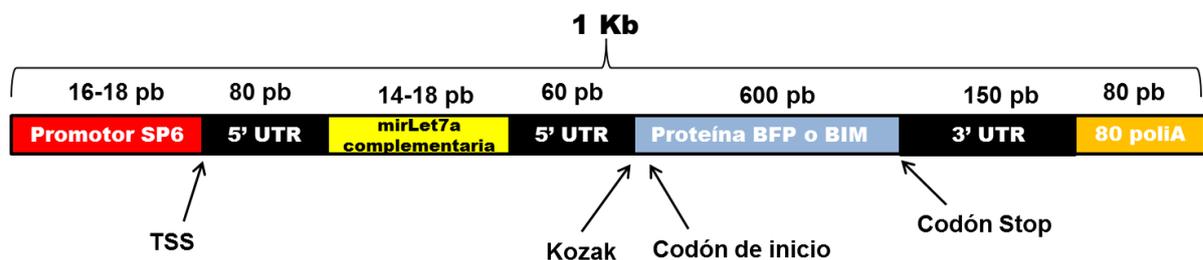


Figura 9. Esquema de las construcciones que fueron utilizadas como molde para la obtención de los ARN maduros para su transcripción *in vitro*. Como ejemplo se esquematiza el ARN interruptor conteniendo la secuencia complementaria al miR-Let7a.

Reacción de transcripción *in vitro* (IVT)

La conversión de ADN hacia ARN fue llevada a cabo mediante el uso del kit SP6 MegaScript® (Ambion, Invitrogen), según las instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones. Brevemente: Se modificó el protocolo añadiendo un análogo de caperuza (3'-O-Me-m7G)(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog, (Thermo Fisher), en una relación 1:4 con el nucleótido GTP. A modo de ejemplo, en la tabla 1 se detalla una mezcla de reacción tipo que se utilizó en todos los protocolos de IVT para obtener los ARN sintéticos.



Tabla 1. Modelo de mezcla de reacción para IVT en un volumen final de 20 μL

Componente	Volúmenes (1x)
Agua	7.5 μL
Buffer 10x	2 μL
ATP	2 μL
CTP	2 μL
UTP	2 μL
GTP	0.4 μL
ARCA	1.6 μL
Enzima	2 μL
Molde	1ng-10pg*

Nota: * se probaron dos concentraciones de molde D1=1ng y D2=10pg.

La mezcla se incubó a 37°C por 4-6 hs, según indicaciones del fabricante. Transcurrido ese tiempo, se realizó un tratamiento con Fosfatasa Antártica (New England Biolabs) durante 30 minutos para eliminar los grupos fosfatos y conferirle estabilidad al ARNm resultante (Warren y col. 2010). El ARN resultante se purificó mediante el kit MegaClear® (Ambion, Invitrogen), según las instrucciones del fabricante.

Para su visualización, los ARN sintéticos se corrieron en un gel en condiciones desnaturizantes. Para ello los ARN fueron co-incubados con 10 μL de buffer MOPS 10x, 2.2 μL de Formaldehído al 4% y 7 μL de Formamida cada 10 μL de ARN. Las muestras se calentaron a 55°C por 15 minutos. Pasado ese tiempo se sembraron en un gel de Agarosa al 1% con 0.5 μL de Bromuro de Etidio y 2.5 μL de buffer de siembra 10x a 50V por 30 minutos. El ARN purificado y visualizado está listo para ser usado en ensayos posteriores y



se almacena para su uso diario en freezer a -20°C o por períodos prolongados en freezer a -80°C .

Modelos celulares y cultivos in vitro

Las líneas celulares HEK293T y HeLa fueron mantenidas en medio DMEM (Gibco®, Invitrogen) y la línea celular MIN6 en DMEM con alto contenido de glucosa. En todos los casos los medios fueron suplementados con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco®, Invitrogen) y 1% de L-glutamina. En todos los casos las células fueron cultivadas en estufa gaseada a 37°C con 5% de CO_2 y el medio fue reemplazado cada 2-3 días. Para los ensayos donde se co-cultivaron células HEK293T y MIN6 se utilizó DMEM alta glucosa suplementado con 10% de SFB y 1% de L-Glutamina.

Se trabajó con la línea celular MIN6 proveniente de un insulinoma de ratón, porque cumple con los requisitos para simular una célula- β humana, siendo insulina positiva (Ishihara y col., 1993) que a su vez expresa los microARNs miR-Let7a y miR-375 que son de nuestro interés (Tang y col., 2008; Klein y col., 2013) (Filius Y Shalev, 2015). Asimismo para la pruebas de especificidad se utilizaron las células HeLa que expresan el miR-Let7a según bibliografía (Zhou, 2009) y datos suministrados por el laboratorio de la Dra. Sander (UCSD-EEUU, comunicación personal). Como no fue posible detectar una población miR-Let7a negativa se utilizó la línea HEK293T que tiene solo expresión basal del microARN-Let7a y que no expresa otros microARN particulares de células β (Tian y col., 2012)

Lipofección de las líneas celulares con los ARN-sintéticos

Las líneas celulares fueron lipofectadas mediante el uso de Lipofectamina 2000® (Thermo Fisher) según las instrucciones del fabricante



utilizando OPTI-MEM (Gibco®, Invitrogen). La concentración de los ARN sintéticos y cantidad de células según la placa de cultivo utilizada se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones para la lipofección de las líneas celulares con los ARN sintéticos.

	6 pocillos	12 pocillos	24 pocillos
ARN-sintético			
ARNm-GFP, miR-Let7a-BFP, miR-375-BFP	500-750ng/ml	500-750ng/ml	500-750ng/ml
miR-Let7a-BIM	5ng-5 µg/ml	5ng-5 µg/ml	5ng-5 µg/ml
Lipofectamina 2000®	12µL	10µL	4µL
Cantidad de células	400.000	200.000	80.000
Medio en ml	2	1	0,5

Prueba de funcionalidad y eficiencia de lipofección de los ARN sintéticos

Luego del diseño, síntesis y la IVT de los ARN sintéticos diseñamos un breve ensayo para verificar su funcionalidad y eficiencia de lipofección. Para ello el ARNm-GFP sintético codificante para la proteína verde fluorescente se lipofectó en las líneas celulares HEK293T y MIN6 como se describió anteriormente. La visualización de fluorescencia se realizó mediante microscopia a las 18-20 hs post-lipofección. El microscopio de fluorescencia utilizado fue Eclipse E400, Nikon en el filtro verde (530- 680nm). Como control negativo se utilizaron las mismas líneas celulares sin lipofectar. El porcentaje de eficiencia de lipofección se calculó mediante el cociente de células lipofectadas (verdes) sobre las células totales contabilizadas por 100.



Prueba de especificidad de los ARN interruptores sintéticos

Para comprobar que la expresión de la proteína codificada en los ARN interruptores sintéticos depende de la presencia/ausencia del microARN endógeno de interés, se llevó a cabo una prueba de especificidad utilizando el ARN interruptor miR-Let7a-BFP en la línea celular HeLa, ya que según bibliografía (Zhou, 2009) y resultados del laboratorio de la Dra Sander en UCSD-EEUU (comunicación personal), esta línea celular expresa altos niveles del miRLet7a. Para ello, un grupo de células fue lipofectado con el miR-Let7a-BFP y un segundo grupo de células fue lipofectado con la misma construcción más el agregado de 50 nM de un inhibidor sintético del miR-Let7a sintetizado por la empresa Exiqon® (www.exiqon.com; secuencia: 5'-AACUAUACAACCUACUACCUC-3'). Como control de eficiencia de lipofección, se incluyó en todos los grupos de células el ARNm-GFP.

Como resultados esperados, en el grupo lipofectado con el ARN miR-Let7a-BFP sin inhibidor no deberían verse células azules bajo observación con microscopio de fluorescencia. Por el contrario el grupo de células con el agregado del inhibidor deberían expresar la proteína fluorescente azul debido a que el inhibidor se une por complementariedad al miR-Let7a-BFP impidiendo su degradación por el complejo RISC.

Curvas de tolerancia al ARN miR-Let7a-BIM en HEK293T y MIN6

Cada línea celular presenta un nivel característico de expresión de sus microARN endógenos. Es por ello que basándose en esas diferencias de expresión se pueden hallar diferentes tolerancias a un mismo ARN interruptor sintético. Para ello realizamos curvas de tolerancia al ARN miR-Let7a-BIM en las líneas celulares HEK293T y MIN6. Brevemente, las células fueron lipofectadas como se describió anteriormente con 0, 5, 50 y 500 ng/ml del ARN miR-Let7a-BIM en las células HEK293T y 0, 50, 500 y 5000 ng/ml en las



células MIN6. En todos los casos a las 18-20 hs post lipofección se analizó el efecto de la proteína pro-apoptótica BIM en las células tratadas.

