



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“Regulación de la estabilidad del transcrito de SnoN a través de su región no traducida 3' UTR, en el contexto de las señales del TGF- $\beta$ ”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:  
L.B.M. AURA NIRVA CAMPERO ROMERO

TUTORA

DRA. MARINA MACIAS SILVA. Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. CLAUDIA GONZÁLEZ ESPINOSA. CINVESTAV-IPN

DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI. Facultad de Química, UNAM.

MÉXICO, D. F. agosto, 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.

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Marina Macías Silva, en el laboratorio 225 Norte del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, del Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Nacional Autónoma de México. El proyecto fue apoyado por los donativos de PAPIIT/DGAPA/UNAM (No. IN206012 y IN208115) y CONACyT (No. 101826 y No. 240224), así como al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado

Se reconoce la asesoría del comité tutorial, conformado por:

Dra. Claudia González Espinosa. (CINVESTAV-IPN)

Dr. José Pedraza Chaverri. (FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM)

Se reconoce por la asesoría y asistencia técnica a la Dra. Ángeles Tecalco Cruz.

Se reconoce la cooperación, asesoría y participación de la Biol. Marcela Sosa Garrocho, Técnica Académica del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, del IFC, UNAM.

Se reconoce al laboratorio del Dr. Fernando López Casillas, en particular al Médico Cirujano Valentín Mendoza por asesoría y asistencia técnica.

Se reconoce a los miembros de la Unidad de Biología Molecular del IFC, UNAM, por su asesoría y apoyo técnico:

Dra. Laura Ongay Larios

Biól. Ma. Guadalupe Códiz Huerta

M. en C. Minerva Mora Cabrera

Se reconoce a los miembros del taller del IFC, UNAM: el Ing. Aurey Lobato Galván y el Ing. Manuel Ortíz Benavides, por su colaboración en el mantenimiento del equipo empleado en este trabajo.

Se reconoce a los miembros de la Unidad de Cómputo del IFC, UNAM, por su asesoría y apoyo técnico:

M. en C. Gerardo Coello Coutiño

M. en C. Ana María Escalante Gonzalbo

Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo

Ing. Ivett Rosas Arciniega

Se reconoce a los miembros de la Unidad de Imagenología del IFC, UNAM, por su asesoría y apoyo técnico:

Dr. Fernando García Hernández

La alumna fue apoyada por una beca otorgada por el CONACyT, en el programa de Ciencias Bioquímicas, UNAM.

## ÍNDICE

Índice de figuras	5
Índice de tablas	6
Lista de abreviaturas	7
Resumen	8
1. Introducción	10
2. Antecedentes	21
3. Justificación	30
4. Hipótesis	31
5. Objetivos	31
6. Estrategia experimental	32
7. Material y métodos	32
Análisis bioinformático:	32
Obtención de la secuencia de la región no traducida 3'UTR del mRNA de SnoN de humano.	32
Alineamiento de secuencias 3'UTR de <i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i> y <i>Rattus norvegicus</i> en MAAFT	33
Identificación de sitios de unión a RBPs	33
Identificación de sitios de unión a miRNAs	34
Identificación de motivos funcionales de RNA	35
Identificación de estructuras de unión entre miRNAs y el transcrito de SnoN	35
Obtención de miRNAs validados experimentalmente	36
Líneas celulares:	36
Línea celular AD293 con expresión estable del mir-155	36
RACE-PCR y subclonación del 3'UTR <i>short</i> de SnoN:	37
Ensayo de luciferasa:	38
Inmunoprecipitaciones (IP) y Western blot (WB)	38
8. Resultados	41
Análisis bioinformático de la región no traducida 3' (UTR) de SnoN.	41
Sitios de unión a RBPs	44
Elementos en <i>cis</i> - que podrían ser regulados por TGF- $\beta$ : AREs	46
Sitios de unión a miRNAs	49

<i>Selección de miRNAs candidatos mediante análisis bibliográfico y alineamiento manual y por algoritmo StarMir</i>	50
miR-155	50
miR-21	53
miRNAs que se unen al 3'UTR de <i>skil</i>	55
<i>Subclonación de la región no traducida 3' (UTR) corta del mRNA de SnoN en pGL3Control</i>	56
<i>Clonación de la región no traducida 3' (UTR) larga del mRNA de SnoN en pCR4.0TOPO TA</i>	57
<i>El reemplazo del 3'UTR de pGL3control por el 3'UTRshort de skil aumenta la actividad de luciferasa en células AD293.</i>	59
<i>Efecto de miR-155 en la región 3'UTRshort de SnoN.</i>	60
<i>Efecto de miR-21 en la región 3'UTRshort de SnoN.</i>	62
<i>Efecto de miR-155 expresado establemente en la regulación de SnoN endógeno.</i>	63
9. Discusión	68
10. Conclusiones	75
11. Perspectivas	75
12. Bibliografía	76

## Índice de figuras

Fig. 1. Vía canónica del TGF- $\beta$ .

Fig. 2. Roles oncogénicos y anti-oncogénicos de SnoN.

Fig. 3. Regulación de los niveles de expresión del gen y de la proteína SnoN mediada por el TGF- $\beta$ .

Fig. 4. SnoN es regulado diferencialmente en líneas celulares normales y tumorales.

Fig. 5. Las Smads activadas regulan la estabilidad del transcrito de SnoN.

Fig. 6. Regulación de elementos *cis* en las regiones no traducidas del extremo 3' (3'UTR) mediante corte y poliadenilación alternativa.

Fig. 7. El TGF- $\beta$  induce la expresión de isoformas del transcrito de SnoN.

Fig. 8 Esquema del intercambio de señales entre la vía canónica de TGF- $\beta$  y la biosíntesis de miRNAs.

Fig. 9. El transcrito de SnoN posee dos sitios de corte y poliadenilación, cuya consecuencia es la generación de 2 transcritos de diferente longitud.

Fig. 10. Secuencia blanco canónica de miR-155, miR-155 y secuencia no canónica presente en la región 3'UTR de *H. sapiens* y *M. musculus*.

Fig. 11. Sitios de unión a miR-155 no canónicos en 3'UTR de SnoN.

Fig. 12. Esquemas que muestran la conformación híbrida entre miR-155:mRNA-*skil*.

Fig. 13. Esquema que muestra la conformación híbrida independiente de sitio semilla entre miR-21:mRNA-*skil*.

Fig. 14. Esquema de la estrategia de la subclonación del 3'UTR short de *skil* en pGL3Control.

Fig. 15. Subclonación de la región no traducida 3' (UTR) corta del gen *skil* en pGL3Control.

Fig. 16. Clonación del 3'UTR largo de *skil* en pCR4.0TOPO TA.

Fig. 17. La construcción que contiene el 3'UTR short de *skil* muestra un aumento en la actividad de luciferasa comparado con el vector vacío, en células AD293.

Fig. 18. En presencia de miR-155, disminuye la actividad de luciferasa de la construcción que contiene a 3'UTR short de *skil*.

Fig. 19. Efecto de miR-21 sobre el 3'UTR short de SnoN.

Fig. 20 . Las células AD293 expresan de manera estable al plásmido que contiene el *cassette* de expresión de miR-155.

Fig. 21. El nivel de SnoN aumenta en células con expresión estable del miR-155, mientras que los niveles de Smad4 y Smad2 se mantienen estables.

Fig. 22 . Efecto del TGF- $\beta$  en los niveles del RNA mensajero y de la proteína SnoN en células AD293 que expresan establemente al miR-155.

Fig. 23. La sobreexpresión de miR-155 impide la recuperación de los niveles de la proteína SnoN tras estímulo de TGF- $\beta$ .

### Índice de tablas

Tabla 1. Matriz de porcentaje de identidad entre las secuencias de RNAm de *skil* de humano (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*) y rata (*Rattus norvegicus*).

Tabla 2. Especies en las que se encuentra conservado el 3'UTR de *skil*.

Tabla 3. Proteínas de unión a RNA (RBPs) con un sitio de unión en la región 3' no traducida del RNAm de *skil*.

Tabla 4. Secuencias AREs en el 3'UTR del RNAm de *skil*.

Tabla 5. miRNAs regulados por TGF- $\beta$  con sitio de unión en la región 3' no traducida del RNAm de *skil*.

