



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE MIR-223, A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE
TLR-4/NF-kB**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

NATALIA SOLÓRZANO DOMÍNGUEZ

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GUILLERMO AQUINO JARQUIN
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

MÉXICO, D.F. MARZO, 2015



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 19 de enero de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **SOLÓRZANO DOMÍNGUEZ NATALIA** con número de cuenta **302136209**, con la tesis titulada **"REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE miR-223, A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE TLR-4/NF-kB"**, realizada bajo la dirección del **DR. GUILLERMO AQUINO JARQUIN:**

Presidente: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
Vocal: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS
Secretario: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Suplente: DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 05 de marzo de 2015

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al apoyo recibido de la beca CONACY.T

Al Comité Tutor:

Dr. Guillermo Aquino Jarquin.

Dra. Leticia Rocha Zavaleta.

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL.

Al Dr. Guillermo Aquino Jarquin por el apoyo que me brindo en la realización de este proyecto y por permitirme formar parte de su equipo.

Al Dr. Jesús Aguirre Hernández se agradece su colaboración en la elaboración de este proyecto.

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, Dra. Ma. del Refugio García Villegas por permitirme ser parte de su equipo y por su apreciable amistad.

A la Dra. Ruth Gutiérrez Aguilar por la asesoría en este proyecto así como por su amistad y buenos consejos.

DEDICATORIAS.

A mi madre, el ángel que cuida mis pasos desde el cielo.

A mi padre, quien me enseñó la fortaleza, responsabilidad y humildad.

A mis hermanos que siempre están presentes en mi mente y en mi corazón.

A toda mi familia que siempre ha estado conmigo.

A Toño, eres el pilar de mi vida.

A la familia Escobar por todo el apoyo que siempre me ha brindado.

A mis queridas amigas Carmen y Male inseparables desde la universidad.

A mis queridas compañeras de laboratorio Chío y Erika por nuestra complicidad

en el lab.

INDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Inmunidad innata y TLRs.....	3
1.2 TLR-4 y LPS.....	5
1.3 NF-kB.....	6
1.3.1 TLR señala NF-kB.....	7
1.3.2 Regulación transcripcional de genes por NF-kB.....	9
1.4 TLRs y miRNAs.....	11
1.4.2 Biogénesis y mecanismos de acción.....	12
1.4.3 Regulación transcripcional de los miRNAs.....	13
2. ANTECEDENTES.....	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVOS.....	16
5.1 General.....	16
5.2 Particulares.....	16
6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	17
7. METODOLOGÍA.....	18
7.1 Análisis bioinformático.....	18
7.2 Reacción de PCR en punto final.....	18
7.3 Construcción de los plásmidos reporteros.....	19
7.4 Mutagénesis sitio dirigida.....	21
7.5 Secuenciación.....	22
7.6 Líneas celulares, cultivo y estímulo.....	23

7.8 Citometría de Flujo.....	23
7.9 Transfección.....	24
7.10 Ensayo de Luciferasa.....	24
7.11 Extracción de núcleos.....	25
7.12 Inmunoprecipitación.....	25
7.13 Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS- PAGE) 5%.....	26
7.14 Western blot.....	26
7.15 RT-PCR en tiempo real.....	27
7.16 Inmunoprecipitación de la cromatina.....	28
7.17 Ensayo de movilidad electroforética EMSA.....	30
7. 18 Métodos alternativos de extracción de núcleos.....	32
8. RESULTADOS	34
8.1 Determinación de los posibles sitios de unión a NF-kB en la región promotora de miR-223.....	34
8.2 Construcción del plásmido reportero pSprom-mir223.....	35
8.3 Determinación de la expresión de TLR-4-MD2 y NF-kB en la línea celular HEK- 293-hTLR-4-MD2-CD14.....	39
8.4 Evaluación de la actividad del promotor de miR-223 mediante ensayos de luciferasa.....	40
8.5 Determinación del efecto que presenta cada uno de los sitios de interacción con NF-kB sobre la actividad del promotor de miR-223.....	41
8.6 Expresión de miR-223 en la línea celular U937 tratadas con PMA y LPS.....	45
8.7 Papel de NF-kB en la regulación del promotor de miR-223.....	46
8.9 Interacción de NF-kB sobre el promotor de miR-223, mediante EMSA.....	47
9. DISCUSIÓN	49
10. CONCLUSIONES	53
11. PERSPECTIVAS	53
12. LITERATURA CITADA	54

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1.	Esquema representativo de los distintos TLRs así como sus respectivos ligandos.....	4
Figura 2.	Formación del complejo LPS/TLR-4, a través de LPB, CD14 y MD-2.....	6
Figura 3.	Vía de señalización mediada por la activación de TLR-2, TLR-3 y TLR-4, llevando a la regulación de genes involucrados en la respuesta inmune.....	8
Figura 4.	Vía de señalización mediada por la activación de TLR-2, TLR-3 y TLR-4, llevando a la regulación de genes involucrados en la respuesta inmune.....	11
Figura 5.	Biogénesis de miRNAs.....	13
Figura 6.	Localización genómica y estructura de los genes de miRNAs.....	14
Figura 7.	Mapas de cada uno de los vectores utilizados en la clonación del promotor de miR-223.....	21
Figura 8.	Secuencia de la región promotora de miR-223.....	34
Figura 9.	Esquema que muestra la posición espacial de los posibles sitios de unión a NF- κ B en la región promotora de miR-223.....	35
Figura 10.	Electroforesis en gel de agarosa al 0.08%. Muestra el fragmento de 1.9 Kb que corresponde al promotor de miR-223, amplificado por PCR a partir del DNA genómico humano.....	35
Figura 11.	Mapa del plásmido pSG-miR223r.....	36
Figura 12.	Electroferogramas representativos de la secuenciación capilar del promotor de miR-223 clonado en el vector pGEM-T-Easy.....	37
Figura 13.	Mapa de pSprom-miR223.....	38
Figura 14.	Gráficas que muestran un aumento en los niveles de expresión de TLR-4, medido por citometría de flujo en las células HEK-293-hTLR-4-MD2-CD14.....	39
Figura 15.	Se muestra por western blot un aumento la translocación de NF- κ B al núcleo después de estimular con 250ng y 100ng de LPS y con las diluciones 1:25, 1:50 y 1:75 del anticuerpo monoclonal anti-p65.....	40
Figura 16.	Regulación transcripcional de miR-223 por NF- κ B.....	41
Figura 17.	Esquema con la posición en que se realizó cada una de las deleciones.....	42
Figura 18.	Regulación transcripcional de miR-223 por NF- κ B al eliminar el sitio distal y central.....	43

Figura 19.	Regulación transcripcional de miR-223 por NF-κB al eliminar el sitio distal y central, comparación.....	44
Figura 20.	Regulación transcripcional de miR-223 por NF-κB al eliminar el sitio proximal.....	45
Figura 21.	Expresión relativa de miR-223, mediante PCR tiempo real.....	46
Figura 22.	Mediante ensayos de CHIP se comprobó que el LPS induce la unión de p50 y p65 a los sitios Distal, Central y Proximal, en el promotor de miR-223.....	46
Figura 23.	Estandarización de la técnica de EMSA utilizando los controles proporcionados por el kit.....	48
Figura 24.	Se probaron distintas concentraciones de extractos nucleares de células HEK-293-TLR4-MD2-CD14.....	48
Figura 25.	Se probaron distintas condiciones al cambiar algunos de los componentes de la reacción así como los extractos nucleares de las líneas celulares HEK-293-TLR4-MD2-CD14 y U937.....	49
Figura 26.	Control positivo de NF-κB. Se probaron dos condiciones tratando de observar el complejo de la interacción entre NF-κB y la sonda de DNA reportada en la literatura.....	49
Tabla 1.	Oligonucleótidos para PCR punto final.....	18
Tabla 2.	Oligonucleótidos para la secuenciación del promotor de miR-223 clonado el vector pGEM-T- Easy.....	20
Tabla 3.	Oligonucleótidos específicos para mutagénesis sitio dirigida.....	22
Tabla 4.	Oligonucleótidos utilizados para realizar la retro-transcripción y el tiempo real.....	28
Tabla 5.	Oligonucleótidos para PCR punto final CHIP.....	30
Tabla 6.	Oligonucleótidos para EMSA.....	31

RESUMEN

La estimulación de TLR-4 por su ligando LPS, conduce a la activación final del factor transcripcional NF- κ B, el cual a su vez regulara la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune, incluyendo los microRNAs (miRNAs). Estudios han demostrado que miR-223 es esencial durante la generación de células del linaje mieloide, así como de su participación durante la respuesta inmune innata. Mediante análisis *in silico* encontramos que la región promotora de miR-223, posee tres posibles sitios de unión a NF- κ B, lo que sugiere que este factor transcripcional podría regular la expresión de miR-223, de manera directa. Por PCR punto final se amplificó a partir de DNA genómico el fragmento de 1.9 Kb del promotor de miR-223, posteriormente se clonó en el vector reportero pGL4.10 y por mutagénesis sitio dirigida se eliminaron los probables sitios de interacción con NF- κ B. Células HEK-293-TLR4-MD2-CD14 fueron transfectadas con cada una de las construcciones, después de ser estimuladas con LPS se evaluó la actividad del promotor mediante ensayos de luciferasa, demostrando un aumento en la actividad del promotor de miR-223 tras el estímulo, sin embargo, al eliminar dos de los sitios esta actividad disminuye aunque no es abatida, mientras que la actividad aumenta al eliminar el tercer sitio, por lo que NF- κ B podría tener un efecto represor. Se comprobó por RT-PCR a partir de células U937 estimuladas con LPS, un aumento en la expresión de miR-223 dependiente de NF- κ B y por último se determinó mediante ensayos de ChIP que el heterodímero p50/p65 interacciona con cada uno de los sitios kB. La evidencia experimental sugiere fuertemente que NF- κ B regula la actividad transcripcional del promotor de miR-223 a través de los tres sitios kB, tras la activación de TLR-4 por su ligando LPS.

ABSTRACT.

The TLR-4 stimulation by its ligand LPS, leading to the final activation of the transcription factor NF- κ B, which in turn regulate the expression of genes involved in the immune response, including microRNAs (miRNAs). Studies have shown that miR-223 is essential for the generation of myeloid lineage cells, and their participation during the innate immune response. By *in silico* analysis found that the promoter region of miR-223, has three potential binding sites for NF- κ B, suggesting that this transcription factor may regulate the expression of miR-223 directly. Endpoint PCR amplified from genomic DNA fragment of 1.9 Kb promoter of miR-223, subsequently cloned into the reporter vector pGL4.10 site-directed mutagenesis and the likely sites of interaction with NF- κ B were removed. HEK293-TLR4-MD2-CD14 cells were transfected with each of the constructs, after being stimulated with LPS promoter activity was assessed by luciferase assays, demonstrating an increase in promoter activity of miR-223 since stimulus, however, by eliminating two of the sites decreases although this activity is not depressed, while the activity increases to remove the third site, so that NF- κ B might have a controlling effect. It was found by RT-PCR from U937 cells stimulated with LPS, increased expression of miR-223-dependent NF- κ B and finally determined by ChIP assays heterodimer p50 / p65 interacts with each of the κ B site. Experimental evidence strongly suggests that NF- κ B regulates the transcriptional promoter activity of miR-223 by the three sites κ B, upon activation of the TLR-4 ligand LPS.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Inmunidad innata y TLRs.

La respuesta inmune humana tradicionalmente ha sido dividida en dos campos: inmunidad innata y adaptativa. Apareciendo primero la inmunidad innata en el origen evolutivo y siendo la primera línea de defensa que reconoce, bloquea la proliferación y diseminación de los patógenos (Akira S. y Takeda K., 2004). Depende de un número limitado de receptores codificados desde la línea germinal que reconocen estructuras microbianas altamente conservadas evolutivamente (Estuar E. *et al.*, 2010). Así, la velocidad es una característica del sistema inmune innato, ya que en cuestión de minutos de exposición al patógeno se genera una respuesta inflamatoria protectora. Más aun la inmunidad innata juega un rol central en la subsecuente activación de la respuesta inmune adaptativa (Estuar E. *et al.*, 2010).

El reconocimiento de patógenos está dado por la familia de receptores tipo Toll (TLRs; del inglés "Toll-like receptors"), son proteínas de un solo paso transmembranal, cuyo dominio N-terminal extracelular contiene repeticiones ricas en leucina, que son responsables del reconocimiento de patrones asociados a patógenos (PAMPs; del inglés "Pathogen-associated molecular pattern") y patrones asociados a daño (DAMPs; del inglés "damage-associated molecular pattern"), los cuales representan principalmente moléculas reguladas positivamente y liberadas durante la lisis celular y daño al tejido que ocurre en contextos de inflamación infecciosa y estéril (Estuar E. *et al.*, 2010). Por otro lado, el dominio C-terminal citoplasmático, es semejante al receptor de interleucina-1 (IL-1), conocido como dominio de receptor TOLL/IL-1 (TIR; del inglés "TOLL/IL-1 receptor"), el cual es requerido para la señalización río abajo (Kawai T. y Akira S., 2010).

Se han descrito cerca de 13 miembros de TLRs, cada uno reconoce distintos PAMPs derivados de patógenos, tales como bacterias, virus, protozoarios y hongos. Estos componentes microbianos incluyen lipopolisacáridos (LPS), el ligando más común de TLR-4, lipoproteínas ligando de TLR-2, flagelina el ligando de TLR-5, dinucleótidos (CpG) bacterianos ligando de TLR-9, RNA viral de una sola cadena rico en guanina y uracilo ligando de TLR-7 y 8, RNA de doble cadena como ligando de TLR-3 (Kawai T. y Akira S., 2010) (Fig. 1).

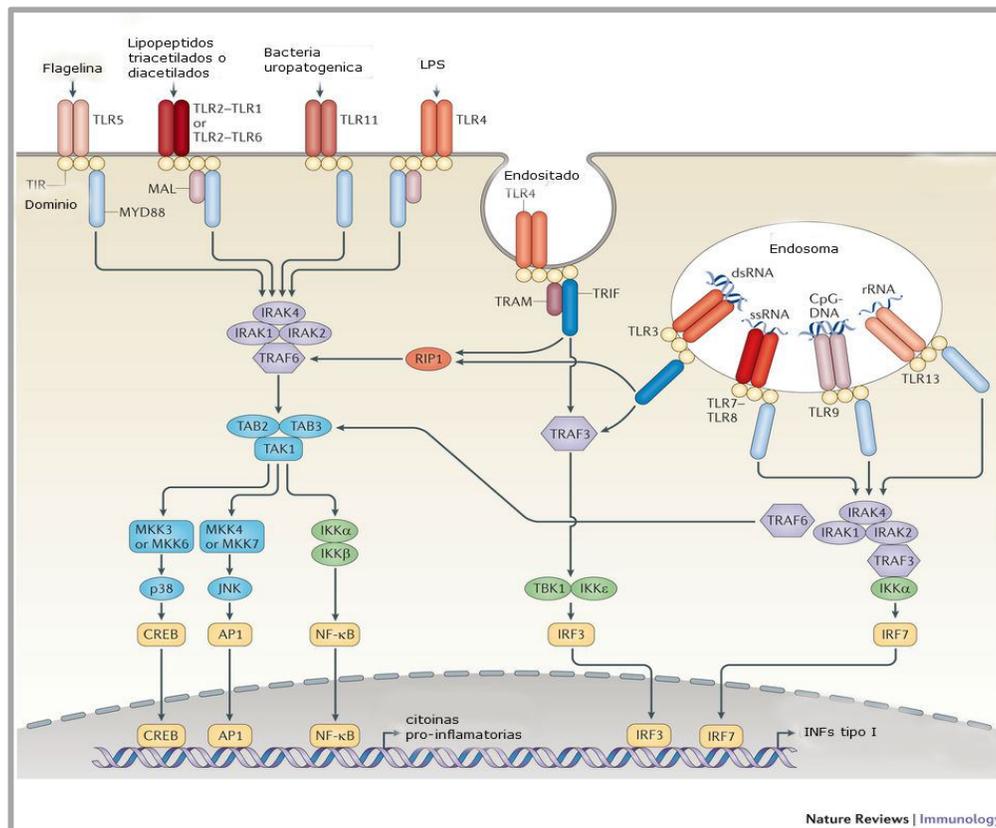


Fig. 1. Esquema representativo de los distintos TLRs así como sus respectivos ligandos (Luke A., *et al*, 2013).

Los TLRs son expresados por células inmunes tales como macrófagos, células dendríticas, células B, neutrófilos y por células no inmunes como fibroblastos, células epiteliales y queratinocitos. Después del reconocimiento de los PAMPs por los TLRs, se recluta un grupo de proteínas adaptadoras con dominios TIR, las cuales interactúan y

disparan la cascada de señalización que conlleva a la activación del factor del transcripcional NF- κ B, el cual controla la inducción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias (Kawai T. y Akira S., 2010).

1.2 TLR-4 y LPS.

La evidencia sugiere que hay diversos PAMPs que pueden estimular a TLR-4 incluyendo LPS, la proteína de fusión del virus sincicial respiratorio (RSV; del inglés “respiratory syncytial virus”) y la proteína del virus de tumor mamario de ratón (MMTV; del inglés “mouse mammary tumor virus”), así como moléculas endógenas tales como proteínas de choque térmico, ácido hialurónico y β -defensina 2 (Yong- Chen L. *et al.*, 2008).

El LPS es el componente bacteriano inmuno-estimulador mejor estudiado que puede inducir inflamación sistémica o sepsis si el estímulo es excesivo. Es un importante componente estructural de la membrana exterior de las bacterias gram-negativa. Es un glicolípido macromolecular compuesto de una región hidrofóbica denominado lípido A unido a una larga y ramificada cadena de carbohidratos. El lípido A es el responsable de la actividad inmunológica (Beom S. P. *et al.*, 2013).