El análisis de las células apoptóticas se realizó mediante el ensayo de TUNEL (por sus siglas en inglés de Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), donde las células apoptóticas pueden visualizarse de color verde bajo microscopía de fluorescencia (filtro 530-680nm). El ensayo de TUNEL es un método que detecta la fragmentación del ADN basado en la presencia de cortes en la doble hélice detectables por la Terminal deoxinucleotidil Transferasa (TdT), una enzima que cataliza la adición de dUTPs marcados con Biotina (Kyrylkova y col., 2012). Para el ensayo de TUNEL las células fueron tratadas siguiendo el protocolo del kit *In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein* (Roche). Se realizó también una co-tinción con Hoechst para la visualización de núcleos totales. Para ello, al preparado final se le agregan 100 μ l de Hoechst33258 (1:500) y se lo incubó por 1 minuto en oscuridad. Finalmente, luego de lavar las muestras 2 veces con PBS, se realizaron 2 frotis por muestra sobre porta objetos, para su visualización mediante microscopía de fluorescencia bajo el filtro verde (530- 680nm) y azul (450-550nm). Para la cuantificación de las células apoptóticas se contaron la cantidad de células apoptóticas sobre la cantidad total de células, a partir de 10 campos tomados al azar. En todos los casos los conteos se realizaron por triplicado.

Modelo de simulación in vitro de purificación celular con HEK293T y MIN6

Como último ensayo se propuso un modelo de simulación *in vitro* de un contexto celular post-reprogramación, utilizando un co-cultivo de poblaciones celulares con un nivel diferencial en la expresión de los microARN particulares de células β , donde probamos la eficiencia de purificación del ARN interruptor sintético miR-Let7a-BIM.



En este ensayo se co-cultivaron células HEK293T y MIN6 para probar la capacidad de purificación celular del ARN interruptor miR-Let7a-BIM. Para ello se sembraron 40.000 células de cada tipo en un mismo pocillo de una placa de 24. A las 24 hs se agregaron 500ng/ml del ARN miR-Let7a-BIM. A las 18 hs post lipofección se analizaron las células por el ensayo de TUNEL para identificar apoptosis. En todos los cultivos celulares se realizó una co-lipofección con el ARN interruptor miR-375-BFP para identificar a la línea HEK293T. Las células HEK293T son miR-Let7a negativas (Kormann y col., 2011) y deberían verse azul bajo microscopía de fluorescencia. Por el contrario las células MIN6 son miR-375 positivas y no deberían verse azules (Tang y col., 2008)(Klein y col., 2013).

En todos los casos para la cuantificación de las células apoptóticas se realizaron 2 frotis por grupo y se contaron 25-35 campos al azar en cada muestra. En cada caso se determinó el número de células verdes/azules (BFP+, TUNEL+) y sólo verdes (BFP-, TUNEL+), sobre el total de células por campo.

Análisis Estadístico

Las células apoptóticas en el ensayo de TUNEL se analizaron mediante un ANOVA seguido por el test de Tukey. Para el ensayo del modelo de purificación *in vitro* se realizó un test de Chi-cuadrado. Para todos los casos se utilizó el software GraphPad Prism v.5, y se consideró un nivel de significancia del 0.05.



RESULTADOS

Amplificación por PCR y Transcripción in vitro (IVT) de las construcciones

Los fragmentos de ADN diseñados fueron sintetizados como gBlocks y amplificados con cebadores específicos para el agregado de una cola de poliA. El producto resultante se visualizó en un gel donde observamos las bandas correspondientes a los tamaños esperados (\cong 1kb) tanto para el fragmento del ARN interruptor miR-Let7a-BIM y del ARNm-GFP; con lo cual indicaría que los gblocks se poliadenilaron correctamente (Figura 10, A). Cabe destacar que si bien la banda del producto de PCR fue más intensa cuando se usó el templado con mayor concentración (D1= 1ng), la segunda dilución de trabajo (D2= 10pg) también amplificó el templado. Este resultado se repitió para ambas construcciones.

Las construcciones amplificadas fueron usadas como templado para la reacción de IVT mediante la utilización del kit comercial SP6 MegaScript® Transcription kit (Ambion, Invitrogen). El producto final se visualizó en un gel de Agarosa 1% luego del tratamiento en condiciones desnaturalizantes para evitar la formación de estructuras secundarias. En la Figura 10, B, se puede observar las bandas coincidentes con tamaño de los ARN transcritos. Cabe destacar que se debió discontinuar la corrida antes de la extensión completa del marcador de peso molecular, debido a que se iba perdiendo nitidez de la muestra probablemente por la degradación de los ARN.

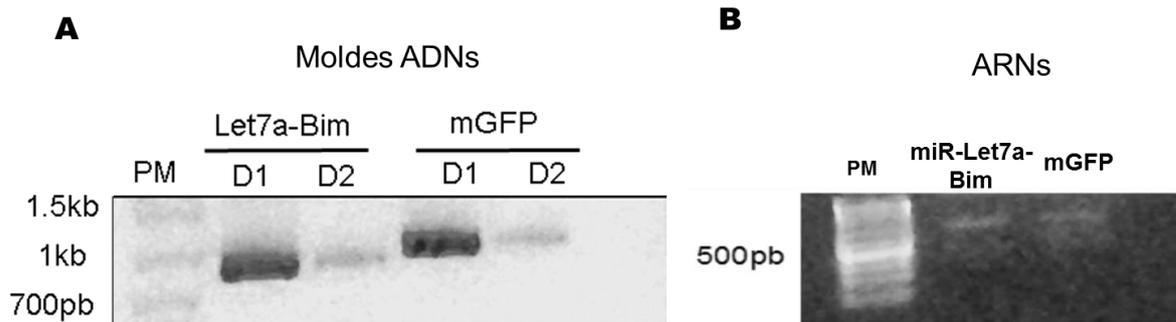


Figura 10. **A)** Visualización de la amplificación por PCR de los fragmentos gBlocks con el agregado de las colas poliA. Estos productos se utilizaron como moldes para las IVT. Notas: Visualización en gel de Agarosa 1% con un marcador de Peso Molecular de 1000pb. D1 y D2; concentraciones de trabajo. **B)** Visualización en condiciones desnaturalizantes de los ARNs sintéticos resultantes luego de la IVT. Notas: Visualización en gel de Agarosa 1% con un marcador de Peso Molecular de 1000pb.

El ARN miR-375-BFP fue sintetizado en el laboratorio de la Dra. Sander en EEUU y usado directamente en nuestras instalaciones para los ensayos.

Los rendimientos obtenidos variaron desde 5-6 μ g totales para las construcciones miR-Let7a-BFP y miR-375-BFP, hasta 20-30 μ g para las contrucciones ARNm-GFP y miR-Let7-BIM.

Prueba de funcionalidad y eficiencia de lipofección de los ARN sintéticos

El ARNm-GFP se lipofectó en las líneas celulares HEK293T y MIN6 como prueba de funcionalidad y para medir la eficiencia de lipofección. A las 18-20 hs se realizó el registro de fluorescencia en las células tratadas. Observamos una eficiencia de lipofección de un 100% en la línea HEK293T (Figura 11, panel superior) y un 80% en la línea MIN6 (Figura 11, panel inferior). En este ensayo pudimos comprobar que los ARN sintéticos

transcriptos *in vitro* eran funcionales y que la eficiencia de lipofección de las líneas celulares seleccionadas fue alta en ambos casos.