## Lista de abreviaturas

ARE	Elemento Rico en AU
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
APC	Complejo promotor de la anafase
BMP	Proteínas formadoras de hueso
cDNA	DNA complementario
Co-Smad	Smad común
h	Horas
HDAC	Desacetilasas de histonas
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
I-Smad	Smad inhibitoria
IP	Inmunoprecipitación
LAP	Proteína asociada a la latencia
LTBP	Proteína de unión al TGF- $\beta$ latente
MET	Transición mesénquima-epitelio
MH1	Dominio 1 homólogo a Mad
MH2	Dominio 2 homólogo a Mad
miRNA	microRNA
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
R-Smad	Smad regulada por receptor
SBE	Elementos de unión a las Smads
<i>skil</i>	Gen que codifica para la proteína SnoN
Smurf	Factor relacionado a la ubiquitinación de Smads
S4, S2, S3	Smad4, Smad2, Smad3
SnoN	Proteína Ski-novel related gene
TGF- $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante Beta
T $\beta$ RI/II	Receptor de TGF- $\beta$ tipo I/II
UTR	Región no traducida



## Resumen

La proteína SnoN regula negativamente la señalización mediada por el TGF- $\beta$ , por lo que los niveles de SnoN repercuten sobre su función. La expresión de SnoN se encuentra elevada en diversos tipos de cáncer humano, mientras que normalmente SnoN es expresado ubicuamente a bajos niveles tanto en tejidos embrionarios como en tejidos adultos. El TGF- $\beta$  es un factor importante en la regulación de la expresión de la proteína SnoN.

SnoN presenta una regulación bifásica temporal; en estado basal, su promotor se encuentra reprimido por un complejo formado por HDACs, las proteínas Smad2 y Smad4, y el mismo SnoN. Tras el estímulo con TGF- $\beta$ , a los 45 min, SnoN es ubiquitinado por las Smads y enviado a degradación vía proteasoma, permitiendo la transcripción de su gen. Después de 2h del estímulo con TGF- $\beta$ , se recuperan los niveles de SnoN, tras la transcripción y síntesis *de novo* y en mayor medida a la estabilidad de su transcrito, la cual está mediada por el mismo TGF- $\beta$  a través de sus efectores, las proteínas Smad.

El transcrito maduro de SnoN posee dos isoformas debidas a la diferente longitud de su cola poly-A; en este trabajo nos dimos a la tarea de buscar una molécula cuya regulación fuera dependiente de TGF- $\beta$ , que a su vez, modificara los niveles de expresión de SnoN mediante su interacción con las regiones 3'UTR de su transcrito. Mediante un análisis bioinformático, se eligió al miR-155, el cual es regulado por TGF- $\beta$  y posee sitios de unión no canónicos en la secuencia 3'UTR del RNAm de SnoN (llamado *skil*).

Se logró la subclonación del 3'UTRshort del transcrito de SnoN (*skil*) en un vector reportero; la isoforma larga del 3'UTR de este transcrito no se pudo subclonar mediante la estrategia empleada. Mediante análisis bioinformático, se identificaron diversos miRNAs que poseen sitios de unión en la región 3' no traducida de *skil*, de los cuales se seleccionó a miR-155 y a miR-21, los cuales son regulados por TGF- $\beta$ , como posibles candidatos reguladores de la estabilidad del transcrito de *skil* a través de su unión con su región 3' no traducida. En células AD293, el miR-155 regula negativamente a *skil* probablemente a través de la interacción con su 3'UTRshort. Para confirmar este dato, se necesita realizar una mutagénesis dirigida en el sitio putativo de unión a miR-155 en la secuencia del 3'UTRshort, y el resultado que confirmaría este dato sería que los niveles de la luciferasa no disminuyeran al expresar a la construcción que tuviera mutado el sitio de unión para el miR-155.

En la línea celular AD293 con una expresión estable del miR-155, los niveles del transcrito de SnoN se encuentran disminuidos, en contraste con los niveles de su proteína, los cuales se encuentran elevados. Ésta aparente contradicción puede explicarse a través de la existencia de diversos mecanismos que controlan la regulación de los niveles de SnoN a nivel post-transcripcional.



# **Regulación de la estabilidad del transcrito de SnoN a través de su región no traducida 3' UTR, en el contexto de las señales del TGF- $\beta$ .**

## **1. Introducción**

### **1.1 Generalidades de la citocina TGF- $\beta$**

La señalización mediada por el Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) controla diversos procesos celulares, incluyendo proliferación celular, diferenciación, apoptosis y especificación de destino celular, tanto en embriogénesis como en tejidos adultos, en especies que varían desde moscas y gusanos hasta mamíferos (Shi y Massagué, 2003).

Los TGF- $\beta$ s pertenecen a una familia diversificada de proteínas de señalización, conocida como la superfamilia del TGF- $\beta$ . Miembros de esta superfamilia incluyen a las proteínas formadoras de hueso (BMP), a los factores de crecimiento y diferenciación (GDF), y a las activinas e inhibinas, entre otros. Las proteínas de la superfamilia del TGF- $\beta$  comparten una estructura dimérica similar, y la mayoría de los miembros de la familia son estabilizados por un puente disulfuro que enlaza a los monómeros (Hinck, 2012).

El TGF- $\beta$  es expresado en la mayoría de los tipos celulares y es sintetizado como una pro-proteína que es escindida proteolíticamente por la furina para generar el TGF- $\beta$  maduro y a la proteína asociada a la latencia (LAP). El ligando activo de TGF- $\beta$  es un dímero de 25 kDa, unido covalentemente por un puente disulfuro entre residuos de cisteína de cada monómero. Cuando está unido a LAP, el TGF- $\beta$  no puede unirse a sus receptores, resultando en un ligando en estado

latente que carece de biodisponibilidad. Esta biodisponibilidad es restringida adicionalmente por la unión de una proteína llamada proteína de unión al TGF- $\beta$  latente (LTBP). LTBP se une a la matriz extracelular y secuestra al complejo LAP-TGF- $\beta$ . Varias proteasas escinden a LAP y a LTBP para liberar al TGF- $\beta$  activo (Zi, 2012).

Debido a que el TGF- $\beta$  participa en la regulación de la homeostasis celular, la desregulación de la vía del TGF- $\beta$  lleva al desarrollo de varias patologías, entre las que se encuentran la fibrosis tisular y el cáncer (Hinck, 2012).

## **1.2 Vía de señalización canónica del TGF- $\beta$**

La unión del ligando TGF- $\beta$  al receptor de TGF- $\beta$  tipo II (T $\beta$ RII) permite que su dominio de cinasa fosforile al dominio GS (rico en glicina y serina) del receptor de TGF- $\beta$  tipo I (T $\beta$ RI), en residuos de serinas y treoninas. Esta fosforilación induce cambios conformacionales en el T $\beta$ RI que activan su dominio de cinasa. Sustratos importantes del receptor T $\beta$ RI son los miembros de la familia de las proteínas Smad activadas por el receptor o R-Smads (Smad2 y Smad3), las cuales son los efectores de la vía de señalización canónica del TGF- $\beta$ . El T $\beta$ RI fosforila a las R-Smads en los últimos dos residuos de serinas localizados en el motivo SSXS del C-terminal. Posterior a la fosforilación inducida por el receptor, las R-Smads forman complejos con el mediador común Smad4 (Co-Smad), los cuales son translocados al núcleo, en donde, en cooperación con otros factores de transcripción, como co-activadores y co-represores, regulan la transcripción de múltiples genes (Heldin y Moustakas, 2012; Xu, 2012).

La familia de proteínas Smad tiene 8 miembros, 2 R-Smads reguladas por TGF- $\beta$  y activinas (Smad2 y Smad3), 3 R-Smads reguladas por BMPs (Smad1, Smad5 y Smad8), 1 Co-Smad (Smad4), y 2 Smads inhibitorias (Smad6 y Smad7). Las R-Smads y la Co-Smad poseen dos dominios conservados, MH1 (*Mad-Homology*) y MH2, conectados por una región *linker*, mientras las I-Smads también poseen un dominio MH2 y una región *linker*, pero un dominio MH1 corto. Las R-Smads y las Co-Smads unen al DNA mediante una estructura  *$\beta$ -hairpin* presente en sus dominios MH1, con excepción de Smad2 que tiene una secuencia insertada en esta región que impide su unión al DNA. El dominio MH2 de las R-Smads es el responsable por la interacción con el receptor T $\beta$ RI. La región *linker* entre los dominios MH1 y MH2 también tiene funciones importantes, ya que contiene motivos PY que unen a diferentes ligasas E3 de ubiquitina y contiene también sitios potenciales de fosforilación (Heldin y Moustakas, 2012).

