



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**“ANTAGONISMO ENTRE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A RNA
MUSASHI1 Y miR-137, Y SU IMPACTO EN LA NEUROGÉNESIS Y
EL DESARROLLO DE GLIOBLASTOMA”**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
MITZLI XOCHITL VELASCO LÓPEZ**

**DIRECTOR DE TESIS
GRECO HERNÁNDEZ RAMÍREZ
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR:
DRA. XOCHITL PÉREZ MARTÍNEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR
DRA. ROCÍO ÁNGELES GARCÍA BECERRA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	1
2.1. Glioblastoma	1
2.2. Proteínas de unión a RNA (RBPs)	2
2.3. Musashi1 (MSI1).....	4
2.4. microRNAs.....	5
2.6. Interacción funcional entre RBPs y microRNAs en cáncer.....	11
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVO GENERAL	15
6. OBJETIVOS PARTICULARES	15
7. MATERIALES Y MÉTODOS	16
7.1. Cultivo celular.....	16
7.2. Cultivo de NSC.	16
7.3. Transfección con siRNAs.....	17
7.4. Transfeccion con microRNAs mimics.....	17
7.5. Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real (qRT-PCR).	18
7.6. Plásmidos.	18
7.7. Ensayos de luciferasa <i>in vitro</i>	20
7.8. Expresión y purificación de la proteína recombinante GST y GST-Msi1.	21
7.8.1. Curva de crecimiento e inducción.....	21
7.8.2. Purificación de las proteínas recombinantes	21
7.9. Transcripción <i>in vitro</i>	22
7.10. Marcaje del RNA con biotina.	22
7.11. RNA-pull down	23
7.12. Análisis de proteínas.....	24
7.13. Ensayo de proliferación celular.	25
7.14. Inmunohistoquímicas.	25
7.15. Cuantificación del crecimiento de neuritas.....	25
7.16. Conteo celular.....	25
7.17. Correlación de la expresión de Musashi1 y miR-137.	26
7.18. Identificación y comparación de los blancos de miRNA y RBP.	26

7.19.	Análisis de blancos compartidos entre miR-137 y MSI1.....	27
8.	RESULTADOS	28
8.1.	Impacto de MSI1 en neurogénesis	28
8.2.	MSI1 y miR-137 comparten blancos que están implicados en desarrollo, diferenciación y migración celular.....	32
8.3.	Impacto de MSI1 y miR-137 sobre sus blancos compartidos.	35
8.4.	Modelo antagónico RBP-miRNA y su importante alcance en neurogénesis y gliomagénesis.	39
9.	DISCUSIÓN	42
10.	CONCLUSIÓN	49
11.	FIGURAS SUPLEMENTARIAS	50
12.	REFERENCIAS	56
13.	APÉNDICE I. Publicaciones derivadas de la tesis de doctorado.	72

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 Representación esquemática del papel de las proteínas de unión a RNA en el desarrollo de glioblastoma.	3
FIGURA 2 Biogénesis de los micrnas.	6
FIGURA 3 Musashi1 comparte varios blancos con sus propios mirnas reguladores.	29
FIGURA 4 Papel de musashi1 en neurogénesis.	31
FIGURA 5 MSI1 y MIR-137 comparten blancos que participan en neurogénesis y gliomagenesis.	34
FIGURA 6 MSI1 promueve la expresión de pdgfra vía unión al 3'-utr.	36
FIGURA 7 MIR-128 y -137 reducen la expresión de pdgfra.	38
FIGURA 8 MSI1 y MIR-137 tiene efectos regulatorios opuestos sobre la expresión de sus blancos compartidos.	39
FIGURA 9 MSI1 Y MIR-137 tienen efectos opuestos sobre la proliferación y diferenciación celular.	40
FIGURA 10 Modelo de regulación antagónica entre MSI1 Y MIR-137.	41
FIGURA S 1 MSI1 Y MIR-137 TIENEN PERFILES DE EXPRESIÓN DIFERENTES EN GLIOMAS.	50
FIGURA S 2 IMPACTO DE LOS BLANCOS COMPARTIDOS ENTRE MSI1 Y MIR-137.	51
FIGURA S 3 EXPRESIÓN DE PDGFRA EN CÉLULAS MSI1-KNOCKOUT.	52
FIGURA S 4 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS GST Y GST-MSI1.	53
FIGURA S 5 CLONACIÓN DEL 3'-UTR DE PDGFRA EN EL VECTOR PTZ57R/T Y TRANSCRIPCIÓN IN VITRO.	54
FIGURA S 6 PDGFRA ES REGULADO POR MIR-128, MIR-137 Y MSI1.	54
FIGURA S 7 ANÁLISIS DE LOS BLANCOS DE MIR-137.	55

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 miRNAs sobre-expresados en glioma y su función.	8
TABLA 2 miRNAs con bajos niveles de expresión en glioma y su función.	9
TABLA 3 Oligonucleótidos utilizados para amplificar las regiones del 3'UTR de PDGFRA.	19
TABLA 4 Oligonucleótidos para PCR de mutagénesis sitio dirigida.	20

1. RESUMEN

Las proteínas de unión a RNA (por sus siglas en inglés, RBP) y los miRNA son reguladores críticos de la expresión génica que interactúan entre sí de manera cooperativa y antagonista. Identificamos a Musashi1 (MSI1) y miR-137 como reguladores de un cambio molecular entre la auto-renovación y la diferenciación. MSI1 y miR-137 tienen patrones y funciones de expresión opuestos, a su vez MSI1 está reprimido por miR-137. MSI1 es una proteína expresada en células madre implicada en la auto-renovación, mientras que miR-137 funciona como un miRNA de diferenciación pro-neuronal. En los gliomas, miR-137 funciona como un supresor tumoral, mientras que MSI1 es un factor pro-oncogénico. Sugerimos que el equilibrio entre MSI1 y miR-137 es un determinante clave en las decisiones del destino celular y la interrupción de este equilibrio podría contribuir a las enfermedades neurodegenerativas y al desarrollo de gliomas. Los análisis genómicos revelaron que MSI1 y miR-137 comparten 141 transcritos diana asociados con la diferenciación, el desarrollo y la morfogénesis. Los resultados iniciales señalaron que estos dos reguladores tienen un impacto opuesto en la expresión de sus mensajeros blanco. Por lo tanto, proponemos un modelo antagónico en el que esta red de blancos compartidos podría ser reprimida por miR-137 o activada por Msi1, lo que llevaría a diferentes resultados celulares como la auto-renovación, proliferación y tumorigénesis.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Glioblastoma

Los astrocitomas tipo IV o glioblastomas (GBM) son los tumores cerebrales primarios más comunes y agresivos, representando entre el 12-15% de los tumores intracraniales y el 60 al 75% de los tumores tipo astrocitoma. En México, constituyen cerca del 30% de los gliomas y el 9% de las neoplasias intracraneales, con supervivencia media de 16 meses¹. Aunque puede afectar a niños, en general, los GBM se observan predominantemente en pacientes mayores de 50 años y la incidencia se incrementa con la edad y es más frecuente en varones².

El GBM suele ser supratentorial, uni o bilateral y multicéntrico. Se caracteriza por la presencia de zonas necróticas, su alto grado de invasividad, rápido crecimiento y resistencia a la radiación o quimioterapia³. Las características clínicas y el pronóstico de los pacientes con glioblastoma no están totalmente reflejadas en la clasificación histológica. Actualmente, dos estudios han propuesto una nueva clasificación molecular. Con base en aberraciones cromosómicas, mutaciones y cambios en la expresión de genes como el receptor de factor de crecimiento epidermal (EGFR)/ neurofibromina 1 (NF1)/ receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo alfa (PDGFRA) y neurofilamento (NEFL)/ Subunidad alfa1 del receptor de ácido gamma-aminobutírico tipo A (GABRA1)/ Sinaptotagmina 1 (SYT1)/ Miembro 2 de la familia de transportadores de soluto 12 (SLC12A5), los GBM se clasifican en clásicos, mesenquimales, proneurales y neurales, respectivamente^{4,5}.

Debido a sus características, el pronóstico de los GBM no ha mejorado significativamente en las últimas cuatro décadas. Actualmente, el campo de investigación de los gliomas está enfocado en el desarrollo de nuevas herramientas de detección temprana, generar un pronóstico confiable, la búsqueda de biomarcadores y terapias nuevas.

Anteriormente, la mayoría de los estudios se centraban en cambios a nivel transcripcional. Sin embargo, estudios recientes demuestran que los niveles de

expresión de los transcritos no corresponden con sus niveles proteicos, lo que indica que los mecanismos post-transcripcionales, incluida la “traducción de RNA mensajeros”, juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica⁶. Estas observaciones sugieren que existen moléculas, como RNAs no codificantes (miRNAs y lncRNAs) y proteínas de unión a RNA (por sus siglas en inglés, RBPs), que regulan los niveles proteicos en la célula.

2.2. Proteínas de unión a RNA (RBPs)

Las RBPs desempeñan un papel crucial en la regulación de la expresión génica, tanto en células normales como tumorigénicas^{6,7}. Recientemente, se han utilizado métodos cuantitativos de gran escala como la secuenciación de nueva generación y espectrometría de masas para extender el catálogo de RBPs, así como el de sus co-factores y transcritos blancos. De esta manera se han logrado identificar más de 1500 RBPs en el genoma humano^{8,9}, que representan ~7.5% de los genes codificados.

Actualmente, se ha demostrado que diversas RBPs regulan estrechamente la estabilidad y traducción de grupos específicos de mRNAs que están implicados en procesos importantes, como son el ciclo celular, proliferación, apoptosis y diferenciación. Por lo tanto, el funcionamiento anormal de las RBPs puede llevar al desarrollo de diferentes patologías como cáncer¹⁰. Las RBPs forman complejos con pre-mRNAs, mRNAs y varios ncRNAs (lncRNAs, miRNAs, rRNAs, etc.), para regular un conjunto de procesos que incluyen splicing, poli-adenilación, maduración, modificación, transporte, estabilidad, localización y traducción¹¹. Estas proteínas ejercen su acción al reconocer secuencias específicas y/o estructuras secundarias presentes en las regiones no traducidas (por sus siglas en inglés, UTRs), secuencias codificantes y/o intrónicas¹².

Mutaciones y alteraciones en los niveles de expresión de varias RBPs se han observado en varios tejidos tumorales y se sabe que impactan en la expresión de un gran grupo de genes que contribuyen a la iniciación y crecimiento de los tumores

¹³⁻¹⁵, entre ellos los glioblastomas. En la Figura 1, se describen las RBPs mejor caracterizadas en el contexto de gliomas.

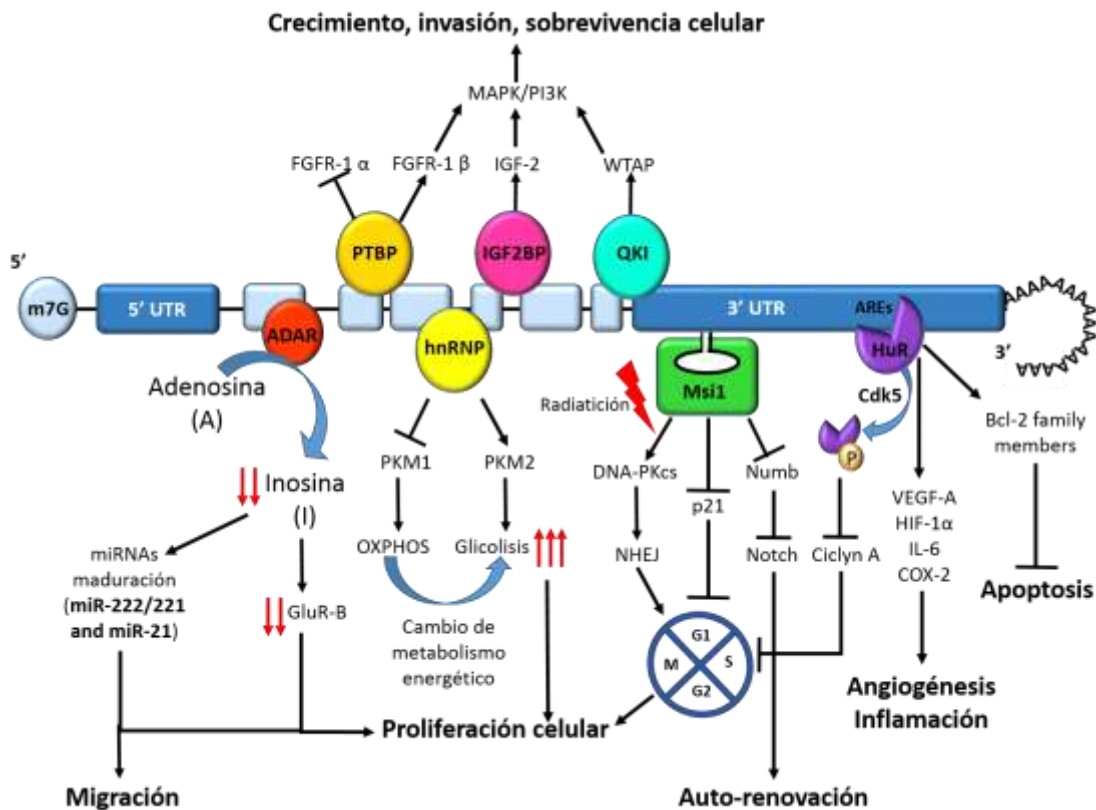


Figura 1 Representación esquemática del papel de las proteínas de unión a RNA en el desarrollo de glioblastoma.

Las adenosinas desaminasas que actúan sobre el RNA (por sus siglas en inglés, ADARs) son las responsables del cambio de adenosina (A) por inosina (I) en los RNAs. ¹⁶. En pacientes con GBM los niveles de edición de las ADARs son muy bajos, favoreciendo un fenotipo epiléptico y el aumento de la letalidad prematura ¹⁷. Por otro lado, se ha demostrado que las ADARs pueden editar precursores de microRNAs y disminuir la expresión de sus correspondientes onco-miRNAs in vivo e in vitro, afectando la proliferación y migración celular ¹⁸. Las proteínas ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs) favorecen la expresión de la isoforma M2 de la piruvato cinasa (por sus siglas en inglés, PK) ¹⁹, provocando un cambio en el metabolismo energético que favorece la proliferación de las células cancerígenas ²⁰. Musashi1 (Msi1) modula la radioresistencia de los GBM a través de la vía de la unión de terminaciones no-homologas (NHEJ) ²¹. HuR participa en el desarrollo y progresión de GBM a través de la regulación que ejerce sobre la estabilidad y traducción de mRNAs que codifican para proteínas que participan en angiogénesis, inflamación y evasión de la apoptosis. Además, se ha reportado el estado de fosforilación de fosforilización de HuR, por CDK5, afecta la progresión del ciclo celular. PTBP, IGF2BP y QKI regulan el procesamiento alternativo

(splicing) de RNAs como el de FGFR, IGF y WTAP, respectivamente, cuyas proteínas participan en las vías MAPK y PI3K afectando el crecimiento, la invasión y supervivencia de las células de GBM²²⁻²⁴.

2.3. Musashi1 (MSI1)

En mamíferos, MSI1 es necesaria para el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) durante las etapas embrionarias, y en adultos su expresión se restringe a células madre y progenitoras de varios tejidos²⁵. La sobre-expresión de MSI1 se ha observado en varios tipos de cáncer como meduloblastoma¹⁰, carcinoma hepatocelular²⁶, adenocarcinoma cervical²⁷, cáncer de pulmón y de mama²⁸. Además, se ha reportado una correlación positiva entre los niveles de expresión elevados de MSI1 y un mal pronóstico de supervivencia en pacientes con glioma, cáncer de mama y de colón²⁸.

El mecanismo de acción de MSI1 sobre algunos mRNAs consiste en la unión de esta a motivos específicos (G/A)UnAGU (n=1-3) localizados en la región 3'-UTR (*untranslated región*) de los mRNAs blanco, regulando su traducción²⁹. Actualmente, en mamíferos se han reportado como blanco directos de MSI1 los transcritos de Numb²⁹, p21³⁰, Doublecortin³¹ y Robo3³². El establecimiento de estos blancos sustenta que MSI1 desempeña un papel importante en la regulación del ciclo celular y en el desarrollo neuronal. Se ha propuesto que debido a la inhibición de la traducción de Numb y p21^{WAF}, los altos niveles de MSI1 podrían promover una proliferación celular descontrolada, fallas en la diferenciación celular e inducción de apoptosis³³.

Uren et al. (2015) identificó más de 1,000 mRNAs blancos de MSI1 in células de glioblastoma, usando iCLIP (*individual-nucleotide resolution cross-linking and immunoprecipitation*)³⁴. Esos blancos codifican para proteínas que participan en vías relevantes para la carcinogénesis como adhesión focal, uniones adherentes, Wnt, JAK/STAT, p53, MAPK, VEGF y ErbB. Ensayos funcionales mostraron que la disminución de MSI1 afecta la adhesión celular, la migración, la invasión, la apoptosis, la proliferación y la regulación del ciclo celular³⁴.

Por otro lado, se ha relacionado a MSI1 con la resistencia a la radio y quimioterapia. La expresión de MSI1 se incrementa en respuesta al daño al DNA en células de glioblastoma ²¹. Por su parte, la disminución de MSI1 aumenta la radiosensibilidad al afectar la reparación del DNA dañado a través de la regulación de la DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*). DNA-PKcs es una enzima clave involucrada en la vía de unión de terminaciones no-homologas (por sus siglas en inglés, NHEJ) en la reparación de rupturas de doble cadena de DNA en mamíferos. Además, se ha demostrado que la sobre-expresión de MSI1 protege a las células de GBM de la apoptosis inducida por drogas como el cisplatino, vía la regulación negativa de genes pro-apoptóticos ³⁵.

2.4. microRNAs

Los microARN (miRNAs) comprenden una gran familia de pequeños RNAs no codificantes, de ~21 nucleótidos. Los genes de miRNAs se transcriben por las RNA polimeras II o III y los transcritos primarios se llaman pri-miRNA^{36, 37}. Dentro del pri-miRNA se encuentra una estructura de tallo-asa de entre 60-70 nt conocida como pre-miRNA, que resulta de su procesamiento en el núcleo de las células animales por un complejo proteico llamado microprocesador, el cual está formado por Drosha (una RNasa tipo III) y una proteína con dominios de unión a RNA de doble hebra llamada Pasha ³⁸. El pre-miRNA es trasladado al citoplasma mediante la exportina 5 en un proceso dependiente de GTP ³⁹. Una vez en el citoplasma, sufre otro procesamiento en el que se remueve el asa terminal y se reduce a una cadena doble de ~21 pares de bases (pb). Dicer, -una RNasa del tipo III realiza la remoción del asa ⁴⁰. Es entonces cuando el RNA pequeño de doble cadena se recluta al complejo conocido como RISC (del inglés *RNA-Induced Silencing Complex*) que es el efector del silenciamiento de los mRNAs. En este complejo se encuentra la proteína Argonata (Ago) cuyas funciones son: 1) degradar una de las dos hebras del RNA pequeño, producto de Dicer, para dar como resultado final al miRNA funcional y 2) posteriormente detener la traducción cuando la homología y por lo tanto su hibridación es parcial; o por el contrario para degradar al mRNA blanco cuando su

hibridación es total ⁴¹. En animales, las secuencias blanco reconocidas por los miRNAs se localizan generalmente en las regiones 3'-UTRs de los mRNAs (**Figura 2**).

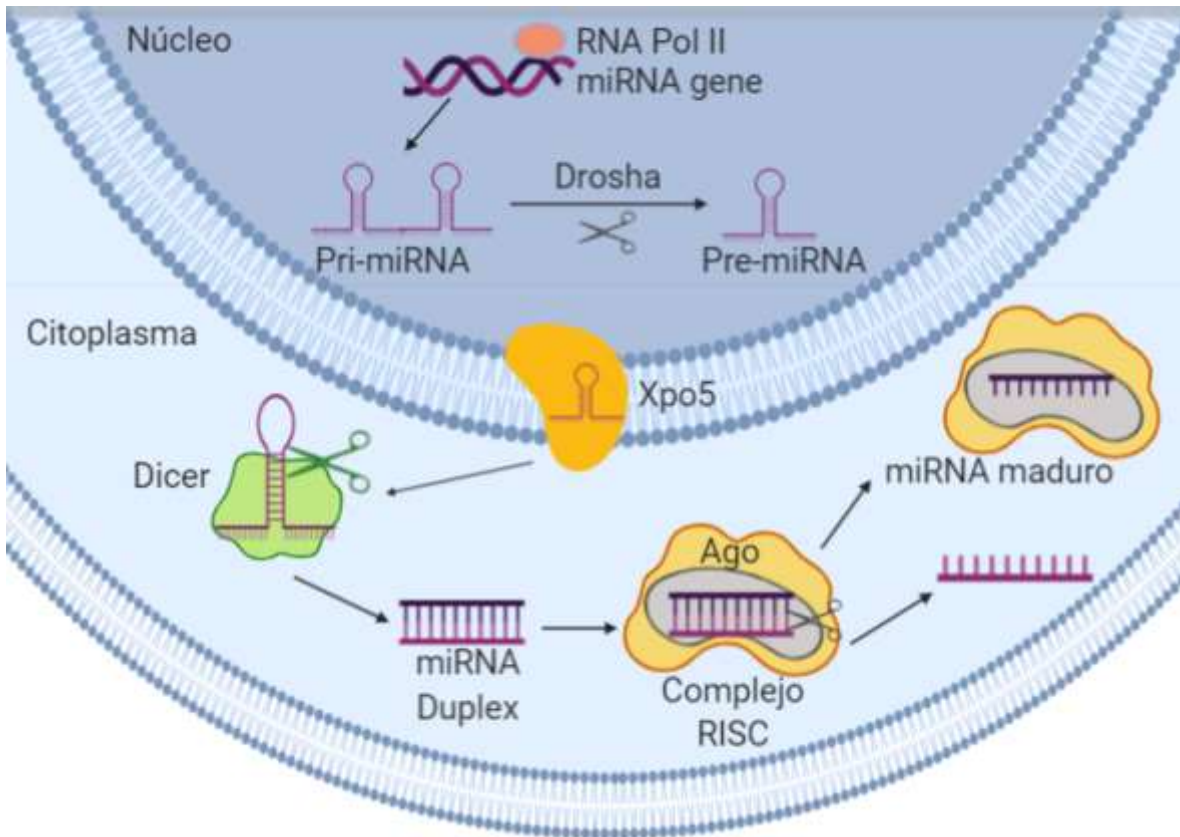


Figura 2 Biogénesis de los microRNAs.