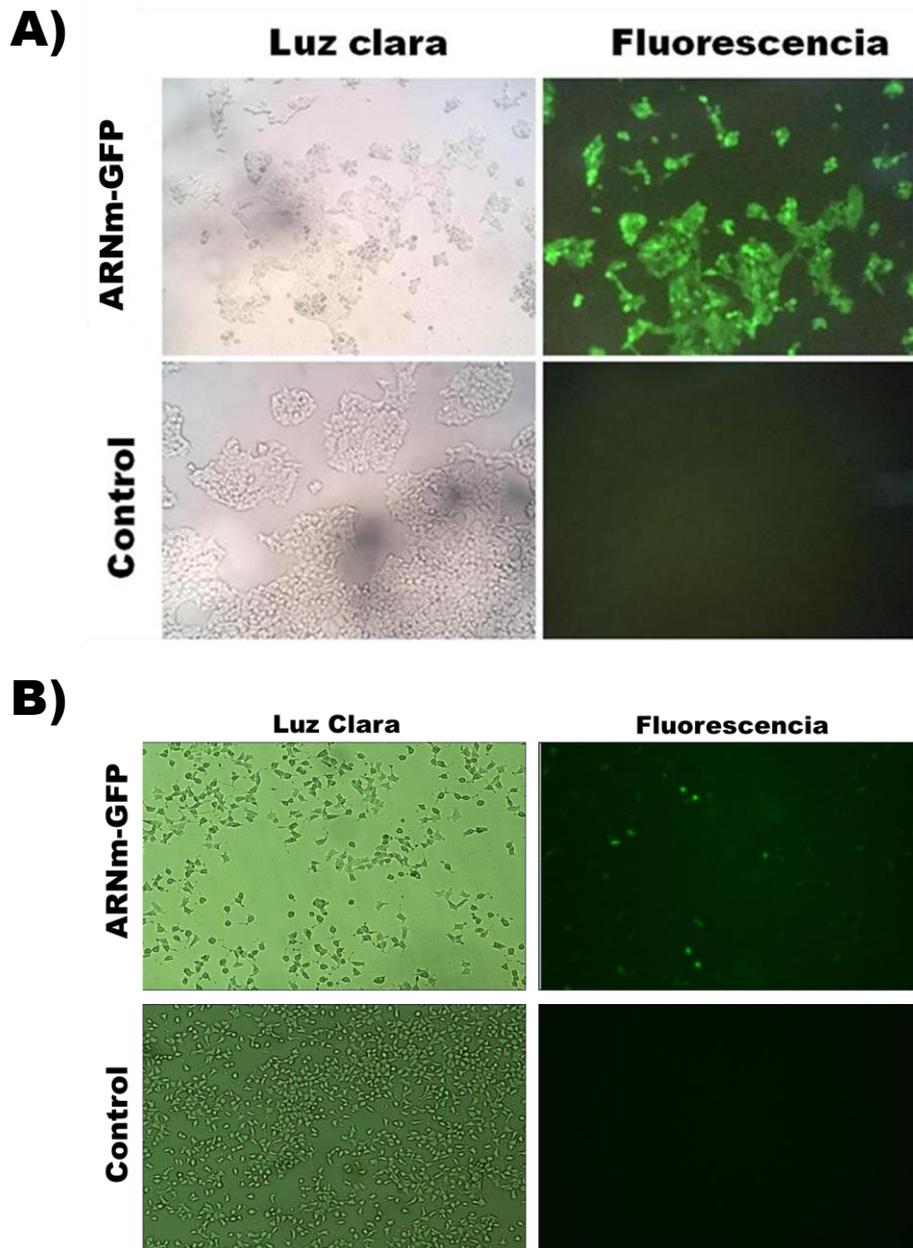


Figura 11. ARNm-GFP sintéticos transcriptos *in vitro* fueron lipofectados en las líneas celulares HEK293T **(A)** y MIN6 **(B)**. Se obtuvo una eficiencia de lipofección del 100% para las HEK293T y un 80% para las MIN6. (Magnificación original 100x).



Prueba de especificidad de los ARN interruptores sintéticos

Para comprobar que la expresión de la proteína codificada en los ARN interruptores sintéticos depende de la presencia/ausencia del microARN endógeno de interés, se realizó una prueba de especificidad incluyendo el uso de un inhibidor. Para ello un primer grupo de células HeLa fue lipofectado con el ARN interruptor miR-Let7a-BFP, y un segundo grupo fue lipofectado con el ARN interruptor miR-Let7a-BFP más un inhibidor sintético del miR-Let7a endógeno.

Se observó que en el grupo sin inhibidor (Figura 12, panel superior); las células expresaban la proteína GFP pero no la proteína BFP. Estos resultados indican que la lipofección fue exitosa (células GFP+) y que la ausencia de expresión de BFP se debe a la degradación del ARN interruptor sintético por la presencia del miR-Let7a endógeno. Por el contrario, al agregar el inhibidor del miR-Let7a endógeno, la proteína BFP codificada en el ARN interruptor sintético se expresa al no ser degradada por el complejo RISC (Figura 12, panel inferior). Cabe destacar que al obtener un porcentaje moderado de eficiencia de transfección con liposomas en la línea celular HeLa (50-60%) se discontinuó su utilización.

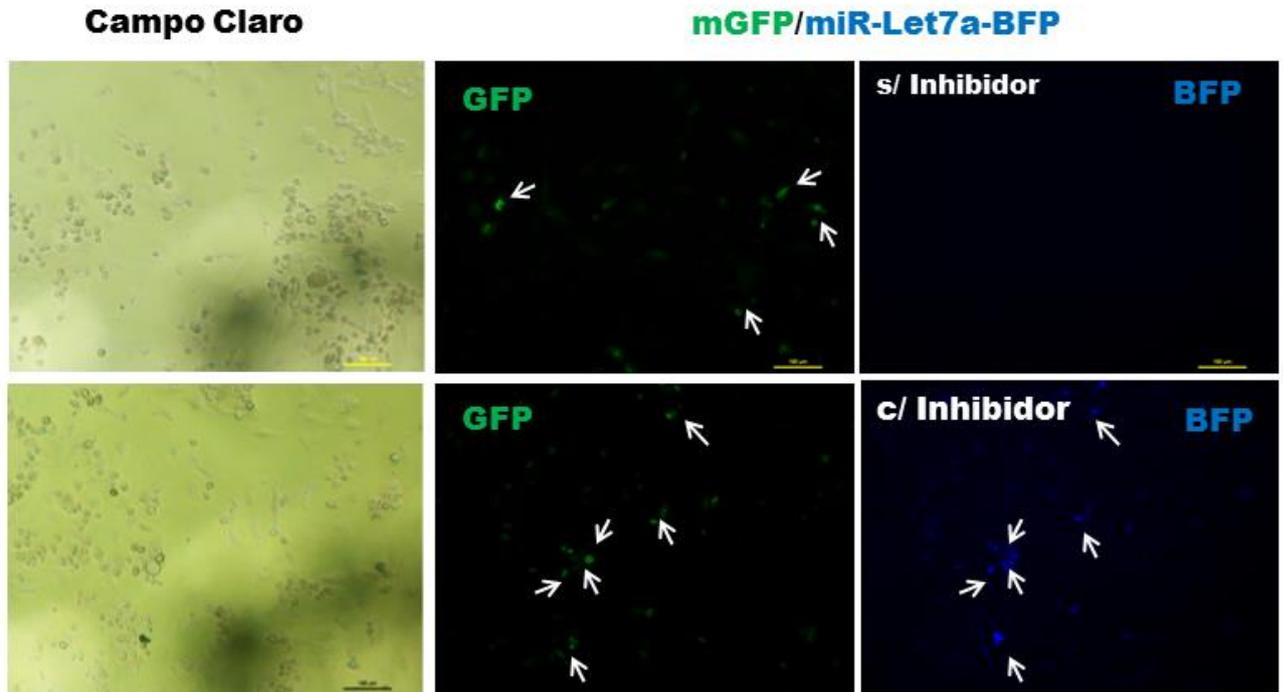


Figura 12. Ensayo de especificidad de los ARN sintéticos. Se lipofectaron dos grupos de células HeLa, uno con el ARN sintético miR-Let7a-BFP (panel superior) y un segundo grupo con el ARN interruptor miR-Let7a-BFP más un inhibidor del miR-Let7a endógeno (panel inferior). En ambos casos, se realizaron co-lipofecciones con el ARNm-GFP como control del procedimiento. Se observó la presencia de la proteína BFP sólo en el grupo con el inhibidor, indicando la especificidad microARN-dependiente del sistema. Las flechas blancas demuestran la co-localización de las señales verde-azul.

Curvas de tolerancia al ARN interruptor miR-Let7a-BIM en HEK293T y MIN6

Como las líneas celulares utilizadas, HEK293T y MIN6 tienen diferentes niveles de expresión del miR-Let7a endógeno, deberían tener también diferentes comportamientos frente al ARN interruptor sintético miR-Let7a-BIM. Para comprobarlo se realizaron curvas de concentraciones y los resultados del efecto de la proteína BIM fueron analizados por la técnica de TUNEL.

Se observó en ambos grupos que el número de células en apoptosis aumentaba conforme se incrementaba la concentración del ARN interruptor, siendo menos tolerante la línea HEK293T y más tolerante la línea MIN6 (Figura 13).

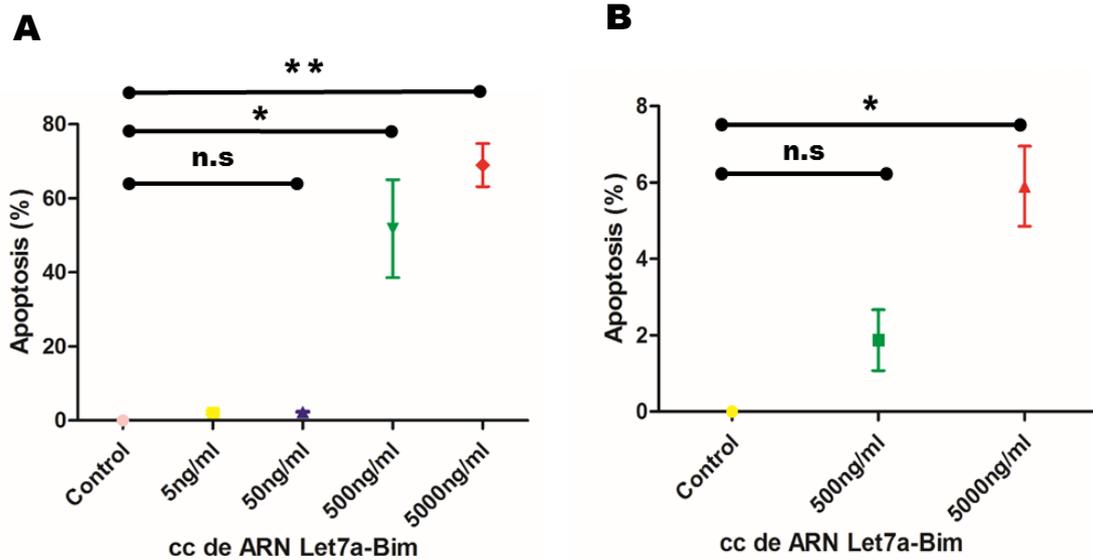


Figura 13. Curvas de tolerancia al ARN interruptor miR-Let7a-BIM en células HEK293T (A) y en células MIN6 (B). La visualización de células apoptóticas se realizó por medio del ensayo de TUNEL. Puede notarse un alto nivel de apoptosis en las HEK293T (TUNEL+) y menor porcentaje en las células MIN6 resultado que implica una mayor tolerancia al ARN interruptor miR-Let7a-BIM. ANOVA; test de Tukey; ($p < 0,05$).