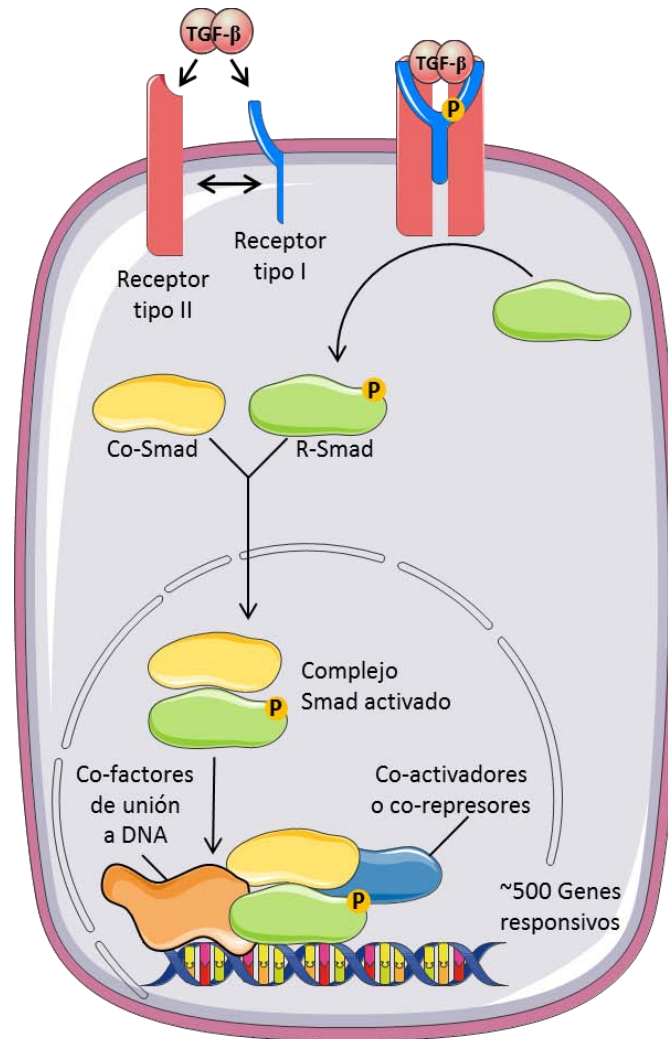
La fosforilación en el C-terminal de las R-Smads les permite unirse a Smad4. Después de la estimulación con el TGF- $\beta$ , se forman complejos triméricos entre los que se incluyen Smad2/Smad2/Smad4, Smad3/Smad3/Smad4 y Smad2/Smad3/Smad4. Parece ser que Smad4 es un compañero importante en esos complejos, ya que en ausencia de Smad4, la señal de TGF- $\beta$  se ve afectada severamente (Heldin y Moustakas, 2012).

Estos complejos triméricos se traslocan rápidamente al núcleo, donde promueven respuestas que incluyen la transcripción de muchos genes blanco, mediante la asociación con gran afinidad a secuencias de unión específicas en el DNA llamadas SBE (*Smad Binding Elements*), la mayoría de las veces en asociación con otros factores de transcripción. Se ha demostrado que los

complejos Smad se asocian a una amplia variedad de factores de transcripción (FTs). El reclutamiento adicional de co-activadores y co-represores define la activación o represión de la transcripción de los genes blanco mediada por el TGF- $\beta$ . La asociación de las R-Smads con los co-activadores CBP o p300 a menudo permite el aumento de la activación de la transcripción. Por el contrario, se ha demostrado que las R-Smads pueden también reclutar desacetilasas de histona (HDACs), llevando a la represión de la transcripción.

Las interacciones de los complejos Smad activados con diversos factores de transcripción, co-activadores o co-represores, permiten múltiples *crosstalks* funcionales entre la vía de señalización del TGF- $\beta$  mediada por Smads y otras vías de señalización, debido a que muchos compañeros que interactúan con las Smads son usualmente blanco de otras vías de señalización. La desfosforilación de las R-Smads causa su regreso al citoplasma para otra ronda de fosforilación mediada por el receptor y su posterior translocación al núcleo (Xu, 2005).

Smad4 y todas las R-Smads (excepto Smad2) pueden unir al DNA directamente, específicamente a la secuencia 5'GTCT3', o a su complementaria, la cual es llamada elemento de unión a Smad (SBE). Muchas regiones promotoras responsivas a Smads contienen uno o más SBEs. La estructura cristalográfica del complejo MH1-SBE muestra que las Smads reconocen a la secuencia 5'GTCT3' a través del motivo  *$\beta$ -hairpin* en el dominio MH1. La interacción de las Smads con otros factores de transcripción para generar complejos transcripcionales que regulan genes específicos, es crucial para la naturaleza pleiotrópica de la señalización mediada por el TGF- $\beta$  (Massagué, 2005).



**Fig. 1. Vía canónica de TGF- $\beta$ .** Los miembros de la familia de TGF- $\beta$  son ligandos diméricos que se unen a su receptor de membrana, promoviendo la formación y activación de un complejo heterotetramérico (dímero de receptor tipo I y dímero de receptor tipo II). La región con actividad cinasa del receptor tipo I fosforila a las R-Smads, y éstas, fosforiladas, son capaces de unirse a la Co-Smad, tras lo cual sufren traslocación nuclear. El complejo R-Smads/Co-Smad incorpora diferentes co-factores que le confieren selectividad para regular sus genes blanco. Modificado de Massagué, 2005.

### 1.3 Regulación de la vía del TGF- $\beta$

Las I-Smads, Smad6 y Smad7, están relacionadas estructuralmente a las R-Smads y Co-Smads, especialmente en el dominio MH2, sin embargo, la región N-terminal es muy distinta entre ellas. Las I-Smads inhiben las actividades de señalización inducidas por la superfamilia de proteínas del TGF- $\beta$ . Smad7 inhibe tanto la señalización del TGF- $\beta$  como la de señalización mediada por BMPs, mientras que Smad6 inhibe preferencialmente la señalización por BMPs. Las I-Smads interactúan físicamente con los receptores tipo I como el T $\beta$ RI; el dominio MH2 de Smad7 se une directamente a la cinasa del T $\beta$ RI, en consecuencia, las I-Smads compiten con las R-Smads por el dominio de cinasa del T $\beta$ RI, e inhiben la señalización del TGF- $\beta$ . En adición a esta inhibición mediada por competencia por el T $\beta$ RI, las I-Smads también interactúan con las R-Smad activadas, e interfieren con la formación del complejo R-Smad/Co-Smad (Xu, 2012; Massagué, 2005).

Entre otros reguladores de la vía del TGF- $\beta$  se encuentran los cofactores transcripcionales Ski y SnoN, que son reguladores negativos importantes de ésta vía debido a su habilidad para interactuar con las Smads y reprimir su actividad transcripcional.

### 1.4 Generalidades de SnoN

El gen *skil*, que codifica para la proteína SnoN en humanos, fue descubierto inicialmente debido a su alta homología con v-ski, el componente transformante del virus *Sloan-Kettering* y su homólogo celular c-ski. El gen *skil* codifica para la proteína SnoN de 683 aminoácidos, así como para varias isoformas derivadas por



empalme alternativo. Esas isoformas incluyen a SnoN2, la cual resulta de una delección de 46 aminoácidos en el exón 3, Sno1, la cual contiene los primeros 399 residuos de SnoN, y SnoA, la cual difiere de SnoN después del exon 1 con un carboxilo terminal acortado (Deheunick y Luo, 2009). La isoforma SnoN es la más abundante en humano.