Esquema representativo de la biogénesis de los microRNAs en la célula. La mayoría de los genes de miRNAs se transcriben mediante la RNA polimerasa II (RNA Pol II) en forma de transcritos primarios (pri-miRNA). Posteriormente, los pri-miRNAs son cortados por la RNasa tipo III Droscha, generando estructuras llamadas pre-miRNAs que son transportados del núcleo al citoplasma por la Expotina 5 (Xpo5). En el citoplasma, el pre-miRNA es cortado por la RNasa Dicer para generar un dúplice de miRNA que será procesado por la proteína Argonauta (Ago), que va a seleccionar la hebra de RNA que formara parte del complejo RISC.

Los miRNAs están implicados en varias funciones biológicas, incluidas la neurogénesis ^{42,43}. El cerebro, en particular, alberga aproximadamente el 70% de los miRNAs detectados experimentalmente, los cuales tienen patrones de expresión

tejido-específicos ⁴⁴. Cambios en su expresión y/o alteraciones en su mecanismo de acción han sido asociados a varias enfermedades neurodegenerativas y cáncer ^{45,46}.

Al igual que con otros tipos de cáncer, los miRNAs son prometedores biomarcadores de pronóstico y blancos terapéuticos en GBM ^{47,48}. Los miRNAs pueden funcionar como posibles oncogenes o supresores de tumores en los gliomas ⁴⁹. Estudios de biología molecular y expresión de genes (incluidos la secuenciación de nueva generación, microarreglos, ensayos de PCR, y técnicas de hibridación *in-situ*) han identificado varios miRNAs que se expresan diferencialmente en tejidos y/o líneas celulares de GBM comparados con los tejidos normales ⁵⁰⁻⁵⁵. La mayoría de los trabajos han detectado altos niveles de expresión de miR-21, miR-10b, miR-155, miR-210 y miR-221 en GBM. Por el contrario, los niveles de miR-128 (-1, a), miR-137, miR-330, miR-124, miR-149, miR-153, miR-154, miR-181, miR-323 y miR-328 son bajos comparados con los tejidos control. En las **Tablas 1 y 2** se han resumido el impacto de los principales microRNAs que afectan el desarrollo de GBM.

La identificación de patrones específicos de expresión de miRNAs en GBM podría ser un importante parteaguas para establecer mejores esquemas de prognosis, así como para proponer estrategias terapéuticas innovadoras. Una gran variedad de fármacos han mostrado su capacidad para modular la expresión de los miRNAs en estudios pre-clínicos, sugiriendo que podrían ser excelentes blancos para agentes anti-neoplásicos. Por ejemplo, la sobre-expresión de miR-21 significativamente inhibe el efecto de temozolamida (TMZ) en la apoptosis, el cual es mediado por la regulación negativa de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Caspase-3 ⁵⁵. Por otro lado, se publicó que miR-21 regula a LRRFIP1 (Leucine Rich Repeat (in FLII) Interacting Protein 1) y contribuye a la resistencia a VM-26 en GBM ⁵⁷. En el mismo año, se demostró que la regulación negativa de dos miembros de la familia miR-181 (miR-181 b y miR-181c) en pacientes con GBM está relacionada con la respuesta al tratamiento con TMZ, sugiriendo que su presencia podría servir como biomarcador a la respuesta a la terapia con TMZ ⁵⁸.

Tabla 1 miRNAs sobre-expresados en glioma y su función.

miRNAs	Blanco	Función	Referencia
Hsa-miR-21	IGFBP3 FASLG RECK	Invasión, apoptosis, crecimiento	59
Hsa-miR-221	p27kip1 CDKN1C/p57	Proliferación, angiogenesis	60 61
Has-miR-10b	HOXD10	Invasión	62
Has-miR-155	FOXO3	Proliferación, invasión y migración.	63
Has-miR-210	ROD1 SIN3A BDNF	Proliferación, apoptosis, migración e invasión	64 65 66
hsa-miR-146a	Notch1	Proliferación, viabilidad, apoptosis y quimioresistencia	67
Hsa-miR-148a	MIG6 BIM	Apoptosis	68
Hsa-miR-335	PAX6 DAAM1	Proliferación, supervivencia, invasión y troncalidad	69–71
Hsa-miR-582-5p	CASP3 CASP8	Supervivencia celular de GSC	72
Hsa-miR-183	NEFL	Proliferación	73

Tabla 2 miRNAs con bajos niveles de expresión en glioma y su función.

miRNAs	Blanco	Función	Referencia
Hsa-miR-128	Bmi-1	Proliferación, crecimiento de xenoinjertos de glioma y adhesión celular	74
	E2F3a		75
	EphB1		
Hsa-miR-137	RTVP-1	Proliferación, invasión, migración y troncalidad de GSC	76
	Cox-2		77
	YBX1		78
	AKT2		
Hsa-miR-330			
Hsa-miR-124	SNAI2	Proliferación, migración, invasión, troncalidad y angiogénesis	79,80
	R-Ras		
	N-Ras		
Hsa-miR-149	Rap1B	Proliferación	81
Hsa-miR-153	BCI2	Apoptosis, invasión y troncalidad de GSCs	82,83
	SNAI1		
	Nrf-2		
Hsa-miR-154			
Hsa-miR-181a/b/c	BCL2	Proliferación, apoptosis, invasión y angiogénesis	84-87
	Rap1B		
	Cyclin B1		
Hsa-miR-323	IGF-1R	Proliferación, invasión y apoptosis	88
Hsa-miR-328	SFRP1	Invasión	89

2.5. miR-137

miR-137 desempeña un papel importante en el sistema nervioso y en el desarrollo del tumores; el incremento de su expresión es necesaria para la diferenciación neuronal, y su reducción está implicada en gliomagénesis. La sobre-expresión de miR-137 en células troncales neuronales embrionarias (por sus siglas en inglés, NSCs) promueve su diferenciación a células neurales y de la glía, pero disminuye su proliferación a través de regular negativamente a LSD1 (lysine-specific histone demethylase lysine-specific demethylase 1) ⁹⁰. Otro estudio confirmó que miR-137 junto con miR-128 y miR-124 impactan en la proliferación, auto-renovación y expresión de genes asociados a la troncalidad de NSCs ⁹¹. En contraste, Szulwach *et al.* (2010) mostró que la sobre-expresión de miR-137 en NSCs de adultos (aNSCs) incrementa su proliferación y disminuye su capacidad de diferenciación, mientras que el bloqueo de la función de miR-137 tiene el efecto opuesto ⁹². Además, estudios *in vivo* sugieren que el aumento de miR-137 disminuye el desarrollo dendrítico de neuronas nacientes ⁹³. Los estudios anteriores sugieren que la función de miR-137 en NSC depende del contexto celular. Además, diversos estudios sugieren que miR-137 desempeña un rol importante en desordenes psiquiátricos y cáncer, incluidos los gliomas ⁹⁴.

Análisis de expresión de microRNAs en tumores cerebrales de adultos mostraron que miR-137 disminuye gradualmente en todos los grados de gliomas, mientras que en tumores pediátricos su expresión disminuye significativamente en los grados más altos en comparación con etapas tempranas, sugiriendo su papel como supresor de tumor ^{95,96}. miR-137 inhibe el crecimiento y capacidad de invasión de las células de glioma, al regular negativamente a CSE1L y Cox-2 ^{77,97}. También, se ha reportado que miR-137 atenúa angiogénesis al regular a EXH2 *in vitro* e *in vivo* en GBM ⁹⁸. Además, estudios recientes sugieren que miR-137 está involucrado en regular la pluripotencia de las células troncales de glioblastoma (por sus siglas en inglés, GSCs) al regular mRNAs que codifican para proteínas oncogénicas y que participan en neurogénesis como c-CDC42, CDK6, MIB1, YB1, NEFL1 y RTVP-1 ^{76,78,99}. Sin embargo, el papel de miR-137 en glioblastoma es aún poco claro.

2.6. Interacción funcional entre RBPs y microRNAs en cáncer.

En los últimos años se ha incrementado el conocimiento sobre la regulación de la expresión génica en eucariontes, especialmente desde que se descubrió que la regulación actúa a nivel post-transcripcional^{6,100}. Las RBPs y miRNAs habían sido generalmente estudiados como dos mecanismos distintos que regulan la abundancia de los transcritos; sin embargo, un creciente número de estudios han demostrado la interacción entre RBPs y miRNAs sobre los 3'-UTR bajo condiciones específicas. Particularmente en cáncer, se ha reportado que HuR promueve la traducción de nucleolin (NCL), mientras que el silenciamiento de HuR facilita la localización de mRNA de NCL en cuerpos de procesamiento (P-bodies), donde miR-494 interactúa con el 3'-UTR de NCL e inhibe su expresión. Al final, la competencia entre HuR y miR-494 modulan la proliferación y la sobrevivencia celular¹⁰¹. Ensayos de luciferasa y *RNase footprinting* sugieren que la unión de HuR al 3'-UTR del mRNA de ERBB-2 bloquea parcialmente el acceso de miR-331-3p. Mutaciones en el sitios de unión de HuR provocan que HuR se una a un sitio diferente, facilitando la acción de miR-331-3p sobre el mRNA de ERBB-2¹⁰². En condiciones hipóxicas, aumenta la traslocación de hnRNP L al citoplasma, donde se une al 3'-UTR del mRNA de VEGFA y bloquea la actividad de miR-299 y -297¹⁰³.

Las interacciones RBP-miRNA son particularmente importantes en el contexto del sistema nervioso, en donde ambos reguladores desempeñan funciones importantes en neurogénesis y desarrollo cerebral, por lo tanto las alteraciones que afecten su función o niveles de expresión contribuyen al desarrollo de enfermedades neuronales o tumores cerebrales¹⁰⁴⁻¹⁰⁹.

3. JUSTIFICACIÓN

Las células madre neurales adultas se generan en etapas embrionarias al entrar en un estado inactivo que permite su retención en la edad adulta y, por lo tanto, el mantenimiento de la homeostasis cerebral durante toda la vida ¹¹⁰. Por lo tanto, un equilibrio estrecho entre el estado de inactividad y activación es fundamental para satisfacer las demandas cerebrales de un tipo de célula específico en los números correctos, en un momento y posición determinados ^{111,112}.

La activación de células madre se caracteriza por la regulación de la síntesis de proteínas seguida de división y diferenciación celular. Las proteínas de unión a RNA (RBPs) y los microRNAs desempeñan un papel crítico en el control de la síntesis de proteínas, al interactuar con elementos de acción *cis* presentes en la secuencia de mRNA afectando la estabilidad, localización sub-celular y la traducción de los mensajeros ¹¹³⁻¹¹⁵. Por lo tanto, alteraciones en la expresión o estequiometría de los *trans*-reguladores pueden conducir a un deterioro neuronal y desarrollo de enfermedades, como glioblastoma ¹¹¹.

Musashi1 (MSI1) es una RBP y un marcador de troncalidad que desempeña un papel importante en neurogénesis, al regular el balance entre la auto-renovación y diferenciación de las células troncales neuronales, que dan origen a las neuronas y células de la glia ¹¹⁶. Por otro lado, se ha reportado que los niveles altos de MSI1 son necesarios para mantener el fenotipo de las células cancerosas e influye considerablemente en su crecimiento ^{10,34,117}. En glioblastoma, la expresión de MSI1 es particularmente alta y prevalente, afectando la radio y quimioresistencia ^{21,35}.

Estudios anteriores han reportado que MSI1 es regulado por varios microRNAs supresores de tumor, incluido miR-137 ¹¹⁸. Contrario a MSI1, miR-137 promueve diferenciación e inhibe el desarrollo de glioblastoma ^{76,78}.

Actualmente, por medio de análisis genómicos y clínicos se han identificado proteínas que podrían participar en el desarrollo de GBM. El análisis *in silico* del 3'-UTR de varios mRNAs desregulados en gliomas sugiere que estos podrían estar regulados por MSI1 y/o microRNAs, como miR-137.

Con base en lo anterior nos preguntamos si miR-137 y MSI1 tienen una relación más compleja, lo que significa que si sus funciones antagonistas en la neurogénesis y el desarrollo glioblastoma son el resultado, al menos en parte, de su impacto sobre mRNAs compartidos que regulan a su vez la neurogénesis y/o el desarrollo de una neoplasia.

4. HIPÓTESIS

Musashi1 y miR-137, ejercen una regulación antagónica sobre varios mRNAs, vía unión a la región 3'-UTR, que participan a su vez en la neurogénesis y/o el desarrollo de una neoplasia.

5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el mecanismo molecular por el cual MSI1 y miR-137 regulan la expresión de transcritos que codifican para proteínas involucradas en el desarrollo de glioblastoma.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Confirmar el papel de Musashi1 en neurogénesis.
- Identificar transcritos blanco compartidos entre MSI1 y miR-137 implicados en neurogénesis y gliomagénesis.
- Evaluar el impacto de MSI1 y miR-137 sobre sus blancos compartidos.
- Proponer un modelo de regulación, mediado por MSI1 y miR-137, para la auto-renovación, proliferación y/o tumorigénesis

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cultivo celular.

Las líneas celulares de glioblastoma U251 y T98G, neuroblastoma BE-(2)-C y fibrosarcoma HT1080 se mantuvieron en medio DMEM-F12 suplementados con suero fetal bovino (SFB) (Thermo Fisher) al 10% y 100 U/ml de bencil penicilina (Thermo Fisher) a 37°C en una atmósfera al 95% de O₂. Las células de glioblastoma MSI-KO fueron cultivadas como se describe en de Araujo et al. 2016.

La línea celular U251 que sobre-expresa MSI1 se generó de la siguiente manera: se sembraron y transdujeron 200 células con el vector lentiviral, que contiene la región codificante de MSI1 (pReceiver-Lv242) (GeneCopoeia), con una multiplicidad de infección (por sus siglas en inglés, MOI) de 10 por célula. Las células control contienen el vector vacío. Después de 24 horas, las células fueron seleccionadas con puromicina al 0.5 µg/ml. La eficiencia de transducción fue determinada como el porcentaje de células positivas para GFP (color verde), con respecto al número total de células visibles.

7.2. Cultivo de NSC.

Los cuidados y procedimientos experimentales en animales fueron aprobados por el Comité de uso y cuidado animal de University of Texas Health Science Center of San Antonio (UTHSCSA, Protocol #13091X).

La zona sub-ventricular (por sus siglas en inglés, SVZ), fue obtenida de ratones Swiss-Webster (Charles River Laboratories) de 2 meses de nacidos. Las células fueron disociadas con papain 0.25% (Worthington Biochemical Corporation) y DNase (Sigma) al 12 mg/ml en DMEM a 37°C por 45 minutos. Las células se lavaron dos veces con DMEM, centrifugadas y sembradas en placas de 6 pozos (Corning) en presencia de medio N5 (DMEM/F-12/N-2), suplementado con SFB al 5% (Thermo Fisher), Factor de crecimiento epidermal (EGF) a 20 ng/ml (Thermo Fisher), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) a 20 ng/ml (Peprotech)

y extracto de pituitaria bovina (Thermo Fisher) a 35 mg/ml. El medio se cambió cada dos días. Al alcanzar la confluencia deseada, las células fueron transfectadas como se describe más adelante. La diferenciación de NSCs fue inducida al remover EGF, FGF y FBS del medio.

7.3. Transfección con siRNAs.

Las células U251 fueron transfectadas con 25 nM de siRNAs contra MSI1 (siMSI1) y siRNAs control usando Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen). Después de 72 h, las células se cosecharon y utilizaron en los experimentos que se describen en las siguientes secciones.

Los siRNAs contra Msi1 (siMsi1) fueron obtenidos de Invitrogen Stealth RNAi Collection: MSI1HSS106732, MSI1HSS106733, and MSI1HSS106734. El siRNA control negativo es # Cat. 12935-300. Los siguientes siRNAs se obtuvieron de la colección ThermoFisher Silencer® Select: FSTL1 (s22034) cat# 4427037, PTGRFN (s11462) cat# 4427037, STC1 (s13549) cat# 4427037, CDH6 (s2784) cat# 4427037, DCBLD2 (s43617) cat# 4427037.

Las transfecciones en NSCs se realizaron como se describe en Santos et al. 2016. Brevemente, 1×10^5 células fueron sembrada en placas de 24 pozos cubiertas con poli-L-Ornitina (Sigma) y Laminina (Thermo Fisher). Las células fueron transfectadas con siRNA control o siMSI1 siguiendo el protocolo de X-Treme siRNA transfection reagent (Roche).

7.4. Transfeccion con microRNAs mimics.

Las células HT1080 fueron transfectadas con 5-25 nM de miR-128 (Cat. no. MSY0000424, QIAGEN), miR-137 (Cat. no. MSY0000429, QIAGEN) or miR-control mimics (Cat. no. 1027280, QIAGEN), using Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen). Las células se usaron en diferentes ensayos que se describen en las siguientes secciones.

7.5. Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real (qRT-PCR).

La extracción de RNA total se realizó con el método de TRIzol (Invitrogen). Seguido de la síntesis de cDNA con The High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (catalog no. 4368814, Applied Biosystems,) usando oligonucleótidos degenerados. Las reacciones de qRT-PCR se prepararon siguiendo el protocolo para TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems), junto con las siguientes sondas TaqMan: Msi1 Hs01045894; PDGFR α Hs00998018; EGFR Hs01076078; ECT2, 00978168; NEFL1 Hs0019624; CDC6 Hs00154374; NRAS Hs00180035; GAPDH Hs99999905, FSTL1 Hs00907496_m1, PTGRFN Hs01385989_m1, STC1 Hs00174970_m1, CDH6 Hs00191832_m1, DCBLD2 Hs00294635_m1. Las reacciones se corrieron en el equipo ABI 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems). Los datos se adquirieron usando el software ABI SDS versión 2.0.1 (Applied Biosystems) y se analizaron por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando los niveles del mRNA de GAPDH como control endógeno.

La transcripción reversa para microRNAs se realizó con el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) y los oligonucleótidos específicos para cada microRNA. La qRT-PCR se realizó con las sondas TaqMan: Hsa-miR-128 TR002216; hsa-miR-137, RT001129 and RNU48, TM 001006, del TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems).

7.6. Plásmidos.

Las construcciones de expresión de Musashi1 (pcDNA-Msi1) y GST (pcDNA-GST) fueron proporcionadas por el Dr. Penalva del UTHSCSA.

Los vectores reporteros de luciferasa se generaron de la siguiente manera: Empleando como molde la secuencia nucleotídica del 3'-UTR del mRNA de PDGFR α (NM_006206), clonada en el vector pEZX-MT01, se amplificaron el 3'-UTR completo y tres regiones (R1, del nucleótido 1 al 715, R2 del nucleótido 716 al 1936 y R3 del nucleótido 1937 al 2987). Los oligonucleótidos empleados para las reacciones de PCR se enlistan en la Tabla 3. Los fragmentos amplificados se purificaron y clonaron en el vector reportero de luciferasa pimirGLO (Promega) entre

los sitios de restricción de las Sall y SacI. La inserción de los fragmentos en el vector se corroboró por digestión enzimática con las enzimas mencionadas anteriormente.

Además, se sub-clonó la región 2 del 3'-UTR en el vector TPZ57R/T (Invitrogen), que posee un promotor T7. Las clonas obtenidas se enviaron a secuenciar para corroborar la integridad de la secuencia clonada. Las construcciones nombradas 3'-UTR-PDGFR α _R2**SENSE**/TPZ57R y 3'-UTR-PDGFR α _R2**ANTISENSE**/TPZ57R y se usaron como molde para las reacciones de transcripción *in vitro*.

Tabla 3 Oligonucleótidos utilizados para amplificar las regiones del 3'UTR de PDGFR α .

Oligos	Secuencia (5' - 3')
R1-F* ^o	CACGAGCTC CGAGGGGTTCCCTTCCACTT
R1-R**	CACGTCGACGCTTTCTCTGGAGGGAAATCATG
R2-F	CACGAGCTC GTAATAATGTAACATGATTTCCCTC
R2-R	CACGTCGAC CCCACACCAACCTGTTTGACAGTG
R3-F	CACGAGCTC GGTTTCATTGGCATTCTTTGCAATAC
R3-R^o	CACGTCGAC GTTTTGGGAACATGTAAGTATCTTTC

*F: Oligonucleótido sentido; **R: Oligonucleótido anti-sentido.

^oLos oligonucleótidos R1-F y R3-R se utilizaron para amplificar el 3'-UTR completo.

Para eliminar los sitios de regulación de miR-137 y miR-128 se utilizaron los oligonucleótidos de la Tabla 4. Por cada oligonucleótido se preparó una reacción de PCR de la siguiente manera: 20 ng de DNA plasmídico, 1 μ l de dNTPs 10 mM, 1 μ l de oligonucleótido sentido o anti-sentido 10 μ M, 2.5 μ l de PfuUltra HF reaction buffer 10x y 0.5 μ l de PfuUltra hotstart DNA polymerase (2.5 U/ μ l; cat # 600390, Agilent Technologies) en un volumen final de 25 μ l por cada reacción. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: Pre-incubación a 95°C por 2 minutos. Desnaturalización 95°C por 30 segundos. Temperatura de alineamiento 55°C por 1 minuto. Extensión a 68°C por 8 minutos 30 segundos. Se programaron 3 ciclos. Posteriormente, se mezcló la reacción del oligonucleótido sentido con el anti-sentido correspondiente.