Asimismo, en la Figura 14 y 15 se observan las imágenes representativas de los resultados del ensayo de TUNEL para las células HEK293 y MIN6 respectivamente, tratadas con diferentes concentraciones del ARN interruptor miR-Let7a-BIM.

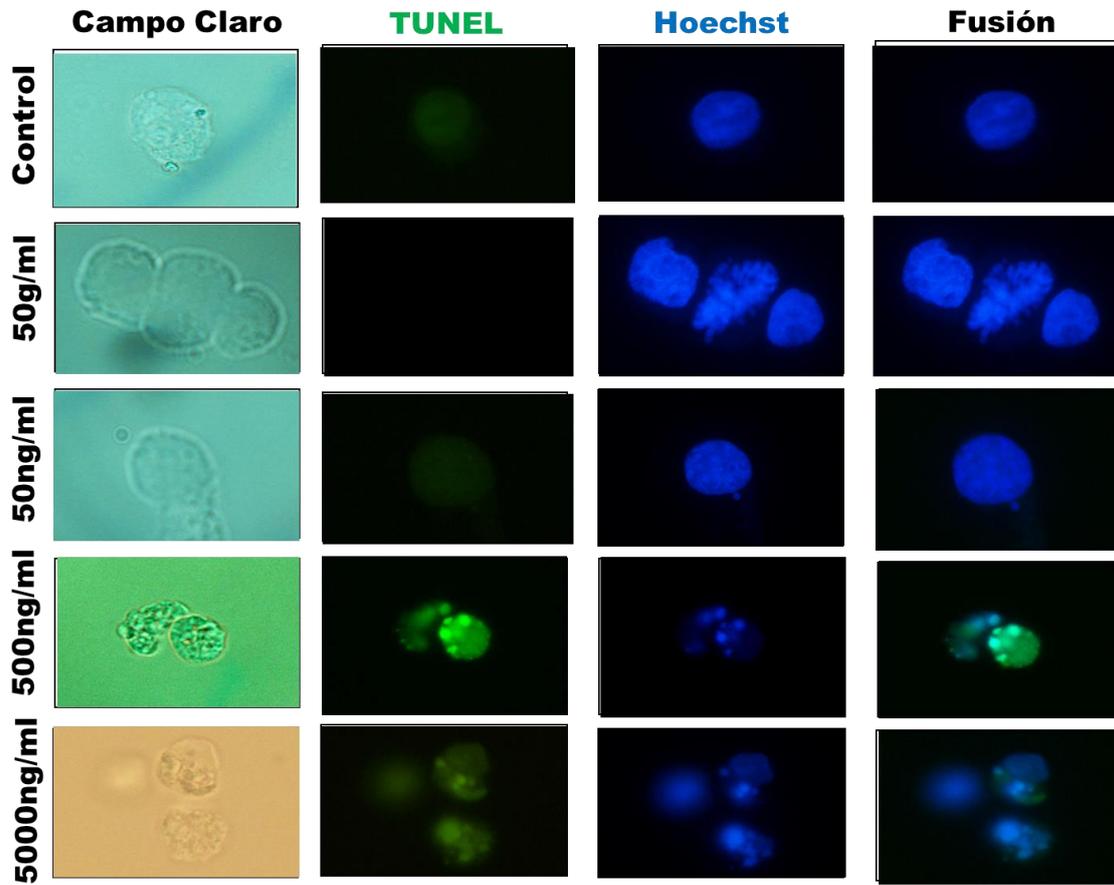


Figura 14. Ensayo de TUNEL en células HEK293 tratadas con diferentes concentraciones del ARN interruptor miR-Let7a-BIM. (Magnificación original 400x).

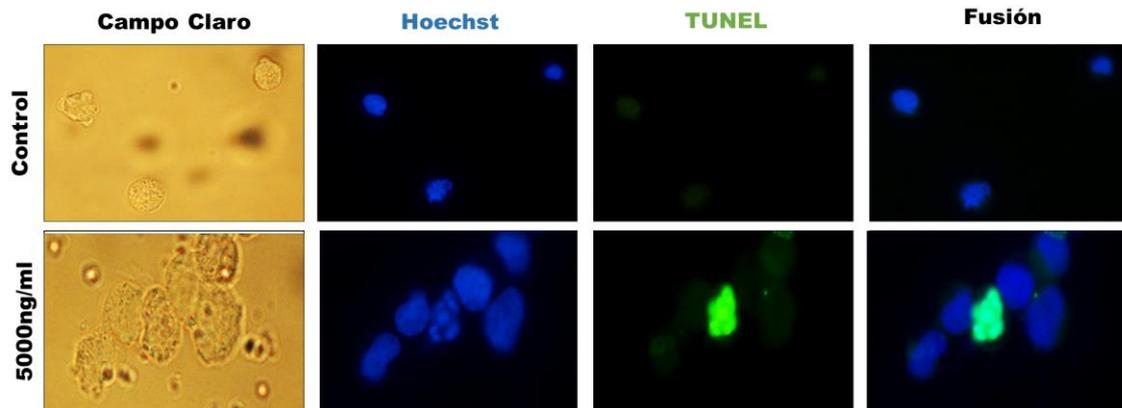


Figura 15. Ensayo de TUNEL en células MIN6 tratadas con diferentes concentraciones del ARN interruptor miR-Let7a-BIM. (Magnificación original 400x).

Estos resultados confirman experimentalmente una apoptosis selectiva por una diferencia en la tolerancia al ARN interruptor sintético, debido al nivel diferencial de expresión para el miR-Let7a endógeno en cada línea celular. Asimismo, estas diferencias confirmadas experimentalmente permitieron utilizar estas poblaciones en un modelo de purificación celular *in vitro*.

Modelo de simulación in vitro de purificación celular con HEK293T y MIN6

Para mimetizar un escenario de purificación celular durante un protocolo de reprogramación, diseñamos un modelo de simulación *in vitro*, donde utilizando un co-cultivo de células HEK293T y MIN6, probamos la eficiencia de purificación del ARN interruptor sintético miR-Let7a-BIM.

En una primera prueba, se lipofectó sólo la línea celular HEK293T con el ARN sintético miR-375-BFP y se realizó un ensayo de TUNEL para observar si el protocolo de TUNEL no dañaba la expresión de la proteína BFP (Figura 16). Observamos que las células HEK293T en apoptosis eran fácilmente distinguibles por su color verde y que la señal de la proteína BFP se conservaba.

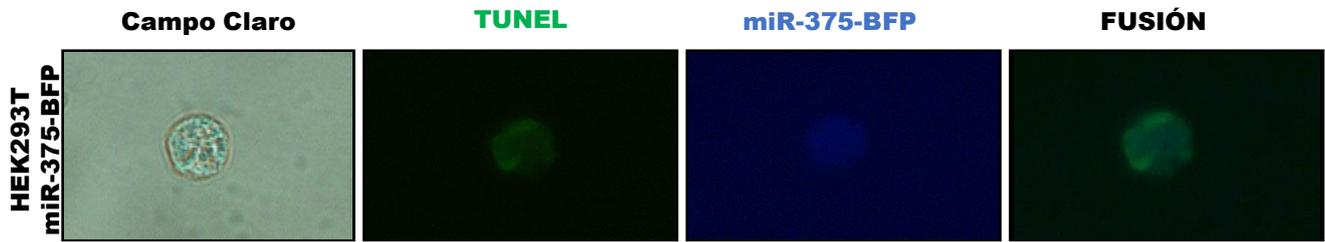


Figura 16: Ensayo de TUNEL en células HEK293T tratadas con el ARN sintético miR-375-BFP. La señal de la proteína BFP se mantiene luego del procedimiento para la detección de células apoptóticas. (Magnificación original 400x).

Para el modelo de simulación *in vitro* se realizó un co-cultivo de células HEK293T y MIN6 en cantidades iguales que fueron lipofectadas con los ARN sintéticos miR-Let7a-BIM y el ARN miR-375-BFP, en el grupo tratado y solo el ARN miR-375-BFP en el grupo control. A las 18-20 hs se realizó la cuantificación de células las células apoptóticas por TUNEL. En el análisis se determinaron el número de células BFP+ TUNEL+ (células HEK293T apoptóticas) y aquellas que eran BFP- TUNEL+ (células MIN6 apoptóticas) sobre el total de células en cada campo.