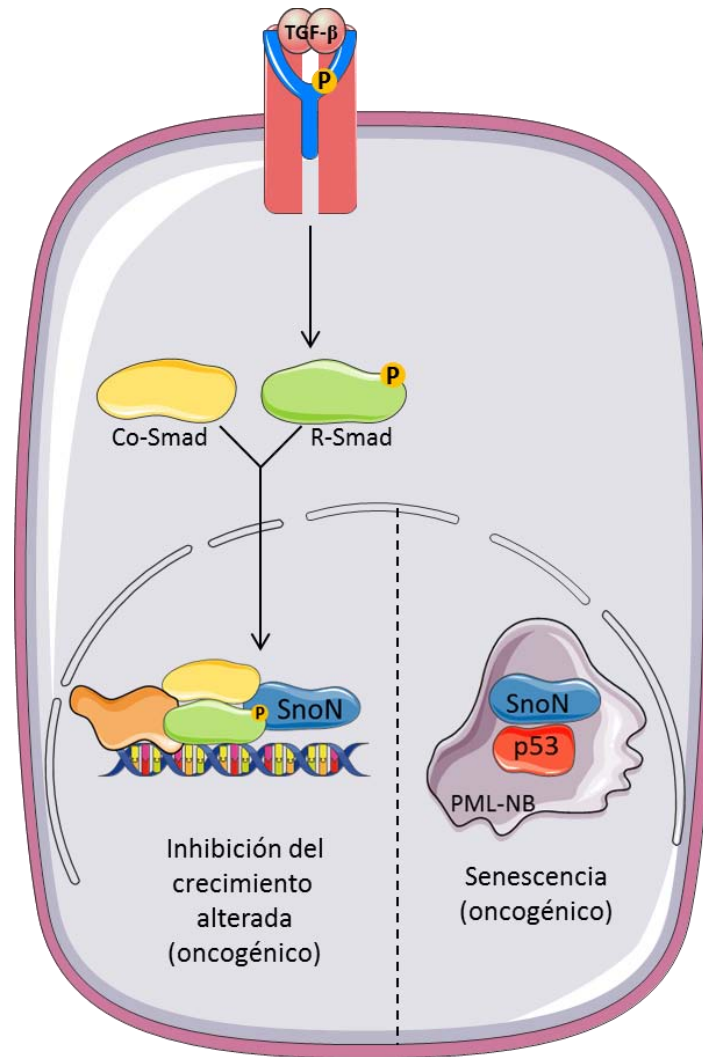
SnoN contiene un dominio DHD (dominio de homología a *Dachshund*) en la región amino terminal. Cerca al DHD está un módulo de unión a Zinc de 80 aminoácidos, con homología estructural al dominio SAND (Sp100, AIRE1, NucP41/75 y DEAF1). Este dominio es necesario para la interacción con Smad4 (Luo, 2004).

Los primeros estudios demostraron que la sobreexpresión de SnoN en fibroblastos embrionarios de pollo induce su transformación. Se ha propuesto que la regulación negativa de la vía del TGF- $\beta$  por la sobreexpresión de SnoN promueve la transformación celular maligna en etapas tempranas del cáncer. La habilidad de SnoN sobre-expresado para regular negativamente la señalización por TGF- $\beta$  y el arresto del ciclo celular podría proveer un mecanismo por la pérdida de la respuesta al TGF- $\beta$ . Consistente con estas observaciones, SnoN está amplificado en varios tipos de cáncer, incluyendo melanomas, cáncer de mama y carcinomas de esófago (Pot, 2010).

De manera importante, SnoN también posee función de supresor de tumores. Ratones heterocigotos *skil*<sup>+/-</sup> desarrollan tumores espontáneos con baja frecuencia, mientras que poseen una tasa aumentada de formación de tumores cuando son retados con carcinógenos químicos. Ratones transgénicos que expresan una mutante de SnoN, defectuosa en la unión a las proteínas Smad,

presentan letalidad embrionaria parcial, pues el 33% de los embriones mueren antes de la etapa E12.5, debido principalmente a defectos en angiogénesis. Los ratones que sobreviven, tienen una menor longitud de vida, reproductividad disminuida, presentan osteoporosis, la capacidad regenerativa se ve disminuida y muestran otros fenotipos relacionados al envejecimiento. Este fenotipo causado por la mutante de SnoN, defectuosa en su unión a las Smads, recae en su habilidad para activar a p53. SnoN se une a p53, en la región promotora de genes responsivos a p53, para promover la activación de su transcripción (Luo, 2004, Pot, 2010; Pan, 2012).

SnoN se expresa ubicuamente a través del desarrollo embrionario y en todos los tejidos adultos a niveles bajos, sugiriendo que puede jugar un papel importante en el desarrollo embrionario, así como en la homeostasis y morfogénesis de tejidos normales.



**Fig. 2. Roles oncogénicos y anti-oncogénicos de SnoN.** En el núcleo, SnoN se puede unir al complejo de Smads con factores de transcripción y reprimir la inhibición de la proliferación inducida por TGF- $\beta$ , por lo tanto actúa como oncogén. SnoN puede interactuar con la proteína de leucemia promielocítica (PML) en cuerpos nucleares (PML-NB), resultando en la estabilización de la expresión de p53. Esto lleva a senescencia prematura y define el rol anti-oncogénico de SnoN.

### 1.5 Regulación de la vía del TGF- $\beta$ por SnoN

Uno de los efectos más ampliamente estudiados del TGF- $\beta$  es su habilidad para inhibir la proliferación celular. Otra respuesta importante del TGF- $\beta$  es inducir la transición epitelio-mesénquima (EMT), un proceso fundamental en el cual las células epiteliales se transdiferencian para adquirir un fenotipo mesenquimatoso,

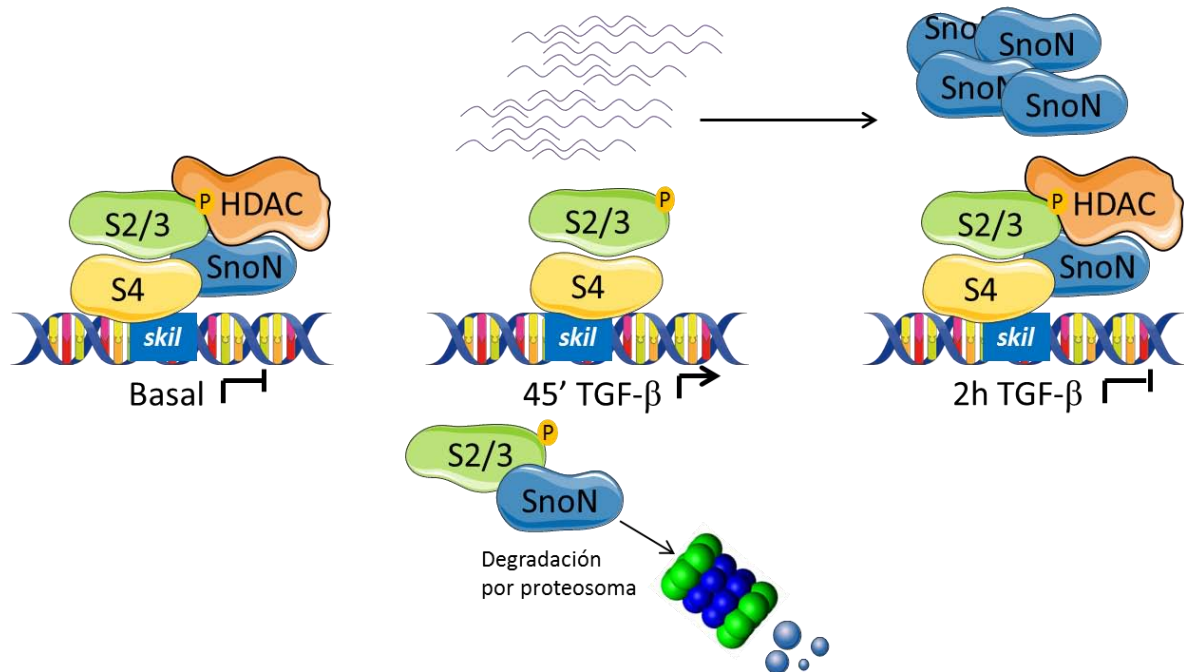
móvil. La evasión del arresto del ciclo celular y la inducción de la transición epitelio-mesénquima son características importantes que adquieren muchas células cancerosas (Pot, 2010).

Se cree que el TGF- $\beta$  juega papeles positivos o negativos en las enfermedades neoplásicas dependiendo del estadio del desarrollo tumoral. En etapas tempranas, la pérdida de responsividad celular al efecto anti-proliferativo del TGF- $\beta$  podría contribuir a la patogénesis de varios tumores epiteliales, incluyendo carcinomas colorrectales, pancreáticos y mamarios. Por otra parte, se cree que la transición epitelio-mesénquima inducida por el TGF- $\beta$  contribuye a la progresión tumoral observada en etapas posteriores en varios carcinomas, entre los que se encuentran el carcinoma mamario, el de próstata y el colorrectal. Similar al TGF- $\beta$ , interesantemente, SnoN parece tener tanto una función oncogénica como supresora de tumores (Pot, 2010).