Los tubos se incubaron con las condiciones de PCR anteriores por 25 ciclos. Al término de la reacción de PCR, las hebras de DNA metilado fueron digeridas con la enzima de restricción DpnI. Posteriormente, se transformaron células E. coli XL-1 Blue con 10 µl del producto de PCR y las clonas se crecieron en agar LB con ampicilina 100 µg/ml a 37°C por 12 h. Se seleccionaron 6 clonas y se realizó la extracción de DNA plásmido con base al protocolo de PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen). Las muestras se enviaron a secuenciar.

Tabla 4 Oligonucleótidos para PCR de mutagénesis sitio dirigida.

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')
128PC-F*	GAAACATGGGCTGTGGCAGATGATGCTTTGG
128PC-R**	CCAAAGCATCATCTGCCACAGCCCATGTTTC
128C-F	GTA TCA CTG CCT TCG CCA CAG GCA CAT TAA C
128C-R	GTT AAT GTG CCT GTG GCG AAG GCA GTG ATA C
137-F	GCAGATGATGCTTTGGAAGACTACCTACTGGTGTAAATC
137-R	GTAGGTAGTCAAGTACTTTAGCATCATCTGCCGATAGCAC

*F: Oligonucleótido sentido; **R: Oligonucleótido anti-sentido.
PC: sitio poco conservado; C: sitio conservado.

7.7. Ensayos de luciferasa *in vitro*.

Se hicieron co-transfecciones transitorias de pcDNA-GST ó pcDNA-Msi1, con el vector pmirGLO-PDGFRα3'-UTR completo (wt), R1,R2 y R3 en células HT1080. Después de 48 horas, las células se cosecharon y se midió la actividad de luciferasa usando el Dual Luciferase Assay System (Promega).

De forma similar, se midió el impacto de los microRNAs sobre la expresión de PDGFRα. Las células HT1080 fueron co-transfectadas con 50 ng/µl del vector reportero PDGFRα/3'-UTR (WT o deleciones de microRNAs) y 10 pmol de miRNA (miR-137 o miR-128 o mimic control), siguiendo el protocolo de Lipofectamine 3000

(invitrogen). Después de 48 horas, las células fueron colectadas y la actividad de luciferasa se midió con el kit mencionado anteriormente.

Los datos fueron expresados como actividad normalizada de luciferasa y la media \pm la desviación estándar de tres experimentos.

7.8. Expresión y purificación de la proteína recombinante GST y GST-Msi1.

Para expresar las proteínas recombinantes, la cepa de *E. coli*, BL21(DE3) se transformó con las construcciones pGEX-GST y GST-Msi1.

7.8.1. Curva de crecimiento e inducción. Se inocularon 50 μ l de bacterias BL21 transformadas con plásmidos GST y GST-Msi1 en 50 ml de LB en presencia de 100 mg/ml de ampicilina y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una D.O a 0.6. Posteriormente, se adicionó el inductor Isopropil β -D-Tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 1 mM. Las bacterias se crecieron a 37°C y se tomó 1 ml del cultivo cada 30 minutos de incubación hasta las 4 horas y media de inducción.

La expresión de las proteínas se analizó en geles de acrilamida teñidos con azul de Coomassie.

7.8.2. Purificación de las proteínas recombinantes. Se inocularon 200 μ l de bacterias BL21/GST o GST-Msi1 en 200 ml de LB con ampicilina y se crecieron a 37°C hasta alcanzar una O.D de 0.6. Posteriormente, se adicionó IPTG a una concentración fina de 1mM y el cultivo se creció a 37°C por 3.5 horas. Adicionalmente, se crecieron bacterias sin inducir (control negativo). Al finalizar el tiempo de inducción, el cultivo líquido se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. El pellet de células fue lavado dos veces con buffer PBS y tratado con 100 mg/ml de lisozima y se incubó durante 15 min en agitación constante a 4°C. A fin de completar la lisis celular, la mezcla fue sonicada con una amplitud de 30% durante 5 ciclos de 30segundos, se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C.

El sobrenadante se adicionó a un tubo eppendorf con perlas de glutatiión sefarosa y se incubó por 1 hora en rotacion a 4°C. Después, las muestras se centrifugaron a

1600 rpm por 3 min y se eliminó el sobrenadante. Las perlas se lavaron con soluciones de NaCl al 1M, 0.5M y 0.1 M /HEPES-KOH pH 7.5.

Después de los lavados con NaCl, las proteínas se recuperaron en glutatión reducido 30 mM.

Las proteínas se concentraron usando columnas Amicon Ultra 0.5 mL Ultracel 10K (#UFC501024, Millipore).

7.9. Transcripción *in vitro*.

Las construcciones 3'-UTR-PDGFR α _R2**SENSE**/TPZ57R y 3'-UTR-PDGFR α _R2**ANTISENSE**/TPZ57R fueron linearizadas con la enzima de restricción KpnI (#ER0521, Thermo Scientific) y desfosforiladas con FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (#EF0654, Thermo Scientific).

Las reacciones de transcripción se prepararon siguiendo el protocolo del MAXIscript Kit (#AM1308, Ambion). Las reacciones se incubaron a 37°C por 3 horas. Además, se trataron con DNase TURBO por 30 min a 37°C. Por último, se adicionaron 5 μ l de EDTA a 100 mM y se incubaron 5 min a 75°C.

Posteriormente, las reacciones de transcripción se transfirieron a tubos de 1.5 ml que contenían 30 μ l de acetato de sodio 3 M (pH 5.2), 280 μ l de agua y 750 μ l de etanol al 100%. El RNA se dejó precipitando a -20°C por 12 horas. Al término de la incubación, los tubos se centrifugaron a 13500 rpm por 25 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se adicionaron a 750 μ l de etanol al 70%. Las muestras se centrifugaron nuevamente, al finalizar se eliminó el sobrenadante y las pastillas de RNA se dejaron secar a temperatura ambiente. El RNA se re-suspendió en 30 μ l de agua libre de RNasas y se cuantificó.

El RNA se almacenó a -80°C.

7.10. Marcaje del RNA con biotina.

El RNA se marcó con biotina siguiendo el protocolo de *3'End Desthiobiotinylation Kit* (#20163, Thermo Scientific Pierce). Las reacciones se incubaron 9 hora a 16°C.

Después, las reacciones se transfirieron a un tubo de 1.5 mL que contenía 200 µl de agua y 600 µl de Clorofomo:alcohol isoamílico (24:1). Las muestras se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 13500 rpm por 15 min para separar las fases. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL y se adicionaron 46 µl de NaCl 5M, 1 µl de glicogen (20 mg/mL) y 1400 µl de etanol al 100%. El RNA se dejó precipitando a -20°C por 12 horas. Al término de la incubación, los tubos se centrifugaron a 13500 rpm por 25 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se adicionaron a 750 µl de etanol al 70%. Las muestras se centrifugaron nuevamente, se eliminó el sobrenadante y las pastillas de RNA se dejaron secar a temperatura ambiente. El RNA se re-suspendió en 30 µl de agua libre de RNasas y se cuantifico.

7.11. RNA-pull down

Los experimentos de interacción RNA/GST o RNA/GST-Msi1 siguiendo el protocolo de *Pierce Magnetic RNA-Protein Pull-Down Kit* (#20164, Thermo Scientific Pierce). Primero, 50 pmol de RNA sentido y antisentido se incubaron con 80 µL de perlas de streptidina magnéticas, previamente lavadas con Tris 20 mM (pH 7.5), a 4°C por 30 minutos en rotación.

Se preparó el mix de interacción RNA-proteína de la siguiente manera: 10 µl de 10X Protein-RNA binding buffer, 30 µl de glicerol al 50%, 30 µg de proteína recombinante (GST o GST-Msi1) y agua (volumen final de 100 µl). El mix de interacción se agregó al tubo con RNA-perlas y se incubó la reacción por 1 hora a 4°C en rotación.

Al término de la incubación, los tubos se colocaron en el soporte magnético y se retiró el sobrenadante. Las perlas se lavaron tres veces con la solución de lavado.

Posteriormente, las perlas se re-suspendieron en buffer de carga para proteínas, se incubaron en baño maría por 5 minutos.

Las muestras de interacción y el INPUT de proteínas se sometieron a un corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida al 12%. Las proteínas se transfirieron en membranas de PVDF. Las membranas se incubaron con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-GST HRP (sc-2357, Santa Cruz).

7.12. Análisis de proteínas.

Análisis en células de GBM. Se obtuvieron extractos proteicos de las células. Treinta microgramos de proteínas se separaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y transferidas a membranas de Polifluoruro de vinilideno (PVDF) (GE Healthcare). Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en TBS 1X-Tween 20 por 1 h a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas 12 h con los anticuerpos primarios, seguido de hibridación de las membranas con los anticuerpos secundarios.

Los anticuerpos y diluciones utilizados en este estudio fueron los siguientes: anti-Msi1 (EP1302) (Abcam, ab52865; 1:2000 in 5% milk-TBST); anti-PDGF Receptor α (D13C6) XP (Cell Signaling, #5241; 1:1000 in 5% BSA-TBST); anti-EGF Receptor (C74B9) (Cell signaling #2646; 1:2000 in 5%BSA-TBST); anti-ECT2 (G-4) (Santa Cruz, sc-514750; 1:1000 5% milk-TBST); anti-NEFL1 (Cell signaling, #2835; 1:1000 in 5% milk-TBST), Anti-CDC6 (C42F7) (Cell signaling, #3387; 1:500 in 5% BSA-TBST); Anti-NRAS (27H5) (Cell signaling, #3339; 1:1000 in 5% BSA-TBST); anti-alpha Tubulin (GeneTex, GTX102078); Anti-GST (B-14) HRP (Santa Cruz, sc-138; 1:5000 in 5% milk-TBST).

Análisis de muestras de ratón: Las células fueron lisadas con buffer de RIPA. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y transferidas a membranas de PVDF. Posteriormente, se bloquearon e incubaron con anti-MSI1 o anti—Tubulin III (Tuj1, 1:500, Covance Inc), seguidas de la incubación con el anticuerpo secundario acoplado a HRP (horseradish peroxide). Anti- β -Actin (Abcam), se utilizó como control endógeno.

Los inmunoblots se revelaron usando Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore).

El análisis densitométrico de las imágenes obtenidas de los blots se realizó en el software ImageJ y el análisis estadístico de los resultados en el software GraphPad Prism 6.

7.13. Ensayo de proliferación celular.

Las células U251 se infectaron con el vector lentiviral que expresa MSI1 o el vector control. Posteriormente, las células se transfectaron con 10 nM de miR-137 o el mimic control y se sembraron en placas de cultivo Image Lock de Essen (Essen BioScience). El porcentaje de confluencia se monitoreo por 5 días con el sistema de imagen automatizado IncuCyte (Essen BioScience). El análisis estadístico se realizó en el software GraphPad y los datos se presentaron como la media \pm la desviación estándar.

7.14. Inmunohistoquímicas.

Los cultivos de NSC se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% por 20 minutos, se lavaron y bloquearon con Suero Normal de Burro (por sus siglas en inglés, NDS) en PBSt-T por una hora y se incubaron por 12 horas con el anticuerpo primario anti- β -Tubulin III (Tuj1, 1:500, Covance, Inc.). Las células fueron marcadas con Alexa 488 o Alexa 546 conjugadas con el anticuerpo secundario ((Invitrogen, Inc., Thermo Fisher) y los núcleos fueron teñidos con DAPI (40,6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma).

7.15. Cuantificación del crecimiento de neuritas.

Después de 96 horas de la transfección, las células fueron monitoreadas a 10X y 20X en el equipo IncuCyte. El crecimiento de neuritas fue cuantificado en ZOOM Imaging System (Essen BioScience). La definición de neurita para las células BE-(2)-C fue creada en el NeuroTrack software module (Essen BioScience).

7.16. Conteo celular.

Los experimentos se realizaron en tres réplicas biológicas. Los núcleos se identificaron como DAPI1 positivos, y se verificó cada uno para Tuj1. Por triplicado, se evaluaron mínimo cinco campos para los núcleos DAPI y anti-Tuj1 positivos. La proporción de Tuj1 positivos se determinó para los 15 campos (cinco campos por triplicado). Algunas muestras se contaron varias veces para evaluar la fiabilidad de los conteos.

7.17. Correlación de la expresión de Musashi1 y miR-137.

Para evaluar si los perfiles de expresión de MSI1 y miR-137 están anti-correlacionados, se obtuvieron los valores de expresión de mRNA y miRNA del *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*. Los valores de expresión de los mRNA fueron normalizados usando el *Upper Quartile normalized FPKM*, del portal *Genomics Data Commons (GDC)*. La expresión del miRNA fue normalizada usando las lecturas por millón del miRNA mapeado, obtenido del portal GDC. En total, 508 sujetos arrojaron datos de expresión para mRNAs y miRNA. Se aplicó una transformación de la raíz cuadrada a la expresión de Musashi1 y miR-137 para estabilizar la varianza. El coeficiente de correlación de Pearson y el valor p se calcularon entre la expresión transformada de Musashi1 y miR-137

7.18. Identificación y comparación de los blancos de miRNA y RBP.

Blancos de miR-137. Las predicciones de los blancos de familias de miRNAs altamente conservadas se obtuvieron de TargetScan ¹¹⁹. Se generó una lista de blancos probables de miR-137 con información publicada por Santos et al, 2016 y Tamim et al. 2014, y los blancos validados en miRTarBase ¹²⁰. Además, se hizo una lista de los sitios blancos de miRNAs por transcrito y se calculó el número de miRNAs que regulan cada transcrito. Los datos usaron para los siguientes análisis.

Blancos de RBPs. Se generó una lista de blancos de MSI1 identificados por RIP o iCLIP ^{34,121,122}. La lista de los blancos de hnRNPH1 y IGF2BP3 se obtuvieron de Ennajdaoui et al. 2016 y Uren et al. 2016.

Blancos compartidos entre miRNAs y RBPs. Se compararon las listas de blancos de los microRNAs y RBPs para identificar los transcritos compartidos entre ambos. Después, se calculó el número de mRNAs compartidos miRNA-RBP y se obtuvo el número de transcritos que contiene un número pequeño de sitios de unión del microRNA (menos de 3 o menos de 5 sitios de regulación por familia conservada de microRNAs). La significancia entre cada grupo fue calculada usando Fisher's test (p-value<0.01).

7.19. Análisis de blancos compartidos entre miR-137 y MSI1.

El análisis de ontología de genes (Gene ontology, GO) se realizó en PANTHER¹²³. REVIGO¹²⁴ se utilizó para copilar y agrupar los términos similares de GO. Por último, el análisis de redes se realizó en STRING (versión 10.5)¹²⁵.

El análisis de expresión de los genes blancos compartidos por MSI1 y miR-137 en corteza, tumor tipo glioma de bajo grado (por sus siglas en inglés, LGG) y GBM se realizó de la siguiente manera: Los recuentos de lectura de genes de 156 GBM y 551 LGG se obtuvieron del TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>), mientras que los recuentos de lectura de 287 muestras de corteza frontal (tejido sano) se obtuvieron de GTEx reléase V7 (<https://www.gtexportal.org/home/>). Para el procesamiento de datos de expresión, primero los recuentos de lectura fueron normalizados usando el método RLE de DESeq2¹²⁶. Posteriormente, se realizó el análisis diferencial de expresión para comparar GBM con corteza y LGG. Todas las comparaciones se realizaron usando DESeq2 y solo los genes que presentaron $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ and $\text{FDR} < 0.05$ se consideraron como diferencialmente expresados. Después, analizamos la lista de 141 genes compartido entre miR-137 y MSI1. Finalmente, después de la transformación logarítmica de los datos normalizados, se generaron los mapas de calor de los genes diferencialmente expresados usando R *scripts*.

El análisis de expresión y supervivencia de los genes compartidos MSI1/miR-137 obtenidos de los datos de glioma de TCGA, se realizó usando en GlioVis¹²⁷.

8. RESULTADOS

8.1. Impacto de MSI1 en neurogénesis

Las redes reguladoras de genes entre factores de transcripción y miRNAs están bien documentadas. Las complejas interacciones entre estos dos reguladores y sus genes blanco tienen lugar en diferentes organismos, afectan varios procesos biológicos y contribuyen en enfermedades como el cáncer ^{128,129}. En el caso de miRNA-RBP, las redes de regulación aún no se han explorado por completo. Aunque se ha demostrado que interactúan de múltiples maneras, la gran mayoría de los ejemplos descritos hasta ahora involucran un solo transcrito blanco compartido.

MSI1 es regulado por un grupo de miRNAs supresores de tumores, en los que se incluyen miR-34a, miR-101, miR-128, miR-137 and miR-138 ¹¹⁸. Al igual que MSI1, estos miRNAs participan en la interesante intersección de neurogénesis y desarrollo tumoral. Con base en lo anterior, nos preguntamos si estos miRNAs y MSI1 tienen una relación más compleja, es decir si sus funciones antagonistas en neurogénesis y el desarrollo de gliomas se producen como resultado de su impacto en la transcripción de sus blancos compartidos. Para evaluar lo anterior, obtuvimos de TargetScan ¹¹⁹ las listas de los posibles blancos de los cinco miRNAs, generamos una lista de blancos de MSI1 a partir de los resultados de CLIP y RIP publicados por Uren *et al.* 2015, Vo *et al.* 2012b y de Sousa Abreu *et al.* 2009 ^{10,34,122} y determinamos el número de blancos compartidos. Corroborando nuestras expectativas, observamos que estos miRNAs comparten un gran número de blancos con MSI1 y también entre ellos. En todos los casos, con excepción de miR-138, las superposiciones observadas son estadísticamente significativas. Además, el análisis reveló que MSI1 comparte más blancos con miR-137 comparado con el resto de los microRNAs analizados (**Figura 3 A; Tabla S1 y S2**).

En este estudio nos enfocamos en la asociación MSI1-miR-137 debido a que comparten un mayor número de blancos (**Figura 3A y B**) y la regulación por miR-

137 es la única entre los miRNAs estudiados que está altamente conservada. En la **Figura 4A**, se muestra que el sitio de unión de miR-137 está altamente conservado en vertebrados y también en el género *Drosophila*. Este grado de conservación sugiere que la regulación de MSI1 por miR-137 es un componente crítico en el balance entre auto-renovación y diferenciación.

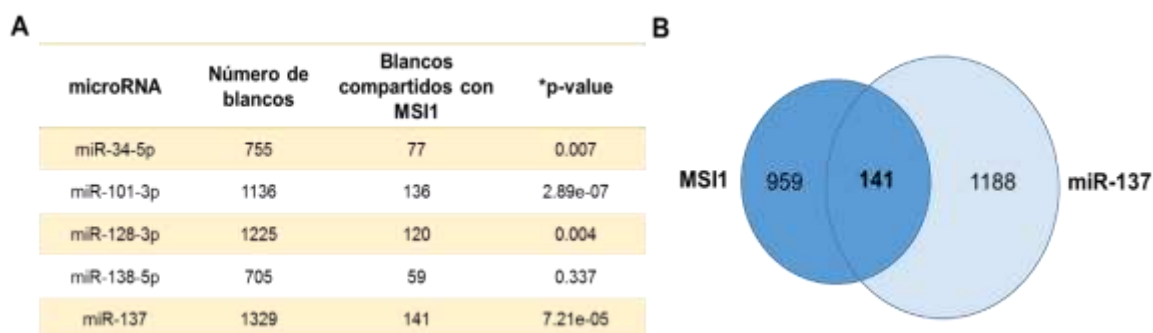


Figura 3 Musashi1 comparte varios blancos con sus propios miRNAs reguladores.

A) Tabla de los microRNAs que regulan a MSI1. La tabla muestra el número de blancos identificados para cada microRNA en TargetScan, así como los compartidos con MSI1. El análisis hipergeométrico mostró que el número de blancos compartidos entre MSI1 y los miRNAs es estadísticamente significativo. **B)** Diagrama de Venn, en el que resaltan los 141 blancos compartidos entre MSI1 y miR-137. El análisis hipergeométrico reveló que la superposición de los blancos es altamente significativa ($p\text{-value} < 7.21e-05$).

Estudios anteriores han mostrado que la expresión de miR-137 incrementa durante la diferenciación de células troncales neuronales (por sus siglas en inglés, NSCs)⁹¹. Mientras que el análisis de expresión de MSI1 durante la neurogénesis muestra un perfil opuesto al descrito para miR-137 (**Figure 4B**). Los niveles de expresión de MSI1 en la zona sub-ventricular (SVZ) (nicho de NSCs) son altos comparados con los observados en el núcleo estriado (STM) que es tejido diferenciado de cerebro de ratón (**Figura 4C**), estos resultados son opuestos a lo reportado para miR-137⁹¹. De igual manera, el análisis en muestras de glioma del *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) muestran que MSI1 y miR-137 tienen patrones de expresión opuestos y que estos patrones están altamente correlacionados ($R = -0.45$; $p\text{-value} = 2.2 \text{ E-}26$) (**Figura S1**). Además, observamos que MSI1 knockdown

reduce la proliferación de NSCs (**Figura 4D**) y disminuye el número de neuronas cuando NSC son inducidas a diferenciación (**Figura 4E**), estos resultados son contrarios a los observados con miR-137⁹¹. Esto sugiere que existe un efecto antagónico entre ambas moléculas.