Como resultado se observó que en las células tratada, el porcentaje de células HEK293T fue del 85% (células BFP+ TUNEL+) y por el contrario solo se contabilizó un 9% de células MIN6 apoptóticas (células BFP- TUNEL+) (Figura 17). En cambio en el control sólo el 5% de las células registradas se detectaron como apoptóticas.

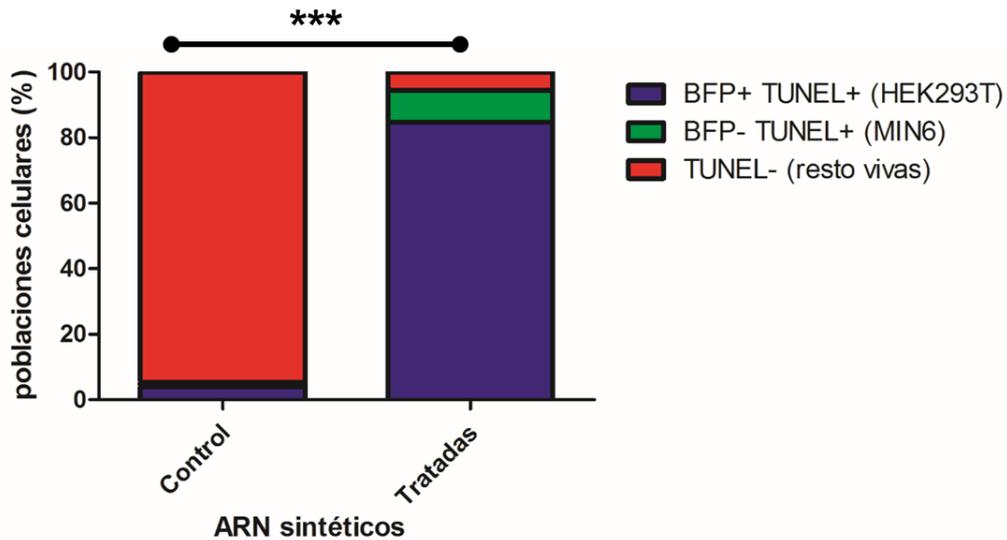


Figura 17: Ensayo de purificación celular en una población heterogénea mediante la aplicación del ARN interruptor sintético miR-Let7a-BIM. Visualización de células apoptóticas por TUNEL. Se obtuvo un 85% de muerte celular en células HEK293T (BFP+ TUNEL+) contra sólo un 9% de células MIN6 (BFP- TUNEL+). Chi-cuadrado; ($p < 0,05$).

En la Figura 18, se observan imágenes representativas del ensayo de TUNEL en el co-cultivo de células HEK293T y MIN6 tratadas con el ARN interruptor sintético miR-Let7a-BIM y el ARN sintético miR-375-BFP

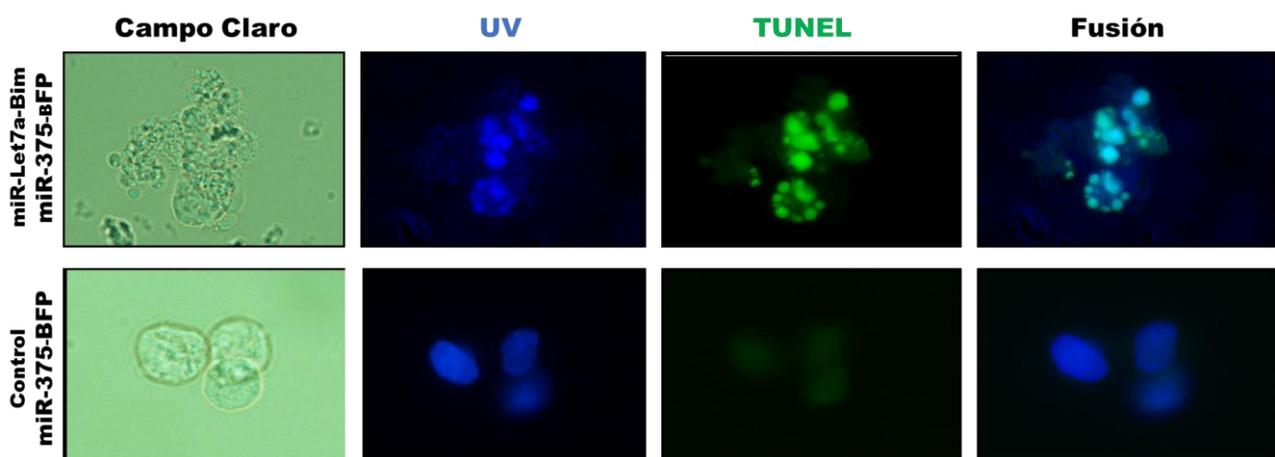


Figura 18: Ensayo de TUNEL en el co-cultivo de células HEK293T y MIN6 luego del tratamiento del ARN interruptor sintético miR-Let7a-BIM. En el panel superior podemos observar 4 células, de las cuales 3 son BFP+ TUNEL+



(HEK293T apoptóticas) y una de ellas es BFP- TUNEL- (MIN6 viva). En el panel inferior se observan 3 células BFP+ TUNEL- (HEK293T vivas). (Magnificación original 100x).

DISCUSIÓN

Mediante el uso de herramientas de la biología sintética se logró identificar diferentes poblaciones celulares utilizando ARN interruptores sintéticos basados en la expresión diferencial de microARN endógenos. Asimismo, durante distintos ensayos se comprobó que los microARN interruptores sintéticos pueden usarse para separar células en base a la expresión diferencial del miR-Let7a, un microARN relacionado con el desarrollo pancreático.

Cabe destacar que el concepto del uso de los microARN endógenos para regular la expresión tejido-específico de distintos genes exógenos, fue inicialmente diseñado con vectores virales o plásmidos (revisado en: (Geisler Y Fechner, 2016)). Sin embargo al tratarse de vectores de ADN tienen entre otros, el potencial riesgo de integrarse al genoma como así también posibles impedimentos asociados a las barreras regulatorias a la hora de su traslación a la clínica. Es por ello que si bien la manipulación de ARN en los laboratorios consume tiempo y recursos, las ventajas desde el punto de vista traslacional ameritan su uso (Warren y cols., 2010). En esta línea el grupo de Miki y colaboradores (2015), demostró que la duración de los ARN interruptores sintéticos dentro de las células no supera las 48 hs y luego de ese tiempo no se hallan rastros de su presencia ni de potenciales efectos en la expresión génica global.

La transcripción *in vitro* (IVT) es un procedimiento simple que permite la síntesis directa de ARN a partir de un molde de ADN de tamaño variado que se basa en la ingeniería del templado. Sin embargo, para la síntesis de los ARN



sintéticos diversos protocolos se han enfocado para modificar los ARN optimizando su rendimiento, vida media dentro de las células e inmunogenicidad (Warren y col., 2010); (Beckert Y Masquida, 2011). Uno de los puntos a destacar en la estrategia usada en esta tesina fue el agregado de la cola de poliA a los templados por medio de PCR. Si bien este procedimiento agrega un paso extra al protocolo, el agregado de la cola de poliA en otros protocolos está relacionado con complicaciones técnicas difíciles de superar (Endo y col., 2016) o con la compra de kits específicos como Poly(a) tailing kit (Ambion, Invitrogen)

Al igual que en otros trabajos (Warren y col., 2010; Miki y col., 2015; Endo y col., 2016) otra de las modificaciones que también se incluyeron en el diseño de los ARN durante esta tesina, fue el agregado de la caperuza. El Anti-Reverse Cap Analog (ARCA) es un análogo de caperuza usado durante la transcripción *in vitro* para la generación de transcritos capeados. Tiene modificaciones químicas para asegurar su incorporación en una sola orientación y reemplaza el grupo oxidrilo-OH- en el 3' (muy cercano a la 7-metil-guanosina) por -OCH₃. Con esta modificación, la ARN polimerasa solo puede iniciar la transcripción con el grupo hidroxilo remanente forzando la incorporación del ARCA y de esa manera se asegura que el 100% de los transcritos sintetizados están capeados para poder ser traducidos sin problemas (Stepinski y col., 2001). El agregado de análogos de la caperuza 7-metilguanósina, protege al transcritos contra la degradación de las exonucleasas presentes y asegura una traducción eficiente del mensajero. Por otro lado, en los ARN obtenidos en este trabajo se empleó un tratamiento con fosfatasa alcalina luego de la transcripción *in vitro*, ya que este tratamiento fue reportado como un aportante de estabilidad a la molécula de ARN, minimizando el riesgo de inmunogenicidad (Warren y col., 2010; Kormann y col., 2011; Zangi y col., 2013). En resumen, trabajar con ARN modificados permite ARN sintéticos más estables y por lo tanto permite vislumbrar mejores resultados en los modelos *in vitro*.



La transfección con liposomas resultó ser un método eficiente para la incorporación de los ARN sintéticos dentro de las células, demostrando ser versátiles para las distintas líneas celulares utilizadas. Durante el desarrollo de esta tesina se obtuvo entre un 80 y un 100% de eficiencia de lipofección en las líneas celulares HEK293T y en MIN6 cuando usamos el ARNm-GFP. Sin embargo cuando se utilizó la línea celular HeLa con el ARN interruptor sintético que codifica para la proteína BFP, los porcentajes de eficiencia de lipofección fueron menores. Esto demuestra que si bien en estos ensayos el uso de liposomas fue eficiente, podría ser un problema si se quiere trabajar con otras líneas celulares o con cultivos celulares primarios, como fue anteriormente reportado (Miki y col., 2015). Es por ello que cada sistema de transfección/transducción, tendrá que ponerse a punto según las líneas celulares o modelos elegidos por cada trabajo.