## **1.6 Regulación de la expresión de SnoN**

La expresión de SnoN en células de mamífero está regulada por un control temporal y espacial preciso. La regulación de la expresión de SnoN ocurre a múltiples niveles, incluyendo una regulación de su transcripción, degradación proteica y localización subcelular. La expresión de SnoN puede ser inducida durante estadios específicos de la morfogénesis tisular, por factores de crecimiento como el TGF- $\beta$ , y en respuesta a una variedad de señales de estrés celular incluyendo el estrés oxidativo y el daño crónico al DNA. El regulador mejor caracterizado de la expresión de SnoN es el TGF- $\beta$ ; éste regula la expresión de

SnoN tanto a nivel de estabilidad de la proteína como a nivel de su inducción transcripcional. Posterior a la estimulación con TGF- $\beta$ , SnoN es degradado rápidamente para permitir la formación de un complejo de Smads, transcripcionalmente activo, para activar la expresión de genes blanco del TGF- $\beta$ . Ésta degradación de SnoN es dependiente del proteasoma y requiere la actividad de varias ligasas de ubiquitina tipo E3, que incluyen al factor regulador de la ubiquitinación de Smad2 (Smurf), al complejo promotor de la anafase (APC/C) y a Arkadia. El gen humano que codifica para SnoN, *skil*, es un blanco transcripcional de la vía del TGF- $\beta$ . La transcripción del gen *skil* se induce después de 1-2 horas de tratamiento con TGF- $\beta$ , mediada por la unión directa del complejo Smad2/Smad4 a los elementos de unión a Smad (SBE) en el promotor de *skil*. Esta regulación positiva de la expresión de SnoN puede funcionar como un mecanismo de retroalimentación negativa para regular la sincronización, duración y robustez de la señalización del TGF- $\beta$ , y puede participar también en otros eventos celulares. La transcripción del gen codificante para SnoN también puede ser inducida por otros factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y la prolactina. Se ha descrito la auto-regulación de SnoN mediante la unión al promotor de su propio gen, *skil*. SnoN reprime la transcripción de su promotor, y ésta represión es dependiente de la unión al promotor a través de Smad4, en un contexto celular específico (Zhu y Luo, 2012; Jahchan, 2012; Tecalco-Cruz, 2012).



**Fig. 3. Regulación de niveles de expresión del gen y la proteína de SnoN mediada por TGF- $\beta$ .** De manera basal, SnoN se encuentra unido a su promotor, y junto a otros co-factores, reprime su transcripción. Tras el estímulo de TGF- $\beta$  (45m), SnoN es ubiquitinado mediante Smad2/3 activadas y enviado a degradación por el proteasoma, asimismo, Smad2/3 activadas promueven la transcripción del gen *skil*; cuando se recuperan los niveles de la proteína SnoN tras el estímulo de TGF- $\beta$  (2h), SnoN se une nuevamente a su promotor y reprime su expresión.

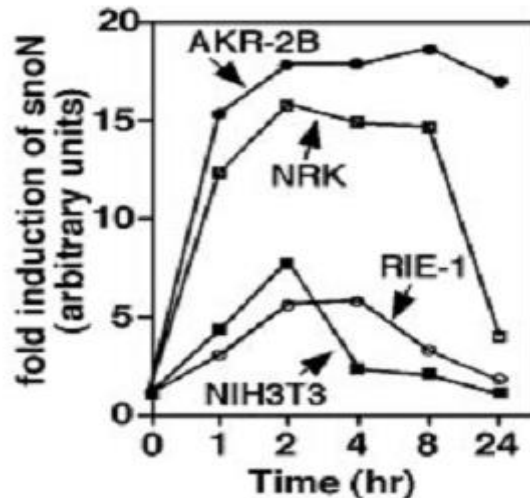
## 2. Antecedentes

### 2.1 La regulación de SnoN está alterada en células y tejidos tumorales

SnoN posee tanto un rol oncogénico como de supresor de tumores. Está presente en bajos niveles en todos los tejidos adultos y embrionarios; sin embargo, se encuentra elevado en varios tipos de cáncer y líneas celulares tumorales humanas derivadas de cáncer de páncreas, de cáncer de mama, melanoma, pulmón, esófago, estómago y próstata, entre otras (Jahchan, 2013).

La proteína SnoN regula negativamente la señalización mediada por TGF- $\beta$ , por lo que los niveles de SnoN repercuten sobre su función. TGF- $\beta$  es un factor importante en la regulación de la expresión de la proteína SnoN. En distintos tipos celulares, se ha reportado que el tratamiento con TGF- $\beta$  en tiempos cortos de estimulación (15-30 min) regula los niveles de las proteínas SnoN, al inducir su degradación vía el sistema ubiquitina-proteasoma. Posteriormente, 1 ó 2 h después del estímulo con TGF- $\beta$  se observa un incremento en los niveles del RNAm y de la proteína SnoN, los cuales disminuyen después de 4-8 h del estímulo de TGF- $\beta$ , sin embargo, tanto en líneas celulares de fibroblastos como en células tumorales, la expresión de SnoN se mantiene elevada incluso a 24 h después del estímulo con TGF- $\beta$  (Luo, 2004; Zhu, 2005).

Existen algunos estudios que demuestran la regulación bifásica de los niveles de RNAm y de la proteína SnoN en líneas celulares normales, así como la expresión elevada que se observa en fibroblastos y en células tumorales; no obstante, no se han aclarado los mecanismos implicados en esta regulación.



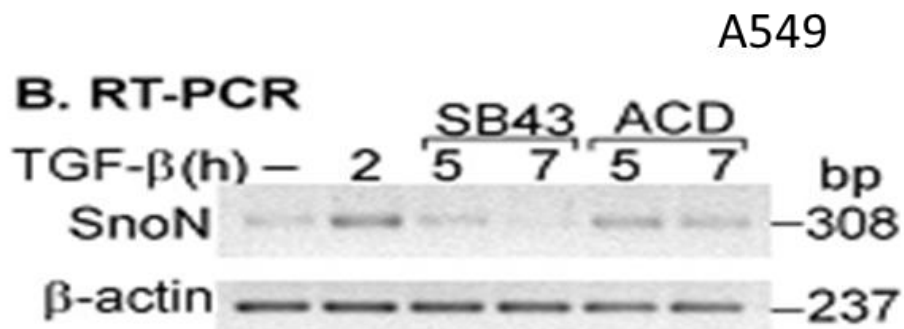
**Fig. 4. SnoN es regulado diferencialmente en líneas celulares normales y tumorales.** TGF- $\beta$  induce la elevación de los niveles del transcrito de SnoN de manera prolongada (24h) en líneas celulares tumorales (AKR-2B y NRK), mientras que en líneas celulares control (NIH 3T3 y RIE-1) la expresión del transcrito de SnoN alcanza un pico a tiempos cortos (2h) y se degrada rápidamente. Tomado de Zhu, 2004.

## 2.2 El TGF- $\beta$ participa en la regulación de la estabilidad del transcrito de SnoN

Mediante RT-PCR se ha estudiado el efecto del TGF- $\beta$  sobre los niveles del RNAm de SnoN a tiempos prolongados de estímulo en las células de cáncer de pulmón A549. El TGF- $\beta$  incrementó los niveles de RNAm a las 2 h y éstos se mantuvieron altos hasta las 8 h posteriores al tratamiento. Para saber si el mantenimiento de los altos niveles de RNAm se debían a la constante transcripción inducida por el TGF- $\beta$ /Smad o debido a la vida media del RNAm, se llevó a cabo un tratamiento con las células A549 tratadas con TGF- $\beta$  por 2 h, a las que se les adicionó posteriormente el inhibidor SB431542 (SB43) o actinomicina (ACD). El SB43 es un inhibidor de la señal del TGF- $\beta$  que bloquea la fosforilación de las R-Smads, mientras que la ACD es un inhibidor de la transcripción.



El tratamiento con SB43 abatió parcialmente los niveles de RNAm de SnoN a las 5 h y totalmente a las 7 h de tratamiento. Sin embargo, el tratamiento con ACD reveló una discreta disminución en los niveles de RNAm de SnoN a las 5 y 7 h. Estos resultados indican que el mantenimiento de los niveles de RNAm de SnoN a tiempos largos de tratamiento con TGF- $\beta$  se debe en gran parte a la vida media del RNAm y no a una transcripción constante. De manera interesante, la estabilidad del RNAm de SnoN parece ser conferida por la vía del TGF- $\beta$ /Smad, dado que al inhibir dicha vía se disminuyen los niveles del RNAm de SnoN (Tecalco-Cruz, 2012).