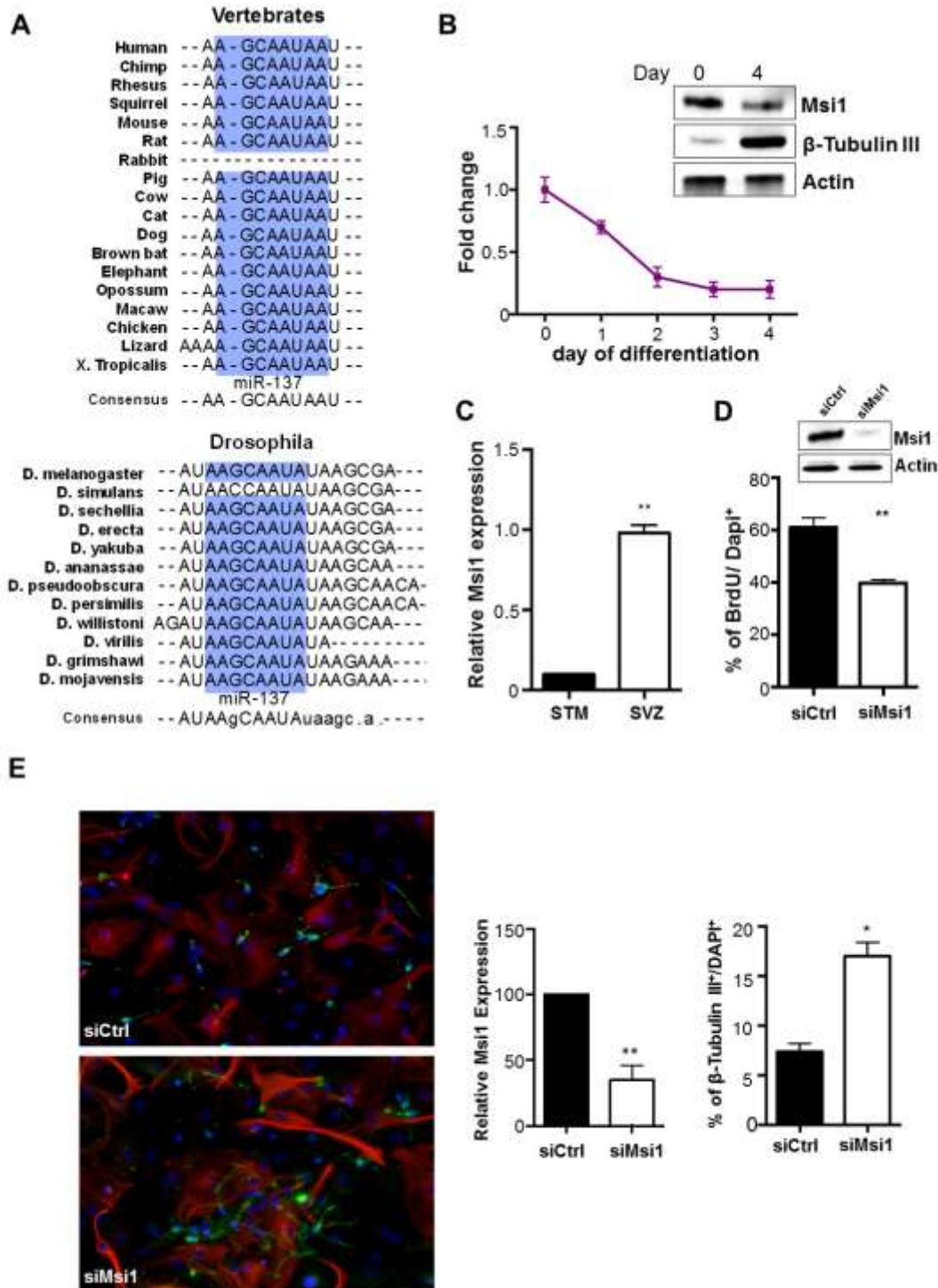


Figura 4 Papel de Musashi1 en neurogénesis.

A) Las predicciones de TargetScan muestran que el sitio de unión de miR-137 esta conservado entre vertebrados y en el género *Drosophila*. Los nucleótidos altamente conservados se muestran en cajas azules. **B)** La expresión del mRNA de MSI1 disminuye durante la diferenciación in vitro de NSCs

(panel izquierdo). El análisis de Western blot muestra que los niveles de MSI1 son altos en NSCs comparados con los que se observan en células diferenciadas. β -Tubulin III se utilizó como marcador neuronal (panel derecho). **C)** La expresión de MSI1 es alta en células localizadas en la zona sub-ventricular (por sus siglas en inglés, SVZ) comparado con lo observado en las células del núcleo estriado (striatum, por sus siglas en inglés, STM). **D)** Proliferación de NSCs. El análisis del Western blot muestra la disminución de la expresión de MSI1 por siRNAs en NSCs, siRNAMS11 (siMSI1) vs. siRNA Control (siCtrl) (panel superior). Porcentaje de NSCs que incorporaron BrdU después de la transfección con siMSI1 y el siRNA control (panel inferior). **E)** Experimento de diferenciación neuronal. Las NSCs fueron transfectadas con siMSI1 o siControl y mantenidas en medio de diferenciación. Las células fueron teñidas con β -Tubulin III (rojo) por cuatro días (panel izquierdo). Los núcleos se tiñeron con DAPI1 (azul) y los oligodendrocitos se tiñeron de verde. El análisis de qRT-PCR muestra los niveles de MSI1 en NSCs (panel central). Cuantificación de neuronas después de 4 días de crecimiento en medio diferenciado (panel derecho). El experimento se realizó en triplicados. Los datos se muestran como media \pm desviación estándar. *p-value<0.05, **p-value<0.001, ***p-value<0.0001.

8.2. MSI1 y miR-137 comparten blancos que están implicados en desarrollo, diferenciación y migración celular.

Para ampliar el potencial antagónico entre MSI1 y miR-137, generamos una lista de blancos de miR-137. En la lista se incluyeron los blancos identificados por Tamim *et al.* 2014 y Santos *et al.* 2016^{78,91}. Además, agregamos los blancos validados de miRTarBase¹²⁰. Después, comparamos la lista final de miR-137 con los blancos de las tres RBPs (MSI1, hnRNPH1 y IGF2BP3) y evaluamos la significancia de los blancos compartidos. El análisis mostró que miR-137 tiene en común más blancos con MSI1, que con hnRNPH1 y IGF2BP3 (**Tabla S1**).

Posteriormente, analizamos los niveles de expresión de los blancos compartidos MSI1/miR-137 en muestras de GBM, glioma de bajo grado (por sus siglas en inglés LGG) y tejido cerebral normal obtenidas del TCGA y el proyecto GTEx (siglas en inglés de Expresión del Genotipo en los Tejidos). Para los que observamos valores de expresión consistentes en cada grupo de muestra y determinamos que la gran mayoría de ellos están sobre-expresados en GBM en comparación con tejido cerebral normal y LGG (**Figure 5A, Tabla S7**).

Se realizó un análisis de ontología de genes (GO) para determinar los procesos celulares en los que participan los blancos MSI1/miR-137. El análisis reveló que los blancos participan en diferenciación, morfogénesis, desarrollo y migración (**Figura 5B, Tabla S4**). Además, el análisis de redes mostró que la mayoría de los genes blanco compartidos están altamente interconectados. Los nodos con mayor número de conexiones son SRC, EGFR, NRAS, PDGFR α y SP1 (**Figura 5C**).

Para ampliar el análisis de las dianas compartidos MSI1/miR-137, seleccionamos un conjunto de genes (FSTL1, STC1 y DCBLD2) con poca o ninguna información sobre su participación en la neurogénesis y el desarrollo de glioblastoma, y evaluamos por experimentos de siRNA *knockdown* su impacto en la proliferación de células de glioblastoma U251 y en diferenciación neuronal utilizando la línea celular de neuroblastoma BE-(2)-C como modelo. Los experimentos mostraron que el *knockdown* de DCBLD2 y STC1 disminuyen la proliferación celular, mientras que el *knockdown* de FSTL1 induce diferenciación neuronal (**Figura S2A-B**). El análisis de datos en el TCGA mostró que estos tres genes tienen altos niveles de expresión en glioblastoma en comparación con los grados II y III. Además, los pacientes con GBM con altos niveles de expresión de estos genes tienen mal pronóstico (**Figura S2C-D**). En general, estos resultados coinciden con la hipótesis de que los blancos compartidos MSI1/miR-137 están "activos" en células cancerosas y contribuyen a la tumorigénesis.

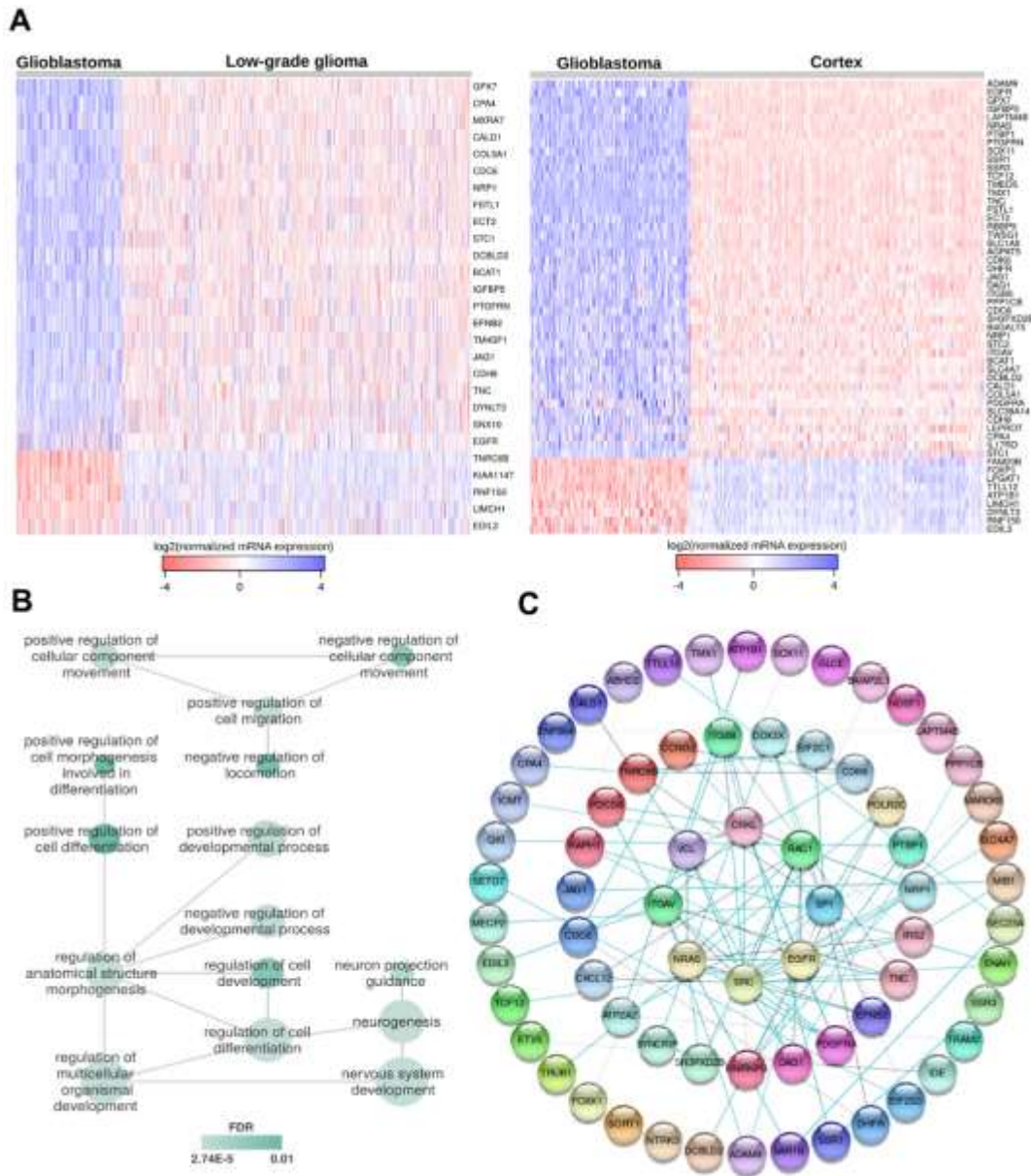


Figura 5 MS11 y miR-137 comparten blancos que participan en neurogénesis y gliomagenesis.

A) Mapa de calor que muestra la expresión de los blancos compartidos MS11/miR-137 en GBM vs LGG del TCGA y GBM vs corteza frontal sana del GTEx. Solamente se muestran los genes con valores de expresión consistente entre los grupos de muestras. **B)** Análisis de GO de los blancos compartidos MS11/miR-137. Se muestran las asociaciones más relevantes de los términos GO obtenidas en REVIGO¹²⁴. **C)** Red de interacción proteína-proteína obtenida en STRING¹²⁵, muestra las asociaciones entre los blancos comunes MS11-miR-137.

8.3. Impacto de MSI1 y miR-137 sobre sus blancos compartidos.

Considerando los papeles opuestos de MSI1 y miR-137 en neurogénesis y tumorigénesis, suponemos que la mayoría de los blancos compartidos estén regulados en direcciones opuestas. Para evaluar lo anterior, seleccionamos a PDGFR α , una de las proteínas con mayor número de conexiones en la red descrita anteriormente (**Figura 5C**). Inicialmente, MSI1 fue descrito como un represor traduccional²⁹, pero estudios posteriores demostraron su papel como activador traduccional. Uren *et al.* 2015 reportaron que el *Knockdown* de MSI1 afecta el perfil del mRNA de PDGFR α en gradientes polisomales, sugiriendo que MSI1 incrementa su traducción³⁴. Para corroborar si MSI1 afecta la traducción de PDGFR α , evaluamos la expresión de PDGFR α a nivel de mensajero por qRT-PCR y de la proteína por Western blot. Nuestros experimentos mostraron que el *knockdown* de MSI1 produce cambios mínimos a nivel de mRNA pero afecta drásticamente los niveles de la proteína PDGFR α (**Figura 6A**). Los cambios en los niveles de la proteína PDGFR α fueron corroborados en células U251/Msi1-KO (**Figura S2A**). El análisis del *Cross-linking and immunoprecipitation* (CLIP) publicado por Uren *et al.* 2015 indica que MSI1 tiene varios sitios de unión a lo largo del 3'-UTR de PDGFR α ³⁴ (**Figura 6B**). Para evaluar si MSI1 regula a PDGFR α a través de la región 3'-UTR preparamos cuatro reporteros de luciferasa, el primero contiene el 3'-UTR de PDGFR α completo y las tres restantes contienen fragmentos adyacentes llamadas R1 (del nucleótido 1 al 715), R2 (del nucleótido 716 al 1936) y R3 (del nucleótido 1937 al 2987). En los ensayos de luciferasa se observó un incremento de la actividad de luciferasa cuando el reportero 3'-UTR completo fue co-transectado con el vector de expresión de MSI1. En el caso de las clonas R2 y R3, la expresión de MSI1 produce solamente un incremento parcial de la actividad del reportero (**Figura 6B-C**). Además, se hicieron ensayos de interacción RNA-proteína (RNA-pull down) para determinar si Msi1 se une directamente al 3'-UTR de PDFR α . Las proteínas GST-Msi1 y GST (control) (**Figura S4**) se incubaron con los RNAs sentido y antisentido de la R2 del 3'-UTR (**Figura S5**). El experimento demuestra que MSI1 se une directamente al RNA sentido del 3'-UTR de PDGFR α (**Figura 6D**). Los

resultados anteriores sugieren que Msi1 regula la traducción de PDGFR α a través de su unión directa en la región 3'-UTR de PDGFR α .

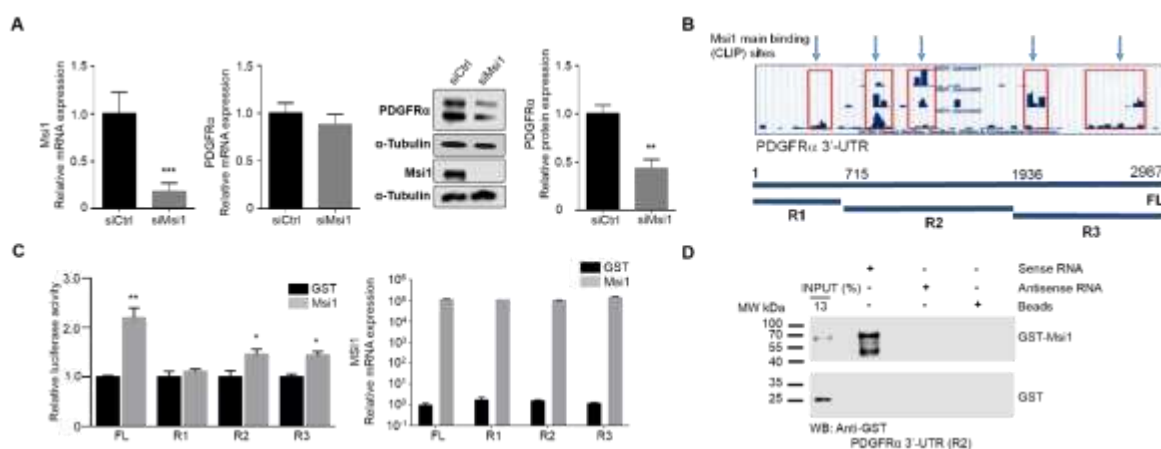


Figura 6 MSI1 promueve la expresión de PDGFR α vía unión al 3'-UTR.

A) Expresión de MSI1 y PDGFR α . Las células de GBM U251 fueron transfectadas con siRNAs contra MSI1. Después de 72 horas, la expresión de los transcritos se analizó qRT-PCR y por Western blot la expresión de las proteínas. GAPDH se utilizó como gen constitutivo para los experimentos de qRT-PCR y α -tubulina como control de carga en WB. En las dos condiciones, los niveles de mRNA de PDGFR α no varían por efecto de MSI1, sin embargo, la expresión de la proteína disminuye en ausencia de MSI1. **B)** Mapa del 3'-UTR de PDGFR α (FL). Se indican con flechas (azul claro) los posibles sitios de unión a Musashi1. Las líneas azules representan las construcciones con diferentes regiones del 3'-UTR de PDGFR α . La primera construcción comprende del nucleótido 1 al 715, la segunda del 716 al 1936 y la última de 1937 al 2987. **C)** Ensayos de luciferasa. Se realizaron cotransfecciones con pcDNA-MSI1 ó GST (control negativo) con el 3'-UTR completo (FL) y las tres regiones (R1, R2 y R3) en células HT1080 por triplicado. Los valores son expresados como la actividad normalizada de luciferasa (media \pm la desviación estándar) y se analizaron con la prueba estadística t-Student comparando la expresión de luciferasa del vector con el 3'-UTR de PDGFR α en presencia de Musashi1 con el control de GST. **D)** Ensayo de interacción MSI1 y R2 del 3'-UTR. 30 μ g de proteína GST-Msi1 y GST (control) se incubaron con 50 pmol de RNA sentido y antisentido. La interacción se reveló por WB, usando el anticuerpo monoclonal de ratón anti-GST.

El 3'-UTR del mRNA de PDGFR α también contiene sitios de unión para un gran número de miRNAs. Interesantemente, miR-128 y miR-137, que también son reguladores de MSI1, tienen sitios conservados en el 3'-UTR de PDGFR α (**Figura 7A**). Para evaluar si el mRNA de PDGFR α es blanco de esos miRNAs se

transfectaron células de GBM con miR-128, miR-137 y miR-Control. La expresión de PDGFR α a nivel de mRNA y proteína se realizó por qRT-PCR y Western blot, respectivamente. El análisis mostró una reducción significativa en los niveles del mensajero y de la proteína PDGFR α (**Figura 7B**), el mismo resultado se confirmó en la línea celular T98G (glioblastoma) (**Figura S6**). Para validar la regulación por microRNAs se realizaron ensayos de luciferasa. Se co-transfectaron los miRNAs con el vector de luciferasa que contiene el 3'-UTR íntegro (3'-UTR WT) y los 3'-UTR sin sitios de regulación por miR-128 (Δ miR-128) y miR-137 (Δ miR-137). En los experimentos se observó reducción de la actividad de luciferasa cuando el 3'-UTR WT fue co-transfectado con mimics miR-128 o miR-137. Sin embargo, en las transfecciones con los reporteros carentes de los sitios de regulación, miR-128 no es capaz de inhibir la actividad del reportero mientras que la actividad disminuye por efecto de miR-137, comparados con sus respectivos controles (**Figura 7C**). Además, corroboramos que MSI1 ejerce su efecto positivo sobre PDGFR α independientemente de la presencia de los sitios de unión de miR-128 y miR-137, refutando la idea de que la regulación de MSI1 ocurre vía la inhibición de los miRNAs (**Figura S6**).

Para seguir explorando nuestro modelo antagónico, evaluamos un grupo de blancos MSI1/miR-137 (EGFR, NEFL1, NRAS, ECT2 y CDC6) por western blot. Células de GBM U251 fueron transfectadas con siRNAs contra MSI1 (siMsi1) o miR-137 y los cambios a nivel de proteína fueron evaluados después de 48 horas. El tratamiento con siMsi1 o miR-137 disminuye la expresión de proteínas, sugiriendo que la expresión de sus transcritos son reprimidos por miR-137 y activados por MSI1 (**Figura 8A-E**). Para confirmar que el efecto que tiene miR-137 sobre los blancos compartidos con MSI1 es directo y no depende de la inhibición de MSI1, realizamos experimentos en células U251 MSI1 KO ²¹. Las células U251 normales y U251 MSI1 KO fueron transfectadas con un mimic control o miR-137. Posteriormente, se midió el impacto de miR-137 sobre los mensajeros compartidos con MSI1 por qRT-PCR. En todos los casos analizados, se observó una reducción de los niveles de los transcritos por efecto de miR-137 y en todos los casos los niveles de represión entre las células U251 y las MSI1 KO fueron similares (**Figura S7**).