Las moléculas de LPS debido a su carácter anfipático, forman grandes agregados en ambientes acuosos, por lo que proteínas accesorias como la proteína de unión a LPS (LBP; del inglés “LPS binding protein”) y CD14, aumentan la detección del LPS por el complejo TLR-4/MD2 al extraer y monomerizar LPS, antes de ser presentado al complejo. La proteína LBP es soluble en plasma y ávidamente se une al LPS permitiendo que esté a su vez, interaccione con CD14. CD14 es una proteína expresada en células mielomonocíticas en forma de glicoproteína anclada a glicosilfosfatidilinositol o soluble en plasma. MD2 es una proteína soluble que se asocia de manera no covalente a TLR-4 y forma directamente un complejo con LPS (Fig. 2) (Beom S. P. *et al.*, 2013).

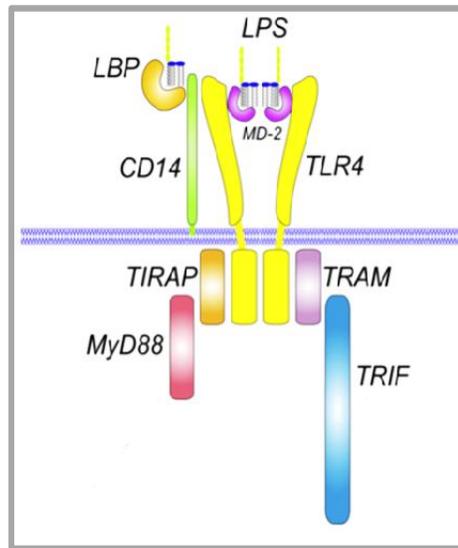


Fig. 2. Formación del complejo LPS/TLR-4, a través de LBP, CD14 y MD-2 (Yong-Cheng I. *et al.*, 2008).

Una vez dado el reconocimiento del LPS por TLR-4, se recluta a una serie de moléculas adaptadoras río abajo para la apropiada señalización, llevando a la activación de factores de transcripción como NF- κ B.

1.3 NF- κ B.

La respuesta inflamatoria es caracterizada por la activación coordinada de varias vías de señalización que regulan la expresión de ambos mediadores pro- y anti-inflamatorios en células del tejido residente o en los leucocitos reclutados.

Estudios han confirmado que durante la inflamación, NF- κ B desempeña papeles pro- y anti- inflamatorios. Por un lado puede inducir la expresión de citocinas inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF α (Hayden M.S. *et al.*, 2006). Mientras que por otro, es capaz de regular el fenotipo M1 o M2 de macrófagos, inducir la expresión de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 o tener un rol pro-apoptótico en neutrófilos (Hagemann *et al.*, 2008).

NF- κ B comúnmente se encuentra en forma de heterodímero, el cual es secuestrado en el citoplasma por la proteína I κ B (inhibidor de NF- κ B). Cuando la vía de señalización se activa, la proteína I κ B se fosforila y degrada, permitiendo la translocación nuclear de NF- κ B (Wong E. T., *et al.*, 2009). Esta vía es denominada “canónica” y es la responsable de la inducción de citocinas inflamatorias.

El término NF- κ B se utiliza indistintamente en la descripción de las subfamilias Rel y NF- κ B o para el heterodímero específico p50-p65 o RelA siendo éste el dímero más común en distintas células. Todas estas proteínas contienen un dominio de dimerización y unión al DNA altamente conservado (RHD; del inglés “Rel homology domain”) (Gilmore, 1990). Sin embargo, la subfamilia Rel compuesta de c-Rel, RelB y RelA contienen un dominio de transactivación en el extremo C-terminal que permite activar la transcripción, mientras que la subfamilia NF- κ B compuesta por p100 y p105 aunque no contienen el dominio de transactivación son distinguidos porque en el extremo C-terminal contienen múltiples copias de anquirina la cual actúa como inhibidor de la proteína, cuando estas repeticiones de anquirina son eliminadas se generan las proteínas p52 (p100) y p50 (p105) cuya unión al DNA se activa. Tales miembros de la familia no son activadores de la transcripción hasta que forman dímeros con miembros de la subfamilia de Rel (Gilmore, 2006).

Son 15 las posibles combinaciones de dímeros de NF- κ B pero solo 12 son capaces de unirse al DNA y potenciar la regulación transcripcional, entre los dímeros mejor estudiados encontramos el heterodímero p50-p65 y los homodímeros de p50 y p52 (Hoffman, 2006).

1.3.1 TLR señala a NF- κ B.

La activación de NF- κ B por TLRs está dada por dos vías (ambas vías son utilizadas por TLR-4). En la primera vía, TLR interactúa con la proteína MyD88, a su vez esta proteína

interactúa con IRAK4 e IRAK1, las cuales son fosforiladas y disociadas de MyD88. Posteriormente, IRAK4 y 1 interactúan con TRAF6. TRAF6 es una ubiquitinligasa E3 que junto con E2, Ubc13 y Uev1A, promueven la ubiquitinación en la lisina 63 en proteínas blanco, como la misma TRAF6 y NEMO, lo que conlleva a la activación de NF- κ B (Wang C., *et al.* 2001). Mientras que en la vía independiente de MyD88, NF- κ B es activado por TRIF, un mecanismo que también es usado por TLR-3. La región C-terminal de TRIF contiene el motivo de interacción homotípico Rip (RHIM; del inglés “Riphomotypic interaction motif”), el cual es poliubiquitinado y forma un complejo con TRAF6 y TAK1, resultando en la activación de NF- κ B (Cusson-Hermance N., *et al.* 2005) (Fig. 3). TLR-4 es capaz de activar NF- κ B mediante ambas vías, siendo el heterodímero p50-p65 preferencialmente activado (Kawai T. y Akira S., 2010).

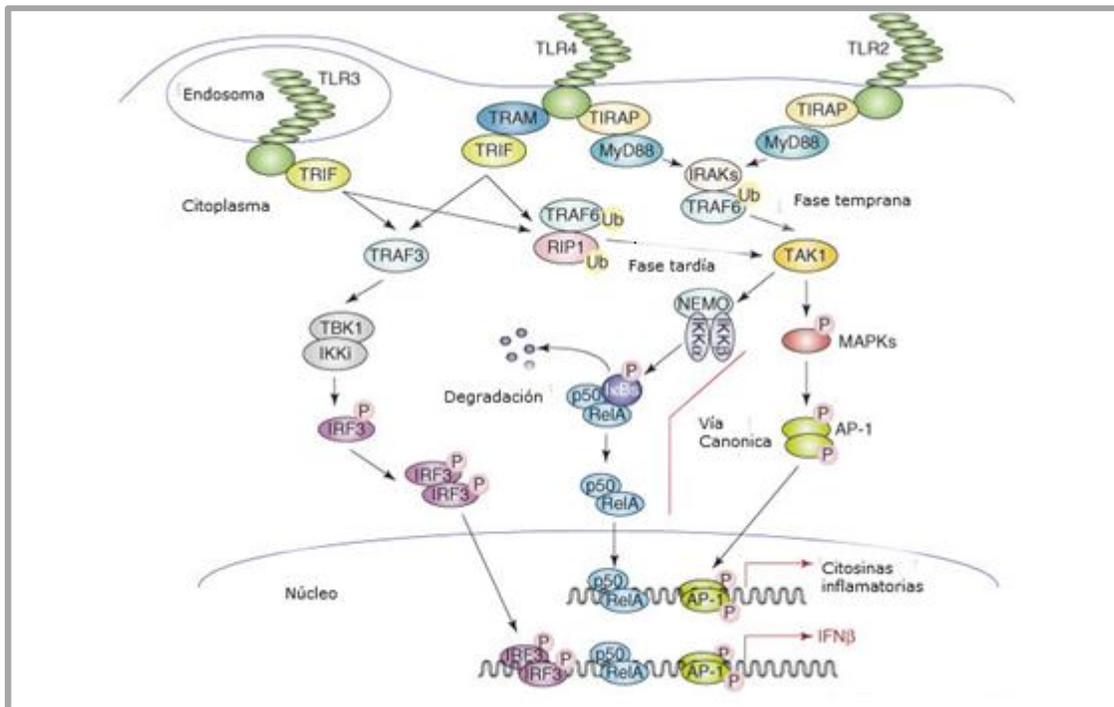


Fig. 3. Vía de señalización mediada por la activación de TLR-2, TLR-3 y TLR-4, llevando a la regulación de genes involucrados en la respuesta inmune (Kawai T. y Akira S., 2007).

1.3.2 Regulación transcripcional de genes por NF-kB.

Los mecanismos que regulan la actividad de NF-kB como: dimerización, inhibición por IκB, interacción con otros activadores transcripcionales; así como cambios en la fosforilación y variación en la secuencia de la proteína pueden afectar la unión al DNA. Mientras que las regiones regulatorias en los genes dependientes de NF-kB, involucran sitios de unión y organización de la cromatina para el apropiado control transcripcional, el cual es específico del tejido o del estímulo (Hoffmann A. *et al.*, 2006).

Las proteínas NF-kB se unen a segmentos con una secuencia consenso de cerca de 10 pares de bases 5'-GGGRNWYYCC-3', referidos como sitios kB, donde R denota una base purina, N denota cualquier base, W denota una adenina o timina e Y denota una pirimidina (Hoffmann A., *et al.* 2006, Chen F. E. y Ghosh G. 1999). Se ha determinado que las secuencias kB son pseudosimétricas con cinco pares de bases 5'-GGGRN-3' para p50 o p52 y cuatro pares de bases 5'-YYCC-3' para p65, c-Rel y RelB y una base intermedia entre las anteriores. Cabe indicar que puede haber cierta flexibilidad en el tamaño de los sub-sitios dependiendo del dímero que interaccione, mientras homodímeros como p50 o p52 prefieren sitios de cerca de 11 pares de bases, separados por una A o T, heterodímeros como p50/p65s prefieren sitios con 10 pares de bases (Hoffmann A., *et al.* 2006).

Estudios de cristalografía han llevado a determinar la estructura de los complejos NF-kB/DNA, principalmente en los heterodímeros p50/p65, en donde se ha demostrado que al interactuar con el DNA forma una estructura en forma de mariposa (Fig. 4). Cada subunidad del dímero contiene dos grupos de láminas β plegadas, que forman el dominio N- terminal que contacta al DNA de manera específica con pares de bases y no específica con el esqueleto de fosfato (Chen F. E. y Ghosh G. 1999) y la unión con el DNA se da mediante "loops". En el desorden convencional de los loops, se encuentra el loop L1

una región altamente estructurada en las proteínas NF- κ B. Este loop es capaz de interactuar con el surco mayor del DNA conteniendo ambos subsitios; un residuo de tirosina mediante enlaces de Van der Waals interactúa con dos pirimidinas centrales (preferencialmente timinas). Una histidina en el loop L1 de p50 y p52 hace contacto directo con la primera guanina en el sitio κ B (Muller C. W. *et al.*, 1995, Cramer P. *et al.*, 1997, Chen F. E. *et al.*, 1998).

Diversos estudios han demostrado que los dímeros de NF- κ B presentan distinta especificidad hacia los promotores. Por ejemplo, algunos promotores como RANTES e IP-10, aunque muestran distintas secuencias en los sitios κ B suelen utilizar los mismos dímeros de NF- κ B, mientras que otros promotores como MIP-2, MCP-1 con idéntica secuencia en el sitio κ B, requieren de diferentes dímeros (Hoffmann A., *et al.* 2006).

Por lo que a pesar de la existencia de numerosas secuencias de DNA con posible interacción con NF- κ B, existen diferencias en la afinidad, siendo mayor para ciertos sitios. Algunos de los factores determinantes en la afinidad son la variación en la secuencia de nucleótidos y las numerosas modificaciones post-transduccionales en los dímeros de NF- κ B (Hoffmann A., *et al.* 2006, Leung T. H. *et al.* 2004).

Las modificaciones post-traduccionales también alteran la unión con I κ B, así como, la interacción con represores y co-activadores de la transcripción. Tales modificaciones post-transduccionales incluyen fosforilaciones y acetilaciones en residuos específicos; como es el caso de la fosforilación de p65, en la serina 536, que le permite interactuar con CBP/P300, los cuales son co-activadores de la transcripción. Por otra parte, la acetilación en la lisina 310 aumenta la transcripción sin modificar la unión al DNA (Chen. *et al.*, 2002). Además del requerimiento de los co-activadores, las funciones específicas de cada dímero de NF- κ B, aún se encuentran bajo una intensa investigación (Britanova. *et al.*, 2008). Las diferencias temporales en la liberación de los dímeros, debido en parte a la vía, el tipo celular, a las modificaciones post-transduccionales, así como la interacción con

otros factores de transcripción, entre otros factores, son de relevancia en la regulación de la expresión de distintos genes (Hayden M. S. *et al.* 2008).

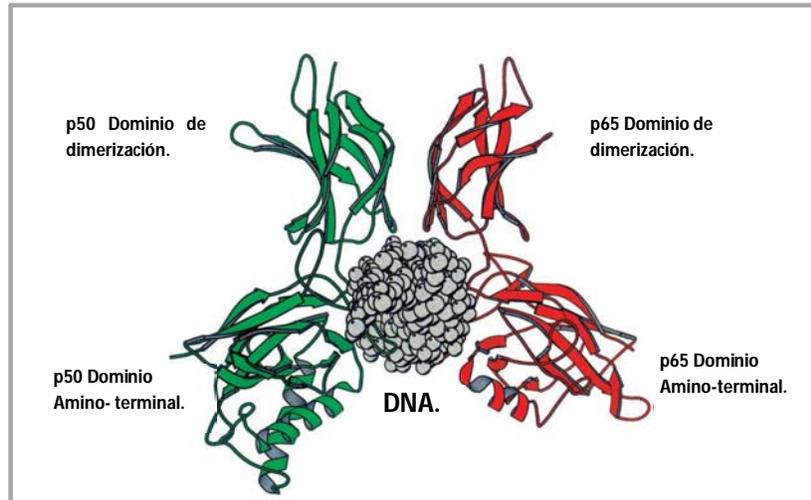


Fig. 4. Interacción del heterodímero p50/p65 con el DNA, formando la estructura en mariposa en la cual los loops son los principales en interaccionar con lo nucleótidos del sitio kB (Chen F. E. y Ghosh G. 1999).

1.4 TLRs y miRNAs.

Las vías de señalización activadas por TLRs deben ser finamente moduladas positiva o negativamente, a distintos niveles, para prevenir la excesiva inflamación y por tanto, mantener la homeostasis de la respuesta inmune. Se ha observado que en varios de estos mecanismos de regulación, se encuentran involucrados los microRNAs (miRNAs), los cuales son RNAs no codificantes de una sola hebra de aproximadamente 21 nucleótidos. De manera canónica, la función de estos RNAs pequeños es regular post-transcripcionalmente la expresión de genes por apareamiento con la región 3' no traducible (UTR; del inglés "untranslated region") del mRNA blanco. La unión de un miRNA al mRNA blanco conduce a la represión traduccional o degradación de este último, dependiendo del grado de complementariedad de sus bases (predominantemente en la región semilla) (Kim. *et al.*, 2009).

La relación entre los miRNAs y la señalización de TLRs es bidireccional, ya que los miRNAs pueden regular la expresión de los TLRs e incluso de las proteínas asociadas a la cascada de señalización de TLRs (He X., *et al.*, 2014). Por el contrario, también se ha demostrado que los TLRs regulan la expresión de ciertos miRNAs. Baltimore y colaboradores en el 2006, demostraron por primera vez, un aumento en la expresión de miR-146, miR-155 y miR-132 en monocitos humanos, después de la estimulación con LPS, siendo regulados transcripcionalmente por NF- κ B. Estudios subsecuentes documentaron que miR-147, miR-9, miR-27b, let-7 podían ser inducidos por estímulos con los ligandos de otros TLRs, lo que lleva a la idea de que los miRNAs son regulados de manera específica y temporal (Moschos S. A.*et al.*, 2007, Liu G. *et al.*, 2009). Por ejemplo, miR-146 y miR-155 son regulados positivamente después de 2 h del tratamiento con LPS, por lo que son considerados miRNAs de respuesta temprana, mientras que miR-22 es expresado mucho tiempo después del tratamiento con LPS y es considerado un miRNA de respuesta tardía (Moschos S. A. *et al.*, 2007, Sheedy F. J. *et al.*, 2010).

1.4.2 Biogénesis y mecanismos de acción de los miRNAs.

Los miRNAs son producidos a través de una serie de pasos que comienzan en el núcleo, donde los genes de miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II. Lo anterior genera transcritos primarios denominados pri-miRNAs, los cuales posteriormente son procesados por la enzima RNasa III llamada Drosha, generando un precursor de menor tamaño llamado pre-miRNA (Kim.*et al.*, 2009). Después, los pre-miRNAs son exportados al citoplasma por la proteína Exportina 5 y procesados por la enzima Dicer (RNasa III), lo que produce miRNAs maduros de doble cadena con un tamaño aproximado de 21 nucleótidos. (Krol.*et al.*, 2010), (Fig. 5).