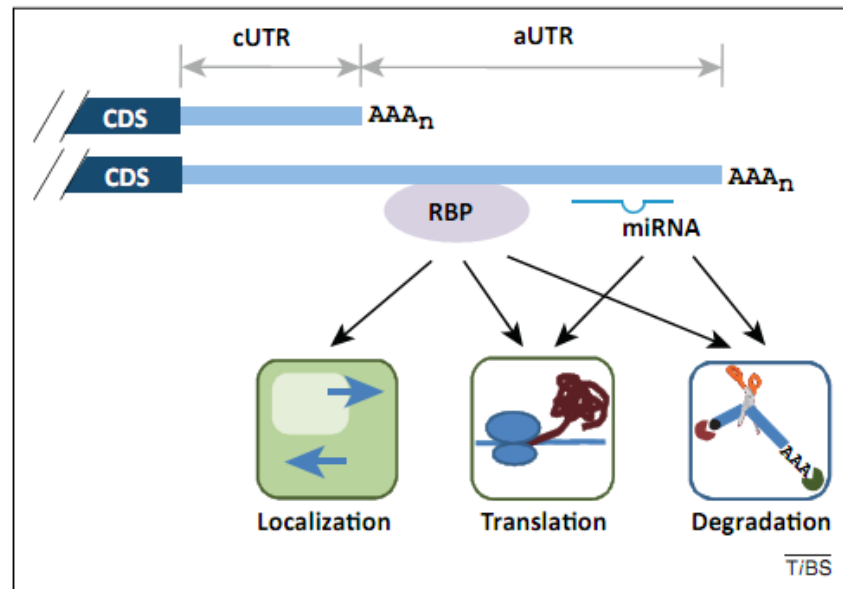
**Fig. 5. Las Smads activadas regulan la estabilidad del transcrito de SnoN.** Mediante RT-PCR, se evaluaron los niveles de transcrito de SnoN en células pre-tratadas con TGF- $\beta$  las cuales fueron sometidas a diferentes tratamientos. En la condición en la cual se inhibe la activación de las Smads (SB43), los niveles del mensajero disminuyen drásticamente, mientras que tras la inhibición de la transcripción (ACD), se observa una pequeña disminución en los niveles del mensajero de SnoN. Tomado de Tecalco-Cruz, 2012.

### 2.3 Isoformas de la región no traducida 3' (3'UTR) de SnoN

El corte y la poliadenilación de transcritos nascentes es esencial para la maduración de los extremos 3' de la mayoría de los mRNAs eucariontes. Análisis genómicos recientes han revelado que la mayoría de los genes eucariontes tienen

múltiples sitios de poliadenilación, cuya consecuencia son isoformas del transcrito que codifican para isoformas de la proteína o para regiones no traducidas 3' (3'UTR) alternativas (Tian y Manley, 2013).

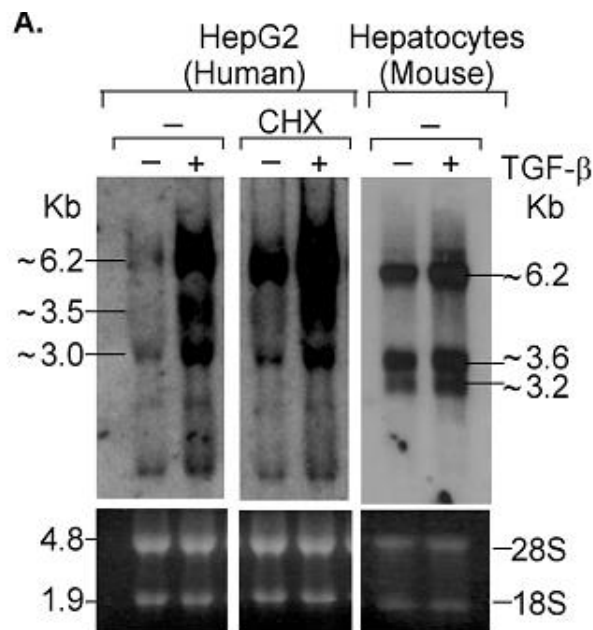
El 3'UTR, a través de sus elementos *cis*, juega un rol importante en la regulación del metabolismo del mRNA, incluyendo su localización subcelular, estabilidad y traducción; por lo tanto, las isoformas derivadas de la poliadenilación alternativa con 3'UTRs de diferentes longitudes poseen propiedades distintas (Tian y Manley, 2013).



**Fig. 6. Regulación de elementos *cis* en las regiones no traducidas del extremo 3' (3'UTR) mediante corte y poliadenilación alternativa.** Se muestran 2 isoformas de RNAm, la región río arriba del corte y poliadenilación proximal es llamada el UTR constitutivo (cUTR), y la región río abajo es llamada UTR alternativo (aUTR). Se muestran las proteínas de unión a RNA (RBP) e interacciones con miRNAs. Se indica el impacto en localización del mRNA, traducción y degradación. Tomado de Tian y Manley, 2013.

Mediante análisis de Northern blot se analizaron los niveles de mRNA de *skil*, utilizando RNA total de las células de hepatoma humano HepG2, utilizando

una sonda que reconoce la isoforma SnoN. El tratamiento con TGF- $\beta$  300 pM por 1 h fue capaz de inducir la expresión de tres transcritos de SnoN de diferente tamaño. La principal diferencia en el tamaño de los transcritos probablemente se debe a las diferentes longitudes de sus 3'UTRs, lo cual coincide con datos reportados previamente (Pearson-White, 1993). La secuencia del transcrito más largo reportado en el *GenBank* contiene dos sitios de poliadenilación en el 3'UTR del gen *skil*. El pretratamiento con cicloheximida indujo acumulación del mRNA de SnoN en células HepG2 y en hepatocitos de ratón, lo cual demuestra que no requiere síntesis proteica *de novo* (Tecalco-Cruz, 2012).



**Fig. 7. El TGF- $\beta$  induce la expresión de isoformas del transcrito de SnoN.** Tras el estímulo con TGF- $\beta$ , se observa la acumulación de 3 distintas isoformas del transcrito de SnoN, tanto en células HepG2 como en hepatocitos de ratón. Tomado de Tecalco-Cruz, 2012.

### **2.3 Regulación de la estabilidad del RNAm mediante miRNAs**

Los 3'UTR de metazoos son blanco de miRNAs, un tipo de RNA pequeño (~22nt) que modula la estabilidad del mRNA y/o la traducción de sus transcritos blanco. Los miRNA se unen a secuencias complementarias, para alterar la expresión por medio de la regulación de la degradación o la traducción del mRNA. La expresión favorecida del 3'UTR corto, al evadir ser blanco de miRNAs, puede tener implicaciones biológicas significativas, particularmente con genes que poseen roles regulatorios. Por otro lado, los mRNA que contienen 3'UTRs largos e intactos tiene gran potencial para la regulación combinatoria para múltiples factores *trans*, tanto positivos como negativos, los cuales se unen a elementos *cis* espacialmente distintos. Los 3'UTRs también contienen sitios de unión para un grupo de proteínas de unión al RNA (*RNA-binding proteins*, RBPs) que regulan la estabilidad del mRNA. Otro mecanismo por el cual el 3'UTR puede influenciar la expresión proteica es vía la regulación de la localización del mRNA (Jia, 2013).

### **2.4 La biogénesis y el procesamiento de algunos miRNAs es regulada por TGF- $\beta$**

Los microRNAs (miRNAs) se transcriben como transcritos primarios (pri-miRNAs) por la RNA polimerasa II; los transcritos de los miRNAs pueden provenir de secuencias transcritas de manera autónoma, ser co-transcritos con otros genes, o pueden estar localizados en intrones de genes hospederos. Cada pri-miRNA contiene una o más estructuras de tallo-asa que son reconocidas y procesados por el complejo Microprocesador, el cual consiste en la RNasa III de tipo ribonucleasa Drosha y su socio, DGCR8. El complejo Microprocesador genera

una estructura de horquilla de ~70 nucleótidos conocido como miRNA precursor (pre-miRNA), que se exporta de forma activa al citoplasma por la exportina 5. En el citoplasma, el pre-miRNA es reconocido por Dicer, otro tipo de RNasa III endonucleasa, y la proteína de unión a TAR RNA (Tar RNA Binding Protein). Generalmente, sólo se selecciona una hebra como el miRNA maduro biológicamente activo y la otra hebra se degrada. Dicer escinde al pre-miRNA, generando una molécula de ~20 nucleótidos de RNA maduro de una sola cadena, al cual se conoce como miRNA. El miRNA maduro se carga en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), que contiene las proteínas Argonata (AGO) y al miRNA maduro. El miRNA permite al complejo RISC reconocer a su RNAm blanco a través de la complementariedad de secuencia parcial entre el miRNA y la secuencia del RNAm. El complejo RISC puede inhibir la expresión del RNAm blanco a través de dos mecanismos principales: la eliminación de la cola poliA seguido por la degradación del RNAm; y el bloqueo de la traducción en la etapa de iniciación o en la etapa de elongación; por ejemplo, mediante la inhibición de factor de iniciación eucariota 4E (EIF4E) (Inui, 2010).