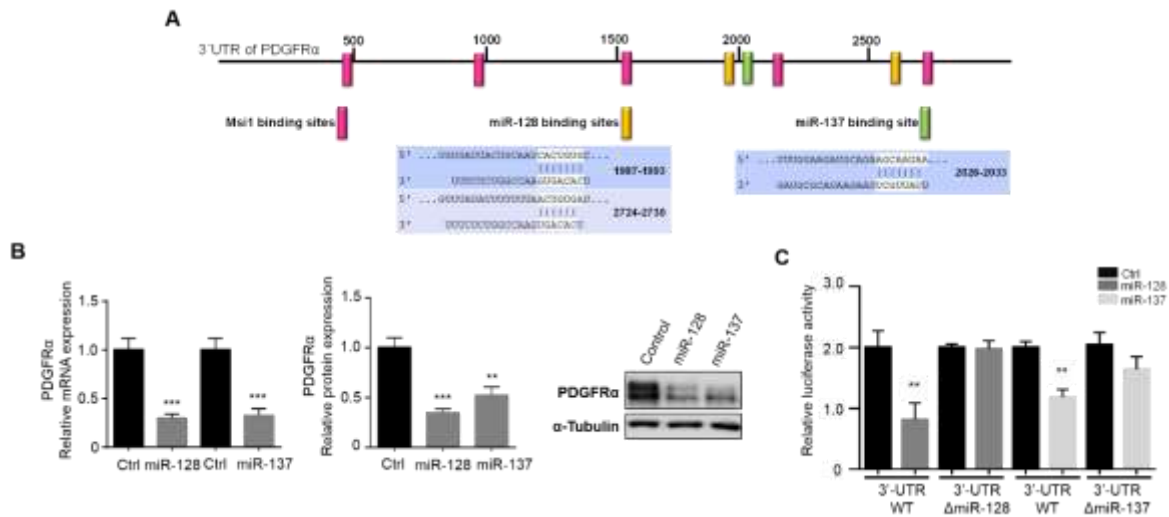


Figura 7 miR-128 y -137 reducen la expresión de PDGFR α .

A) Esquema del 3'-UTR de PDGFR α . Se muestran los sitios de unión de MsiI en color rosa y los sitios de interacción de los microRNAs en amarillo y verde para miR-128 y -137, respectivamente.

B) Niveles de expresión de mensajero y de la proteína PDGFR α . Las células U251 se transfectaron con los miR-control (Ctrl), miR-128y -137. Los niveles del mRNA de PDGFR α se analizaron por el método de 2- $\Delta\Delta$ Ct usando los niveles del mRNA de GAPDH como control endógeno. La expresión de la proteína se analizó por Western blot, usando α -Tubulin como control de carga.

C) Ensayos de luciferasa. Células HT1080 fueron transfectadas con el vector reportero y el 3'-UTR de PDGFR α que tiene los sitios putativos de los miRNAs y el vector reportero carente de estos. La actividad de lucíferasa se evaluó después de 48 horas. Los datos fueron analizados con la prueba de t-Student, comparando los niveles del mRNA del transfectados con el mimic y el miRNA control. Los datos se muestran como la media \pm la desviación estándar. **p-value<0.001, ***p-value<0.0001.

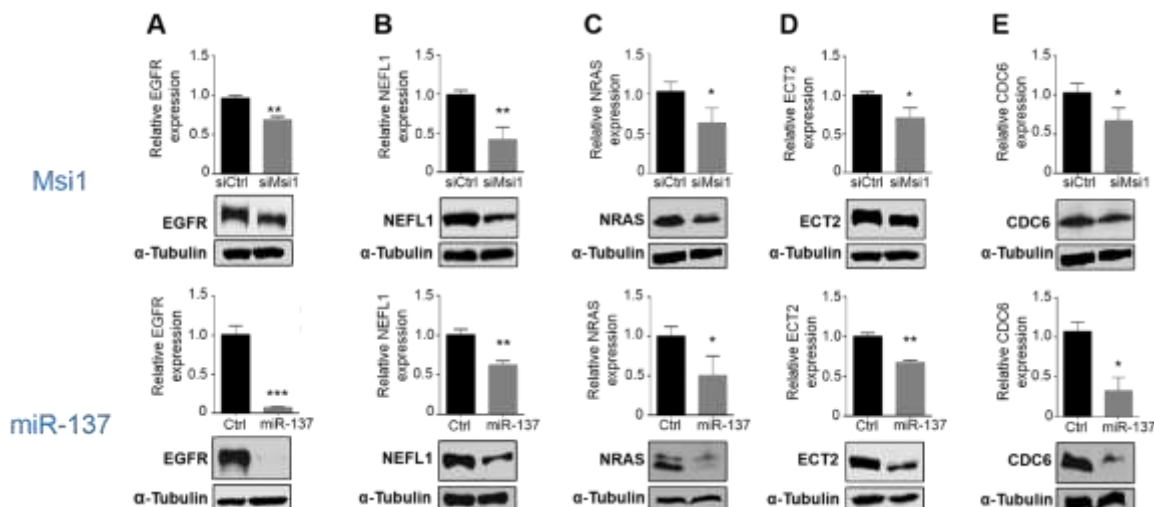


Figura 8 MSI1 y miR-137 tiene efectos regulatorios opuestos sobre la expresión de sus blancos compartidos.

A-E) Análisis de expresión de las proteínas EGFR, NEFL1, NRAS, ECT2 y CDC6. Las células U251 fueron transfectadas con un siRNAs contra MSI1 (*siMSI1*) o un siRNA control (*siCtrl*) (panel superior) y con un mimic control (*Ctrl*) y miR-137 (panel inferior). α -Tubulin fue usada como control de carga. MSI1 y miR-137 tienen efectos opuestos sobre la expresión de sus blancos compartidos. Los datos fueron analizados usando la t-Student y se muestran como la media \pm la desviación estándar. *p-value<0.05, **p-value<0.001, ***p-value<0.0001.

8.4. Modelo antagónico RBP-miRNA y su importante alcance en neurogénesis y gliomagénesis.

Para dar soporte a nuestro modelo de antagonismo entre MSI1 y miR-137, se evaluó si MSI1 era capaz de contrarrestar o disminuir el efecto de miR-137 sobre la proliferación y diferenciación celular. Las células U251 fueron transfectadas e infectadas de la siguiente manera: 1) un vector control y un *mimic* control, 2) vector control y miR-137, 3) Vector que expresa a MSI1 y *mimic* control, y 4) miR-137 y el vector que expresa a MSI1. En los experimentos se observó que las células transfectadas con miR-137 reducen significativamente su proliferación. Sin embargo, cuando las células son también infectadas con la construcción lentiviral que contiene la secuencia codificante de MSI1, el efecto negativo de miR-137 sobre

la proliferación celular fue totalmente neutralizada por MSI1 (**Figura 9A**). Además, usamos la línea celular de neuroblastoma BE-(2)-C como modelo para evaluar el impacto de miR-137 contra MSI1 sobre la diferenciación neuronal. Las células fueron transfectadas e infectadas con las mismas condiciones del experimento anterior. Después de 5 días, se midió el crecimiento de las neuritas como un indicador de diferenciación. miR-137 efectivamente induce la formación de neuritas pero el efecto es disminuido por la presencia de MSI1 (**Figura 9B**).

Con base en los resultados anteriores sugerimos que la regulación negativa de miR-137 puede ser un evento clave que incrementa la expresión de MSI1, promoviendo la troncalidad (*stemness*) de las células y la activación oncogénica en gliomas (**Figura 10**).

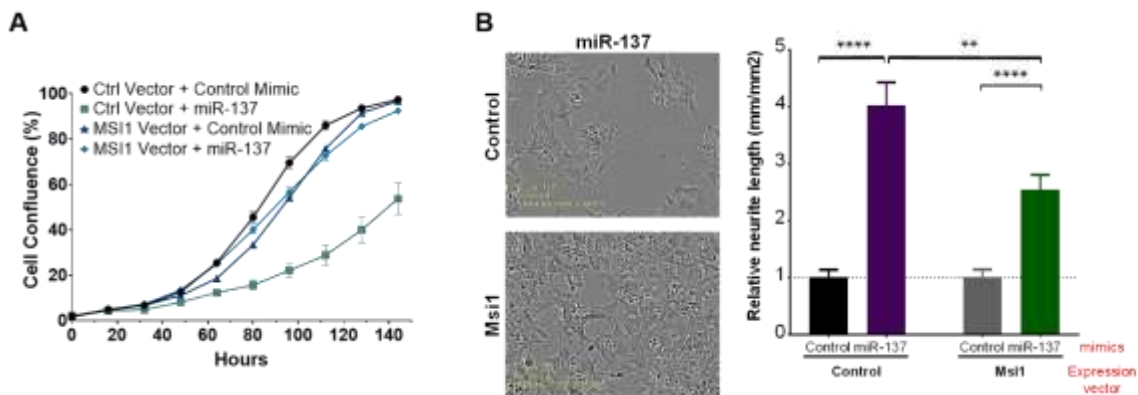


Figura 9 MSI1 y miR-137 tienen efectos opuestos sobre la proliferación y diferenciación celular.

A) Curvas de proliferación celular. Las células u251 fueron transfectadas e infectadas de la siguiente manera: 1) vector control y *mimic control*; 2) vector control y *miR-137*; 3) Vector que expresa a *MSI1* y *mimic control*; y 4) *miR-137* y el vector que expresa a *MSI1*. Se realizaron réplicas del experimento tanto biológicas como técnicas. MSI1 contrarresta el efecto represor de miR-137. **B)** Ensayo de diferenciación neuronal. Las células BE(2)C fueron transfectadas con combinaciones de miRNAs y vectores de expresión (se muestran en la figura) y el impacto de esas moléculas en la diferenciación fueron medidas por 5 días en el sistema IncuCyte. Las imágenes de la izquierda muestran el aspecto de las células diferenciadas. Las gráficas (derecha) muestran el crecimiento relativo en cada condición de transfección. Se realizaron duplicados biológicos y cuadruplicados técnicos del experimento. Los datos fueron analizados usando la t-Student y se muestran como la media \pm la desviación estándar. **p-value<0.001, ****p-value<0.0001.

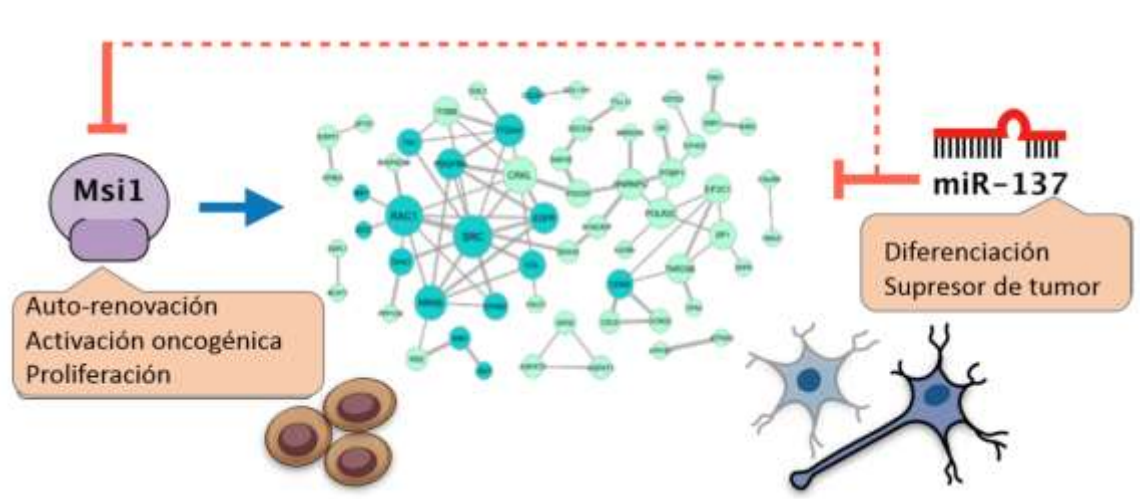


Figura 10 Modelo de regulación antagonista entre MSI1 y miR-137.

En este modelo, miR-137 promueve diferenciación (represión tumoral) por medio de dos vías posibles. La primera, a través de inhibir directamente a MSI1 y la segunda por reprimir la expresión de los blancos compartidos con MSI1. Por otro lado, MSI1 tiene un impacto positivo en la expresión de las dianas que participan en auto-renovación, proliferación y tumorigénesis.

9. DISCUSIÓN

Los miRNAs fueron identificados como reguladores negativos de mRNAs y no se sabe con certeza si su efecto inhibitorio puede ser revertido efectivamente por otros factores, como las RBPs. Cientos de RBPs son expresadas en la célula y varias de ellas interactúan, al igual que los microRNAs, con el 3'-UTR de los mensajeros y regulando así su expresión¹³⁰. Considerando que los 3'-UTR de los transcritos de mamíferos pueden ser tan largos como 10 o más kilobases y pueden asociarse con diferentes miRNAs y RBPs, se puede inferir que existe una interacción compleja entre estas dos clases de reguladores que interactúan con el 3'-UTR.

Las RBPs son expresadas en patrones y regiones específicos durante el desarrollo cerebral, lo que sugiere que son cruciales en el establecimiento de funciones específicas de cada tipo celular¹³¹. Una RBP de particular interés es Musashi1, considerada un marcador de células troncales neuronales¹³². MSI1 reprime la expresión de doblecortina (*dcx*), evitando la migración inadecuada de las NSCs *in vivo*³¹. MSI1 es regulada por un grupo de microRNAs (34a, miR-101, miR-128, miR-137 and miR-138)¹¹⁸, que también participan en la interesante intersección de neurogénesis y desarrollo tumoral. Estos microRNAs promueven diferenciación neuronal y sufren cambios drásticos en su expresión durante ese proceso^{91,133,134}.

En GBM, se han reportado bajos niveles de expresión de esos microRNAs comparados con tejido normal, y su transfección afecta el fenotipo de las células cancerosas^{78,98,135-141}. Con base en lo anterior, nos preguntamos si existe una relación más compleja entre esos microRNAs y MSI1, dada por sus funciones antagónicas sobre sus transcritos blancos en neurogénesis y el desarrollo de gliomas. Para evaluar lo anterior, obtuvimos de TargetScan¹¹⁹ las listas de los blancos de cada microRNA y la comparamos con la lista de los blancos de MSI1. Como esperábamos estos miRNAs comparten un gran número de blancos con MSI1, que son estadísticamente significativos, pero miR-137 comparte 141 blancos con la RBP de interés. Entre los miRNAs, miR-137 comparte el mayor número de blancos con MSI1 y es el único entre el grupo de microRNAs que está altamente

conservado entre vertebrados y el género *Drosophila* (Figura 4A). Diferentes estudios sugieren que miR-137 es una figura importante en la red de regulación de los procesos de neuro-desarrollo y cáncer.

Con base en lo anterior, decidimos enfocarnos en estudiar cómo la interacción de miR-137 y MSI1 impactan en la neurogénesis y desarrollo de tumores. En cáncer, miR-137 se ha definido como un supresor de tumor en varios tipos de tumores, incluidos los gliomas^{76,142-145}. En gliomas, los niveles de miR-137 predicen la sobrevivencia de los pacientes y la transfección del mimic miR-137 disminuye proliferación, invasión y crecimientos de células de glioma^{77,78,97}.

Para confirmar el papel que desempeñan nuestras moléculas de interés en neurogénesis, evaluamos la expresión de MSI1 durante ese proceso. Los resultados indican que la expresión de MSI1 disminuye durante la neurogénesis (Figura 4B), mostrando un perfil opuesto a lo descrito para miR-137⁹¹. Además, confirmamos que MSI1 se expresa principalmente en la zona subventricular (SVZ), donde la auto-renovación y proliferación de las células troncales esta activa, mientras que en tejido diferenciado, como el estriatum (STM) donde se han encontrado altos niveles de miR-137⁹¹, son bajos (Figura 4C). Santos *et al.* 2016 reportó que la transfección del mimic miR-137 en NSCs disminuye su capacidad de auto-renovación y proliferación. Nosotros realizamos un análisis similar con MSI1, en el que observamos que el *knockdown* de MSI1 disminuye la proliferación de NSCs comparado con los controles (Figura 4D), e incrementa el número de neuronas cuando se induce la diferenciación de las NSCs (Figura 1E). De igual manera, el análisis de expresión de muestras de gliomas del *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) muestra que MSI1 y miR-137 tienen patrones de expresión opuestos y que estos patrones están altamente correlacionados (Figura S1). Estos resultados sustentan la hipótesis de que miR-137 podría ser un regulador importante de la expresión de MSI1.

Para darle mayor fuerza a la observación de que existe una regulación antagónica entre MSI1 y miR137, la comparación de los blancos de miR-137 con las listas de otras RBPs, como hnRNPH1 y IGF2BP3, reveló que miR-137 tiene un mayor número de blancos compartidos con MSI1 comparado con las otras RBPs.

Por otro lado, el análisis de expresión de las dianas compartidas MSI1/miR-137 en muestras de GBM y glioma de bajo grado (LGG) obtenidas del TCGA y GTEx, mostró que la mayoría de los blancos están sobre-expresados en GBM comparado con tejido cerebral normal y LGG.

La ontología de genes y el análisis de vías mostró que los blancos compartidos MSI1/miR-137 preferencialmente participan en diferenciación, morfogénesis, desarrollo y migración (Figura 5B, Tabla S4). Además, el análisis de redes mostró que la gran mayoría de los blancos están altamente interconectados. Los nodos con mayor número de conexiones son SRC, EGFR, NRAs, PDGFR α y SP1 (Figura 2C). Curiosamente, estos cinco genes son clave en neurogénesis y gliomagénesis. EGFR y PDGFR α son receptores de tirosina cinasa que están sobre-expresados en GBM ¹⁴⁶. En la zona subventricular, donde la neurogénesis persiste hasta la edad adulta, el EGFR contribuye al mantenimiento de células progenitoras neuronales (NPC), afectando su proliferación y migración ¹⁴⁷. Diferentes tipos de isoformas y mutaciones de EGFR se han reportado varios tumores ^{148,149}. PDGFR α es necesario durante el desarrollo embrionario, particularmente en el desarrollo del cerebro. Ratones que no expresan PDGFR α presentan defectos en el sistema nervioso con anomalías en el tubo neural y cerebro¹⁵⁰. Por otro lado, se han relacionado los niveles de expresión de PDGFR α con el aumento de la proliferación de células de glioblastoma y el mal pronóstico para los pacientes ^{151,152}. SRC es miembro de la familia Src (SFKs), interactúa con varios receptores de superficie celular incluidos EGFR y PDGFR α ¹⁵³. Inhibidores de SRC se han estudiado en el tratamiento de GBM ¹⁵⁴. NRAS, es miembro de la familia de proto-oncogenes RAS, es una GTPase que esta frecuentemente mutada en tumores y se sabe que promueve proliferación celular e inhibe apoptosis ¹⁵⁵. SP1 es un factor de transcripción que regula la expresión de un gran número de genes que están implicados en crecimiento celular, diferenciación, apoptosis y desarrollo de tumores. Debido al aumento de su expresión en tumores, se ha propuesto a SP1 como estrategia terapéutica ¹⁵⁶.

Continuando con el estudio de los blancos MSI1/miR-137, seleccionamos un grupo de dianas (FSTL1, PTGRFN, STC1, CDH6, DCBLD2) con antecedentes en

neurogénesis y desarrollo de GBM, y evaluamos por siRNA *knockdown* su impacto en proliferación y diferenciación usando las líneas celulares de GBM U251 y neuroblastoma BE-(2)-C, respectivamente. Los experimentos mostraron que la ausencia de DCBLD2 y STC1 disminuye proliferación celular, mientras que el *knockdown* de FSRL1 induce diferenciación neuronal. Discoidin, CUB and LCCL domain containing 2 (DCBLD2) es un receptor tirosina cinasa que está altamente expresado en varios tumores y está ligado a invasión y mal pronóstico ^{157–160}. Stanniocalcin-1 (STC1) es una glicoproteína secretora que se ha asociado a quimioresistencia, metástasis e incremento de la proliferación en varios tipos de tumores incluidos cáncer gástrico y colorectal, carcinoma hepatocelular y leucemia mieloide ^{161–164}, en glioblastoma esta proteína funciona como estimulador de los rasgos de troncalidad de las células ¹⁶⁵. Follistatin-like 1 (FSTL1) es una glicoproteína implicada en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, cáncer y artritis ¹⁶⁶. El análisis de estos genes en el TCGA muestra altos niveles de expresión en GBM (grado IV) en comparación con los grados II y III. Además, los pacientes con GBM que tienen altos niveles expresión de estos genes tienen mal pronóstico. En resumen, los resultados anteriores sustentan la hipótesis de que los blancos compartidos MSI1/miR-137 están activados en células cancerosas y contribuyen a la tumorigénesis.

Considerando los papeles opuestos de MSI1 y miR-137 en neurogénesis y tumorigénesis, esperaríamos que las dianas compartidas estuvieran reguladas en direcciones opuestas. Para evaluar lo anterior, elegimos a PDGFR α , una de las proteínas con mayor número de conexiones de la red proteína-proteína. MSI1 fue inicialmente descrita como un represor de traducción ¹⁶⁷, posteriormente se demostró su función como activador traduccional y su participación en degradación, *splicing* y poliadenilación de mensajeros ^{168,169}. Uren *et al.* 2015, reportó que el *knockdown* de MSI1 afecta el perfil del mRNA de PDGFR α en gradiente polisomales, sugiriendo que MSI1 incrementa su traducción ³⁴. En apoyo a lo anterior, nosotros reportamos que el *knockdown* de MSI1 produce cambios mínimos a nivel de mRNA pero afecta drásticamente los niveles de la proteína PDGFR α (Figura 6A). También corroboramos los cambios de los niveles proteicos en células

U251 MSI1 KO (Figura S3). Diferentes grupos de trabajo han reportado que MSI1 regula la expresión de sus blancos a través de la región 3'-UTR ¹⁶⁹. El análisis del CLIP del 3'-UTR de PDGFR α reportado por Uren *et al.* 2015, indica que MSI1 tiene varios sitios de unión a lo largo del 3'-UTR (Figura 6B). Para evaluar si MSI1 regula a PDGFR α de la misma manera, se co-transfectó el vector que expresa MSI1 con reporteros de luciferasa con el 3'-UTR de PDGFR α completo y regiones adyacentes del mismo, llamadas R1, R2 y R3. Los ensayos mostraron que la expresión transgénica de MSI1 aumenta la actividad de luciferasa cuando se transfecta el reportero con el 3'-UTR completo; en el caso de las clonas R2 y R3 se observa solo un incremento parcial de la actividad de luciferasa (Figura 6C). Además, corroboramos la interacción directa de MSI1 con el 3'-UTR de PDGFR α por medio de ensayos de *RNA-pulldown*. Estos resultados sugieren que la unión de MSI1 a los diferentes sitios a lo largo del 3'-UTR es necesario para regular adecuadamente la expresión de PDGFR α .