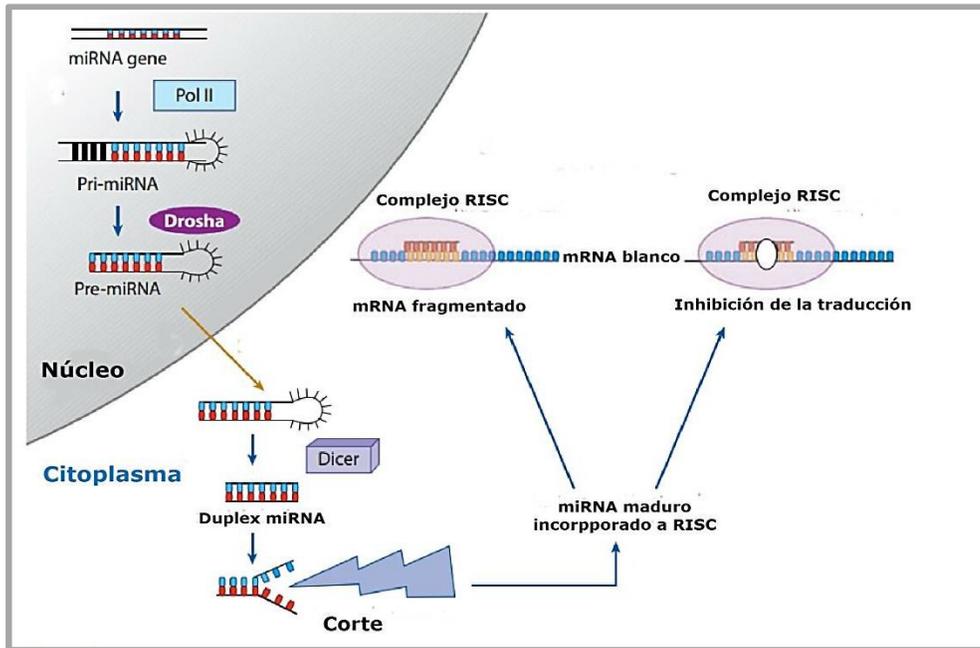


Fig. 5. Biogénesis de miRNAs (Garzon R *et al.*, 2009).

1.4.3 Regulación transcripcional de los miRNAs.

La expresión de los miRNAs se ve regulada a diferentes niveles, sin embargo, la regulación transcripcional ha resultado ser trascendental en mantener la correcta función de los miRNAs.

Aproximadamente el 50% de los genes que codifican miRNAs se encuentran en grupos y son transcritos a partir de una sola unidad transcripcional (TU; del inglés "transcription unit"), aunque hay casos en los que forman genes individuales. Además pueden ser transcritos a partir de TUs no codificantes o codificantes para proteínas. En TUs no codificantes cerca del 40% se transcribe a partir de intrones, mientras que cerca del 10% provienen de exones. Los miRNAs transcritos a partir de TUs que codifican para proteínas, comúnmente se encuentran en intrones (Kim *et al.*, 2007) (Fig.6).

Ahora bien, se ha visto que la transcripción de genes que pertenecen a miRNAs, es regulada de una manera similar a la regulación transcripcional de los genes que codifican proteínas (Krolet *et al.*, 2010).

El control en la expresión de genes por retroalimentación, es un mecanismo de regulación común que es particularmente importante durante la determinación del destino celular. Los miRNAs pueden formar parte de estos mecanismos de regulación debido a que son capaces de reprimir la traducción de mRNAs que codifican para factores involucrados en la biogénesis, en la función del mismo miRNA o de otros miRNAs. Esta regulación se puede estar acoplada a factores de transcripción específicos (Krolet *et al.*, 2010).

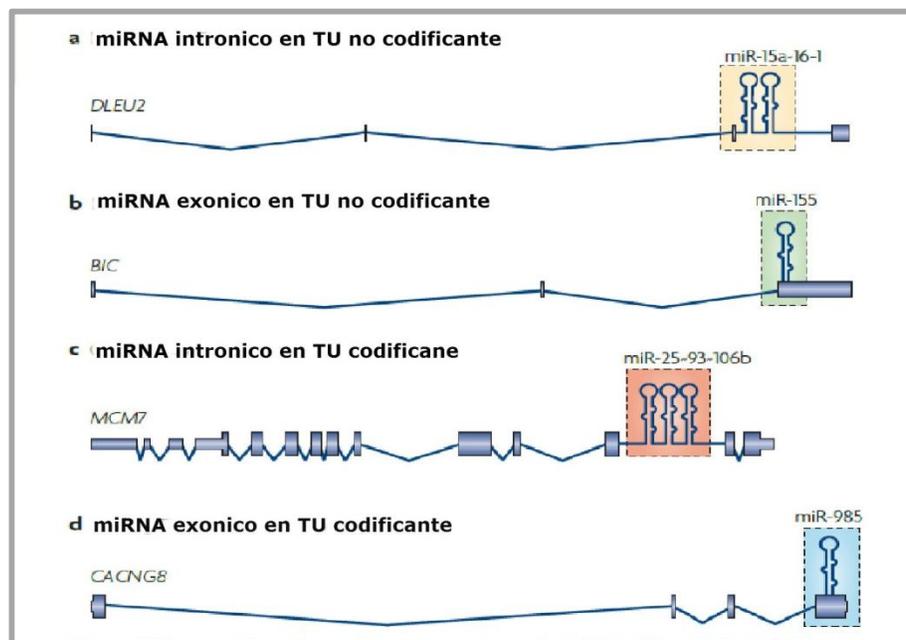


Fig. 6. Localización genómica y estructura de los genes codificantes de miRNAs (Kim NV., *et al.*, 2009).

2. ANTECEDENTES.

A pesar de que se ha generado una gran cantidad de información acerca del papel que juegan algunos miRNAs en la respuesta inmune innata, aún hay mecanismos que no han sido aclarados, como es el caso de la función de miR-223. Este miRNA es considerado

un regulador maestro de la granulopoiesis (Fazi F. *et al.*, 2005); sin embargo, disminuye durante la diferenciación de granulocitos-monocitos (Johnnidis J.B. *et al.*, 2008). Aunque se ha observado que es regulado positivamente en células epiteliales bronqueales y alveolares durante la inducción de inflamación pulmonar en modelo murino con LPS (Moschos S. A. *et al.*, 2007), también se ha visto que es regulado negativamente a través de IL-6 y STAT3 en macrófagos, después de ser estimulados con LPS. Sin embargo, un aumento en sus niveles en suero de pacientes con sepsis se ha asociado a un pronóstico favorable (Wang J. *et al.*, 2010). Los estudios anteriores demuestran que miR-223 juega un papel importante en la respuesta inmune, el cual es específico del tipo y contexto celular, por lo que conocer los mecanismos que regulan la expresión de este miRNA puede tener importantes implicaciones en la terapia de distintas patologías.

En nuestro laboratorio mediante un análisis *in silico* se determinó que en la región promotora de miR-223, existen tres posibles sitios de unión al factor de transcripción NF- κ B, por lo que, nuestro interés se centró en determinar si NF- κ B es un modulador de la expresión de miR-223, como resultado de la activación de TLR-4/LPS, como una vía de activación de este factor transcripcional.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La estimulación de TLR-4 por su ligando LPS conduce a la activación final de NF- κ B, el cual a su vez regulará la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune capaz de controlar a los patógenos. La activación descontrolada de TLR4 por LPS conlleva a la producción de citocinas como TNF- α , IL-1b e IL-6 siendo las principales causantes de shock séptico (Bosshart H. y Heinzelmann M., 2007). Sin embargo, aún faltan estudios que permitan discernir los mecanismos de regulación del promotor de miR-223, a través de una respuesta inflamatoria inducida por LPS y entender si la regulación de dicho promotor mediada por la vía TLR-4/NF- κ B

4. HIPÓTESIS.

La activación de TLR-4 mediante su ligando LPS inducirá la translocación del factor NF- κ B al núcleo, promoviendo la interacción sobre la región promotora de miR-223 y por tanto causará un efecto en los niveles de expresión de este miRNA.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general.

Evaluar la actividad transcripcional de NF- κ B sobre el promotor de miR-223.

5.2. Objetivos particulares.

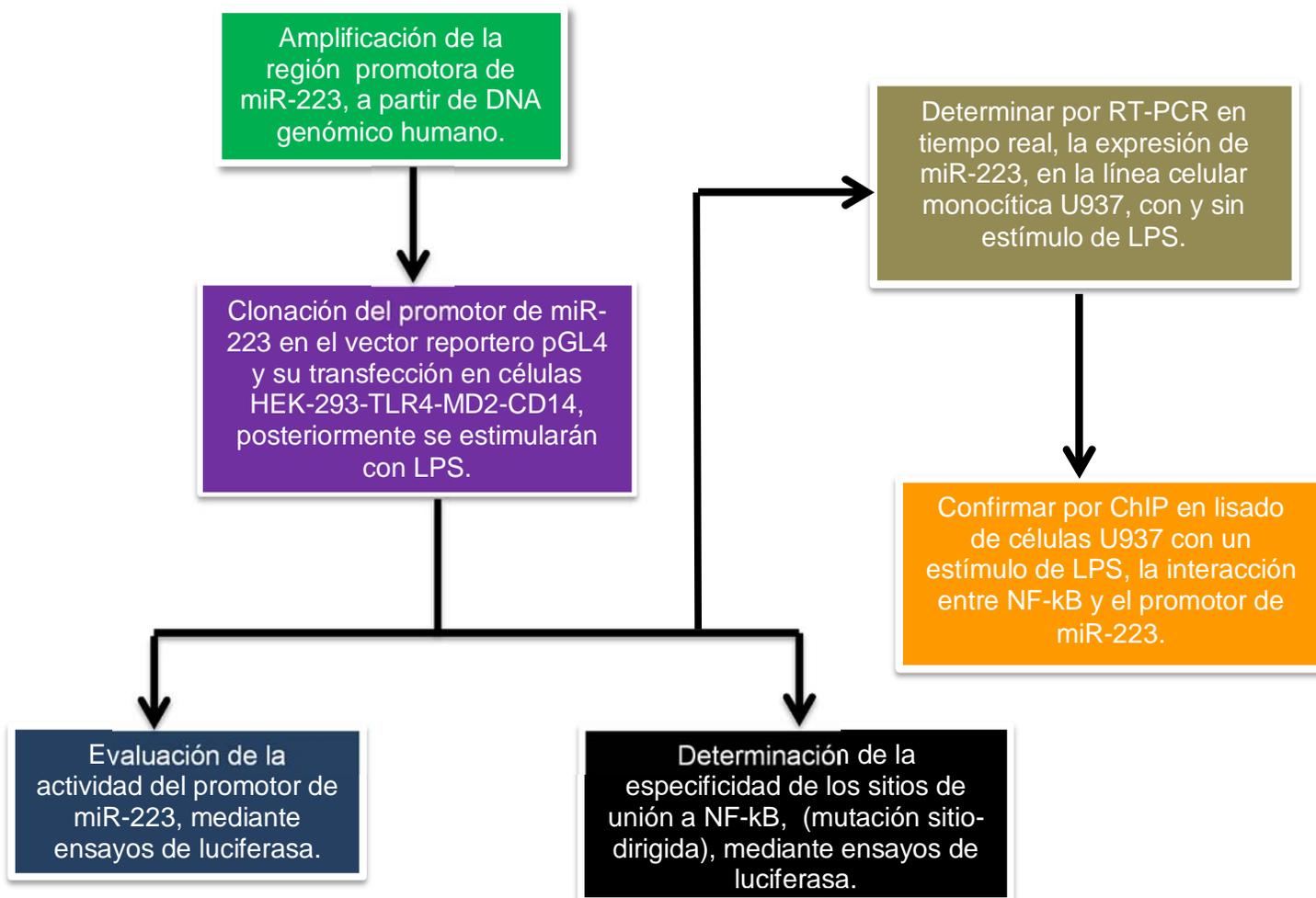
1. Evaluar que la región promotora de miR-223 presente actividad transcripcional, posterior al estímulo con LPS, en la línea celular HEK-293-TLR4-MD2-CD14.

2. Realizar mutaciones en cada sitio kB sobre la región promotora de miR-223 y averiguar su participación en la activación del mismo, en la línea celular HEK-293-TLR4-MD2-CD14, posterior al estímulo con LPS.

3. Determinar la expresión de miR-223 en la línea celular monocítica U937, posterior al estímulo con LPS.

4. Demostrar la interacción de NF- κ B en al menos un sitio kB, en la región promotora de miR-223 en un contexto celular (U937), posterior al estímulo con LPS.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL.



7. METODOLOGÍA.

7.1 Análisis bioinformático.

En colaboración con el Dr. Jesús Aguirre Hernández del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” se realizó un análisis *in silico* con las herramientas bioinformáticas: miRStarthttp://mirstart.mbc.nctu.edu.tw/home.php y contra V2 http://www.dnbr.ugent.be/prx/bioit2-public/contrav2/, determinando una secuencia de 1.9 Kb correspondiente al promotor de miR-223, la cual contiene tres posibles sitios de unión a NF-kB.

7.2 Reacción de PCR en punto final.

Para la obtención del fragmento de 1.9 Kb del promotor de miR-223, se diseñaron los oligonucleótidos específicos mediante el software Vector NTI 6, incluyen los sitios de restricción *KpnI* y *XhoI* para la posterior clonación en el vector pGEM- T-easy (Promega)

y la subclonación sitio dirigida en el vector reportero pGL4.10 basic (Promega) (Tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos para PCR punto final.

Forward Prom-223-*KpnI*

Reverse Prom-223-*XhoI*

5' **GGTACC**AGGACTACCCTACTTCGCTCC 3'

5' **CTCGAG**CCAGCTTGAGAATCCAAGAAG 3'

En amarillo se muestran los sitios de restricción utilizados durante la clonación.

A partir de DNA genómico extraído (kit QIAamp DNA blood mini (QIAGEN, No. de cat. 51104)) de un individuo sano, se amplificó el fragmento de 1.9 Kb del promotor de miR-223, mediante PCR punto final, usando el kit comercial “Expand High Fidelity PCR System” (Roche, No de cat. 11 732 641 001). Se preparó la reacción con 5 µL del Buffer

Expand High Fidelity 10X, 1 μ L dNTPs (200 mM), 1.5 μ L de oligonucleótido sentido (300 nM) y 1.5 μ L de oligonucleótido anti-sentido (300 nM), 5 μ L de DNA templado (50 ng), 0.75 μ L de la DNA polimerasa Expand High Fidelity (2.6 U) y se aforó a un volumen de 50 μ L con agua libre de nucleasas. Una vez que se preparó la reacción se procedió a la amplificación con el siguiente programa: Desnaturalización inicial 94°C por 5 min un ciclo, después 30 ciclos con desnaturalización a 94°C por 15 seg, alineación 58°C por 30 seg, elongación 72°C por 2 min y posteriormente 4°C. Se verificó la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

7.3 Construcción de los plásmidos reporteros.

Como estrategia para clonar el promotor de miR-223 en el vector final pGL4.10 (Fig. 7B), inicialmente se clonó el amplicón del promotor de miR-223, en el vector pGEM-T-easy, usando el kit comercial “pGEM®-T Vector System I” (Promega) (Fig.7A), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Este vector presenta una timidina en la posición 3´ terminal de cada hebra de DNA, lo que permite aumentar la eficiencia de ligación del amplicón, e impide que el vector recircularice.

La construcción generada fue denominada pSGprom-miR223, con la cual se realizó la transformación mediante el método de choque térmico a 42°C, utilizando bacterias competentes *E. coli* de la cepa DH5 α . Las bacterias se plaquearon en platos de agar LB con ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron a 37°C por 16 h. Posteriormente se seleccionaron 10 clonas y el DNA plasmídico fue purificado mediante el sistema comercial “PureYield Plasmid Miniprep System” (Promega, No de cat. A1223). La integridad del DNA se verificó mediante secuenciación capilar, utilizando los oligonucleótidos T7 y SP6 los cuales alinean con los extremos del vector pGEM-T-easy. Sin embargo, se necesitó diseñar tres primers más para secuenciar el resto del fragmento del promotor de miR-223 (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos para la secuenciación del promotor de miR-223 clonado el vector pGEM-T- Easy.

T7 Promoter	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'
SP6 Promoter	5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA 3'
Prom- miR223sF1 (Forward)	5' GGC TCG CAG AAT GTG GTC 3'
Prom- miR223sF2 (Forward)	5' CCA ATG TGG GAA AGT AGA CG 3'
Prom- miR223sR1 (Reverse)	5' GCT CTG CCT GTG GGT CAA G 3'

Una vez generada la construcción pSGprom-miR223 se procedió a la subclonación en el vector pGL4.10 (Promega). La construcción pSGprom-miR223 fue digerida con las enzimas *KpnI/XhoI* por 2 h a 37°C para liberar la región promotora de miR-223 del vector pGM-T-easy. Por otra parte, el vector pGL4 fue linearizado al ser digerido de igual forma con las enzimas *KpnI/XhoI* por 2 h a 37°C. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para separar el fragmento del inserto del resto del vector pGEM-T-Easy, después se escindir la banda del gel, se procedió a purificar el DNA mediante el sistema comercial “Wizard SV gel and PCR clean UP system” (Promega). Se cuantificó el inserto y el vector pGL4 mediante densitometría de las bandas, con ayuda del software “genes tools from syngene”. Una vez cuantificado el DNA, se realizó la ligación en una proporción molar 1:5 (1 porción del vector: 5 porciones del inserto), a 16°C por 16 horas. Posteriormente, se transformaron bacterias competentes *E. coli* de la cepa DH5α con todo el volumen de reacción de ligación. Las bacterias se plaquearon en platos de agar LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37°C por 16 h. Posteriormente se seleccionaron 10 clonas y se purificó el DNA plasmídico. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% para verificar el DNA plasmídico.

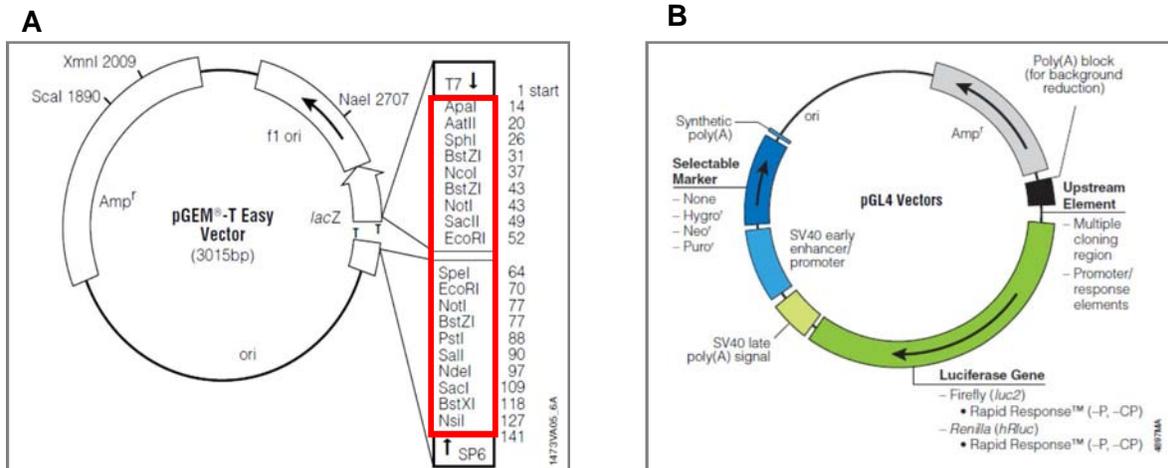


Fig. 7. Se muestra los mapas de cada uno de los vectores utilizados en la clonación del promotor de miR-223. **A)** pGEM- T-Easy; Amp: cassette de resistencia a ampicilina, Ori: origen de replicación, en rojo sitio de policlonación, **B)** pGL4; en verde gen codificante de luciferasa, en negro sitio de policlonación.