Para demostrar la especificidad y la eficiencia de los ARNs interruptores sintéticos se diseñó un ensayo con células HeLa utilizando el ARN interruptor miR-let7a-BFP. Cuando se lipofectaron las células con este ARN interruptor, no se observó la expresión de la proteína BFP codificada. Sin embargo cuando se agregó el inhibidor del miR-Let7a endógeno, se observó la expresión de BFP en el cultivo celular. La presencia del miR-Let7a endógeno en las células HeLa fue ampliamente reportada en varios trabajos (Zhou, 2009). Asimismo en un ensayo realizado por nuestro grupo en la universidad de California-San Diego, pudimos demostrar por citometría de flujo que la expresión de la proteína BFP es inhibida en el 97.9% de las células HeLa con esta construcción, mientras que con el agregado del inhibidor la expresión se registró en el 67% de las células (datos no mostrados). Otros reportes indican también el elevado grado de especificidad y eficiencia del sistema de ARN interruptores, conferido por la secuencia del microARN utilizada en la construcción; que dependiendo del tipo celular utilizado y el miARN blanco varía del 99 al 99.7%. En su conjunto estos resultados demuestran la alta especificidad y eficiencia de los ARN



interruptores sintéticos para bloquear la expresión de un gen exógeno dependiendo específicamente de la presencia del miARN endógeno blanco.

En una publicación reciente de Endo y colaboradores (2016) reportaron que cada tipo celular tiene un contenido diferencial de microARN y este diferencial hace que los ARN interruptores actúen con diferentes eficiencias según los diferentes tipos celulares en donde se los emplee. Aprovechando este reporte en esta tesina se diseñó un ensayo donde se probó el ARN interruptor miR-Let7a-BIM en células HEK293T y células MIN6. En ambas líneas celulares fue reportado la presencia del miR-Let7a (Tian y col., 2012; Filios Y Shalev, 2015), siendo en MIN6 uno de los microARN más abundantes (Filios Y Shalev, 2015). Nuestros resultados confirman estos reportes previos cuando observamos que a partir del uso de 500 ng/ml casi un 50% de las células HEK293 sufren apoptosis, mientras que con la misma concentración solo un 2% de las células MIN6 son TUNEL positivas. Nuestros resultados en concordancia con los resultados de Endo y colaboradores (2016), indican que según el contenido endógeno de cada microARN blanco es necesario usar una concentración determinada de los ARN interruptores sintéticos. Cabe destacar que si bien específicamente en este ensayo no se pudo emplear inhibidores del microARN endógeno (por no disponer del recurso), los ensayos realizados por Endo y colaboradores (2016), confirman que el diferencial de tolerancia al BIM es debido al diferencial en el contenido de los microARN endógenos y no a la tolerancia intrínseca a la proteína BIM de cada tipo celular (Sionov y col., 2015).

Una de las formas de abordaje, frente al desafío del desarrollo de terapias celulares en Diabetes Tipo 1, es la reprogramación celular. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, luego de un protocolo de reprogramación celular no todas las células alcanzan un fenotipo maduro (Pereyra-Bonnet y col., 2014; Otonkoski, 2016), por lo que la obtención de poblaciones celulares puras representa una necesidad pensando en futuras



terapias celulares. Para ello se diseñó y realizó un modelo *in vitro* de simulación donde co-cultivamos células MIN6 que son miR-Let7a y miR-375 positivas y células HEK293T que contienen el miR-Let7a a nivel basal. En este modelo *in vitro* las células MIN6 mimetizan a células tipo- β pancreáticas productoras de insulina (miR-375+ y miR-Let7a+, (Ishihara y col., 1993)) obtenidas luego de un protocolo de reprogramación celular. Mientras que las células HEK293T representan a las células refractarias a la reprogramación o con un menor grado de diferenciación. Como resultado tanto el ARN interruptor miR-375-BFP como el microARN-Let7a-BIM se expresaron en las células HEK293 marcándolas de azul e induciéndolas hacia la apoptosis con una eficiencia del 85%. De esta manera fue posible eliminar las células de fenotipo no deseado (HEK293T) y enriquecer el cultivo con las células blanco (MIN6). Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros grupos que lograron separar diferentes poblaciones celulares usando los microARN interruptores sintéticos con blanco en los miR endógenos miR-1, miR28a y miR499a en cardiomiocitos (Miki y col., 2015); miR-375 en células productoras de insulina (Miki y col., 2015) y miR-302 para eliminar células pluripotenciales sin diferenciar (Parr y col., 2016). En estos reportes se obtuvieron porcentajes de purificación celular similares a los obtenidos en esta tesis (del 80 al 99%). Asimismo, cabe destacar que en el trabajo de Miki y colaboradores (Miki y col., 2015) purificaron células reprogramadas productoras de insulina utilizando como blanco el miR-375. Sin embargo, usar en conjunto el miR-375 y el miR-Let7a como diana para los interruptores, permite vislumbrar mayor versatilidad para usar esta técnica en escenarios donde se necesiten más de un microARN como blanco para la separación (por ejemplo en poblaciones celulares con un perfil de expresión génica similar, en escenarios de purificación de células pancreáticas). En conjunto estos resultados ponen en evidencia el gran potencial de los ARN interruptores sintéticos para identificar y separar poblaciones celulares.



Un Resultado inesperado en el trabajo fue el alto porcentaje de células TUNEL positiva hallados en el grupo tratado con los el ARN interruptor miR-Let7a-BIM como el miR-375-BFP. Sin embargo, cabe resaltar que estás células apoptóticas fueron, en su mayoría, positivas para BFP, indicando que se trataban en efecto de células HEK293T y no de MIN6. Una posible explicación sobre este elevado porcentaje de células HEK293T apoptóticas podría deberse a que los preparados se analizaron sobre frotis y no representaron la composición de la población original. Para descartar cualquier posible falsa interpretación positiva, se están realizando nuevos ensayos para presentar al momento de la defensa de esta tesina.

Por último, si bien en la presente tesis sólo se trabajó sobre estrategias para identificación y separación celular, los ARN interruptores sintéticos pueden usarse para expresar dentro de las células genes exógenos en forma diferencial y para detectar la presencia o ausencia de microARN endógenos en diferentes estirpes celulares, entre otros.



CONCLUSIONES

El diseño y síntesis de los ARN sintéticos mostraron ser correctos.

Los ARN sintéticos sintetizados *in vitro* mostraron ser funcionales y estables.

El uso de las modificaciones para la transcripción *in vitro* aseguró la correcta traducción de los ARN sintéticos y las proteínas codificadas demostraron ser funcionales.

Los transfección con liposomas fue un método sencillo y efectivo de incorporación del material genético a las células HEK293T y MIN6.

Los ARN interruptores sintéticos fueron específicos para los microARN endógenos de interés. Las poblaciones celulares utilizadas pueden ser segregadas por sus diferencias de expresión para el miR-Let7a y la tolerancia frente al ARN interruptor miR-Let7a-BIM.

El ensayo de TUNEL propuesto permitió la visualización de células apoptóticas.

El modelo de simulación *in vitro* para purificar células insulina positivas (*INS+*) de una población heterogénea representó de manera eficiente la realidad y demostró ser comparable al descrito por Miki y colaboradores (2015).

Los ARN interruptores sintéticos pueden usarse para detectar e identificar poblaciones de células con expresión de miR-Let7a endógeno, como así también para purificar poblaciones celulares que expresan el miR-Let7a sin el uso de un citómetro de flujo acoplado a un separador celular.