El 3'-UTR de PDGFR α contiene posibles sitios de unión para varios de miRNAs, entre ellos resaltan miR-128 y miR-137, dos reguladores reportados para MSI1 ¹¹⁸. Por medio de qRT-PCR y Western blot confirmamos que miR-128 y -137 disminuyen los niveles del mensajero y de la proteína PDGFR α en células de GBM. También, validamos la regulación por medio de ensayos de luciferasa, usamos el reportero de luciferasa con el 3'-UTR de PDGFR α íntegro y preparamos construcciones que carecen de los sitios de regulación de miR-128 y miR-137. Los experimentos mostraron una reducción significativa en la actividad de luciferasa cuando el reportero con el 3'-UTR íntegro se co-transfectó con miR-128 o miR-137. Para validar la especificidad de unión de miR-128 y miR-137 a los posibles sitios de unión identificados, se co-transfectaron los miRNAs con los reporteros de luciferasa que carecen de los sitios de regulación de los microRNAs observándose que miR-128 no fue capaz de inhibir la expresión del reportero, mientras que el efecto disminuye en el caso de miR-137, comparados con sus controles correspondientes.

Se podría argumentar que el impacto positivo de MSI1 en la expresión de PDGFR α se podría deber a la represión ejercida por miR-128 y -137 sobre sus

secuencias diana. Esta posibilidad es muy poco probable ya que típicamente miR-128 y -137 muestran niveles muy bajos de expresión en GBM. En cualquier caso, realizamos ensayos de luciferasa utilizando construcciones que carecen de los sitios de unión para miR-128 y -137. La eliminación de los sitios de unión miR-128 o miR-137 no afectó el efecto positivo de MSI1 en la expresión del vector de luciferasa; los valores de la actividad de luciferasa fueron muy similares a los obtenidos con la construcción UTR completo (Figura 7). Los ensayos anteriores demuestran que MSI1 y miR-137 tienen efectos antagónicos sobre sus dianas compartidas.

Para probar aún más nuestro modelo antagónico, evaluamos un blancos compartidos MSI1/miR-137 por Western Blot. Las células de GBM U251 se transfectaron con siRNAs contra MSI1 o miR-137 y los cambios en los niveles de proteína se midieron 48 horas después. El tratamiento con siRNAs contra MSI1 o miR-137 disminuye la expresión de proteínas, lo que sugiere que la transcripción de las dianas es reprimida por miR-137 y activadas por Msi1.

Para eliminar la posibilidad de que la represión por miR-137 podría depender de la inhibición de MSI1, se realizaron experimentos en la línea U251 MSI1 KO ²¹. Las células U251 normales y U251 MSI1 KO fueron transfectadas con el mimic control o miR-137, y el impacto de estos sobre los niveles de los mensajeros MSI1/miR-137 se evaluó por qRT-PCR. En todos los casos analizados, se observó una reducción en los niveles del mRNA por efecto de miR-137, y los niveles de represión fueron muy similares entre ambas líneas celulares.

La expresión ectópica de miR-137 en células de GBM rompe con varios fenotipos de las células cancerosas ^{78,98}. Resultados similares se observaron en ausencia de MSI1 ³⁴. Para dar soporte a nuestro modelo antagónico entre MSI1 y miR-137, determinamos que MSI1 es capaz de contrarrestar o disminuir el efecto de miR-137 sobre la proliferación y diferenciación celular. Niveles bajos de miR-137 se han observado en varios tipos de cáncer, incluido glioblastoma, como resultado de la hipermetilación de su promotor ^{76,143,170,171}. En este trabajo sugerimos que la regulación negativa sobre miR-137 puede ser un evento importante para

incrementar al expresión de MSI1 y sus blancos compartidos en células de glioma, promoviendo así la troncalidad y la activación oncogénica en la célula.

10. CONCLUSIÓN

Estudios recientes han reportado que las RBPs y los microRNAs funcionan coordinadamente entre sí para controlar la regulación post-transcripcional. Sin embargo, la mayoría de esos trabajos se han centrado en estudiar el efecto regulador de las RBP o miRNAs de forma individual o bien evalúan el impacto que tienen sobre un blanco en común. En este trabajo, evaluamos el efecto de ambos reguladores sobre un grupo de genes blancos comunes. Además, decidimos estudiar la asociación MSI1/miR-137, debido a que MSI1 es regulado por miR-137, el cual es el único entre los miRNAs estudiados que está altamente conservado, lo que sugiere que la regulación de MSI1 por miR-137 es un factor clave en el balance entre la auto-renovación y la diferenciación celular. Nuestros resultados demuestran que MSI1 y miR-137 regulan de forma opuesta la expresión de EGFR, NEFL1, NRAS, ECT2 y CDC6, genes importantes en la carcinogénesis. Además, demostramos que MSI1 es capaz de neutralizar el efecto anti-proliferativo y de disminuir el crecimiento de neuritas inducidas por miR-137.

En resumen, concluimos que MSI1 y miR-137 modulan las decisiones del destino celular actuando principalmente en una red de genes blanco comunes. En nuestro modelo antagónico, miR-137 impulsa la diferenciación (supresión tumoral) usando un interruptor doble negativo. Primero, por inhibición directa de MSI1 y segundo, reprimiendo la expresión de sus blancos compartidos. Por otro lado, el impacto positivo de MSI1 en la expresión de las dianas compartidas es fundamental para su función en auto-renovación y proliferación (activación oncogénica). Sin embargo, aún es necesario realizar estudios funcionales para identificar a los mediadores principales de nuestro modelo de regulación que determinan la participación de MSI1 y miR-137 en neurogénesis, auto-renovación y desarrollo de tumores cerebrales.

11. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

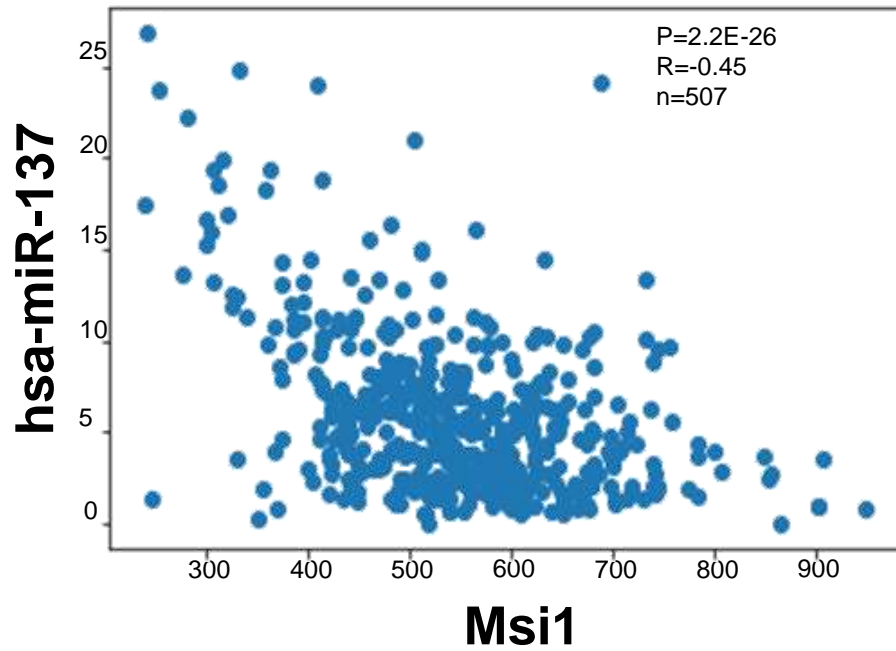


Figura S 1 Msi1 y miR-137 tienen perfiles de expresión diferentes en gliomas.

Análisis de co-relación inversa entre los niveles de expresión de MSI1 y miR-137 en gliomas ($r=-0.45$, $p\text{-value } 2.2 \times 10^{-26}$, $n=508$). * $p\text{-value} < 0.05$, ** $p\text{-value} < 0.001$.

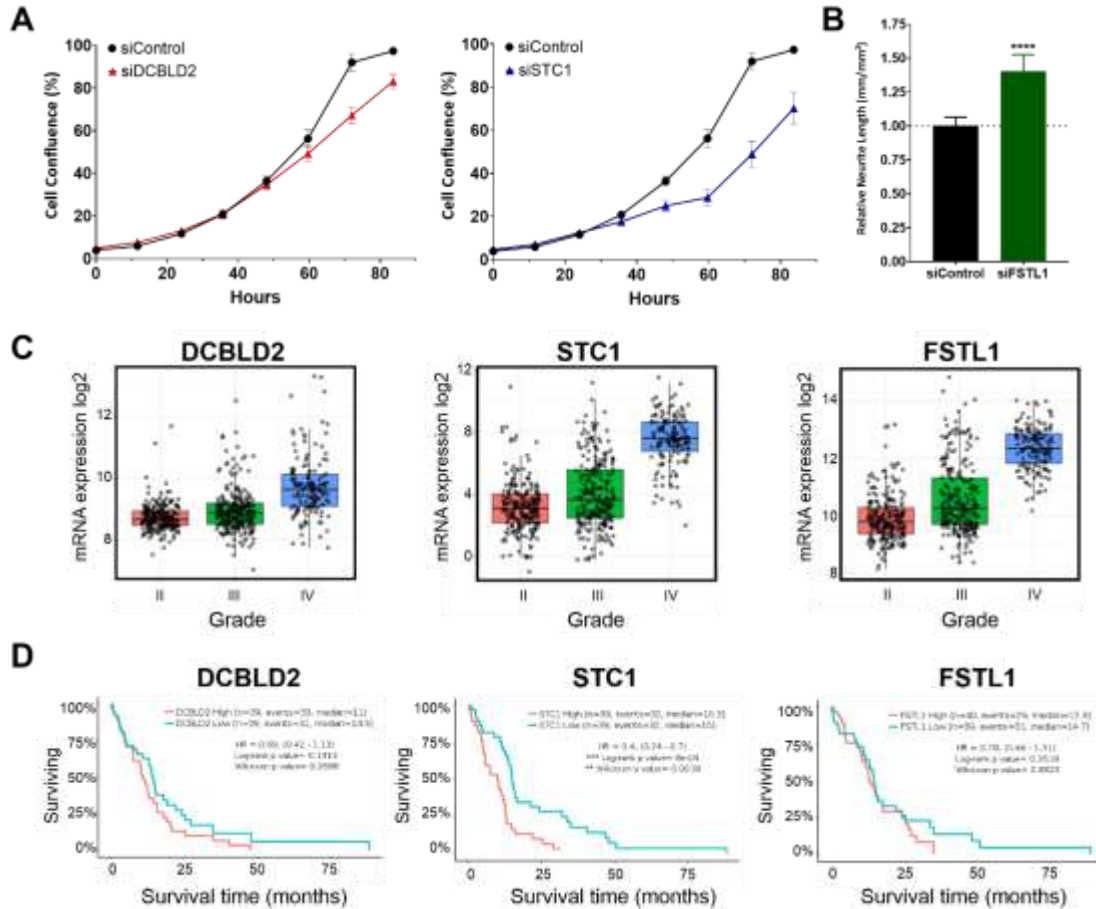


Figura S 2 Impacto de los blancos compartidos entre MSI1 y miR-137.

A) Curvas de crecimiento obtenidas con el sistema de imágenes de IncuCyte. Las células U251 fueron transfectadas con los siRNAs contra *DCBLD2* y *STC1* y el siRNA control. El experimento se realizó con duplicados biológicos y cuadruplicados técnicos. **B)** Ensayo de diferenciación celular. Las células BE(2)C fueron transfectadas con el control y el siRNA contra *FSTL1* y el impacto en la diferenciación (crecimiento de neurítico) se midió cinco días después en el sistema IncuCyte. Las gráficas muestran el crecimiento de neuronas en cada condición. El experimento se realizó con duplicados biológicos y cuadruplicados técnicos. Los datos fueron analizados usando *t*-Student y son presentados como la media \pm desviación estándar ***p-value<0.0001. **C)** Niveles de expresión de *DCBLD2*, *STC1*, *FSTL1* en gliomas (grado II, III y IV). **D)** Gráficas de supervivencia de pacientes con GBM que expresan *DCBLD2*, *STC1*, *FSTL1* (alto/rojo vs bajo/azul) del TCGA. Las gráficas fueron generadas usando la herramienta GlioVis ¹²⁷.

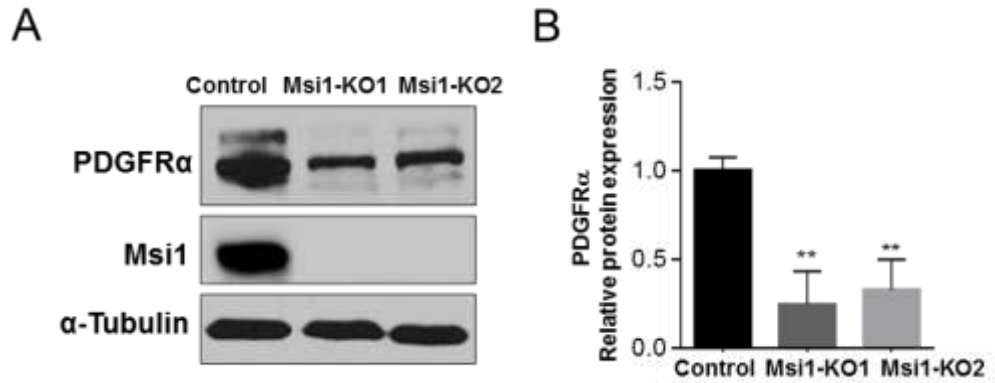


Figura S 3 Expresión de PDGFRα en células MSI1-Knockout.

A) Análisis de expresión de las proteínas MSI1 y PDGFRα por Western blot en células U251 *MSI-KO*. α-Tubulin fue usada como control de carga. La expresión de *PDGFRα* es menor en las células *MSI1-KO* comparado con las células control. **B)** Análisis densitométrico del Western blot del panel A. Se observa una disminución significativa de los niveles de PDGFRα en las células *MSI1-KO*. El experimento se realizó en triplicados. **p-value<0.001.

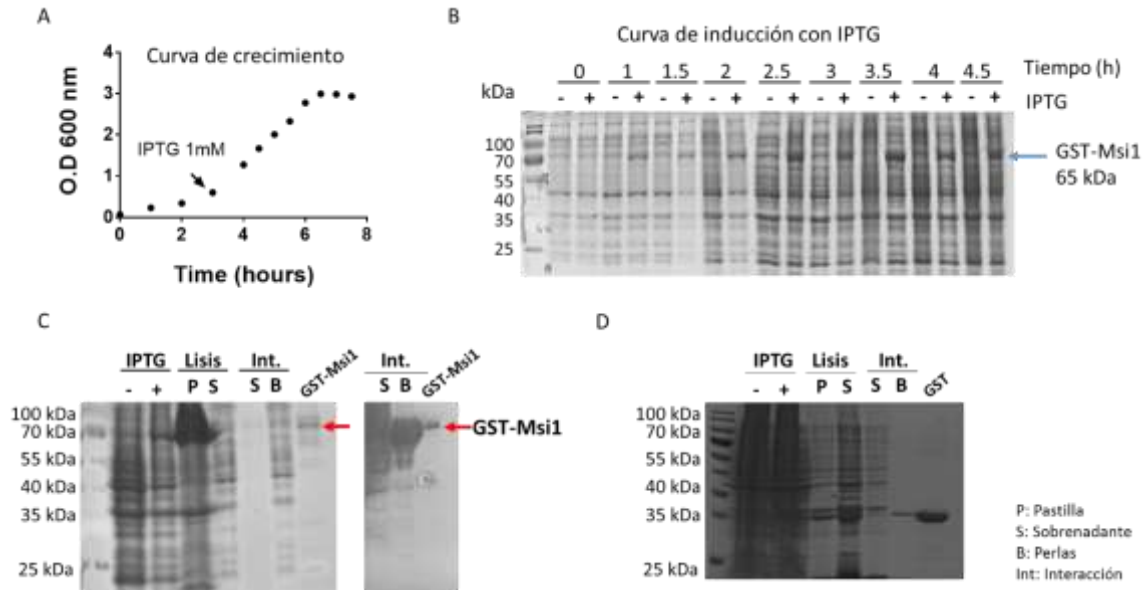


Figura S 4 Expresión y purificación de las proteínas GST y GST-Msi1.

A) Curva de crecimiento de las bacterias BL21/GST-Msi1. La expresión de la proteína recombinante *GST-Msi1* se indujo la con IPTG 1mM, cuando el cultivo alcanzó densidad óptica (O.D) de 0.6, usando como control un cultivo sin inducir. Se tomó 1mL de los cultivos cada 30 minutos de incubación para su análisis. **B)** Curva de inducción de *GST-Msi1* con IPTG. La expresión de la proteína recombinante GST-Msi1 se analizó en geles de acrilamida teñidos con azul de Coomassie. **C)** Purificación de la proteína GST-Msi1. En los geles se observa la obtención de la proteína *GST-Msi1* (65 kDa). **D)** Purificación de la proteína GST.

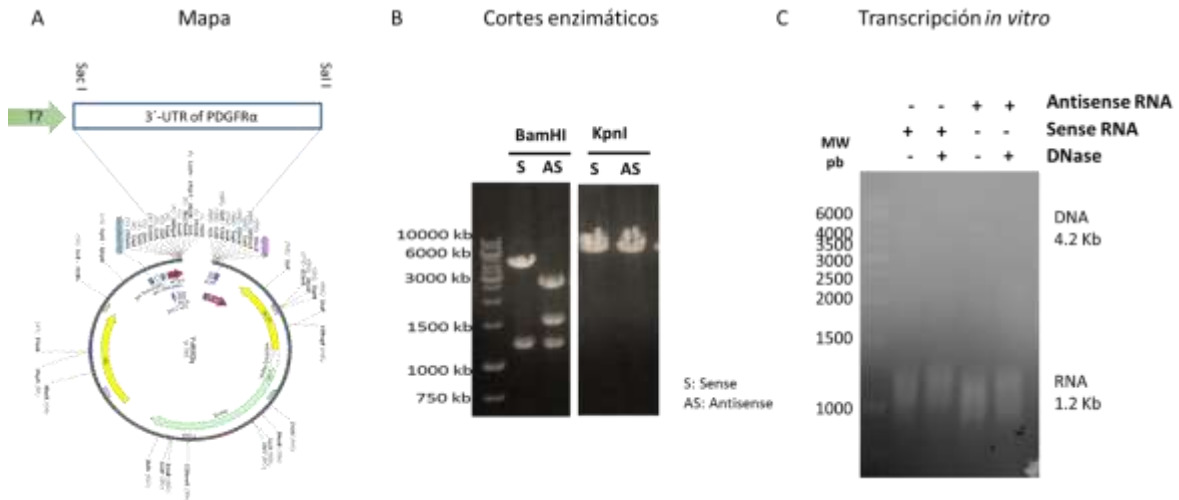


Figura S 5 Clonación del 3'-UTR de PDGFR α en el vector pTZ57R/T y transcripción *in vitro*.

(A). Mapa de los vectores 3'-UTR-PDGFR α _R2SENSE/TPZ57R y 3'-UTR-PDGFR α _R2ANTISENSE/TPZ57R. (B). corrimiento electroforético del corte de los vectores con las enzimas BamHI y KpnI. (C). Corrimiento electroforético de los RNA sentido y antisentido sintetizados en las reacciones de transcripción bajo condiciones desnaturalizantes.

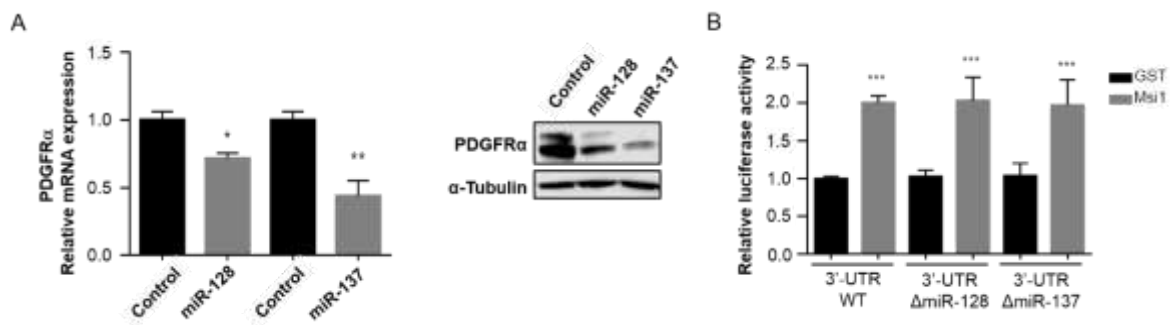


Figura S 6 PDGFR α es regulado por miR-128, miR-137 y MSI1.

A) Análisis de expresión del mRNA (izquierda) y proteínas (derecha) de PDGFR α en células T98G. B) Ensayo de luciferasa. El ensayo se realizó con los vectores reporteros que tiene el 3'-UTR de PDGFR α integro (WT) y las construcciones que carecen de los sitios de regulación de los microRNAs (Δ miR-128 y Δ miR-137). Los resultados muestran que el efecto positivo de MSI1 impacta en la expresión de PDGFR α independientemente de la presencia de los sitios de unión de los microRNAs. Los experimentos se realizaron por triplicado. *p-value<0.05, **p-value<0.001.