7.4 Mutagénesis sitio dirigida.

Para determinar el efecto que tiene cada sitio de interacción con NF- κ B en la actividad del promotor de miR-223, se generaron tres construcciones a las cuales se les eliminó cada uno de los sitios de interacción de NF- κ B, mediante el sistema comercial “Stratagene’s Quik Change[®] II XL Site-directed mutagenesis kit (No. de cat. 200521)”, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El diseño de los oligonucleótidos específicos para cada deleción se realizó mediante el software <http://labtools.stratagene.com/QC> (Tabla 3). Las construcciones generadas fueron denominadas pDistal, pCentral y pProximal, respectivamente. Bacterias ultracompetentes de la cepa XL-10-Gold fueron transformadas con los plásmidos generados, de acuerdo al protocolo antes descrito. Se plaquearon en platos de agar LB con ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron a 37°C por 16 h. Posteriormente fueron seleccionadas 3 clonas de cada transformación para extraer DNA plasmídico mediante el sistema comercial “Pure Yield Plasmid Miniprep System” (Promega). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1%

para verificar la integridad del DNA y se comprobó la clonación mediante secuenciación capilar.

Tabla 3. Oligonucleótidos específicos para mutagénesis sitio dirigida.

Forward DelBS1-Sense-223.

5' CTC AGG TCC TGC AAC CTGGGGAGCCCA ACA GTG AGT AAC GAA GAG 3'

Reverse AS-DelBS1-223.

5' CTC TTC GTT ACT CAC TGT TGGGCTCCCCAG GTT GCA GGA CCT GAG 3'

Forward DelBS2-Sense-223.

5' GAA TTC ATC ATC TTC CTG GCT GTT AGTGGGGACTTCCAG GAG ACT GCAAAC 3'

Reverse AS-DelBS2-223.

5' GTT TGC AGT CTC CTGGAAGTCCCC ACT AAC AGC CAG GAA GAT GAT GAA TTC 3'

Forward DelBS3-Sense-223.

5' TAT CAT AAG TAC TCC AAT AAA TGTGAATTTCCCTAT TTA TTT CCT TCA GCA AGC CC 3'

Reverse AS-DelBS3-223.

5' GG GCT TGC TGA AGG AAA TAA ATA AGGAAATTC ACA TTT ATT GGA GTA CTT ATG ATA 3'

7.5 Secuenciación.

Se llevó a cabo la reacción de PCR con el kit comercial "Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing (LifeTechnology, No. de cat. 4337455)", se utilizaron 500 ng de DNA plasmídico, 10 pg de oligonucleótido sentido, 2 µL de Buffer de secuenciación 5X, 3 µL de Big Dye v3.1 y se aforo a un volumen de 20 µL, con agua libre de nucleasas. Se procedió a la amplificación con el siguiente programa: un ciclo de 96°C por 1 min y 25 ciclos de 96°C por 10 s, seguido de 50°C por 5 seg y por último 60°C por 4 min. Después la reacción se limpió con 5 µL de EDTA 125 mM y 60 µL de etanol absoluto y lavados posteriores con 250 µL de etanol al 70% dos veces. La secuenciación capilar se llevó a cabo en el secuenciador automático ABI Prism 3200 (Applied Biosystem).

7.6 Líneas celulares, cultivo y estímulo.

La línea celular HEK-293-hTLR4A-MD2-CD14 fue obtenida a partir de la co-transfección estable de las células HEK-293 (células humanas embrionarias de riñón) con el plásmido pUNO-TLR4, el cual expresa el gen humano TLR4 y los plásmidos pDUO2-MD2-CD14, que expresan los genes humanos de MD2 y CD14 bajo la inducción de los antibióticos Higromicina y Blastidina (InvivoGen). Estas células fueron cultivadas en medio DMEN advanced, suplementado con 5% de SBF, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomina, 100 µg/mL de Normocina y 2 mM de L-Glutamina. Para inducir la expresión de MD2 y CD14 se suplemento el medio con 10 µg/mL de Blastidina y 50 µg/mL de Higromicina.

Esta línea celular fue tratada con 100 ng/mL de LPS (Sigma-Aldrich, No. de Cat. L-3024) por 3 h, posteriormente se evaluó la actividad del promotor mediante ensayos de luciferasa o tiempo real para evaluar la expresión de miR-223.

7.7 Citometría de flujo.

Para realizar la detección de TLR-4 por citometría de flujo, 1×10^6 células se tiñeron con el anticuerpo primario anti-TLR-4/MD2 (Abcam, No. de cat. Ab105950) en una dilución 1:50 en solución FACS, a 4°C y en oscuridad por 30 min.

Una vez incubado el primer anticuerpo, se procedió a centrifugar a 3000 rpm por 1 min y realizaron nuevamente dos lavados con FACS. Después se agregó el anticuerpo secundario IgG (HTL) Goat anti-mouse conjugado a Ficoeritrina (Invitrogen, No de cat. M30004-4), a una dilución 1:200 en FACS, a 4°C y en oscuridad por 30 min. Posteriormente se hicieron dos lavados con FACS y las células fueron analizadas en un citómetro.

7.8 Transfección.

4X10⁴ células HEK-293-hTLR4A-MD2-CD14 por pozo, fueron sembradas en placas de 24 pozos. 24 h después se realizó una transfección transitoria con 200 ng de los plásmidos de interés más 4ng del vector pCMV *Renilla* (Promega, No. de cat.E2261) y 2 µL del reactivo TurboFec de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Fermentas, No. cat. R0531). Al día siguiente se evaluó por microscopía de epifluorescencia que la eficiencia de transfección fuera ≥50%. Posteriormente las células se cosecharon y se llevó a cabo el ensayo de luciferasa correspondiente.

7.9 Ensayo de luciferasa.

La actividad del promotor de miR-223 fue evaluada mediante ensayos de luciferasa. Para ello, las células HEK-293-hTLR4A-MD2-CD14 fueron transfectadas con los plásmidos pGL4, pSprom-miR223, pDistal, pCentral o pProximal según fuera el caso y co-transfectadas con pCVM *Renilla*. 24 h post-transfección se evaluó la actividad de luciferasa con el kit comercial “Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, No. de cat. E292)”, para lo cual, las células fueron lavadas con 300 µL PBS 1X, se lisaron con 200 µL de Buffer de lisis pasivo y en agitación suave durante 15 min. Posteriormente, el lisado se transfirió a microtubos de 1.5 mL y fue centrifugado por 30 seg a máxima velocidad. Por otro lado, en microtubos de 1.5 mL se agregó 100 µL del sustrato de ensayo de luciferasa, al cual inmediatamente se le agregaron 20 µL de lisado, se mezcló brevemente y se leyó la actividad de la luciferasa *Firefly* en un luminómetro GLOMAX, Multi JR (Promega). Posteriormente se adicionaron 100 µL del reactivo “Stop & Glo” y se evaluó la actividad de la luciferasa *Renilla*.

7.10 Extracción de núcleos.

Para evaluar la translocación nuclear de NF- κ B, las células HEK-293-TLR4 fueron estimuladas con 100 y 250 ng de LPS por 60 min. Posteriormente se lavaron PBS a temperatura ambiente (T.A.), se cosecharon en microtubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 3000 rpm por 3 min. El botón se recuperó y se procedió a congelar en hielo seco con etanol por 10 min. Una vez transcurrido el tiempo, se resuspendió el botón en 100 μ L de buffer hipotónico (100 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT). La integridad de los núcleos fue evaluada por microscopia de campo claro al teñirlos con azul tripano y estos fueron recuperados por centrifugación a 3000 rpm por 10 min, a 4°C. Después de centrifugar, el buffer hipotónico fue retirado y se adicionaron 25 μ L de buffer RIPA con inhibidor de proteasas (Complete, Mini, EDTA free, Roche, No. de cat. 11836170001), se agitó en vortex por 15 seg y se incubó 20 min en hielo. Nuevamente se centrifugó a máxima velocidad por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se almaceno a -70°C. El extracto proteico fue cuantificado por el método de Bradford.

7. 11 Inmunoprecipitación.

Con la finalidad de evaluar la translocación de NF- κ B al núcleo posterior al estímulo de las células con LPS, 50 μ g de extractos nucleares se diluyeron en 1800 μ L de buffer de dilución más inhibidores de proteasas (Complete, Mini, EDTA free, Roche No. cat.11 836 170 001). Posteriormente se pre-limpió con 75 μ L de Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA por 30 min a 4°C en agitación, luego se centrifugó a 1000 rpm por 1 min a T. A., recuperando el sobrenadante, al cual se le agregó el anticuerpo en las diluciones 1:25, 1:50 y 1:75, se incubo a 4°C por 16 h, en agitación constante. Posteriormente, se incubó con 60 μ L de Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA por 1 h a 4°C en agitación constante. Los complejos fueron colectados mediante centrifugación a

1000 rpm por 1 min, se removió el sobrenadante y los complejos se lavaron con 500 μ L, durante 4min, con cada uno de los siguientes buffer: Low salt Immune Wash Buffer (1 lavado), High Salt Immune Wash Buffer (1 lavado), LiCl Immune Complex Wash Buffer (1 lavado) y TE Buffer (2 lavados). Posteriormente, se retiró el Buffer TE y se llevó a un volumen de 7.5 μ L de Buffer de Elución (el cual fue preparado previamente con bicarbonato de sodio al 0.1M y 1% SDS), se mezcló suavemente y se incubó por 15 min. El sobrenadante fue transferido a otro microtubo, al cual se le agregó 20 μ L de NaCl 5 M incubando por 4 h a 65°C para revertir el entrecruzamiento.

7.12 Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) 5%.

La detección de p65 se realizó en condiciones desnaturalizante mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% y gel espaciador de 7.5%, agregando 50 μ g proteína de inmunoprecipitado por carril. Las condiciones de electroforesis fueron 125 voltios por 40 min, utilizando una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN tetra cell de Bio Rad. Se usó buffer de corrida constituido por Tris-Base, Glicina y SDS al 10%. Las muestras fueron preparadas por separado en una dilución 1:4 con buffer de muestra (buffer espaciador, SDS 10%, glicerol, azul de bromofenol 05%) y se incubaron a 100°C en baño maría por 5 min. Se utilizaron marcadores de peso molecular comerciales Bio-Rad Precision Plus (No. de cat. 161-0376).

7.13 Western blot.

Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a realizar la transferencia de las proteínas a membranas PVDF en el TransBlot (Bio Rad) a un voltaje constante de 15 voltios durante 15 min, para detección de la proteína p65. Posteriormente, la membrana de PVDF fue bloqueada con PBS 1X/Tween 20 al 0.05%/leche descremada al 5%,

durante 1h, en agitación constante a T.A. Después se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 1X/Tween 20 al 0.05%, en agitación constante a T.A., se incubo con el anticuerpo primario anti-p65 (Abcam, No. de cat. 7970) en una dilución 1:2000 por 1h a T.A. en agitación constante y se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS 1X/Tween 20 al 0.05%, posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-rabbit p65 (Santa Cruz, No. de Cat. Sc2004) acoplado a HRP, en una dilución 1:2000 por 45 min a T. A. en agitación constante. Tras la incubación se realizaron 5 lavados con PBS 1X/Tween 20 0.05% y la reacción se reveló con el reactivo Luminol (Santa Cruz, No. de cat. sc-2048) escaneando en el equipo C-Digit blot scanner de LI-COR.

7.14 RT-PCR en tiempo real.

El RNA total fue aislado de las líneas celulares de interés, usando el kit Quick-RNA miniprep (Zymo Research, No. cat. R10545). Para verificar la integridad de RNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para analizar una alícuota de los RNA. Posteriormente se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). Para la síntesis del cDNA se empleó el sistema comercial TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, No. cat. PN 4366596). Se utilizaron 300 ng de RNA total, dNTPs 100 nM, enzima multiscrypt 50 U/ μ L, buffer RT 10X, inhibidor de RNasa 20 U/ μ L, oligonucleótido RT específico para miR-223 (Tabla 4) y la reacción se aforó con agua libre de nucleasas a un volumen de 15 μ L. Las condiciones de retro-transcripción fueron: 1 ciclo a 16°C por 30 min, 1 ciclo a 42°C por 30 min y 1 ciclo a 85°C por 5 min.

Para examinar la expresión de miR-223, se utilizaron células U937, las cuales fueron tratadas con 150 ng/mL de PMA por 16 h y con un estímulo de 1 μ g/mL de LPS por 8 h. Posteriormente se llevó a cabo qRT-PCR usando el kit comercial "TaqMan Universal Master Mix II (No. de cat. PN 4428175)". Se utilizaron 10 μ L del Master mix II, 5 μ L de la sonda TaqMan acoplada al fluoróforo 6-FAM, 1.33 μ L del cDNA a una dilución previa

1:100, 2.5 μ L de oligonucleótidos específicos sentido y anti-sentido para miR-223 (Tabla. 4) y la reacción se aforó con agua libre de nucleasas a un volumen de 25 μ L. Como control positivo se amplificó el RNA pequeño nuclear U6, cuya expresión es endógena y constitutiva. El programa de amplificación fue el siguiente: 1 ciclo de 50°C/2 min, 1 ciclo de 95°C/ 10 min, 40 ciclos de 95°C/15 seg, 40 ciclos de 60°C/1 min y 1 ciclo de 25°C/10 min

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para realizar la retro-transcripción y el tiempo real.

RT-miR223	5'GCGACTGTTCCCTCTCTTCCTCTGTGTGTGTGTGTGTCGCAA 3'
miR-223 sentido	5' GAGTGTCAGTTTGTCAAAT3'
miR-223 anti-sentido	5'GACTGTTCCCTCTCTTCCTC3'

7.15 Inmunoprecipitación de la cromatina CHIP.

Para determinar la interacción entre NF- κ B y los sitios κ B en el promotor de miR-223, las células U937 fueron tratadas con 150ng/mL de PMA por 16 h y con un estímulo de un 1 μ g/mL de LPS por 8 h. Posterior a la incubación se realizó el entrecruzamiento con formaldehído al 1% durante 10 min a 37°C. Las células se cosecharon en microtubos de 1.5 mL para centrifugarse a 2500 rpm por 3 min, se lavaron una vez con PBS 1X y nuevamente se centrifugaron. Utilizando el kit comercial "Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit" (MILLIPORE, No. de Cat. 17-295) el pellet se diluyó en 1 mL Buffer de lisis más inhibidores de proteasas (Complete, Mini, EDTA free, Roche, No. de cat. 11836170001), se vortexeó por 15 seg hasta obtener el lisado y con ello se realizaron alícuotas de 200 μ L y almacenaron a -80°C. Posteriormente, la cromatina fue sonicada a una potencia de 10 por 15 seg a 4°C con un sonicador OMNI Sonic Ruptor 4000 (OMNI

International). El lisado se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm a 4°C, y el sobrenadante fue transferido a un microtubo de 2 ml, se agregó 1800 µL del Buffer ChIP Dilution más inhibidores de proteasas (Complete, Mini, EDTA free, Roche, No. de cat. 11836170001). Cabe mencionar que se tomaron 20 µl del sobrenadante como input el cual se almacenó a -20°C. Por otro lado, el sobrenadante restante se limpió con 75 µl de Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA por 30 min a 4°C en agitación, después se centrifugó a 1000 rpm/1 min, recuperando el sobrenadante y se agregó el respectivo anticuerpo en una dilución 1:50, anti-p50 (Abcam no. cat. Ab7971), anti- p65 (Abcam, no. cat. ab7970) y IgG isotipo como control negativo (Santa Cruz Biotechnology, no. de cat SC2004) y se incubó a 4°C en rotación toda la noche.

Después de la incubación, se agregaron 60 µl de Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA por 1 hora a 4°C, en agitación constante, para coleccionar los complejos DNA/histona/anticuerpo. Estos se centrifugaron a 1000 rpm a 4°C por 1 min y el sobrenadante fue removido cuidadosamente. Los complejos DNA/histona/anticuerpo/agarosa se lavaron por 5 min con un 1 ml de cada buffer (entre cada buffer se centrifugó 1000 rpm por 1 min): Buffer Low Salt Immune Wash (1 lavado); Buffer High Salt Immune Wash (1 lavado); Buffer LiCl Immune Complex Wash (1 lavado); Buffer TE (2 lavados). Posteriormente, los complejos se eluyeron de la agarosa, al adicionar 500 µl de buffer de elución (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃), se vortexó por 15 s y se incubó a T.A. por 15 min en agitación, seguido por una centrifugación a 1000 rpm por 1 min. El sobrenadante fue transferido cuidadosamente a otro microtubo, al cual se agregó 20 µl de NaCl 5 M para revertir el entrecruzamiento entre el DNA y el anticuerpo, incubandolo a 65°C por 4 h. Revertido el entrecruzamiento, el DNA se limpió mediante extracción fenol-cloroformo y se procedió a realizar el PCR punto final con los oligonucleótidos específicos para cada uno de los sitios (Tabla 5).