PERSPECTIVAS

- ✓ Probar los ARN interruptores sintéticos en otras poblaciones y para otros microARN de interés.
- ✓ Utilizar los ARN interruptores sintéticos en islotes aislados de páncreas de donantes cadavéricos para el aislamiento de células β .
- ✓ Optimizar la técnica de IVT para obtener mejores resultados en cuanto a rendimientos totales.
- ✓ Desarrollar nuevos ARN interruptores sintéticos con varios microARN de interés en tándem para lograr separar poblaciones con un perfil de expresión génica similar, como las células α y β pancreáticas.
- ✓ Optimizar el uso del Citómetro de Flujo del laboratorio para una aproximación más exacta en los ensayos de purificación de células lipofectadas para permitir la selección con BIM de un tipo celular en una población.
- ✓ Acoplar al sistema nuevas proteínas para conferir nuevas funciones al ARN interruptor.
- ✓ Desarrollar una estrategia combinada de ARN interruptor sintético acoplado al sistema de edición CRISPR-ON/OFF



BIBLIOGRAFÍA

- Banerjee, M., YOtonkoski, T. (2009). A simple two-step protocol for the purification of human pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 52(4), 621-625.
- Beckert, B., YMasquida, B. (2011). Synthesis of RNA by in vitro transcription. *Methods Mol Biol*, 703, 29-41.
- Chendrimada, T. P.y cols. . (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051), 740-744.
- Dubois, N. C.y cols. . (2011). SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 29(11), 1011-1018.
- Endo, K., Hayashi, K., YSaito, H. (2016). High-resolution Identification and Separation of Living Cell Types by Multiple microRNA-responsive Synthetic mRNAs. *Sci Rep*, 6, 21991.
- Filius, S. R., YShalev, A. (2015). beta-Cell MicroRNAs: Small but Powerful. *Diabetes*, 64(11), 3631-3644.
- Frost, R. J., YOlson, E. N. (2011). Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(52), 21075-21080.
- Geisler, A., YFechner, H. (2016). MicroRNA-regulated viral vectors for gene therapy. *World J Exp Med*, 6(2), 37-54.
- Gimenez, C. A.y cols. . (2016). CRISPR-on system for the activation of the endogenous human INS gene. *Gene Ther*, 23(6), 543-547.
- Ishihara, H.y cols. . (1993). Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia*, 36(11), 1139-1145.
- Joglekar, M. V., Joglekar, V. M., YHardikar, A. A. (2009). Expression of islet-specific microRNAs during human pancreatic development. *Gene Expr Patterns*, 9(2), 109-113.



- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(5), 376-385.
- Klein, D.y cols. . (2013). MicroRNA expression in alpha and beta cells of human pancreatic islets. *PLoS One*, 8(1), e55064.
- Kormann, M. S.y cols. . (2011). Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol*, 29(2), 154-157.
- Kyrylkova, K.y cols. . (2012). Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol*, 887, 41-47.
- Lagos-Quintana, M.y cols. . (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853-858.
- Latreille, M.y cols. . (2015). miR-375 gene dosage in pancreatic beta-cells: implications for regulation of beta-cell mass and biomarker development. *J Mol Med (Berl)*, 93(10), 1159-1169.
- Lee, R. C. (1993). The C. elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to H-14. *Cell Press, Vol. 75*, 843-854, .
- Lee, Y.y cols. . (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415-419.
- Li, X. (2014). MiR-375, a microRNA related to diabetes. *Gene*, 533(1), 1-4.
- Liu, J.y cols. . (2005). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol*, 7(12), 1261-1266.
- Lukowiak, B.y cols. . (2001). Identification and purification of functional human beta-cells by a new specific zinc-fluorescent probe. *J Histochem Cytochem*, 49(4), 519-528.
- Matthew N. Poy, L. E., Jan Krutzfeldt, Satoru Kuwajima, Xiaosong Ma, Patrick E. MacDonald, Sébastien Pfeffer, Thomas Tuschl, Nikolaus Rajewsky, Patrik Rorsman y Markus Stoffel. (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *NATURE*, 432.



- Miki, K.y cols. . (2015). Efficient Detection and Purification of Cell Populations Using Synthetic MicroRNA Switches. *Cell Stem Cell*, 16(6), 699-711.
- Nathan, G.y cols. . (2015). MiR-375 promotes redifferentiation of adult human beta cells expanded in vitro. *PLoS One*, 10(4), e0122108.
- Olvera-Granados, C. P. L.-A., G. E.; Hernández-Montiel H.L. (2008). Pancreas and β cells: Differentiation mechanisms, morphogenesis and endocrine cellular specification. Regeneration? *Bol Med Hosp Infant Mex*, Vol. 65, 306-324.
- Otonkoski, T. (2016). New tools for experimental diabetes research: Cellular reprogramming and genome editing. *Ups J Med Sci*, 121(2), 146-150.
- Parr, C. J.y cols. . (2016). MicroRNA-302 switch to identify and eliminate undifferentiated human pluripotent stem cells. *Sci Rep*, 6, 32532.
- Pereyra-Bonnet, F.y cols. . (2014). Skin fibroblasts from patients with type 1 diabetes (T1D) can be chemically transdifferentiated into insulin-expressing clusters: a transgene-free approach. *PLoS One*, 9(6), e100369.
- Poy, M. N.y cols. . (2009). miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(14), 5813-5818.
- Roberts, T. C. (2015). The microRNA Machinery. *Adv Exp Med Biol*, 887, 15-30.
- Roush, S., YSlack, F. J. (2008). The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol*, 18(10), 505-516.
- Rui Yi, Y. Q., Ian G. Macara, and Bryan R. Cullen. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 17(24), 3011–3016.
- Shapiro, A. M., Pokrywczynska, M., YRicordi, C. (2017). Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol*, 13(5), 268-277.
- Sionov, R. V., Vlahopoulos, S. A., YGranot, Z. (2015). Regulation of Bim in Health and Disease. *Oncotarget*, 6(27), 23058-23134.



- Stepinski, J.y cols. . (2001). Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG. *RNA*, 7(10), 1486-1495.
- Tang, X., Tang, G., YOzcan, S. (2008). Role of microRNAs in diabetes. *Biochim Biophys Acta*, 1779(11), 697-701.
- Tian, W.y cols. . (2012). High-throughput functional microRNAs profiling by recombinant AAV-based microRNA sensor arrays. *PLoS One*, 7(1), e29551.
- van Dijk, P. R.y cols. . (2014). Intraperitoneal insulin infusion: treatment option for type 1 diabetes resulting in beneficial endocrine effects beyond glycaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 81(4), 488-497.
- Warren, L.y cols. . (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7(5), 618-630.
- Weir, G. C., Bonner-Weir, S., YLeahy, J. L. (1990). Islet mass and function in diabetes and transplantation. *Diabetes*, 39(4), 401-405.
- Zangi, L.y cols. . (2013). Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nat Biotechnol*, 31(10), 898-907.
- Zhou, J.-Y. M., W-L.; Liang, S.; Zeng, Y.; Shi, R.; Yu, H-L.; Xiao W-W.; & Zheng W-L. (2009). Analysis of microRNA expression profiles during the cell cycle in synchronized HeLa cells. *BMB reports*, 42 (9), 593-598.
- Zhu, H.y cols. . (2011). The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell*, 147(1), 81-94.



ANEXOS

Anexo 1: Materiales y Metodos

Diseño y síntesis de los ARN sintéticos.

1) Secuencia de los gBlocks diseñados.

miR-SP6-Let7a-Bim-switch

GCATTTAGGTGACACTATAGAATCCTTAATCGCGGATCCAACCTATAACAACCTACTACCTCAAGA
 TCACACCGGTGCGCCACCATGGCCAAGCAACCTTCTGATGTAAGTTCTGAGTGTGACAGAGAAGG
 TGGACAATTGCAGCCTGCTGAGAGGCCTCCCCAGCTCAGGCCTGGGGCCCCTACCTCCCTACAG
 ACAGAACCGCAAGGTAATCCCGACGGCGAAGGGGACCGCTGCCCCACGGCAGCCCTCAGGGCC
 CGCTGGCCCCACCGCCAGCCCTGGCCCTTTTGTCTACCAGATCCCCACTTTTCATCTTTGTGAG
 AAGATCTTCTCTGCTGTCCCGTCTCCAGTGGGTATTTCTCTTTTGACACAGACAGGAGCCCG
 GCACCCATGAGTTGTGACAAGTCAACACAAACCCCAAGTCTCCTTGCCAGGCCTTCAACCACT
 ATCTCAGTGCAATGGCTTCCATACGACAGTCTCAGGAGGAACCTGAAGATCTGCGCCCGGAGAT
 ACGGATTGCACAGGAGCTGCGGCGGATCGGAGACGAGTCAACGAAACTTACACAAGGAGGGTG
 TTTGCAAATGATTACCGCGAGGCTGAAGACCACCCTCAAATGGTTATCTTACAACCTGTTACGCT
 TTATCTTCCGTCTGGTATGGAGAAGGCATTGAACCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCC
 CTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAAAAAAAA
 AA
 AA

SP6-EGFP-switch

GCATTTAGGTGACACTATAGGTGCAATTAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACA
 CCGGTCGCCACCATGGGATCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCC
 TGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGA
 TGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGG
 CCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGA
 AGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTT
 CAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC
 CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGT
 ACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAA



CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC
 ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC
 TGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGG
 GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGAGATCTCATATGCATCTCGAGTGATAGTCTAGA
 CCTTCTGCGGGGCTTGCCCTTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGT
 CTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAA
 AA
 AAAAAAAAAAAAAA