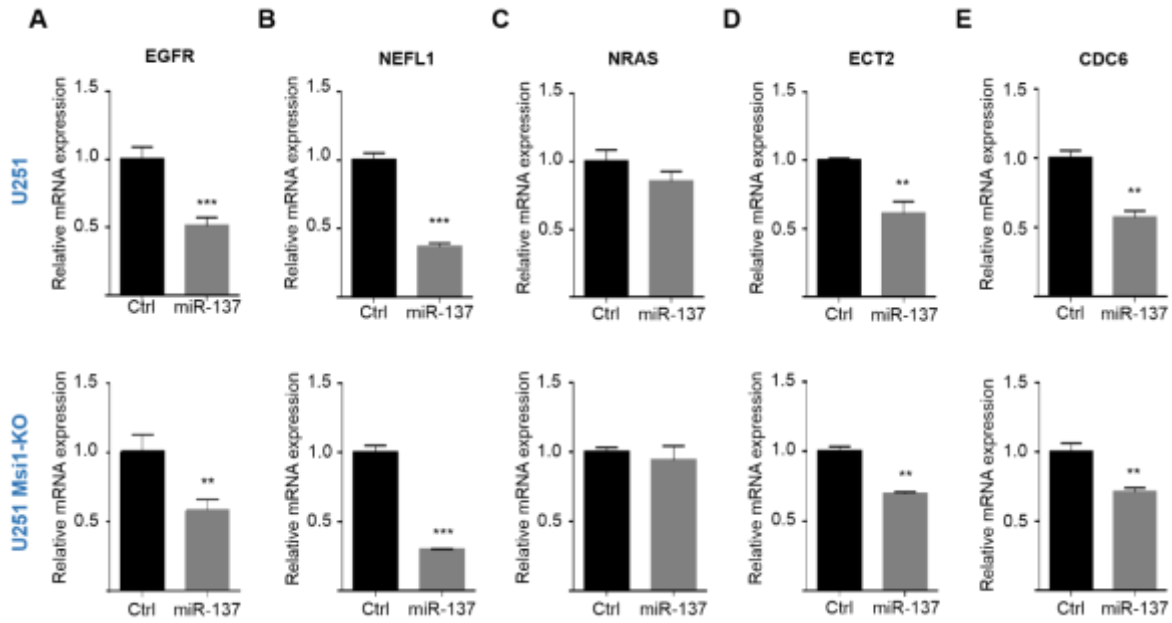


Figura S 7 Análisis de los blancos de miR-137.

A-E) Niveles de mRNA EGFR, NEFL1, NRAS, ECT2, CDC2. Para confirmar que el efecto de represión de miR-137 sobre los blancos compartidos con MSI1 es directo y no via la inhibición de MSI1, se transfectaron células U251 normales y U251 MSI1 KO con el mimic control y miR-137. Se evaluó y comparo los cambios en los niveles de expresión de las dianas MSI1/miR-137 por qRT-PCR. En todos los casos, los niveles de represión por miR-137 fueron muy similares entre ambas líneas celulares.

12. REFERENCIAS

1. Hernández-Reyna, R., Medellín-Sánchez, R. M. & Cerda-Flores, A. L. Factores pronósticos de supervivencia en pacientes mexicanos con glioblastoma multiforme. *Rev Med Ins Mex Seguro Soc* **48**, 121–126 (2010).
2. Ostrom, Q. T. *et al.* CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006 - 2010. *J. Neurooncol.* **15**, 788–796 (2013).
3. Jiang, C. *et al.* MicroRNA-564 is downregulated in glioblastoma and inhibited proliferation and invasion of glioblastoma cells by targeting TGF- β 1. *Oncotarget* **7**, (2016).
4. Verhaak, R. G. W. *et al.* Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**, 98–110 (2010).
5. Mischel, P. S. *et al.* Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling. *Oncogene* **22**, 2361–2373 (2003).
6. Maier, T., Güell, M. & Serrano, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* **583**, 3966–3973 (2009).
7. de Sousa Abreu, R., Penalva, L. O., Marcotte, E. M. & Vogel, C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol. Biosyst.* **5**, 1512–1526 (2014).
8. Castello, A. *et al.* Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins. *Cell* **149**, 1393–1406 (2012).
9. Gerstberger, S., Hafner, M. & Tuschl, T. A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet* **15**, 829–845 (2014).
10. Vo, D. T. *et al.* The RNA-Binding Protein Musashi1 Affects Medulloblastoma Growth via a Network of Cancer-Related Genes and Is an Indicator of Poor Prognosis. *The American Journal of Pathology* **181**, 1762–1772 (2012).
11. Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J. & Dreyfuss, G. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* **582**, 1977–1986 (2008).
12. Mitchell, S. F. & Parker, R. Principles and Properties of Eukaryotic mRNPs.

- Mol. Cell* **54**, 547–588 (2014).
13. Galante, P. A. F. *et al.* A comprehensive in silico expression analysis of RNA binding proteins in normal and tumor tissue: Identification of potential players in tumor formation. *RNA Biol.* **6**, 426–433 (2009).
 14. Kechavarzi, B. & Janga, S. C. Dissecting the expression landscape of RNA-binding proteins in human cancers. *Genome Biol.* **15**, R14 (2014).
 15. Wang, J., Liu, Q. & Shyr, Y. Dysregulated transcription across diverse cancer types reveals the importance of RNA-binding protein in carcinogenesis. *BMC Genomics* **16**, S5 (2015).
 16. Brusa, R. *et al.* Early-Onset Epilepsy and Postnatal Lethality Associated with an Editing-Deficient GluR-8 Allele in Mice. *Science (80-.)*. **270**, 1677–1680 (1995).
 17. Maas, S., Patt, S., Schrey, M. & Rich, A. Underediting of glutamate receptor GluR-B mRNA in malignant gliomas. *Neurobiology* **98**, 14687–14692 (2001).
 18. Tomaselli, S. *et al.* Modulation of microRNA editing, expression and processing by ADAR2 deaminase in glioblastoma. *Genome Biol.* **16**, 5 (2015).
 19. Noguchi, T., Inoue, H. & Tanaka, T. The M1- and M2-type Isozymes of Rat Pyruvate Kinase Are Produced from the Same Gene by Alternative RNA Splicing. *J. Biol. Chem.* **261**, 13807–13812 (1986).
 20. Clower, C. V, Chatterjee, D., Wang, Z. & Cantley, L. C. The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 10–15 (2010).
 21. de Araujo, P. R. *et al.* Musashi1 Impacts Radio-Resistance in Glioblastoma by Controlling DNA-Protein Kinase Catalytic Subunit. *Am. J. Pathol.* **186**, 2271–2278 (2016).
 22. Jin, W., Mccutcheon, I. E., Fuller, G. N., Huang, E. S. & Cote, G. J. Fibroblast Growth Factor Receptor-1 a-Exon Exclusion and Polypyrimidine Tract-binding Protein in Glioblastoma Multiforme Tumors. *CANCER Res.* **60**, 1221–1224 (2000).

23. Suvasini, R. *et al.* Insulin Growth Factor-2 Binding Protein 3 (IGF2BP3) Is a Glioblastoma-specific Marker That Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase/Mitogen-activated Protein Kinase (PI3K/MAPK) Pathways by Modulating IGF-2. *J. Biol. Chem.* **286**, 25882–25890 (2011).
24. Xi, Z. *et al.* Overexpression of miR-29a reduces the oncogenic properties of glioblastoma stem cells by downregulating Quaking gene isoform 6. *Oncotarget* **8**, 24949–24963 (2017).
25. Sakakibara, S. *et al.* Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev. Biol.* **176**, 230–242 (1996).
26. Shu, H.-J. *et al.* Expression of the Musashi1 gene encoding the RNA-binding protein in human hepatoma cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 150–154 (2002).
27. Ye, F., Zhou, C., Cheng, Q., Shen, J. & Chen, H. Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells. *BMC Cancer* **8**, 108 (2008).
28. Wang, X.-Y. *et al.* Musashi1 regulates breast tumor cell proliferation and is a prognostic indicator of poor survival. *Mol. Cancer* **9**, 221 (2010).
29. Imai, T. *et al.* The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3888–3900 (2001).
30. Battelli, C., Nikopoulos, G. N., Mitchell, J. G. & Verdi, J. M. The RNA-binding protein Musashi-1 regulates neural development through the translational repression of p21WAF-1. *Mol. Cell. Neurosci.* **31**, 85–96 (2006).
31. Horisawa, K., Imai, T., Okano, H. & Yanagawa, H. 3'-Untranslated region of doublecortin mRNA is a binding target of the Musashi1 RNA-binding protein. *FEBS Lett.* **583**, 2429–2434 (2009).
32. Kuwako, K. *et al.* Neural RNA-binding protein Musashi1 controls midline crossing of precerebellar neurons through posttranscriptional regulation of Robo3/Rig-1 expression. *Neuron* **67**, 407–21 (2010).
33. Sanchez-Diaz, P. C., Burton, T. L., Burns, S. C., Hung, J. Y. & Penalva, L. O. F. Musashi1 modulates cell proliferation genes in the medulloblastoma cell

- line Daoy. *BMC Cancer* **8**, 280 (2008).
34. Uren, P. J. *et al.* RNA-Binding Protein Musashi1 Is a Central Regulator of Adhesion Pathways in Glioblastoma. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 2965–2978 (2015).
 35. Chen, H. *et al.* Musashi-1 regulates AKT-derived IL-6 autocrinal/paracrine malignancy and chemoresistance in glioblastoma. *Oncotarget* **7**, 42485–42501 (2016).
 36. Fabian, M. R., Sonenberg, N. & Filipowicz, W. Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 351–379 (2010). doi:10.1146/annurev-biochem-060308-103103
 37. Bartel, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
 38. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419 (2003).
 39. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **17**, 3011–3016 (2003).
 40. Kim, Y., Kim, B. & Kim, V. N. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E1881–E1889 PNAS (2016).
 41. Sheu-gruttadauria, J. & MacRae, I. J. Structural Foundations of RNA Silencing by Argonaute. *J. Mol. Biol.* **429**, 2619–2639 (2017).
 42. Shi, Y. *et al.* microRNA regulation of neural stem cells and neurogenesis. *J. Neurosci.* **30**, 14931–14936 (2010).
 43. Naka-Kaneda, H. *et al.* The miR-17/106–p38 axis is a key regulator of the neurogenic-to-gliogenic transition in developing neural stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 1604–1609 (2014).
 44. Cao, X., Yeo, G., Muotri, A. R., Kuwabara, T. & Gage, F. H. Noncoding RNAs in the Mammalian Central Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**, 77–103 (2006).
 45. Saraiva, C., Esteves, M. & Bernardino, L. MicroRNA: Basic concepts and implications for regeneration and repair of neurodegenerative diseases.

- Biochem. Pharmacol.* **141**, 118–131 (2017).
46. Rupaimoole, R. & Slack, F. J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 203–222 (2017).
 47. Dong, H. *et al.* Investigation gene and microRNA expression in glioblastoma. *BMC Genomics* **11**, S16 (2010).
 48. Saadatpour, L. *et al.* Glioblastoma: exosome and microRNA as novel diagnosis biomarkers. *Cancer Gene Ther.* **23**, 415–418 (2016).
 49. Liu, N. & Tu, Y. Systematic Review of MicroRNAs and its Therapeutic Potential in Glioma. *Cancer Transl. Med.* **1**, 50–66 (2015).
 50. Ciafrè, S. A. *et al.* Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 1351–1358 (2005).
 51. Dong, H. *et al.* Integrated analysis of mutations, miRNA and mRNA expression in glioblastoma. *BMC Syst. Biol.* **4**, 163 (2010).
 52. Hua, D. *et al.* A Catalogue of Glioblastoma and Brain MicroRNAs. *Omi. A J. Interact. Biol.* **16**, 690–699 (2012).
 53. Lages, E. *et al.* MicroRNA and Target Protein Patterns Reveal Physiopathological Features of Glioma Subtypes. *PLoS One* **6**, e20600 (2011).
 54. Srinivasan, S., Patric, I. R. & Somasundaram, K. A Ten-microRNA Expression Signature Predicts Survival in Glioblastoma. *PLoS One* **6**, e17438 (2011).
 55. Teplyuk, N. M. *et al.* MicroRNAs in cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers. *Neuro. Oncol.* **14**, 689–700 (2012).
 56. Ahir, B. K., Ozer, H., Engelhard, H. H. & Lakka, S. S. MicroRNAs in glioblastoma pathogenesis and therapy: A comprehensive review. *Crit. Rev. Oncol. / Hematol.* **120**, 22–33 (2017).
 57. Li, Y. *et al.* MicroRNA-21 targets LRRFIP1 and contributes to VM-26 resistance in glioblastoma multiforme. *Brain Res.* **1286**, 13–18 (2009).
 58. Slaby, O. *et al.* MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients. *Neoplasma*

- 57**, 264–269 (2010).
59. Chan, J. A., Krichevsky, A. M. & Kosik, K. S. MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells. *CANCER Res.* **65**, 6029–6034 (2005).
 60. Gillies, J. K. & Lorimer, I. A. J. Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in Glioblastoma. *Cell Cycle* **6**, 2005–2009 (2007).
 61. Yang, F. *et al.* MiR-221/222 promote human glioma cell invasion and angiogenesis by targeting TIMP2. *Tumor Biol.* **36**, 3763–3773 (2015).
 62. Sasayama, T., Nishihara, M., Kondoh, T., Hosoda, K. & Kohmura, E. MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors , uPAR and RhoC. *Int. J. Cancer* **125**, 1407–1413 (2009).
 63. Ling, N. *et al.* microRNA-155 regulates cell proliferation and invasion by targeting FOXO3a in glioma. *Oncol. Rep.* **30**, 2111–2118 (2013).
 64. Zhang, S., Lai, N., Liao, K., Sun, J. & Lin, Y. MicroRNA-210 regulates cell proliferation and apoptosis by targeting regulator of differentiation 1 in glioblastoma cells. *Folia Neuropathol.* **53**, 236–244 (2015).
 65. Shang, C., Hong, Y., Guo, Y., Liu, Y. & Xue, Y. MiR-210 Up-Regulation Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Glioma Cells by Targeting. *Med. Sci. Monitos* **20**, 2571–2577 (2014).
 66. Liu, S., Jiang, T., Zhong, Y. & Yu, Y. miR-210 inhibits cell migration and invasion by targeting the brain derived neurotrophic factor in glioblastoma. *J. Cell. Biochem.* **120**, 1–8 (2019).
 67. Mei, J., Bachoo, R. & Zhang, C.-L. MicroRNA-146a Inhibits Glioma Development by Targeting Notch1. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 3584–3592 (2011).
 68. Kim, J. *et al.* microRNA-148a Is a Prognostic oncomiR That Targets MIG6 and BIM to Regulate EGFR and Apoptosis in Glioblastoma. *Cancer Res.* **74**, 1541–1553 (2014).
 69. Cheng, Q. *et al.* PAX6, a novel target of miR-335, inhibits cell proliferation and invasion in glioma cells. *Mol. Med. Rep.* **10**, 399–404 (2014).
 70. Shu, M. *et al.* Targeting oncogenic miR-335 inhibits growth and invasion of

- malignant astrocytoma cells. *Mol. Cancer* **10**, 59 (2011).
71. Shu, M. *et al.* MicroRNA 335 Is Required for Differentiation of Malignant Glioma Cells Induced by Activation of cAMP/Protein Kinase A Pathway. *Mol. Pharmacol.* **81**, 292–298 (2012).
 72. Floyd, D. H. *et al.* Novel Anti-Apoptotic MicroRNAs 582-5p and 363 Promote Human Glioblastoma Stem Cell Survival via Direct Inhibition of Caspase 3, Caspase 9, and Bim. *PLoS One* **9**, e96239 (2014).
 73. Wang, Z. *et al.* Up-Regulation of microRNA-183 Promotes Cell Proliferation and Invasion in Glioma By Directly Targeting NEFL. *Cell. Mol. Neurobiol.* **36**, 1303–1310 (2016).
 74. Godlewski, J. *et al.* Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by MicroRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res.* **68**, 9125–9130 (2008).
 75. Zhang, Y. *et al.* MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a. *J. Mol. Med.* **87**, 43–51 (2009).
 76. Bier, A. *et al.* MicroRNA-137 is downregulated in glioblastoma and inhibits the stemness of glioma stem cells by targeting RTVP-1. *Oncotarget* **4**, 665–676 (2013).
 77. Chen, L. *et al.* miR-137 is frequently down-regulated in glioblastoma and is a negative regulator of Cox-2. *Eur. J. Cancer* **48**, 3104–3111 (2012).
 78. Tamim, S. *et al.* Genomic analyses reveal broad impact of miR-137 on genes associated with malignant transformation and neuronal differentiation in glioblastoma cells. *PLoS One* **9**, e85591 (2014).
 79. Xia, H. *et al.* Loss of Brain-enriched miR-124 MicroRNA Enhances Stem-like Traits and Invasiveness of Glioma Cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 9962–9971 (2012).
 80. Shi, Z. *et al.* MiR-124 governs glioma growth and angiogenesis and enhances chemosensitivity by targeting R-Ras and N-Ras. *Neuro. Oncol.* **16**, 1341–1353 (2014).
 81. She, X. *et al.* miR-128 and miR-149 enhance the chemosensitivity of temozolomide by Rap1B-mediated cytoskeletal remodeling in glioblastoma.

- 957–964 (2014). doi:10.3892/or.2014.3318
82. Zhao, W. *et al.* MicroRNA-153 suppresses cell invasion by targeting SNAI1 and predicts patient prognosis in glioma. *Oncol. Lett.* **17**, 1189–1195 (2019).
 83. Yang, W., Shen, Y., Wei, J. & Liu, F. MicroRNA-153/Nrf-2 GPx1 pathway regulates radiosensitivity and stemness of glioma stem cells via reactive oxygen species. *Oncotarget* **6**, 22006–22027 (2015).
 84. Shi, L., Cheng, Z., Zhang, J., Li, R. & Zhao, P. hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res.* **1236**, 185–193 (2008).
 85. She, X. *et al.* miR-181 subunits enhance the chemosensitivity of temozolomide by Rap1B-mediated cytoskeleton remodeling in glioblastoma cells. *Med. Oncol.* **31**, 892 (2014).
 86. Chen, G. *et al.* MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting Bcl-2. *Oncol. Lett.* **23**, 997–1003 (2010).
 87. Wang, F. *et al.* MicroRNA-181 inhibits glioma cell proliferation by targeting cyclin B1. *Mol. Med. Rep.* **10**, 2160–2164 (2014).
 88. Lian, H.-W., Zhou, Y., Jian, Z.-H. & Liu, R.-Z. MiR-323-5p acts as a Tumor Suppressor by Targeting the Insulin-like Growth Factor 1 Receptor in Human Glioma Cells. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **15**, 10181–10185 (2014).
 89. Delic, S. *et al.* MiR-328 promotes glioma cell invasion via SFRP1-dependent Wnt-signaling activation. *Neuro. Oncol.* **16**, 179–190 (2014).
 90. Sun, G. *et al.* miR-137 forms a regulatory loop with nuclear receptor TLX and LSD1 in neural stem cells. *Nat. Commun.* **2**, 510–529 (2011).
 91. Santos, M. C. T. *et al.* miR-124, -128, and -137 Orchestrate Neural Differentiation by Acting on Overlapping Gene Sets Containing a Highly Connected Transcription Factor Network. *Stem Cells* **34**, 220–232 (2016).
 92. Szulwach, K. E. *et al.* Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *J. Cell Biol.* **189**, 127–141 (2010).
 93. Smrt, R. D. *et al.* MicroRNA miR-137 Regulates Neuronal Maturation by Targeting Ubiquitin Ligase Mind Bomb-1. *Stem Cells* **28**, 1060–1070 (2010).
 94. Mahmoudi, E. & Cairns, M. J. MiR-137 : an important player in neural

- development and neoplastic transformation. *Mol. Psychiatry* **22**, 44–55 (2017).
95. Koshkin, P. A. *et al.* Analysis of expression of microRNAs and genes involved in the control of key signaling mechanisms that support or inhibit development of brain tumors of different grades. *Clin. Chim. Acta* **430**, 55–62 (2014).
 96. Liang, M.-L. *et al.* Downregulation of miR-137 and miR-6500-3p promotes cell proliferation in pediatric high-grade gliomas. *Oncotarget* **7**, 19723–19737 (2016).
 97. Li, K. K.-W. *et al.* MIR-137 Suppresses Growth and Invasion, is Downregulated in Oligodendroglial Tumors and Targets CSE1L. *Brain Pathol.* **23**, 426–439 (2013).
 98. Sun, J., Zheng, G., Gu, Z. & Guo, Z. MiR-137 inhibits proliferation and angiogenesis of human glioblastoma cells by targeting EZH2. *J. Neurooncol.* **122**, 481–489 (2015).
 99. Silber, J. *et al.* miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med.* **6**, 14 (2008).
 100. Schwanhäusser, B. *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337–342 (2011).
 101. Tominaga, K. *et al.* Competitive Regulation of Nucleolin Expression by HuR and miR-494 □. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 4219–4231 (2011).
 102. Epis, M. R., Barker, A., Giles, K. M., Beveridge, D. J. & Leedman, P. J. The RNA-binding Protein HuR Opposes the Repression of ERBB-2 Gene Expression by MicroRNA miR-331-3p in Prostate Cancer Cells * □. *J. Biol. Chem.* **286**, 41442–41454 (2011).
 103. Jafarifar, F., Yao, P. & Fox, P. L. Repression of VEGFA by CA-rich element-binding microRNAs is modulated by hnRNP L. *EMBO J.* **30**, 1324–1334 (2011).
 104. Gardiner, A. S., Twiss, J. L. & Perrone-bizzozero, N. I. Competing Interactions of RNA-Binding Proteins, MicroRNAs, and Their Targets Control