Tabla 5. Oligonucleótidos para PCR punto final ChIP.

Forward ChIP-Fw-p65-BS1	Reverse ChIP-p65-BS1-Rev
5'-CCA GGA CTA CCC TAC TTC CGC TCC-3'	5'-CAC ATT CTG CGA GCC AAG AGC C-3'
Forward ChIP-Fw-p65-BS2	Reverse ChIP-p65-BS2-Rev
5'-CGG CTT GAC TAT CAC TCA GGG CC-3'	5'-CCC ACA TTG GCT ACA AGG AAG GG-3'
Forward ChIP-Fw-p65-BS3	Reverse ChIP-p65-BS3-Rev
5'-CTG TGT GCC TCA GTT TCC TCA CC-3'	5'-GGT CCT TCT AAG CAT GGA GCC C-3'

7.16 Ensayo de movilidad electroforética EMSA.

Inicialmente, para demostrar la interacción entre NF-kB y el promotor de miR-223 se utilizó la técnica de EMSA, para lo cual se probaron extractos nucleares de células U937 tratadas con PMA y LPS previamente descrito. Por otra parte mediante el uso del sistema comercial “Biotin 3´ End DNA Labeling Kit (PIERCE, no. de cat. 89818)”, se llevó a cabo el marcaje individual de los oligonucleótidos para el sitio distal y central así como los sitios mutados, Scramble (control de especificidad), además de un control positivo para NF-kB con Biotina (Tabla 6). Posteriormente se realizó la hibridación mezclando concentraciones equimolares (100 nM) de ambos oligonucleótidos. Para inducir la formación de un fragmento de doble cadena (denominado sonda), los oligonucleótidos se calentaron a 92°C (ebullición) en baño maría, por 1 min y se dejó enfriar a T.A.

La detección del complejo NF-kB/sondase se llevó a cabo mediante el kit comercial “Light Shift Chemiluminescent EMSA (PIERCE, no. de cat. 20148)”. Para ello se utilizaron 2 µL de Buffer Bindig 10X, 4 µL de Glicerol al 50%, 2 mM de EDTA, 1µL de Poly

(dl:dC). Se probaron concentraciones de extractos nucleares desde 6 µg hasta 20 µg aforando con agua libre de nucleasas, e incubando por 30 min a T.A.

La electroforesis se realizó en condiciones no-desnaturalizante, mediante geles de poliacrilamida al 5%. Las condiciones de electroforesis fueron: un pre-corrimento de 80 volts por 40 min, una vez cargado el gel se corrió 150 volts por 3 h, utilizando una cámara de electroforesis P10DS de Owl Separation Systems. Se usó buffer de corrida TBE 0.5x constituido por Tris-Base, Ácido bórico y EDTA (TAE) 0.5 M.

Después de finalizada la electroforesis, se procedió a realizar la transferencia de los complejos a membranas de Nylon (PerkinElmer, no. de cat. 800575), previamente activadas en TBE 0.5X por 10 min, en el TransBlot (Bio Rad), a un voltaje constante de 25 volts, 1Amperio, durante 30 min, para la detección de los complejos. Una vez realizada la transferencia, la membrana se entrecruzó con los complejos mediante UV en el Transiluminador (UVP, modelo M-20) por 20 min, exponiendo 10 min cada lado de la membrana. Posteriormente la membrana se reveló mediante el kit Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (PIERCE, no. de cat. 89880) y se escaneó en el equipo C-Digit blot scanner de LI-COR.

Tabla 6. Oligonucleótidos para EMSA.

RelA/-1171-Fw	Rev-RelA/-1171
5'-TGT TAG TGG GGA CTT CCA GGA GAC-3'	5'-GTC TCC TGG AAG TCC CCA CTA ACA-3'
RelA/-1171at-Fw	Rev-RelA/-1171at
5'-TGT TAG TAT GGA CTT CCA GGA GAC-3'	5'-GTC TCC TGG AAG TCC ATA CTA ACA-3'
-1171-Scramble-Fw	-1171-Scr-Rev
5'-GAG AGC GTA TGC TCG GAG TCT TGA-3'	5'-TCA AGA CTC CGA GCA TAC GCT CTC-3'
RelA/-1589-Fw	Rev-RelA/-1589
5'-CAA CCA TGG GGA AGC CCA CAG TG-3'	5'-CAC TGT GGG CCT CCC CAT GGT TG-3'
RelA/-1589AT-Fw	Rev-RelA/-1589AT

5'-CAA CCA TAT GGA AGC CCA CAG TG-3'

-1589-Scramble-Fw

5'-ACC GAG GAC ACG CAG ACG TGC AT-3'

(C+)NF-kB-Fw

5'-AGG GAC TTT CCG CTG GGG ACT TTC C-3'

5'-CAC TGT GGG CTT CCA TAT GGT TG-3'

-1589-Scr-Rv

5'-ATG CAC GTC TGC GTG TCC TCG GT-3'

NF-kB-Rv(C+)

5'-GGA AAG TCC CCA GCG GAA AGT CCC T-3'

7.17 Métodos alternativos de extracción de núcleos.

Como parte de la estandarización del EMSA se probaron extractos nucleares obtenidos por dos métodos. El primero (Ho W. C. *et al.*, 2005) consistió en cosechar las células en PBS 1X frío y centrifugar a 1500 rpm por 5 min. Posteriormente se lavaron con el Buffer A (10 mM Hepes (pH 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT e inhibidores de proteasas (Complete, Mini, EDTA free, Roche, No. de cat. 11836170001)), centrifugando a 1500 rpm por 5 min, se lisaron en el mismo buffer suplementado con 0.1% de Nonidet-P40 y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue removido y el pellet se resuspendió en el Buffer B (20 mM Hepes(pH 7.9), 25% glicerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT e inhibidores de proteasas) y se centrifugó 13000 rpm por 10 min. El sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo y se le agregó 5 volúmenes del Buffer C (20 mM Hepes (pH 7.9), 20% glicerol, 0.2 mM EDTA, 50 mM KCl, 0.5 mM DTT e inhibidores de proteasas). Los extractos nucleares se almacenaron a -80°C.

El segundo método de igual forma las células se cosecharon y centrifugaron a 2500 rpm por 3 min, se lavaron 2 veces con PBS 1X frío. Se agregó 300 µL del Buffer A (DTT 1 mM, MgCl₂ 1 mM, inhibidores de proteasas) incubando a 4°C por 10 min. Después se agregó 60 µL de NP-40 agitando vigorosamente e incubando 20 min a 4°C. Posteriormente se centrifugó 13000 rpm por 5 min, resuspendiendo el pellet en 30 µL del Buffer B (HEPES 20 mM, NaCl 0.4 M, EDTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM e inhibidores de

proteasas), se vortexeó por 30 s y centrifugó 13000 rpm por 2 min, recuperando el sobrenadante, el cual se almacenó a -80°C.

8. RESULTADOS.

8.1 Determinación de los posibles sitios de unión a NF-κB en la región promotora de miR-223.

Para determinar los posibles sitios de unión a NF-κB, primero se delimitó una secuencia de aproximadamente 1.9 Kb correspondiente a la región promotora, río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen de miR-223, utilizando la herramienta bioinformática “*mirstart*” [http://mirstart.mbc.nctu.edu.tw/query.php?mirna=hsa-mir-223&submit_query=GO].

Una vez obtenida la secuencia de 1.9 Kb del promotor de miR-223, se buscaron posibles sitios de unión a NF-κB mediante el uso de la herramienta bioinformática “*Contra v2*” [<http://www.dnbr.ugent.be/prx/bioit2-public/contrav2/>], la cual usa bases de datos de matrices generadas a partir de los sitios consensos para factores de transcripción (Fig. 8).

Símbolo: **miR-223**
 No. Acceso: **MI0000300**
 Tipo: **Intergénico**
 Localización: **Cromosoma X**
 Localización Genómica de las 5Kbp río-arriba: **65013324-65018323**

GGTACCAGGACTACCCTACTTCCGCTCCAAGCTTTAGTCAGAAAACAAAAGAAACAAGAAGTGAATCTTTCTAGAAGCTAGA
 TCTGGGGTCTTGAGGCCTGAGCCAATAAATTTCTGGTAGAAGGAAGTTTCTACAGAGTGATGTTAGTGAAGTGAATCCCTATTTT
 AGGCTTTCACAGAGCCTCAGGTCTGCAACCA**TGGGGAAGCCCA**CAGTGAGTAACGAAGAGCCACAAAGGAACCAGGGAATGTTGAGT
 TGGAGTGGTCTCCAAGACCAATTTAGTCCAACCTCTGTTGATTAAAGGAGAACTAATGCCAGGGAGGTAGTAGAGTGGGGACTAGGGC
 CCAGGGCTCTTGCTCGCAGAAATGTGGTCTTTCTTTTGAGCCTGAGTATATAAGAATGTACATAGCTTGAAAAGATTATTTACCACGGC
 TTGACTATCACTCAGGGCCATACTTCCACTAGTGTAGACAGAGGACTGTGACTTGGGCACTGCAGTCATTGAAAGCTATCAAAGTATAA
 CCTGAAAGCATTGCCCTCCCATCCTTCATGCCATCAGAATTCATGGTGGAGGGCACTGCATGATGGGAATTCATCATCTTCTGGCTG
 TTAGT**GGGACTTCC**AGGAGACTGCAAACATGAGGCATTAAGAAACCATCCACCTTCTTTTCACACCTTTCATGTCCCTCATTAGCCTG
 AAGGTCACAGTTGAACCTTAGGGGTCTGGCACTAATTTTCTTCTCAAAGTCAACTACTTTCTTCTCCCTTCTTGTAGCCAATGTGGG
 AAAGTAGACGAAAACCTCAACATTTGGAGTTAGACCTGAGTGAAAAATCTGCCTTCTCTATTATTTTCTAGTTTTGTTTCTTAGACAG
 GTCACCTTTATTTCTGTGTGCCTCAGTTTCTCACCTATAAATAAGAATAATAATACCATAACCAGAGAGTTGTTGAATAAATTAGATAAT
 ACACATGAAAGAAATATCATAAGTACTCCAATAAATGT**GAATTCCT**TATTTATTTCTTTCAGCAAGCCCCAAGATGACAGAATGTGGCT
 TGTGGTCATAACTGTGCCCCAGAGCCAGCTTCATAGGCATATGACTTGTACAGCTTCACAGGGCTCCATGCTTAGAAGGACCCACACT
 TAGTTTAATGTTCTGCTGTCACTCATCTTGATATTCTTAATTTTTAAATAAAGGGCCTATCGTTTTTCATTTTTTACTGGGCCCTTGCAAT
 TATGTAGCTGGTCTGTATGCCAGGAGAGAAGTTGGAAGTAAAATGGTATTTCCAGGACCAGGAGGCACTTCTGGCAGAGTGAAGAACAT
 GTGATTTGGAGTCCATGGGGATGGGTTTAAATTTAGCTTTCCACTAATTTGCTTTGTGATACTGAGTATTTCCTTTTATCCCTCAGAG
 GCTCTGTTTCTCAATTTTACTACGGGTTTTTTCATTAGATAATGTCTCAGTTCTGGTATTTCCAGGTTTTCCCTCAATTATTTCTGGGAAA
 ACCTCCTTGACCCACAGGCAGAGCCTAGGGCAGCCAGGTGCTTTCTACTCTCTCTCTCTCTGACGCTTGGAAGTTAGTGTCTGTTGAA
 GGTCAGCTGGGAGTTGGTGGAGGCAGGGCAGTGGCCTGCTACTATTGCTGCAGTAGCAGACCCTTTCACAACAGCATTGTTTTGTCTATT
 TTGCATCCAGATTTCCGTTGGCTAACCTCAGTCTTATCTTCCCTCATTTCCTGTTTCCCTGTTGAAGACACCAAGGGCCCTTCAAACACAG
 AAGCTTCTTGCTCAGGGC**A**GAAAGCCCAATTCATCTGGCCCTGCAGGTTGGCTCAGCACTGGGGAATCAGAGTCCCTCCATGACCA
 AGGCACCACTCCACTGACAGGTATGGTATCCATTTGCCCTCTTCTTGGATTCTCAAGCTGGCTCGA

- A** Nucleótido +1
- G** Primeras 1,900 pb, a partir del nucleótido +1
- Posibles sitios de unión a NF-κB

Fig. 8. Secuencia de la región promotora de miR-223, donde se muestran los tres posibles sitios de unión a NF-κB.

Tras el análisis *in silico*, se determinó que la región promotora de miR-223 presenta tres posibles sitios de unión para NF-κB. El sitio proximal en la posición -773, el sitio central en la posición -1171 y el sitio distal en la posición -1589, las anteriores posiciones con respecto al sitio +1 del inicio de la transcripción (Fig. 9).

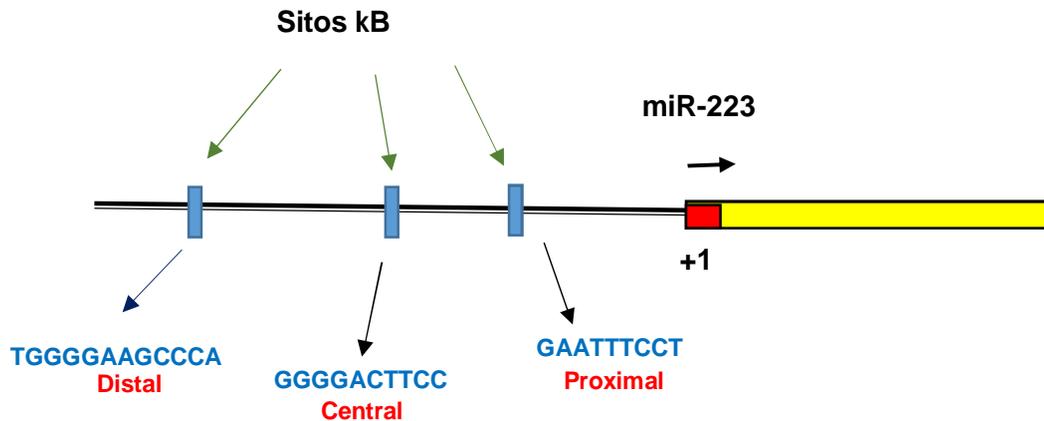


Fig. 9. Esquema que muestra la posición espacial (río arriba del sitio de inicio de la transcripción) de los posibles sitios de unión a NF-κB en la región promotora de miR-223.

8.2 Construcción del plásmido reportero pSprom-miR223.

Posteriormente se llevó a cabo la amplificación por PCR punto final del fragmento de 1.9 Kb, correspondiente al promotor de miR-223, a partir de DNA genómico humano aislado de sangre periférica de un individuo sano (Fig. 10).

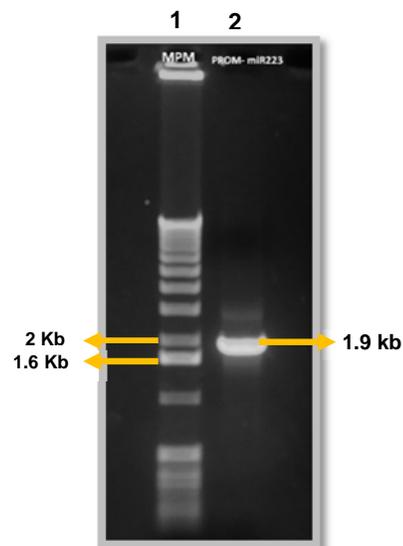


Fig. 10. Electroforesis en gel de agarosa al 0.08%, corrimiento 120 volts/40 min. 1) Marcador de 1 Kb, 2) Fragmento de 1.9 Kb que corresponde al promotor de miR-223, amplificado por PCR punto final a partir del DNA genómico humano.

Con la finalidad de evaluar la actividad del promotor de miR-223, se llevó a cabo la construcción de un plásmido reportero. Inicialmente, la clonación del promotor de miR-223 se llevó a cabo en el vector intermediario pGEM-T-Easy, el cual posee una timidina en la posición 3´ terminal de cada hebra de DNA, permitiendo la fácil inserción del amplicón, aumentando la eficiencia y evitando que el vector recircularise (pSG-miR223) (Fig. 11). Con el fin de confirmar la correcta clonación y descartar mutaciones en el promotor se realizó a partir de la clona seleccionada, la secuenciación capilar del DNA plasmídico (Fig. 12).

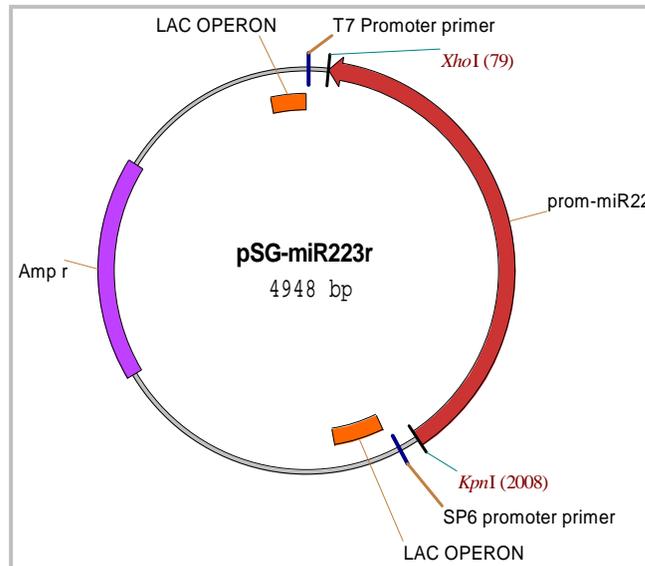


Fig. 11. Mapa del plásmido pSG-miR223r. La secuencia del promotor de miR-223 (café), Amp r: cassette de resistencia a antibióticos (violeta).