Sp6-miR-Let7a-Switch-BFP

GCATTTAGGTGACACTATAGAATCCTTAATCGCGGATCCAACATAACAACCTACTACCTCAAGA
 TCACACCGGTGCGCACCATGGGATCCAGCGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTA
 CATGGAGGGCACCGTGGACAACCATCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTAC
 GAGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGTGGTCGAGGGCGGCCCTCTCCCCTTCGCCTTCGACA
 TCCTGGCTACTAGCTTCTCTACGGCAGCAAGACCTTCATCAACCACACCCAGGGCATCCCCGA
 CTTCTTCAAGCAGTCCTTCCCTGAGGGCTTCACATGGGAGAGAGTCACCACATACGAAGACGGG
 GCGTGTGACCGCTACCCAGGACACCAGCCTCCAGGACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGA
 TCAGAGGGGTGAACTTCACATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGGAGGC
 CTTACCCGAGACGCTGTACCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAAACGACATGGCCCTGAAG
 CTCGTGGGCGGGAGCCATCTGATCGAAACATCAAGACCACATATAGATCCAAGAAACCCGCTA
 AGAACCTCAAGATGCCTGGCGTCTACTATGTGGACTACAGACTGGAAAGAATCAAGGAGGCCAA
 CAACGAGACCTACGTCGAGCAGCACGAGGTGGCAGTGGCCAGATACTGCGACCTCCCTAGCAA
 CTGGGGCACAGATCTCATATGCATCTCGAGTGATAGTCTAGACCTTCTGCGGGGCTTGCCCTTCT
 GGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGG
 AA
 AA

Sp6-miR-375-BFP

GCATTTAGGTGACACTATAGAATCCTTAATCGCGGATCCTCACGCGAGCCGAACGAACAAAAGA
 TCACACCGGTGCGCACCATGGGATCCAGCGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTA
 CATGGAGGGCACCGTGGACAACCATCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTAC
 GAGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGTGGTCGAGGGCGGCCCTCTCCCCTTCGCCTTCGACA



TCCTGGCTACTAGCTTCCTCTACGGCAGCAAGACCTTCATCAACCACACCCAGGGCATCCCCGA
CTTCTTCAAGCAGTCCTTCCCTGAGGGCTTCACATGGGAGAGAGTCACCACATACGAAGACGGG
GGCGTGCTGACCGCTACCCAGGACACCAGCCTCCAGGACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGA
TCAGAGGGGTGAACCTTCACATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGGAGGC
CTTCACCGAGACGCTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAAACGACATGGCCCTGAAG
CTCGTGGGCGGGAGCCATCTGATCGCAAACATCAAGACCACATATAGATCCAAGAAACCCGCTA
AGAACCTCAAGATGCCTGGCGTCTACTATGTGGACTACAGACTGGAAAGAATCAAGGAGGCCAA
CAACGAGACCTACGTCGAGCAGCACGAGGTGGCAGTGGCCAGATACTGCGACCTCCCTAGCAAA
CTGGGGCACAGATTCATATGCATCTCGAGTGATAGTCTAGACCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCT
GGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGG

Primers

5UTR-SP6F

GCATTTAGGTGACACTATA

3UTR-poliAR

TT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTACTCAGGCTTTATTCA

2) Ejemplo de mezcla de reacción para la PCR de los gblocks sintetizados *in vitro* usando una polimerasa de alta fidelidad y las condiciones de ciclado utilizadas.

	Mix x 1
Agua	32.5µl
Buffer 5X	10 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
Primer F (10x)	2.5 µl
Primer R (10x)	2.5 µl
Enzima (1U)	0.5 µl
Templado	1ul µl

Etapas del ciclado	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	98°C	30seg
Desnaturalización	98°C	10seg
Hibridación de cebadores	55°C	10seg
Extensión	72°C	30seg
Extensión final	72°C	5min

Anexo 2: Materiales y métodos.

Curvas de tolerancia al microARNint-Let7a-BIM en HEK293 y MIN6

- 1) nº de células apoptóticas del total de células del campo en la línea HEK293T luego del tratamiento de 4 concentraciones del ARN interruptor sintético miR-Let7a-BIM.

TRAT/Nº C.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTA L	%
CONTRO L	0/2 1 0/1 3	0/1 1 0/1 8	0/1 5 0/9	0/1 4 0/6	0/1 0 0/6	0/1 5 0/7	0/2 2 0/1 0	0/3 1 0/7	0/2 3 0/1 2	0/1 3 0/8	0/175 0/96	0 0
5NG/ML	2/2 5 1/2 0	0/2 8 0/2 2	3/1 1 1/2 5	0/2 4 0/2 6	0/2 9 0/2 4	0/2 0 1/3 0	1/2 7 0/2 2	0/1 9 1/2 1	0/2 0 0/1 9	0/2 3 0/2 1	6/226 4/230	2.65 1.73
50NG/M L	0/9 0/2 4	0/5 0/3 6	0/9 0/3 2	0/8 0/2 9	0/6 1/2 6	0/1 2 2/3 8	2/7 2/4 6	0/8 1/3 9	0/1 0 0/2 7	0/7 1/2 4	2/81 7/321	2.47 2.18
500NG/ ML	11/ 16 7/2 4	3/4 3/2 4	10/ 14 8/2 0	8/1 4 6/2 6	24/ 31 10/ 19	11/ 21 4/1 5	15/ 19 7/2 3	7/1 9 8/2 0	11/ 15 14/ 16	6/1 0 14/ 23	106/1 63 81/21 0	65.0 3 38.5 7
5000NG/ ML	10/ 25 26/ 28	9/1 7 16/ 21	15/ 29 11/ 19	19/ 23 17/ 23	12/ 16 14/ 21	8/1 0 17/ 22	4/9 14/ 19	6/8 5/9	11/ 14 16/ 21	9/1 2 9/1 1	103/1 63 145/1 94	63.1 9 74.7 4



3) ANOVA. Test de Tukey ($p < 0.05$)

P value	0,0015
P value sum	**
Are means sig	Yes
Number of gr	5
F	25,83
R squared	0,9538

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between column	8621	4	2155
Residual (within columns)	417,2	5	83,45
Total	9038	9	

Tukey's Multiple Compariso	Mean Diff.	q	nt? P < 0.05?	Summary 95% CI of diff
Control vs 5ng/ml	-2,19	0,339	No	ns}8.83 to 34.45
Control vs 50ng/ml	-2,325	0,3599	No	ns}8.97 to 34.32
Control vs 500ng/ml	-51,8	8,019	Yes	* 8.44 to -15.16
Control vs 5000ng/ml	-68,97	10,68	Yes	** 05.6 to -32.32
5ng/ml vs 50ng/ml	-0,135	0,0209	No	ns}6.78 to 36.51
5ng/ml vs 500ng/ml	-49,61	7,68	Yes	* 6.25 to -12.97
5ng/ml vs 5000ng/ml	-66,77	10,34	Yes	** 03.4 to -30.13
50ng/ml vs 500ng/ml	-49,48	7,659	Yes	* 6.12 to -12.83
50ng/ml vs 5000ng/ml	-66,64	10,32	Yes	** 03.3 to -30.00
500ng/ml vs 5000ng/ml	-17,17	2,657	No	ns}3.81 to 19.48



4) nº de células apoptóticas del total de células del campo en la línea MIN6 luego del tratamiento de 4 concentraciones del ARN interruptor sintético miR-Let7a-BIM.

TRAT/NUM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	%	
CONTROL	0/3	0/1	0/4	0/2	0/1	0/2	0/1	0/2	0/1	0/3	0/20	0
	0/5	0/7	0/6	0/7	1/7	0/5	0/7	0/6	0/11	0/9	1/70	0
500NG/ML	2/33	0/51	1/46	0/24	0/30	0/33	0/48	0/27	0/35	1/41	4/368	1.08
	0/35	2/23	1/13	1/22	1/23	0/15	0/26	0/8	0/8	0/14	5/187	2.67
5000NG/ML	3/37	5/48	2/16	1/36	1/9	1/11	0/12	2/15	1/16	0/30	16/230	6.95
	1/24	0/4	0/4	0/5	0/3	1/7	0/3	3/7	0/9	1/15	6/81	4.86

5) Salida del estadístico. ANOVA. Test de Tukey ($p < 0.05$)

One-way analysis of variance	
P value	0,0254
P value summary	*
Are means signif. different? ($P < 0.05$)	Yes
Number of groups	3
F	15,84
R squared	0,9135

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	36,42	2	18,21
Residual (within columns)	3,448	3	1,149
Total	39,87	5	

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? $P < 0.05$?	Summary	95% CI of diff
Control vs 500ng/ml	-1,875	2,473	No	ns	-6.355 to 2.605
Control vs 5000ng/ml	-5,905	7,789	Yes	*	-10.39 to -1.425
500ng/ml vs 5000ng/ml	-4,030	5,316	No	ns	-8.510 to 0.4502



Modelo de simulación in vitro de purificación celular con HEK293T y MIN6

6) Conteo del nº de células BFP+ TUNEL+ y BFP- TUNEL- del total de células del campo luego del uso del ARN interruptor sintético miR-Let7a-BIM en una población heterogénea con co-cultivo de HEK293T y MIN6

	BFP+ TUNEL+	BFP- TUNEL+	TUNEL-
CONTROL	9	3	212
MIR-LET7-BIM	227	26	15

7) Chi-cuadrado. ($p < 0.05$)

TABLE ANALYZED	DATA 3
CHI-SQUARE	
CHI-SQUARE, DF	389.8, 2
P VALUE	< 0.0001
P VALUE SUMMARY	***
ONE- OR TWO-SIDED	NA
STATISTICALLY SIGNIFICANT? (ALPHA<0.05)	YES
DATA ANALYZED	
NUMBER OF ROWS	2
NUMBER OF COLUMNS	3