Entre los genes blanco del TGF- $\beta$ , se encuentran genes que codifican para miRNAs. Un ejemplo es miR-155; tras estímulo con TGF- $\beta$  de la línea NMuMG (células normales epiteliales de glándula mamaria de ratón) se elevan los niveles de este miRNA. La secuencia de miR-155 se encuentra en el exón 3 del gen BIC, cuyo promotor contiene 2 elementos de respuesta a Smad y su transcripción es dependiente de Smad4; TGF- $\beta$  modula los niveles de miR-155 directamente a nivel transcripcional (Kong, 2008).

TGF- $\beta$  puede regular a los miRNAs también a nivel post-transcripcional; el tratamiento con TGF- $\beta$  en células PASM (células de músculo liso pulmonar humanas) resulta en el aumento en los niveles de pre-miRNAs y miRNAs maduros. Esto es el resultado de la asociación específica de las R-Smads (Smad1, Smad3, Smad5) con p68, un componente de Drosha, el cual es parte del complejo Microprocesador que regula el procesamiento de pri-miRNAs a pre-miRNAs. Entre los miRNAs que se sabe son regulados por Smads se encuentran miR-21 y miR-105 (Davis, 2010).

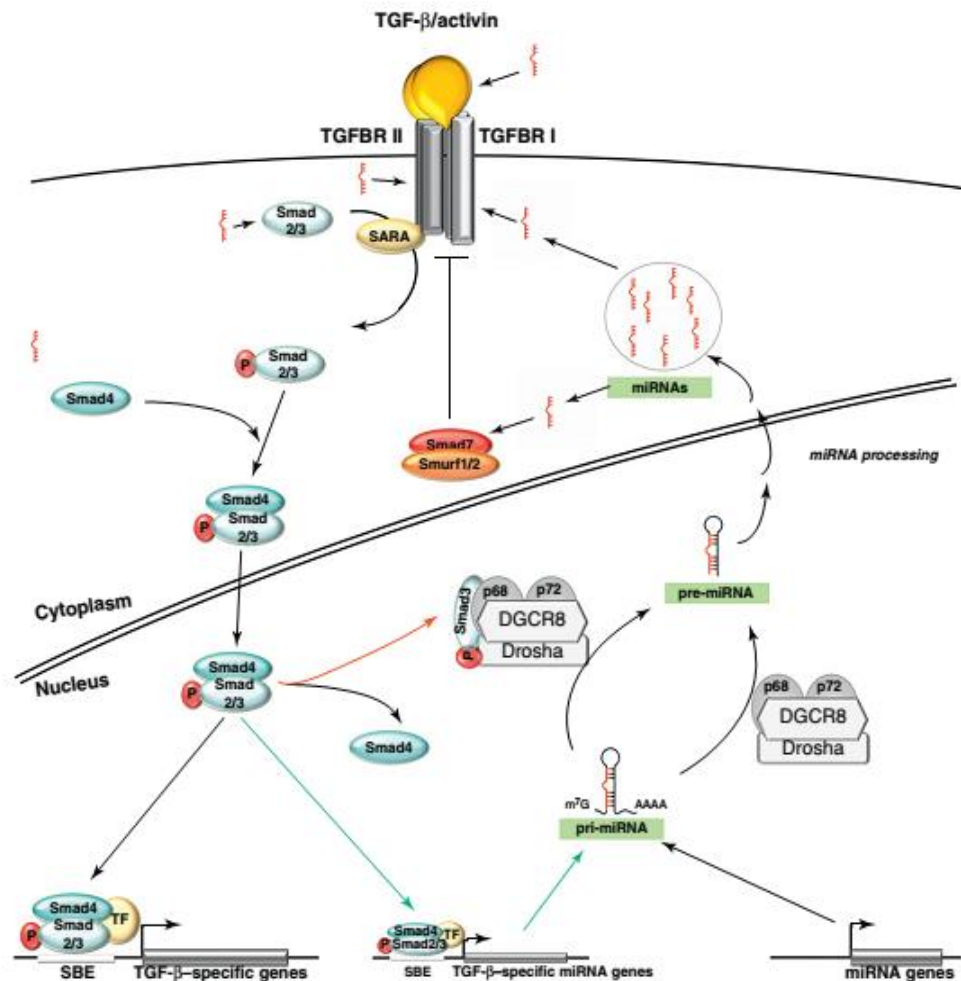


Fig. 9 Esquema del intercambio de señales entre la vía canónica de TGF- $\beta$  y la biosíntesis de miRNAs. Tomado de Butz, 2012.

### 3. Justificación

La expresión de SnoN se encuentra elevada en diversos tipos de cáncer humano, mientras que normalmente SnoN es expresado ubicuamente a bajos niveles tanto en tejidos embrionarios como en tejidos adultos. Por lo tanto, resulta interesante evaluar la regulación de la expresión de SnoN, ya que ésta proteína es uno de los principales reguladores negativos de la vía de señalización del TGF- $\beta$ .

El TGF- $\beta$  induce la expresión de transcritos de la isoforma SnoN de diferente tamaño, lo cual probablemente se deba a las diferentes longitudes de sus 3'UTRs. No se sabe cuál es la importancia de estas diferencias en la longitud del 3'UTR de la isoforma SnoN, pero podrían existir mecanismos regulados por el TGF- $\beta$  que promueven la acumulación del transcrito de SnoN, y ser trascendentales en el control de la estabilidad del transporte del RNAm de SnoN, de manera que impacten en los niveles de la proteína SnoN, tanto en la regulación en células normales, así como en la expresión desregulada de SnoN por el TGF- $\beta$  en fibroblastos y células tumorales.

#### **4. Hipótesis**

La región 3'UTR del transcrito de SnoN es regulada por un mecanismo dependiente de TGF- $\beta$ , que involucra la participación de un miRNA.

#### **5. Objetivos**

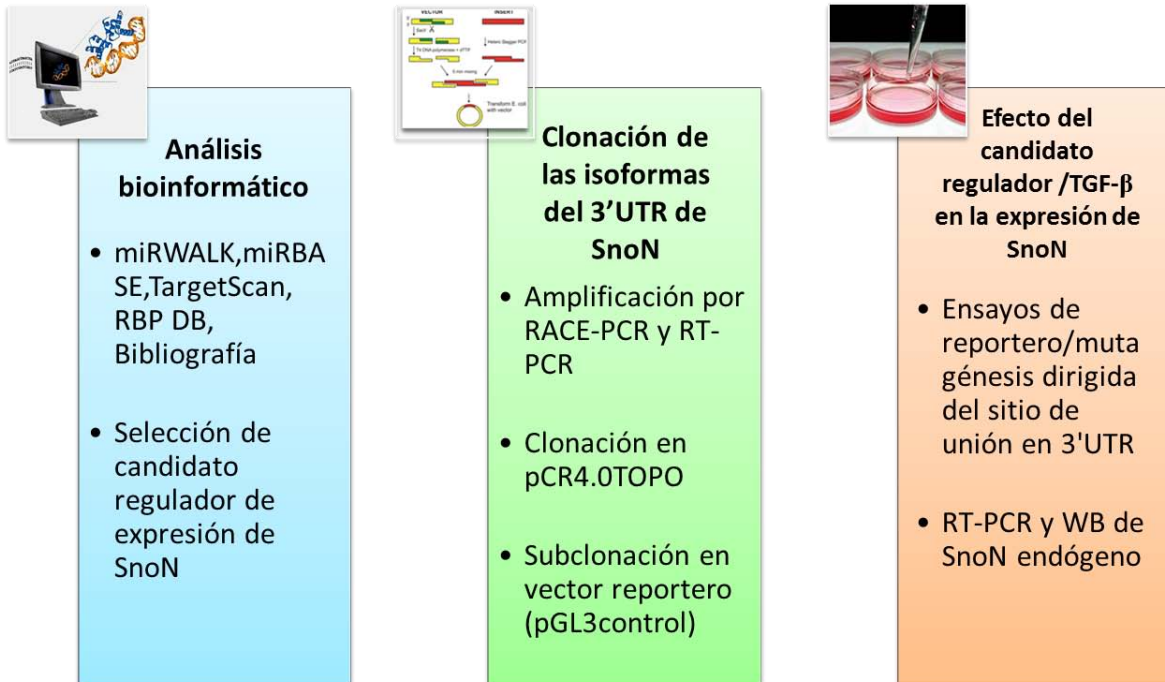
**General:** Estudiar los mecanismos de acción del TGF- $\beta$  involucrados en la regulación de la expresión de la proteína SnoN.