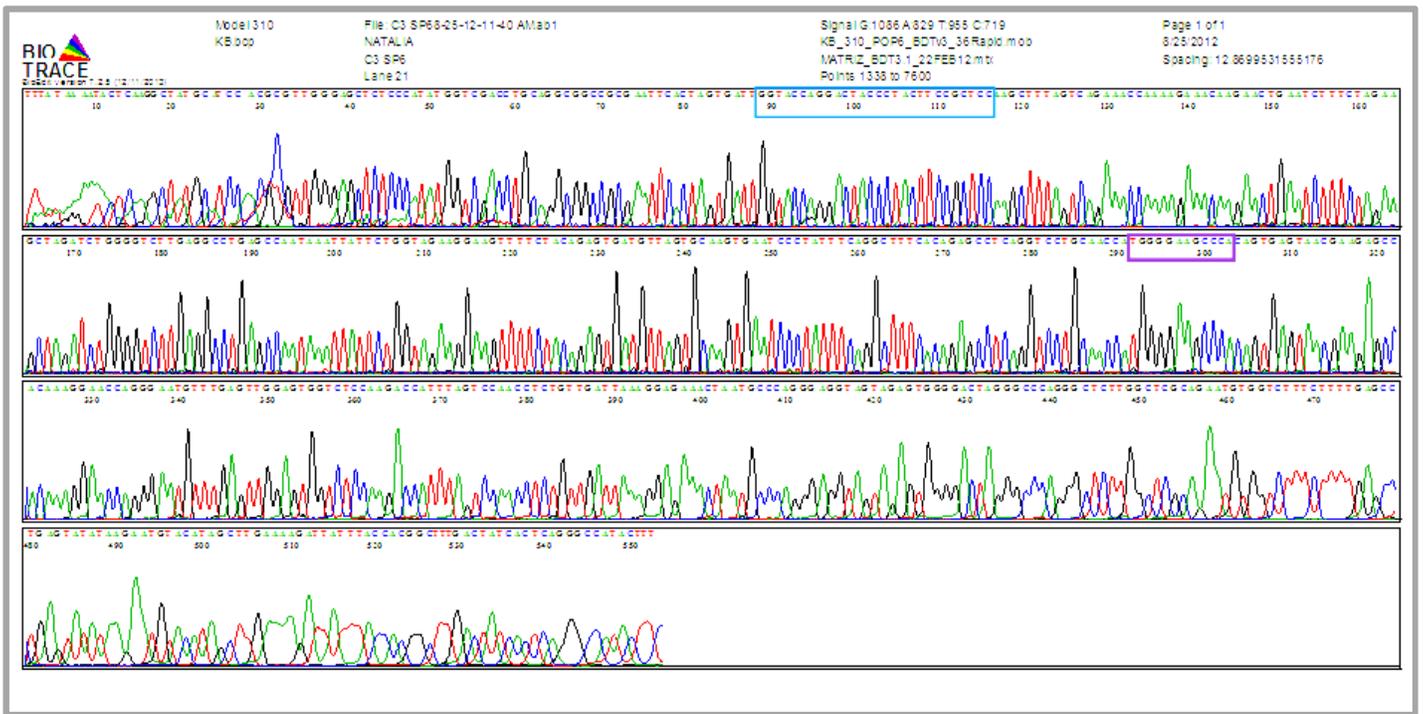
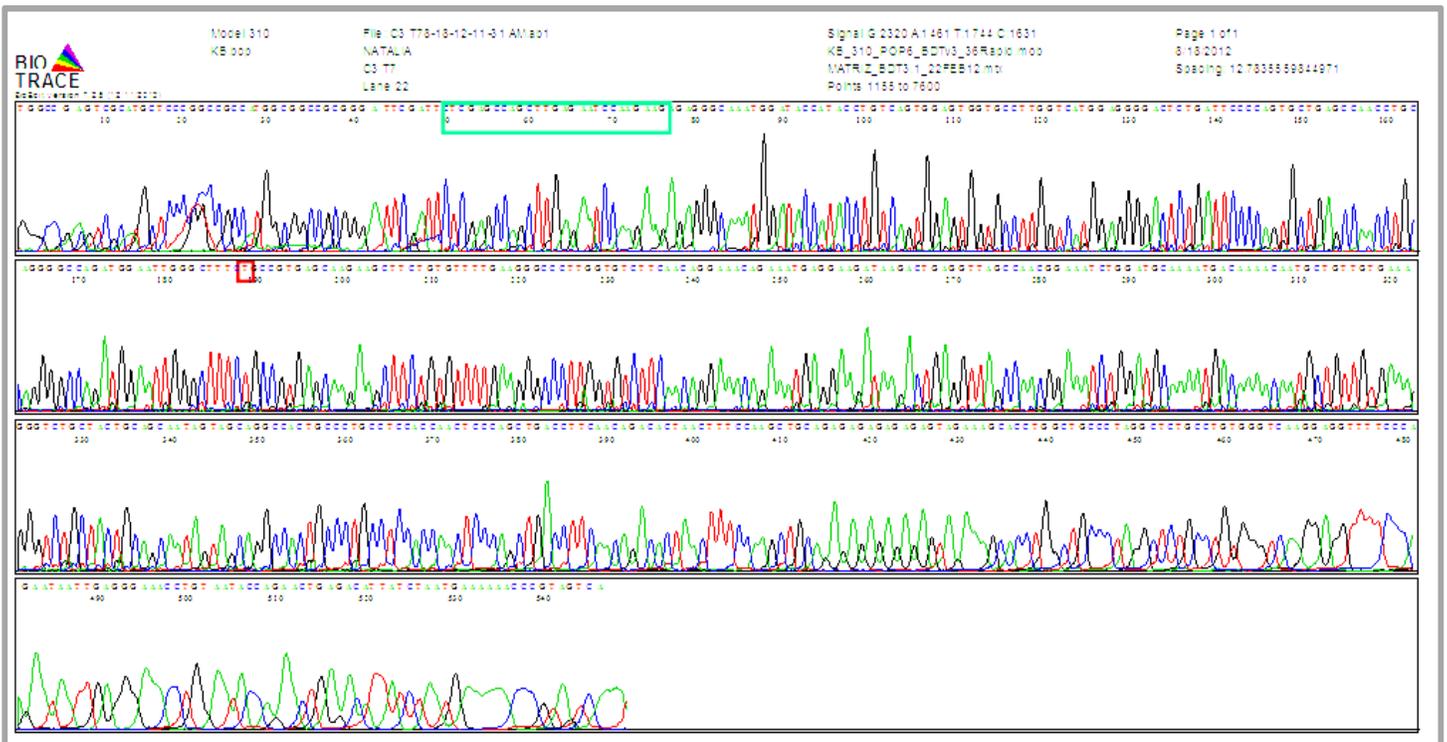
A**B**

Fig. 12. Electroferogramas representativos de la secuenciación capilar del promotor de miR-223 clonado en el vector pGEM-T-Easy. Se muestran dos electroferogramas que indican la secuencia del oligonucleótido utilizado en la amplificación del promotor. **A)** En azul la secuencia del oligonucleótido “prom-223-KpnI”, en morado el sitio distal de interacción con NF-κB, indicando el final de la secuencia del promotor. **B)** En verde la secuencia del oligonucleótido “prom-223-XhoI”, en rojo el sitio de inicio de la transcripción, indicando el inicio de la secuencia del promotor.

El plásmido reportero usado para la subclonación fue pGL4.10, a través de los sitios de restricción *KpnI* y *XhoI*, mismos que se encuentran en el fragmento de la región promotora de miR-223.

Una vez que se verificó la correcta clonación y la ausencia de mutaciones en el fragmento del promotor de miR-223, se procedió a liberar la región promotora de 1.9 Kb mediante la digestión con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI*. Posteriormente se ligó el fragmento del promotor en el vector pGL4.10 para generar la construcción pSprom-miR-223 (Fig. 13).

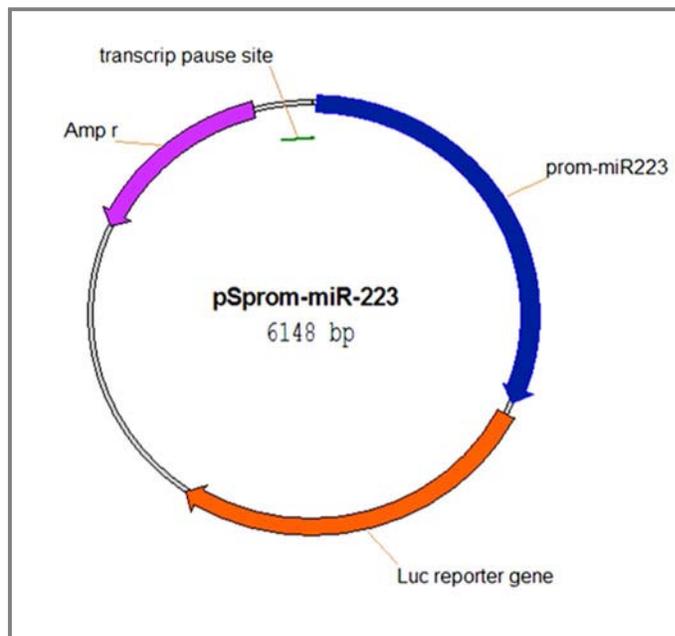


Fig. 13. Mapa de pSprom-miR223. Fragmento del promotor de miR-223 (azul). Gen reportero de luciferasa (naranja), Amp r: cassette de resistencia a antibióticos (violeta).

8.3 Determinación de la expresión de TLR-4-MD2 y NF-κB en la línea celular HEK-293-hTLR-4-MD2-CD14.

Como se mencionó en la introducción, la estimulación de TLR-4 lleva a la activación de NF-κB. Esta estrategia fue utilizada para determinar la activación del promotor de miR-223. Mediante Citometría de Flujo, se verificó la expresión de TLR-4 y MD2 (Fig. 14), en las células HEK-293-hTLR-4-MD2-CD14 bajo la inducción de los antibióticos Higromicina y Blastomicina. Una vez demostrada la expresión de TLR-4 se procedió a estimular las células con 100 ng y 250 ng de LPS por 1 h, posteriormente se realizó la inmunoprecipitación con distintas diluciones del anticuerpo monoclonal anti-p65 y por Wester blot se observó el aumento en la translocación de NF-κB al núcleo, lo que sugiere que el factor de transcripción se estaría activando a causa del estímulo de TLR-4 con LPS. Se determinó que la concentración utilizada para los ensayos sería de 100 ng, la cual permite ver la activación de NF-κB, además de ser la concentración sugerida para esta línea celular (Fig. 15).

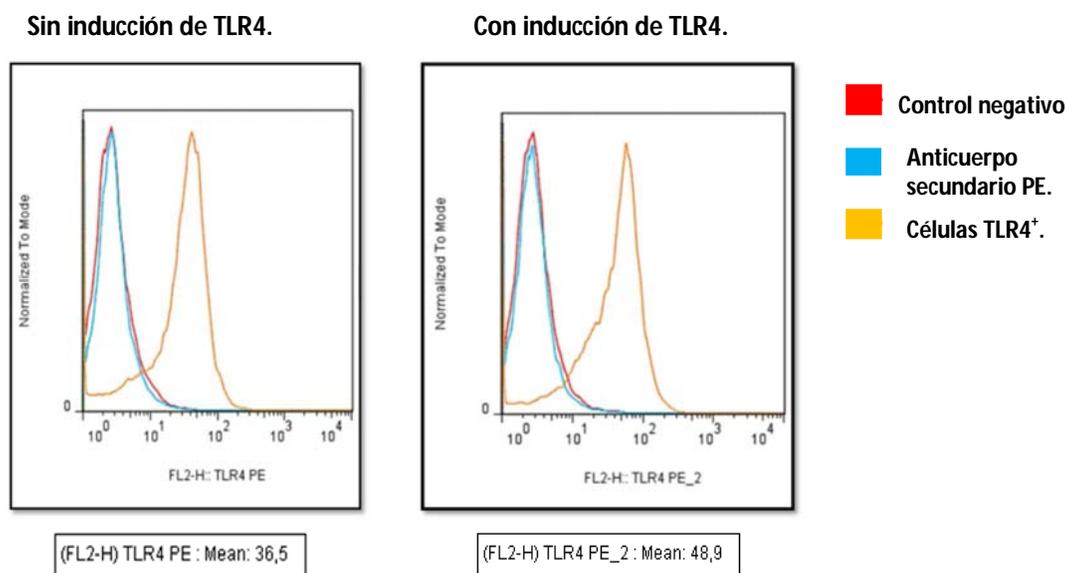


Fig. 14. Gráficas que muestran un aumento en los niveles de expresión de TLR-4, medido por Citometría de Flujo en las células HEK-293-hTLR-4-MD2-CD14.

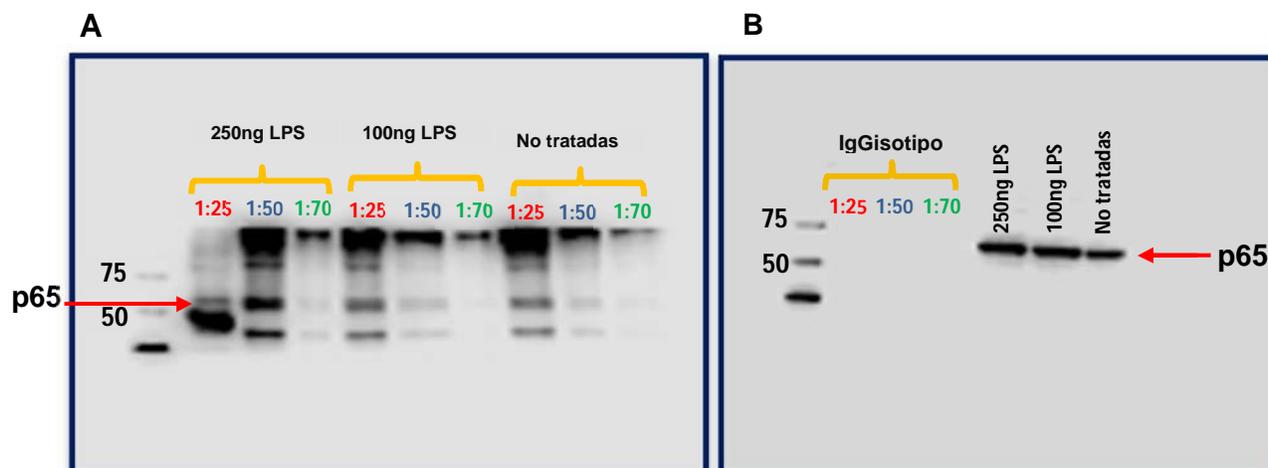


Fig. 15. Inmunoprecipitación de NF- κ B mediante el anticuerpo anti-p65, el cual se probó en las diluciones 1:25, 1:50 y 1:75 en extractos nucleares de células HEK-293-hTLR-4-MD2-CD14 tratadas con 100 ng y 250 ng de LPS. Posteriormente se realizó el Western blot. **A)** se observa una mayor translocación de NF- κ B con un estímulo de 250 ng de LPS y con una dilución 1:25 del anti-p65. Se muestra la banda de tamaño molecular de 65 kDa. **B)** control negativo IgG isotipo, control positivo extractos nucleares.

8.4 Evaluación de la actividad del promotor de miR-223 mediante ensayos de luciferasa.

Para evaluar que la región promotora de miR-223 es regulada por la posible interacción con el factor de transcripción NF- κ B, se realizaron ensayos de luciferasa con el plásmido reportero generado pSprom-miR223, en la línea celular HEK-293-hTLR-4-MD2-CD14, en la cual ya se demostró que expresan TLR-4 así como MD2/CD14 y que NF- κ B se activa por el estímulo con LPS. Estas células fueron co-transfectadas con 200 ng del vector vacío pGL4.10 o de la construcción pSprom-miR-223 y 10 ng del vector pCMV *renilla* (normalización). 24 h post-transfección, se estimuló con 100 ng de LPS por 3h y posteriormente se llevó a cabo el ensayo de luciferasa. En la Figura 16, se muestra, un aumento en la actividad de luciferasa en la construcción que contiene el promotor de miR-223 con respecto al vector pGL4.10 vacío, así como también puede observarse que tras el estímulo con LPS, esta actividad aumenta cerca de tres veces más, en comparación con los otros tratamientos.

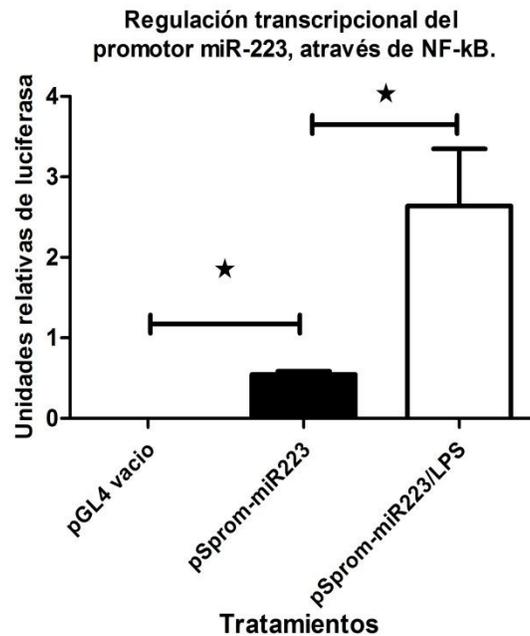


Fig. 16. Regulación transcripcional de miR-223 por NF-κB. Ensayo de luciferasa normalizado con *renilla*, datos expresados como el promedio de tres experimentos independientes, se realizó una prueba estadística de t-Student $p < 0.05$.

8.5 Determinación del efecto que presenta cada uno de los sitios de interacción con NF-κB, sobre la actividad del promotor de miR-223.

Para evaluar la importancia de los sitio de unión a NF-κB en la activación del promotor de miR-223, se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos para eliminar cada uno de los sitios de unión a NF-κB.

Una vez que se obtuvieron los oligonucleótidos, se procedió a realizar cada una de las construcciones con las deleciones pDISTAL, pCENTRAL y pPROXIMAL. Se transformaron bacterias ultra-competentes con la construcción generada, se obtuvo el DNA plasmídico de las clonas seleccionadas y se evaluó la ausencia del sitio de interacción mediante secuenciación capilar (Fig. 17).