- Neuronal Development and Function. *Biomolecules* **5**, 2903–2918 (2015).
105. Yano, M., Ohtsuka, T. & Okano, H. RNA-binding protein research with transcriptome-wide technologies in neural development. *Cell Tissue Res.* **359**, 135–144 (2015).
 106. Rajgor, D. Macro roles for microRNAs in neurodegenerative diseases. *Non-coding RNA Res.* **3**, 154–159 (2018).
 107. Banelli, B. *et al.* MicroRNA in glioblastoma: An overview. *Int. J. Genomics* **2017**, 7639084 (2017).
 108. Lennox, A. L., Mao, H. & Silver, D. L. RNA on the brain: emerging layers of post-transcriptional regulation in cerebral cortex development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **7**, 1–18 (2018).
 109. Neelamraju, Y., Hashemikhabir, S. & Janga, S. C. The human RBPome: From genes and proteins to human disease. *J. Proteomics* **127**, 61–70 (2015).
 110. Zhang, B. *et al.* Proliferation and differentiation of neural stem cells in adult rats after cerebral infarction. *Chinese Med. Sci. J.* **26**, 8–11 (2004).
 111. Lara-pezzi, E., Desco, M., Gatto, A. & Gómez-gavero, M. V. Neurogenesis: Regulation by Alternative Splicing and Related Posttranscriptional Processes. *Neuroscientist* **23**, 466–477 (2017).
 112. Tonchev, A. B., Yamashima, T., Sawamoto, K. & Okano, H. Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res.* **81**, 776–788 (2005).
 113. Ghigna, C., Cartegni, L., Jordan, P. & Paronetto, M. P. Posttranscriptional Regulation and RNA Binding Proteins in Cancer Biology. **2015**, 2–4 (2015).
 114. Sen, R., Ghosal, S., Das, S., Balti, S. & Chakrabarti, J. Competing Endogenous RNA : The Key to Posttranscriptional Regulation. *Hindawai* **2014**, (2014).
 115. Schaefer, B., Sun, W., Fang, Y. L. L. & Chen, W. The evolution of posttranscriptional regulation. 1–20 (2018). doi:10.1002/wrna.1485

116. Glazer, R. I., Vo, D. T. & Penalva, L. O. F. Musashi1: an RBP with versatile functions in normal and cancer stem cells. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* **17**, 54–64 (2012).
117. Yi, C. *et al.* Luteolin inhibits Musashi1 binding to RNA and disrupts cancer phenotypes in glioblastoma cells. *RNA Biol.* 1–13 (2018).
doi:10.1080/15476286.2018.1539607
118. Vo, D. T. *et al.* The oncogenic RNA-binding protein Musashi1 is regulated by tumor suppressor miRNAs. *RNA Biol.* **8**, 817–828 (2011).
119. Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J.-W. & Bartel, D. P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* **4**, e05005 (2015).
120. Hsu, S. Da *et al.* MiRTarBase: A database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* **39**, 163–169 (2011).
121. Vo, D. T. *et al.* The RNA-Binding Protein Musashi1 Affects Medulloblastoma Growth via a Network of Cancer- Related Genes and Is an Indicator of Poor Prognosis. *Am. J. Pathol.* **181**, 1762–1772 (2012).
122. de Sousa Abreu, R. *et al.* Genomic analyses of musashi1 downstream targets show a strong association with cancer-related processes. *J. Biol. Chem.* **284**, 12125–12135 (2009).
123. Thomas, P. D. *et al.* PANTHER: A browsable database of gene products organized by biological function, using curated protein family and subfamily classification. *Nucleic Acids Res.* **31**, 334–341 (2003).
124. Supek, F., Bošnjak, M., Nieves, Š. & Šmuc, T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLoS One* **6**, e21800 (2011).
125. Szklarczyk, D. *et al.* STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* **43**, D447–D452 (2015).
126. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
127. Bowman, R. L., Wang, Q., Carro, A., Verhaak, R. G. & Squatrito, M. GlioVis data portal for visualization and analysis of brain tumor expression datasets. *Neuro. Oncol.* **19**, 139–141 (2017).
128. Arora, S., Rana, R., Chhabra, A., Jaiswal, A. & Rani, V. miRNA-transcription

- factor interactions: A combinatorial regulation of gene expression. *Mol. Genet. Genomics* **288**, 77–87 (2013).
129. Martinez, N. J. & Walhout, A. J. M. The interplay between transcription factors and microRNAs in genome-scale regulatory networks. *BioEssays* **31**, 435–445 (2009).
130. Ciafrè, S. A. & Galardi, S. microRNAs and RNA-binding proteins. *RNA Biol.* **10**, 934–942 (2013).
131. Di Liegro, C. M., Schiera, G. & Di Liegro, I. Regulation of mRNA transport, localization and translation in the nervous system of mammals (Review). *Int. J. Mol. Med.* **33**, 747–62 (2014).
132. Okano, H. *et al.* Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. *Exp. Cell Res.* **306**, 349–356 (2005).
133. Chang, S.-J. *et al.* MicroRNA-34a modulates genes involved in cellular motility and oxidative phosphorylation in neural precursors derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *BMC Med. Genomics* **4**, 65 (2011).
134. Rajman, M. & Schratt, G. MicroRNAs in neural development: from master regulators to fine-tuners. *Development* **144**, 2310–2322 (2017).
135. Rooj, A. K. *et al.* MicroRNA-Mediated Dynamic Bidirectional Shift between the Subclasses of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cell Rep.* **19**, 2026–2032 (2017).
136. Liu, N. *et al.* MicroRNA-101 inhibits proliferation, migration and invasion of human glioblastoma by targeting SOX9. *Oncotarget* **8**, 19244–19254 (2016).
137. Tian, T. *et al.* MicroRNA-101 reverses temozolomide resistance by inhibition of GSK3 β in glioblastoma. *Oncotarget* **7**, 79584–79595 (2016).
138. Rathod, S. S., Rani, S. B., Khan, M., Muzumdar, D. & Shiras, A. Tumor suppressive miRNA-34a suppresses cell proliferation and tumor growth of glioma stem cells by targeting Akt and Wnt signaling pathways. *FEBS Open Bio* **4**, 485–495 (2014).
139. Qiu, S. *et al.* Suppression of tumorigenicity by MicroRNA-138 through inhibition of EZH2-CDK4/6-pRb-E2F1 signal loop in glioblastoma multiforme.

- Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 1697–1707 (2013).
140. Shea, A. *et al.* MicroRNAs in glioblastoma multiforme pathogenesis and therapeutics. *Cancer Med.* **5**, 1917–1946 (2016).
 141. Shan, Z. *et al.* miR128-1 inhibits the growth of glioblastoma multiforme and glioma stem-like cells via targeting BMI1 and E2F3. *Oncotarget* **7**, 78813–78826 (2016).
 142. Chang, X., Zhang, H., Lian, S. & Zhu, W. miR-137 suppresses tumor growth of malignant melanoma by targeting aurora kinase A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **475**, 251–256 (2016).
 143. Zhang, W. *et al.* miR-137 is a tumor suppressor in endometrial cancer and is repressed by DNA hypermethylation. *Lab. Investig.* **2018**, (2018).
 144. Sakaguchi, M. *et al.* miR-137 Regulates the Tumorigenicity of Colon Cancer Stem Cells Through the Inhibition of DCLK1. *Mol. Cancer Res.* **137**, 354–362 (2016).
 145. Han, Y. *et al.* miR-137 suppresses the invasion and procedure of EMT of human breast cancer cell line MCF-7 through targeting CtBP1. *Hum. Cell* **29**, 30–36 (2016).
 146. Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G. & von Deimling, A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* **129**, 829–848 (2015).
 147. Aguirre, A., Rubio, M. E. & Gallo, V. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature* **467**, 323–327 (2010).
 148. Babic, I. *et al.* EGFR Mutation-Induced Alternative Splicing of Max Contributes to Growth of Glycolytic Tumors in Brain Cancer. *Cell Metab.* **17**, 1000–1008 (2013).
 149. Scaltriti, M. & Baselga, J. The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway : A Model for Targeted Therapy The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway : A Model for Targeted Therapy. *Clin Cancer Res* **12**, 5268–5272 (2006).
 150. Clarke, I. D. & Dirks, P. B. A human brain tumor-derived PDGFR- α deletion

- mutant is transforming. *Oncogene* **22**, 722–733 (2003).
151. Phillips, J. J. *et al.* PDGFRA amplification is common in pediatric and adult high-grade astrocytomas and identifies a poor prognostic group in IDH1 mutant glioblastoma. *Brain Pathol.* **23**, 565–573 (2013).
 152. Ribom, D. *et al.* Prognostic value of platelet derived growth factor alpha receptor expression in grade 2 astrocytomas and oligoastrocytomas. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **72**, 782–787 (2002).
 153. Han, X. *et al.* The role of Src family kinases in growth and migration of glioma stem cells. *Int. J. Oncol.* **45**, 302–310 (2014).
 154. Eom, K.-Y. *et al.* The Effect of Chemoradiotherapy with SRC Tyrosine Kinase Inhibitor, PP2 and Temozolomide on Malignant Glioma Cells In Vitro and In Vivo. *Cancer Res. Treat.* **48**, 687–697 (2016).
 155. Serna-Blasco, R., Sanz-Álvarez, M., Aguilera, Ó. & García-Foncillas, J. Targeting the RAS-dependent chemoresistance: The Warburg connection. *Semin. Cancer Biol.* pii: S1044-579X(17)30272-9. (2018).
doi:10.1016/j.semcancer.2018.01.016
 156. Vizcaíno, C., Mansilla, S. & Portugal, J. Sp1 transcription factor: A long-standing target in cancer chemotherapy. *Pharmacol. Ther.* **152**, 111–124 (2015).
 157. Martínez-Romero, J., Bueno-Fortes, S., Martín-Merino, M., Molina, A. R. De & De Las Rivas, J. Survival marker genes of colorectal cancer derived from consistent transcriptomic profiling. *BMC Genomics* **19**, 857 (2018).
 158. Raman, P., Maddipati, R., Lim, K. H. & Tozeren, A. Pancreatic cancer survival analysis defines a signature that predicts outcome. *PLoS One* **13**, e0201751 (2018).
 159. Kikuta, K. *et al.* Discoidin, CUB and LCCL domain-containing protein 2 (DCBLD2) is a novel biomarker of myxo fibrosarcoma invasion identified by global protein expression profiling. *BBA-Proteins and Proteomics* **1865**, 1160–1166 (2017).
 160. Hofslí, E., Wheeler, T. E., Langaas, M., Lægreid, A. & Thommesen, L. Identification of novel neuroendocrine-specific tumour genes. *Br. J. Cancer*

- 99**, 1330–1339 (2008).
161. Wang, Y. *et al.* Stanniocalcin-1 promotes cell proliferation, chemoresistance and metastasis in hypoxic gastric cancer cells via Bcl-2. *Oncol. Rep.* **41**, 1998–2008 (2019).
162. Chan, K. K.-S. *et al.* Secretory Stanniocalcin 1 promotes metastasis of hepatocellular carcinoma through activation of JNK signaling pathway. *Cancer Lett.* 1–9 (2017). doi:10.1016/j.canlet.2017.06.034
163. Rezapour, S. *et al.* STC1 and NF- κ B p65 (Rel A) is Constitutively Activated in Colorectal Cancer. *Clin. Lab.* **62**, 463–469 (2016).
164. Abaza, H. M. H., Elmougy, M. I., Maraghy, H. M. A. E. L. & Mahmoud, H. M. Stanniocalcin1 gene expression in patients with acute leukemia : impact on response to therapy and disease outcome. *Int. J. Lab. Hematol.* **38**, 81–89 (2016).
165. Li, Y. *et al.* Stanniocalcin-1 augments stem-like traits of glioblastoma cells through binding and activating NOTCH1. *Cancer Lett.* **416**, 66–74 (2018).
166. Mattiotti, A., Prakash, S., Barnett, P. & Van Den Hoff, M. J. B. Follistatin-like 1 in development and human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 2339–2354 (2018).
167. Okabe, M., Imai, T., Kurusu, M., Hiromi, Y. & Okano, H. Translational repression determines a neuronal potential in Drosophila asymmetric cell division. *Nature* **411**, 94–8 (2001).
168. Kuwako, K. *et al.* Neural RNA-binding protein Musashi1 controls midline crossing of precerebellar neurons through posttranscriptional regulation of Robo3/Rig-1 expression. *Neuron* **67**, 407–421 (2010).
169. Kudinov, A. E., Karanickolas, J., Golemis, E. A. & Bumber, Y. Musashi RNA-Binding Proteins as Cancer Drivers and Novel Therapeutic Targets. *Clin. Cancer Res.* **23**, 2143–2154 (2017).
170. Kang, N. *et al.* Silencing of miR-137 by aberrant promoter hypermethylation in surgically resected lung cancer. *Lung Cancer* **89**, 99–103 (2015).
171. Chen, Q. *et al.* miR-137 is frequently down-regulated in gastric cancer and is a negative regulator of Cdc42. *Dig. Dis. Sci.* **56**, 2009–2016 (2011).

13. APÉNDICE I. Publicaciones derivadas de la tesis de doctorado.

Antagonism between the RNA-binding protein Musashi1 and miR-137 and its potential impact on neurogenesis and glioblastoma development

MITZU X. VELASCO,^{1,2,4} ADAM KOSTI,^{1,2,4} GABRIELA D.A. GUARDIA,^{4,4} MARCIA C. SANTOS,¹ ALLISON TEGGE,² MEI QIAO,¹ BRUNA R.S. CORREA,^{1,4} GRECO HERNÁNDEZ,² ERZSEBET KOKOVAY,² PEDRO A.F. GALANTE,⁴ and LUIZ O.F. PENALVA^{1,3}

¹Greiner Children's Research Institute, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas 78229, USA

²Translational and Cancer Laboratory, Unit of Biomedical Research on Cancer, National Institute of Cancer (INCAI), Mexico City 14080, Mexico

³Department of Cell Systems and Anatomy, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas 78229, USA

⁴Centro de Oncologia Molecular-Hospital Sírio-Libanês, São Paulo 01308-050, Brazil

⁵Department of Statistics, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia 14080, USA

ABSTRACT

RNA-binding proteins (RBPs) and miRNAs are critical gene expression regulators that interact with one another in cooperative and antagonistic fashions. We identified Musashi1 (Msi1) and miR-137 as regulators of a molecular switch between self-renewal and differentiation. Msi1 and miR-137 have opposite expression patterns and functions, and Msi1 is repressed by miR-137. Msi1 is a stem-cell protein implicated in self-renewal while miR-137 functions as a proneurogenic differentiation miRNA. In gliomas, miR-137 functions as a tumor suppressor while Msi1 is a pro-oncogenic factor. We suggest that the balance between Msi1 and miR-137 is a key determinant in cell fate decisions and disruption of this balance could contribute to neurodegenerative diseases and glioma development. Genomic analyses revealed that Msi1 and miR-137 share 141 target genes associated with differentiation, development, and morphogenesis. Initial results pointed out that these two regulators have an opposite impact on the expression of their target genes. Therefore, we propose an antagonistic model in which this network of shared targets could be either repressed by miR-137 or activated by Msi1, leading to different outcomes (self-renewal, proliferation, tumorigenesis).

Keywords: Musashi1; miR-137; glioblastoma; neurogenesis; RNA-binding protein; miRNA

INTRODUCTION

RNA-binding proteins (RBPs) and miRNAs function in the same regulatory space and interact in multiple ways. RBPs participate in the processing of specific pre-miRNAs (Treiber et al. 2017; Nussbacher and Yeo 2018). RBPs and miRNAs can bind overlapping or nearby regulatory elements and modulate the expression of shared target transcripts in an antagonistic fashion (Gardiner et al. 2015; Neelamsetty et al. 2015; Yano et al. 2015; Banelli et al. 2017; Lannik et al. 2018; Rajgor 2018). On the other hand, they can act as partners to repress the expression of a common target (Gafre and Galardi 2013; Zhao et al. 2018). Although most cases described so far involve a single transcript, there are examples suggesting that the rela-

tionship between RBPs and miRNAs can be more complex. For instance, seven mammalian microRNAs preferentially colocalize with Pumilio (PUM) binding sites and have binding motifs that reverse complements the PUM recognition site; PUM binding to transcripts enhances miRNA-binding efficiency and subsequently increases decay of shared targets (Jiang and Lou 2013). Many more of these types of complex interactions are predicted to occur (Preusse et al. 2015). RBP-miRNA interactions are particularly important in the context of the nervous system; both regulators play critical roles in neurogenesis and brain development, and alterations affecting their function or expression levels contribute to neurological disorders

[†]These authors contributed equally to this work.
Corresponding author: penalva@uthscsa.edu
Article is online at: <http://www.nature.com/nrg/journal/10.1038/nrn.089211118>.

© 2019 Velasco et al. This article is distributed exclusively by the RNA Society for the first 12 months after the full-issue publication date (<http://www.nature.com/nrg/journal/10.1038/nrn.089211118>). After 12 months, it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.



The Diverse Roles of RNA-Binding Proteins In Glioma Development

2

Mitzli X. Velasco, Adam Kosti, Luiz O. F. Penalva,
and Greco Hernández

Abstract

Post-transcriptional regulation of gene expression is fundamental for all forms of life, as it critically contributes to the composition and quantity of a cell's proteome. These processes encompass splicing, polyadenylation, mRNA decay, mRNA editing and modification and translation and are modulated by a variety of RNA-binding proteins (RBPs). Alterations affecting RBP expression and activity contribute to the development of different types of cancer. In this chapter, we discuss current

research shedding light on the role of different RBPs in gliomas. These studies place RBPs as modulators of critical signaling pathways, establish their relevance as prognostic markers and open doors for new therapeutic strategies.

Keywords

ADARs · Cancer · Glioblastoma · hnRNP · HuR · IGF2BPs · Musashi1 · PTBP · RNA-binding proteins · Translation initiation

M. X. Velasco

Laboratory of Translation and Cancer, Unit of Biomedical Research on Cancer, Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Mexico City, Mexico
Biomedical Sciences Ph.D. Program, National Autonomous University of Mexico, UNAM, Mexico City, Mexico

Grechey Children's Cancer Research Institute, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX, USA

A. Kosti · L. O. F. Penalva

Grechey Children's Cancer Research Institute, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX, USA
e-mail: penalva@uthscsa.edu

G. Hernández

Laboratory of Translation and Cancer, Unit of Biomedical Research on Cancer, Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Mexico City, Mexico
e-mail: ghernandez@incan.edu.mx

Abbreviations

RBPs	RNA-binding proteins
MS	Mass spectrometry
UTRs	Untranslated regions
GBM	Glioblastoma multiforme or Glioblastoma
hnRNP	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
PTBP	Polypyrimidine-tract-binding protein
ADARs	Adenosine deaminases that act on RNA
HuR	Hu antigen R
MSI1	Musashi1
IGF2BPs/IMP	Insulin-like growth factor II mRNA binding proteins
PK	Pyruvate-kinase

© Springer Nature Switzerland AG 2019


L. Romão (ed.), *The mRNA Metabolism in Human Disease*, Advances in Experimental Medicine and Biology 1157, https://doi.org/10.1007/978-3-030-19966-1_2

29

RESEARCH PAPER



Luteolin inhibits Musashi1 binding to RNA and disrupts cancer phenotypes in glioblastoma cells

Caihong Yi^{a,b}, Guiming Li^{c,d}, Dmitri N. Ivanov^d, Zhonghua Wang^d, Mitzli X. Velasco^{a,c}, Greco Hernández^e, Soni Kaundal^f, Johanna Villarreal^g, Yogesh K. Gupta ^{h,i}, Mei Qiao^g, Christopher G. Hubert^j, Matthew J. Hart^{a,c,d}, and Luiz O.F. Penalva^{a,g}

^aGreehey Children's Cancer Research Institute, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA; ^bXiangya School of Medicine, Central South University, Hunan, China; ^cCenter for Innovative Drug Discovery, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA; ^dDepartment of Biochemistry and Structural Biology, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA; ^eDivision of Basic Research, National Institute of Cancer (INCan), Mexico City, Mexico; ^fDepartment of Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Cleveland Clinic, Cleveland, OH, USA; ^gDepartment of Cell Systems and Anatomy, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA

ABSTRACT

RNA binding proteins have emerged as critical oncogenic factors and potential targets in cancer therapy. In this study, we evaluated Musashi1 (Msi1) targeting as a strategy to treat glioblastoma (GBM); the most aggressive brain tumor type. Msi1 expression levels are often high in GBMs and other tumor types and correlate with poor clinical outcome. Moreover, Msi1 has been implicated in chemo- and radio-resistance. Msi1 modulates a range of cancer relevant processes and pathways and regulates the expression of stem cell markers and oncogenic factors via mRNA translation/stability. To identify Msi1 inhibitors capable of blocking its RNA binding function, we performed a ~ 25,000 compound fluorescence polarization screen. NMR and LSPR were used to confirm direct interaction between Msi1 and luteolin, the leading compound. Luteolin displayed strong interaction with Msi1 RNA binding domain 1 (RBD1). As a likely consequence of this interaction, we observed via western and luciferase assays that luteolin treatment diminished Msi1 positive impact on the expression of pro-oncogenic target genes. We tested the effect of luteolin treatment on GBM cells and showed that it reduced proliferation, cell viability, colony formation, migration and invasion of U251 and U343 GBM cells. Luteolin also decreased the proliferation of patient-derived glioma initiating cells (GICs) and tumor-organoids but did not affect normal astrocytes. Finally, we demonstrated the value of combined treatments with luteolin and olaparib (PARP inhibitor) or ionizing radiation (IR). Our results show that luteolin functions as an inhibitor of Msi1 and demonstrates its potential use in GBM therapy.

ARTICLE HISTORY

Received 3 July 2018
 Revised 12 October 2018
 Accepted 16 October 2018

KEYWORDS

RNA binding protein;
 Musashi1; cancer therapy;
 glioblastoma; luteolin