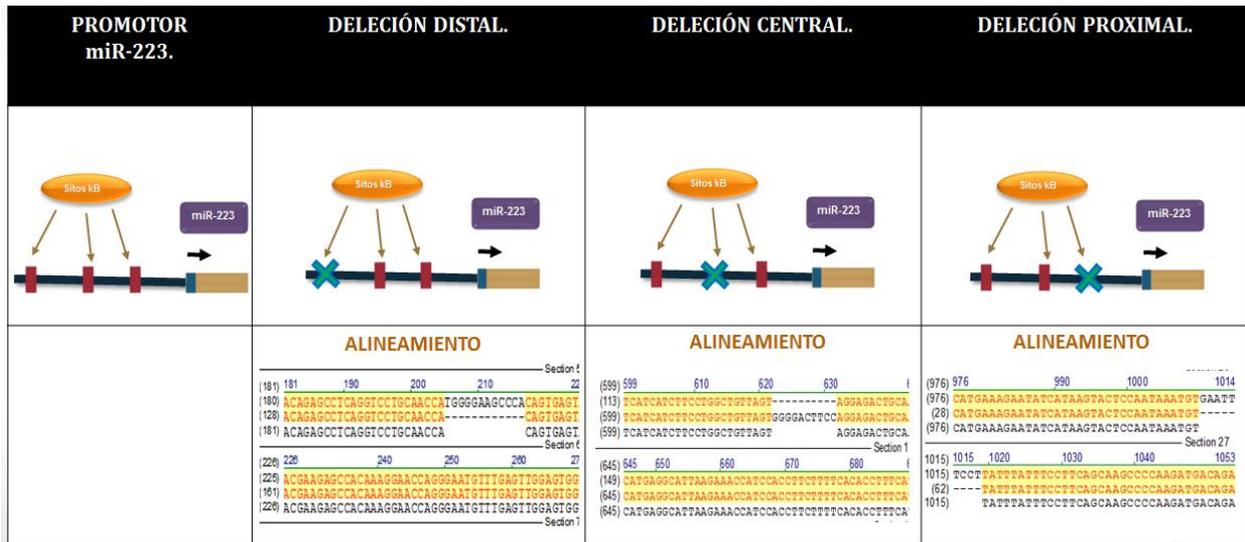


Fig. 17. En la parte superior se muestran los esquemas con la posición en que se realizó cada una de las deleciones. En la parte inferior se muestra el alineamiento posterior a la secuenciación capilar, donde se observa la ausencia de cada uno de los sitios de interacción con NF-kB.

Se comenzó a evaluar la importancia de los sitios distal y central del promotor de miR-223 en el reconocimiento por NF-kB, mediante ensayos de luciferasa. Para ello, 40,000 células HEK-293-hTLR-4-MD2-CD14 fueron transfectadas con los siguientes plásmidos: 200 ng del vector vacío pGL4.10, 200 ng de las construcciones pSprom-mir223, pDISTAL, pCENTRAL. Para la normalización, las células se co-transfectaron con 10 ng del plásmido pCMV*renilla*. 24 h post-transfección, se estimuló con 100 ng de LPS por 3h y se llevó a cabo el ensayo de luciferasa. En la gráfica A de la figura 18, se observa una reducción de cerca tres veces en la actividad de luciferasa de la construcción pDISTAL, respecto al promotor silvestre (pSprom-miR223). Sin embargo, tras el estímulo de las células con LPS la actividad del promotor en la construcción pDISTAL aumenta cerca de 3 veces, en comparación a las células sin estímulo. Aunque este aumento sigue siendo menor que el que presenta la actividad del promotor silvestre, este resultado indica claramente que el sitio distal influye en la actividad del promotor de miR-223. Por otro lado, en la gráfica B se observa que el efecto del sitio central en la actividad transcripcional del promotor, presenta un comportamiento

similar al sitio distal. Aunque cabe mencionar que al estimular con LPS la actividad de luciferasa aumenta en un mínimo en la deleción central, con respecto al promotor silvestre.

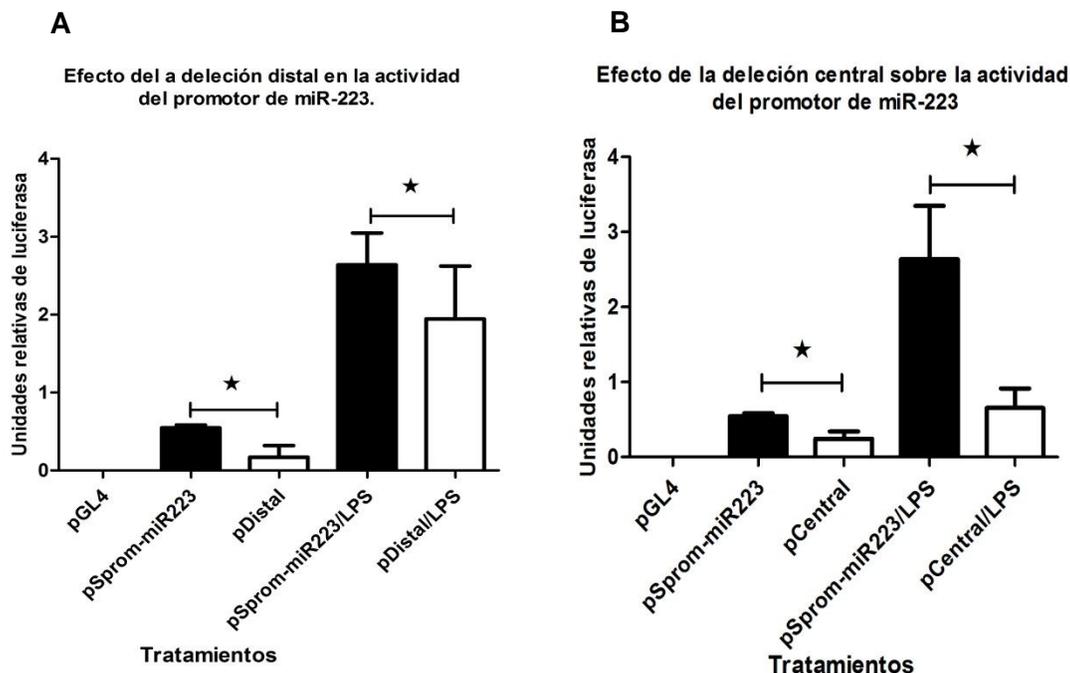


Fig. 18. Regulación transcripcional de miR-223 por NF- κ B al eliminar el sitio distal y central. **A)** Deleción distal, **B)** Deleción central. Ensayo de luciferasa normalizado con *Renilla*; datos expresados como el promedio de tres experimentos independientes, se realizó una prueba estadística de t-Student $p < 0.05$

En la Figura 19, se observa una comparación entre la actividad que muestra el promotor silvestre y ambas deleciones, mostrando claramente que ambos sitios forman parte de la regulación en la actividad transcripcional del promotor, ya que al estar ausentes la actividad de luciferasa desciende, aunque no es totalmente abatida.

Efecto de la deleción distal y central sobre la activida del promotor de miR-223.

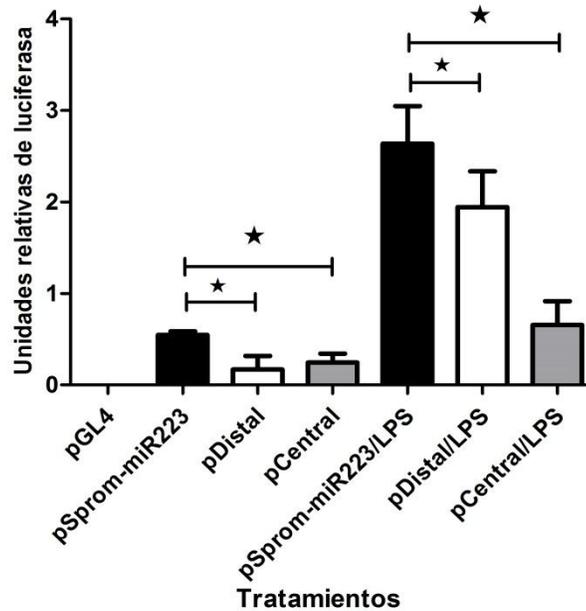


Fig. 19. Regulación transcripcional de miR-223 por NF-κB al eliminar el sitio distal y central. Ensayo de luciferasa normalizado con *Renilla*. Datos expresados como el promedio de tres experimentos independientes, se realizó una prueba estadística de t-Student $p < 0.05$.

En el caso particular del sitio proximal, al ser eliminado y evaluar la actividad de luciferasa se observó un aumento drástico en comparación con el promotor silvestre que no fue posible normalizar los valores mediante pCMV *Renilla*. La pPROXIMAL (Fig. 20) muestra un aumento de cerca de 4000 veces más que el promotor silvestre, mientras que al estimular las células con LPS hay un aumento de cerca del 6000 con respecto al promotor silvestre.

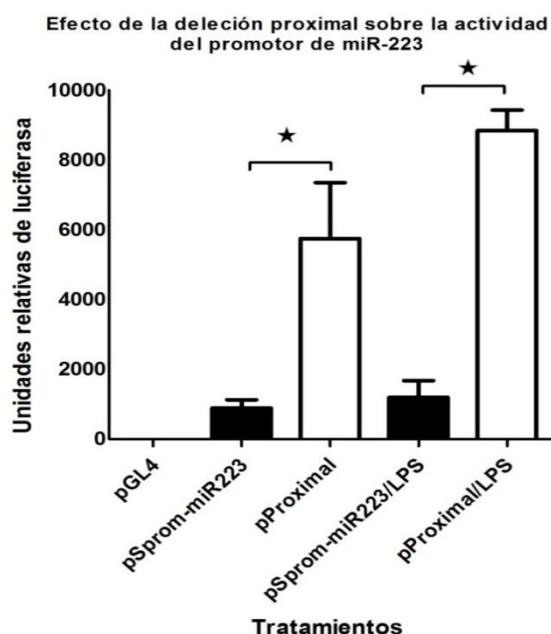


Fig. 20. Regulación transcripcional de miR-223 por NF- κ B al eliminar el sitio proximal. Ensayo de luciferasa. Datos expresados como el promedio de tres experimentos independientes, se realizó una prueba estadística de t-Student $p < 0.05$.

8.6 Expresión de miR-223 en la línea celular U937 tratadas con PMA y LPS.

Se evaluó la expresión de miR-223 mediante PCR en tiempo real, en la línea celular U937 con fenotipo monocítico, las cuales fueron tratadas con PMA y LPS. Tras realizar el análisis $\Delta\Delta C_t$ a los resultados obtenidos y teniendo como control endógeno U6, se muestra un aumento en la expresión de miR-223, debido al estímulo con PMA y LPS comparado con las células sin tratar o con los controles, en donde el aumento que presentan no es significativo (figura 21). Los resultados anteriores sugieren que el aumento en la expresión de miR-223 se ve asociado a la activación de las vías de señalización que activan el PMA y LPS pudiendo incluir NF- κ B.

Expresión de miR-223 en la línea celular U937.

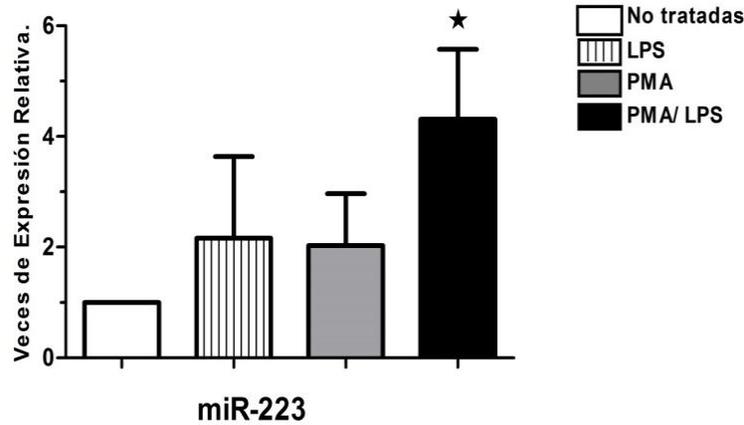


Fig. 21. Expresión relativa de miR-223, mediante PCR tiempo real. Control endógeno U6, analizados mediante el método del $\Delta\Delta Ct$. Datos expresados como el promedio de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados mediante una prueba estadística ANOVA $p < 0.05$.

8.7 Papel de NF- κ B en la regulación del promotor de miR-223.

Los resultados anteriores indican que NF- κ B puede estar regulando la activación del promotor de miR-223, por lo que se realizó un ensayo de ChIP para determinar el papel de NF- κ B (p50/p65), en la interacción con la región promotora, después del estímulo con LPS. En la Figura 22 se muestran los amplicones que indican la unión de p50 y p65 a los tres sitios en el promotor de miR-223. El ensayo reveló una mayor interacción en sitio central.

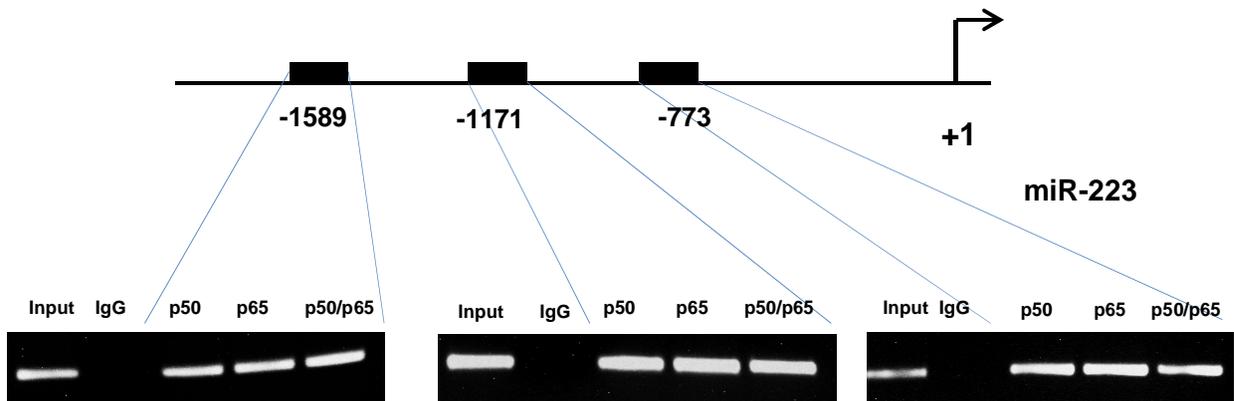


Fig. 22. Mediante ensayos de ChIP se comprobó que el LPS induce la unión de p50 y p65 a los sitios Distal, Central y Proximal, en el promotor de miR-223.

8.8 Interacción de NF- κ B sobre el promotor de miR-223, mediante EMSA.

La técnica de EMSA permite demostrar la interacción entre proteínas y DNA, mediante el retardamiento del complejo proteína:DNA en gel de agarosa, durante una electroforesis. Podría considerarse una extensión de técnicas como el CHIP. Inicialmente se estandarizó la técnica utilizando los controles proporcionados por el fabricante del kit, teniendo como control positivo la interacción entre DNA:proteína a partir de extracto de antígeno nuclear Epstein-Barr (EBNA; del inglés "Epstein-Barr Nuclear Antigen") y la sonda de DNA marcada con biotina permitiendo ser revelada mediante una reacción quimioluminiscente y como controles negativos: la sonda marcada con biotina pero sin extracto nuclear, la sonda marcada más el extracto nuclear más una sonda no marcada con biotina (considerada sonda fría) con la finalidad de revertir la interacción (Fig. 23). Una vez que la técnica permitió observar el complejo DNA: proteína del control positivo se procedió a demostrar la interacción entre NF- κ B y el promotor de miR-223 para los sitios Central y Distal; sin embargo, en un primer intento no se obtuvo el complejo como lo muestra la figura 23. Siendo el siguiente paso encontrar las condiciones adecuadas para la interacción entre NF- κ B y el promotor de miR-223, por lo que se procedió a probar concentraciones entre 6 y 20 μ g de extractos nucleares de células HEK-293-TLR4-MD2-CD14 estimuladas con 100 ng de LPS por 3 h, sin encontrar resultados positivos (Fig. 24). Posteriormente, se cambiaron las concentraciones de algunos de los componentes de la reacción como el EDTA, poly (dI:dC) y sales, tratando de propiciar la interacción entre NF- κ B y las sondas de DNA el sitio Central y Distal en extractos nucleares de células HEK-293-TLR4-MD2-CD14 y células U937 (Fig. 25). Sin embargo, a pesar de los cambios realizados, en ninguno de los casos se observó interacción. Debido a lo anterior, se decidió como siguiente estrategia la obtención de un control positivo a partir de la interacción entre NF- κ B y la sonda de DNA reportada en la literatura (Chi H. W. *et al.*,

2005). Tratando de observar la interacción DNA:proteína, en un primer intento se incubaron extractos nucleares de las células U937 más la sonda de DNA y el competidor poly (dl:dC), no logrando observar el complejo (Fig. 26 A.). En un segundo intento se utilizaron extractos nucleares de las células U937 obtenidos mediante dos métodos, sin poder obtener resultados positivos (Fig. 26 B.), por lo que hasta el momento no se lograron obtener las condiciones adecuadas para observar la interacción entre las sondas propuestas y NF-kB.

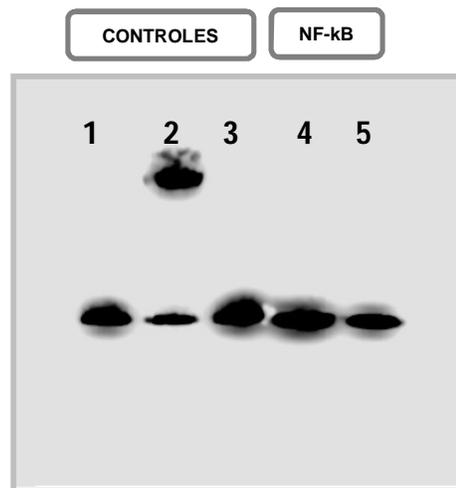


Fig. 23. Estandarización de la técnica de EMSA utilizando los controles proporcionados por el kit: 1) Control negativo: sin extracto nuclear EBNA más sonda marcada, 2) Control positivo: extracto nuclear EBNA más sonda marcada, 3) Control negativo extracto nuclear EBNA más sonda marcada y un exceso de sonda fría; sitios de interacción con NF-kB: 4) Extracto nuclear NF-kB más sonda marcada sitio Central, 5) Extracto nuclear NF-kB más sonda marcada sitio Distal

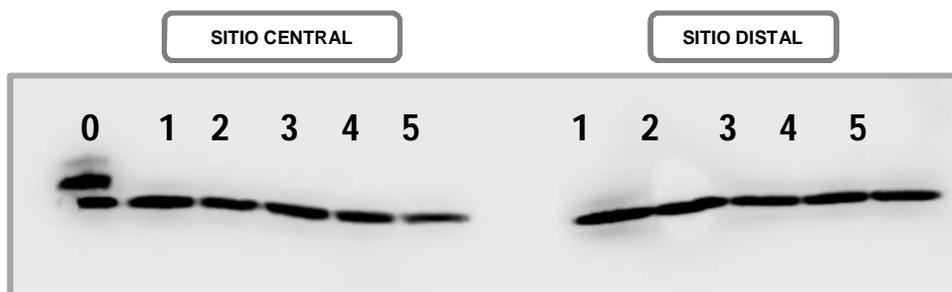


Fig. 24. Se probaron distintas concentraciones de extractos nucleares de células HEK-293-TLR4-MD2-CD14 estimuladas con 100 ng de LPS por 3 h, tratando de encontrar las condiciones de interacción con la sonda de DNA para el sitio Central y Distal, 0) Control positivo EBNA proporcionado por el kit, 1) 6 µg, 2) 10 µg, 3) 15 µg, 4) 20 µg, 5) 40 µg.

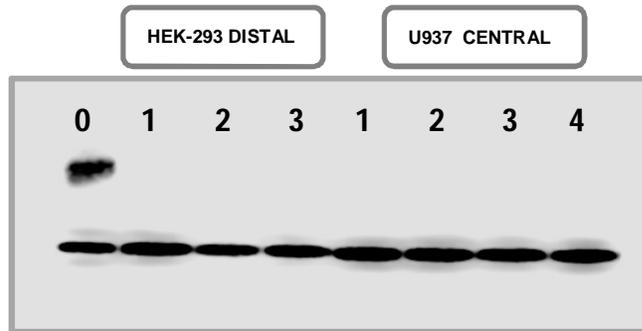


Fig. 25. Se probaron distintas condiciones al cambiar algunos de los componentes de la reacción así como los extractos nucleares de las líneas celulares HEK-293-TLR4-MD2-CD14 y U937, después de ser estimuladas con LPS, tanto para el sitio Distal como para el Central: 0) Control positivo EBNA proporcionado por el kit, 1) 2 mM EDTA, 2) 1mM EDTA, 3) Solo extracto nuclear más sonda marcada y el competidor poly(dI:dC), 4) 5mM NaCl en lugar de MgCl.

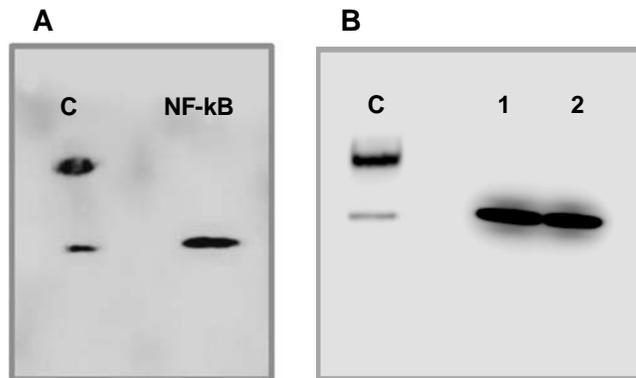


Fig. 26. Control positivo de NF-kB. Se probaron dos condiciones tratando de observar el complejo de la interacción entre NF-kB y la sonda de DNA reportada en la literatura. **A)** C) Control positivo EBNA proporcionado por el kit, NF-kB) extractos nucleares de células U937 (tratadas con LPS) más la sonda de DNA marcada; **B)** C) Control positivo EBNA proporcionado por el kit, 1) y 2) extractos nucleares de células U937 (tratadas con LPS) obtenidos mediante dos métodos distintos más la sonda de DNA marcada.

8. DISCUSIÓN.

Durante la activación de la respuesta inmune innata, se desencadena una serie de eventos que llevan a la regulación en la expresión de distintos genes, entre los que se encuentran los miRNAs, siendo involucrados en mecanismos cruciales de la inmunidad. La evidencia experimental obtenida en este estudio, sugiere fuertemente que la expresión de mir-223 es regulada por NF-kB, a través de tres sitios de interacción en su promotor, una vez que NF-kB es activado por la vía de señalización TLR-4/LPS.

El gen codificante de miR-223 se encuentra en el cromosoma X, siendo de tipo intergénico, es decir, presenta su propio promotor, lo que permite la modulación transcripcional mediante elementos regulatorios, tales como sitios de interacción con factores de transcripción. Tras el análisis *in silico*, se determinaron tres posibles sitios de interacción con NF-κB en un fragmento de 1.9 Kb a partir de la secuencia del promotor en humano, con tres posibles sitios de interacción con NF-κB. Por lo que se procedió a clonar el fragmento y a evaluar la actividad del promotor mediante ensayos de luciferasa, demostrando que al estimular las células HEK-293-TLR4 con LPS, hay un aumento en la actividad de luciferasa indicando que la región clonada funciona como promotor para el gen de miR-223, posiblemente por la interacción NF-κB.

Los resultados anteriores llevaron a evaluar la expresión de miR-223 en células U937, las cuales expresan de manera endógena TLR-4 y por tanto pueden activar NF-κB, por LPS (Baek Y. S., *et al.*, 2009). Al ser estimuladas con LPS, se observó un aumento en la expresión de miR-223, con respecto a las células sin tratar, indicando un efecto dependiente de la activación de NF-κB tras el estímulo con LPS permitiendo comprobar el fenómeno previamente observado en los ensayos de luciferasa.

Como siguiente paso se procedió a determinar la participación de cada uno de los sitios en la regulación del promotor; mediante la eliminación de cada uno, se observó que el sitio distal y central regulan de manera positiva la activación ya que al ser eliminados, la actividad de luciferasa disminuye considerablemente aun y con el estímulo de LPS. Interesantemente al eliminar el sitio proximal, la actividad de luciferasa aumenta varias magnitudes tras el estímulo con LPS, lo que sugiere fuertemente que NF-κB ejerce un papel represor en la actividad del promotor silvestre. Como se sabe el estímulo con LPS induce la expresión de TNF lo cual puede llevar a la activación del dímero p50/p50 (Leung

T. H. y Hoffmann A., 2004), por lo que efecto observado probablemente se deba a la interacción de dímeros como p50/p50 con el sitio proximal, se sabe que este dímero al no contener el dominio de transactivación no es capaz de activar la transcripción teniendo un efecto represor (Hoffmann A. *et al.*, 2006). Sin embargo, esto tuvo que ser confirmado mediante los ensayos de ChIP.

Finalmente se buscó confirmar la interacción de NF-kB, sobre la región promotora de miR-223, mediante ensayos de ChIP. Estos ensayos permitieron demostrar que ambas subunidades p50 y p65, interactúan con los tres sitios, aunque en condiciones diferentes, ya que en el caso del sitio central se observa una mayor interacción de ambas proteínas en comparación con los sitios Distal y Proximal. Cabe mencionar que cada uno de los sitios, presenta diferentes secuencias consenso, la secuencia del sitio Distal es similar al sitio kB de TNF-alfa, mientras que el sitio Central es similar al de I κ B y el sitio Proximal al de IL-8, lo cual influye en el tipo de interacción con NF-kB. (Hoffmann A., *et al.* 2006, Leung T. H. *et al.* 2004). En el caso particular del sitio proximal donde anteriormente se observó un efecto de represor de la transcripción NF-kB se propuso una posible interacción con homodímeros de p50; sin embargo, el ensayo de ChIP demostró que este sitio también interactúa con p50/p65, en la literatura ya se ha reportado un efecto represor para p65. Al estimular células U-2 OS de osteosarcoma con activadores atípicos como luz ultravioleta o daunorubicina se demostró un efecto represor de la transcripción de p65 al asociarse con deacetilasas de histonas (Campbell K. J. *et al.*, 2004). También se ha demostrado su efecto represor al asociarse con proteínas como Bgr-1 (Burkhart B. A. *et al.*, 2004) y YB-1 (Raj G. V. *et al.*, 1996).

La importancia de evaluar la regulación transcripcional de miR-223 por NF-kB, es debido a que hay suficiente evidencia que sugiere que este miRNA desempeña importantes funciones en la inmunidad, en condiciones fisiológicas normales y en

patologías como la sepsis, en donde se ha demostrado que niveles altos de miR-223 en suero, se asocian con un diagnóstico favorable en la sobrevivencia de pacientes (Wang J. *et al.*, 2010). Sin embargo, aún no se sabe en su totalidad, cuáles son las moléculas blanco que se regulan en estas condiciones, aunque se conoce que puede regular post-transcripcionalmente a

I κ B α , el activador principal de los dímeros de NF- κ B, particularmente p50/p65 (Li T., *et al.*, 2010). Lo anterior indicaría una disminución en la activación del factor de transcripción y por lo tanto, una baja en la producción de citocinas inflamatorias como IL-1, IL-2, IL-6 citosinas identificadas en sepsis. Es por ello que miR-223 podría funcionar como un marcador en el diagnóstico de sepsis o como un agente terapéutico en la resolución de la enfermedad (Moschos S. S *et al.*, 2007), siendo relevante estudiar su regulación en esta enfermedad.

9. CONCLUSIONES.

➤ La evidencia experimental sugiere fuertemente que NF-κB regula la actividad transcripcional del promotor de miR-223 a través de los tres sitios kB, tras la activación de TLR-4 por su ligando LPS, en la línea celular U937.

➤ El sitio Distal y Central participan activamente en la modulación positiva del promotor, mientras que el sitio Proximal ejerce un efecto represor.

10. PERSPECTIVAS.

➤ Evaluar el mecanismo por el cual NF-κB tiene un efecto represor en el sitio proximal, analizando si el dímero p50/p65 interacciona con otras proteínas que regulen la transcripción.

➤ Determinar si el efecto en el aumento de la actividad transcripcional al eliminar el sitio proximal es debido a efecto de los otros dos sitios, mediante distintas composiciones en las deleciones de los sitios.

➤ La regulación en la expresión de miR-223 por el eje TLR4/NF-κB, puede estar asociado al desarrollo o resolución de patologías como la sepsis, por lo que será importante determinar cual es la participación de miR-223 en la regulación de alguna molécula blanco involucrada en la vía de señalización de TLR-4.

11. LITERATURA CITADA.

Beom S.P., Jie-Oh L., 2013. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes., *Experimental & Molecular Medicine*.,45, e66; doi:10.1038/emm.2013.97

Britanova, L.V., Makeev, V.J., and Kuprash, D.V. 2008. In vitro selection of optimal RelB/p52 DNA-binding motifs. *Biochemistry Biophys. Research Communications*. 365: 583–588.

Bushati N., Cohen S.M. 2007. MicroRNA functions. *Annual Review of Cell Developmental Biology*. 23:175-205.

Burkhart B. A., Hebbar P. B, Trotter K. W., Archer T. K., 2005. Chromatin-dependent E1A Activity Modulates NF- κ B RelA-mediated Repression of Glucocorticoid Receptor-dependent Transcription. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 280, No. 8: 6349–6358.

Campbell K. J., Rocha S., Perkins N. D. 2004. Active Repression of Antiapoptotic Gene Expression by RelA(p65) NF- κ B. *Molecular Cell*. Vol. 13: 853–865.

Chen F. E., Ghosh G. 1999. Regulation of DNA binding by Rel/NF- κ B transcription factors: structural views. *Oncogene*. 18: 6845-6852.

Chen F.E., Huang D.B., Chen Y.Q., Ghosh G. 1998. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- κ B bound to DNA. *Nature*. 391: 410–413.

Chen, L.F., Mu, Y., and Greene, W.C. 2002. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF- κ B. *EMBO Journal*. 21: 6539–6548.

Cimmino A., Calin G.A., Fabbri M., Iorio M.V., Ferracin M., Shimizu M., Wojcik S. E., Aqeilan R. I., Zupo S., Dono M., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu C. G., Kipps T. J., Negrini M. 2005. Croce CM: miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 102: 13944–13949.

Cramer P., Larson C.J., Verdine G.L., Müller C.W. 1997. Structure of the human NF- κ B p52 homodimer-DNA complex at 2.1 Å resolution. *EMBO Journal*. 16(23):7078-7090.

Cusson-Hermance, N. 2005. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3 and 4-induced NF- κ B activation but does not contribute to IRF-3 activation. *Journal Biology Chemistry*. 280, 36560–36566.

Fazi F., Rosa A., Fatica A. 2005. A microcircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBP α regulates human granulopoiesis. *Cell*. 123: 819–31.

- Gilmore T. D. 2006. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 25, 6680- 6684.
- Hayden, M.S. 2006. NF- κ B and the immune response. *Oncogene*. 25, 6758–6780.
- He L., Hannon G. J. 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*. 5:522-531.
- He L., Thomson J. M., Hemann M. T., Hernando-Monge E., Mu D., Goodson S., Powers S., Cordon-Cardo C., Lowe S. W., Hannon G. J., Hammond S. M. 2005. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 435:828–833.
- Hoffmann A., Natoli G., Ghosh G. 2006. Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module. *Oncogene*. 25: 6706-6716.
- Ismail N., Wang Y., Dakhallah D. 2013. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood*. 121: 984–95.
- Johnnidis J.B., Harris M.H., Wheeler R.T. 2008. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*. 451: 1125–9.
- Kim V.N., Han J., Siomi M.C. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Genetics*. 10: 126-139.
- Kim, J. 2007. A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science*. 317: 1220–1224.
- Krol J., Loedige I., Filipowicz W. 2010. The widespread regulation of microRNAs biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*. 11:597-610.
- Leung T. H., Hoffmann A., Baltimore D. 2004. One Nucleotide in a κ B Site Can Determine Cofactor Specificity for NF- κ B Dimers. *Cell*. 118: 453–464.
- Li T., Morgan M. J., Choksi S., Zhang Y., Kim Y. S., Liu Z.G. 2010. MicroRNAs modulate the non canonical transcription factor NF- κ B pathway by regulating expression of the kinase IKK α during macrophage differentiation. *Nature Immunology*. Vol. 11. No. 9: 799–805.
- Liu G., Friggeri A., Yang Y., Park Y., Tsuruta Y., Abraham E. 2009. miR-147, a microRNA that is induced upon toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory Responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Vol. 106, No. 37: 15819–15824.
- Moschos S. A., Williams A. E., Perry M. M., Birrell M. A., Belvisi M. G., Lindsay M. A. 2007. Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the antiinflammatory action of glucocorticoids. *BMC Genomics*, Vol. 8, article 240.

Muller C.W., Rey F.A., Sodeoka M., Verdine G.L., Harrison S.C. 1995. Structure of the NF- κ B p50 homodimer bound to DNA. *Nature*. 373: 311–317.

Raj G. V, Safak M., Macdonald G. H., Khalili K., 1996. Transcriptional Regulation of Human Polyomavirus JC: Evidence for a Functional Interaction between RelA(p65) and the Y-Box-Binding Protein, YB-1. *Journal of Virology*, Vol. 70, No. 9: 5944–5953.

Sheedy F. J., Palsson-Mcdermott E., Hennessy E. J. 2010. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nature Immunology*. Vol. 11. No. 2: 141–147.

Sovak M. A., Bellas R.E., Kim D. W., Zanievski G. J., Rogers A.E., Traish A. M. 1997. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 100: 2952–2960.

Stuart E., Turvey M. B., David H. B. 2010. Innate Immunity. *Journal Allergy Clinical Immunology*. 125: S24-32.

Swerts K., Moerloose De B., Dhooge C., Laureys G., Benoit Y., Philippe J. 2006. Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *European Journal of Cancer*. 42: 295–309.

Taganov K. D., Boldin M. P., Chang K. J., Baltimore D., 2006. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 103(33): 12481-6.

Wang H., Garzon R., Sun H., Lander K. L., Singh R., Dahlman J., Gheng A., Hall B. M., Qualman S. J., Chandler D. S., Croce C.M., Guttridge D. C. 2008. NF- κ B–YY1–miR-29 Regulatory Circuitry in Skeletal Myogenesis and Rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell*. 14: 369–381.

Wong E. T., Tergaonker V. 2009. Roles of NF- κ B in health and disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science*. 116: 451–465.

Xu Y., Sengupta T., Kukreja L., Minella A. C. 2010. MicroRNA-223 regulates cyclin E activity by modulating expression of F-box and WD-40 domain protein 7. *Journal Biology Chemistry*. 285:34439–34446.

Yong-Chen L., Wen-Chen Y., Ohashi P. S., 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 42:145–151.

Yu Y.H., Chen H.A., Chen P.S, Cheng Y.J., Hsu W.H., Chang Y.W, Chen Y.H, Jan Y., Hsiao M., Chang T.Y., Liu Y.H, Jeng Y.M., Wu C.H, Huang M.T., Su H.Y., Hung M.C., Chien M.H., Chen C.Y., Kuo M.L, Su J.L. 2012. MiR-520h-mediated FOXC2 regulation is critical for inhibition of lung cancer progression by resveratrol. *Oncogene*. doi:10.1038/onc.2012.74 [Epub ahead of print].