**Específicos:**

1. Análisis bioinformático de la región 3'UTR del transcrito de SnoN, para seleccionar un candidato (miRNA o RBP) que pudiera estar regulando los niveles de la proteína SnoN a través de su unión a la región 3'UTR del RNAm de SnoN.
2. Clonar las dos formas (corta y larga) del 3'UTR del RNAm de SnoN de humano.
3. Estudiar el efecto de los miRNAs seleccionados tanto en células normales como en células tumorales, así como el efecto del TGF- $\beta$  y de los miRNAs sobre la regulación de los niveles del SnoN endógeno.



## 6. Estrategia experimental



## 7. Material y métodos

Análisis bioinformático:

Obtención de la secuencia de la región no traducida 3'UTR del mRNA de SnoN de humano.

El alineamiento se efectuó con los datos obtenidos mediante secuenciación del cDNA 3'RACE clonado en el vector pCR4.0TOPO TA, obtenido mediante amplificación con *primers* que hibridan con la región codificante del gen *skil* (sentido) y con la región poliadenilada (antisentido), así como con la secuencia depositada en *GenBank* con número de acceso NM\_001248008.1.

**www.ncbi.nlm.nih.gov→Resources→DNA&RNA→BLAST→nucleotide blast→Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)→BLAST**

Alineamiento de secuencias 3'UTR de *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus* en MAAFT

El alineamiento se llevó a cabo con las secuencias para cada especie obtenidas de *GenBank* (*Homo sapiens* - NM\_001248008.1, *Mus musculus* - NM\_011386.3 y *Rattus norvegicus* - XM\_008760948.1) en el algoritmo MAFFT del sitio EMBL-EBI, el cual permite hacer alineamientos con múltiples secuencias.

**<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/> →Enter your input sequences →Submit**

Identificación de sitios de unión a RBPs

Para la detección de sitios de unión a proteínas de unión a RNA, se utilizó el algoritmo *catRAPID*. Este algoritmo explota predicciones de estructura secundaria, así como las contribuciones de enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals' para estimar la probabilidad de unión entre proteínas y moléculas de RNA. Las variables utilizadas para estimar las asociaciones RNA-proteínas son: probabilidad de interacción, poder discriminativo, fuerza de interacción y presencia de dominios de unión a RNA, así como motivos de RNA. Los motivos de unión fueron tomados de *RBPDB* (RNA-Binding Protein DataBase), *SpliceAid-F* y un reciente compendio de motivos (Agostini, 2013).

Para seleccionar las proteínas candidatas se determinó un límite de porcentaje de Poder Discriminativo de 20% o mayor, así como la presencia de sitio de unión en la secuencia blanco.

**[service.tartaglialab.com/page/catrapid\\_group](http://service.tartaglialab.com/page/catrapid_group)→catRAPID omics→[transcript vs nucleotide-binding proteome]→RNA sequence (FASTA format-min 50nt)**

Identificación de sitios de unión a miRNAs

Se utilizó *miRWalk*, una base de datos de miRNAs, la cual hospeda tanto predicciones de sitios de unión como sitios de unión a miRNAs validados. El algoritmo *miRWalk* identifica subsecuencias de complementariedad Watson-Crick consecutivas entre miRNAs y secuencias de genes. *miRWalk* incorpora todos los sitios de predicción de unión a miRNAs del algoritmo de *miRWalk*, así como los sitios de predicción de ocho programas diferentes de predicción de sitios de unión a miRNAs (*Diana-microT*, *miRanda*, *miRDB*, *PICTAR*, *PITA*, *RNA22*, *RNAhybrid* y *Targetscan*). Después, presenta los resultados de acuerdo al sitio de unión en el gen, considerando región promotora, 5'UTR, secuencia codificante y 3'UTR. (Dweep, 2011).

**<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>→Predicted targets → Gene targets → Predicted gene-miRNA interaction search**

## Identificación de motivos funcionales de RNA

El sitio *RegRNA 2.0* es un servidor en red integrado para la identificación de motivos funcionales de RNA. A partir del análisis de una secuencia de RNA, arroja los resultados integrados de diversos programas alojados en la red para identificación de los diversos motivos de RNA, así como algoritmos propios de *RegRNA 2.0* en un único esquema.

**<http://regrna2.mbc.nctu.edu.tw/index.html> → Scan → Step 1: Input an RNA Sequence  
→ Step 2: Select RNA Motifs → Submit**

## Identificación de estructuras de unión entre miRNAs y el transcrito de SnoN

En adición a los algoritmos ya descritos para la búsqueda de miRNAs, se utilizó StarMir, un algoritmo que en adición del apareamiento Watson-Crick para la búsqueda de potenciales sitios de unión miRNA:mRNA, utiliza la vasta colección de estudios de sitios de unión de miRNAs obtenidos mediante inmunoprecipitación (CLIP). Entre ellos se incluyen HITS-CLIP de cerebro de ratón, y PAR-CLIP de varias líneas celulares humanas. Los modelos obtenidos adoptan características esenciales para la unión de miRNAs, entre ellas secuencia, termodinámica y características estructurales de la molécula blanco (Rennie, 2014).

**<http://sfold.wadsworth.org/> → STarMir → Model for prediction: V-CLIP Based Model (human) → Species for prediction: Human (Homo sapiens) → microRNA sequence(s):**

**microRNA ID (has-miR-) → Single target sequence (Manual sequence entry) → Submit**

Obtención de miRNAs validados experimentalmente

Se utilizó la base de datos *MirTarBase*, la cual es una *database* que acumula interacciones miRNA:mRNA, las cuales son recabadas mediante búsqueda bibliográfica y minado de datos en estudios a gran escala. Generalmente, las interacciones son validadas por ensayos de reportero, Western blot, microarreglos y/o experimentos de secuenciación de siguiente generación (Hsu, 2014).

**<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/> → Search → By target gene → Species (human) → Gene symbol (skill) → Submit**

Líneas celulares: se utilizó la línea celular AD293 (epiteliales de riñón embrionario humano), la cual es responsiva a la vía del TGF- $\beta$ . Se cultivó a las células en medio DMEM (Gibco BRL) complementado con Suero Bovino Fetal (FBS) 10%, y con 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (GIBCO). Para los ensayos de estimulación con TGF- $\beta$  se utilizó DMEM con FBS 0.2% y con 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (medio de ayuno).

Línea celular AD293 con expresión estable del mir-155: Se diseñó y construyó una línea celular que expresa establemente al plásmido MGP-155, el cual contiene el exón 2 del gen BIC, a partir de la cual se transcribe miR-155; para

facilitar los ensayos de reportero, RT-PCR y WB. El antibiótico de selección utilizado fue puromicina (1 µg/ml).

RACE-PCR y subclonación del 3'UTR *short* de SnoN: Se empleó la técnica de RACE-PCR para obtener el 3'UTR a partir de 2 µg de RNA total (obtenido de células HepG2 estimuladas con TGF-β por 2 h), primero se sintetizó el cDNA con una mezcla de hexámeros y un *primer* que contiene una secuencia de amplificación unida a un homopolímero polidT (GeneRacer OligodT Primer); en una segunda etapa se amplificó mediante PCR la secuencia blanco (3'UTR) utilizando un primer sentido específico de la secuencia conocida del gen (H075) y un primer antisentido poliA (rv skil) que hibrida con la secuencia polidT añadida en el paso anterior. El producto de amplificación se clonó en el vector pCRTPO4.0 TA. La obtención del fragmento de interés se confirmó por secuenciación. Se subclonó el fragmento de interés en un plásmido reportero, el vector pGL3-Control (Promega); a partir de DNA plasmídico se amplificó el 3'UTR con *primers* específicos que incluyen sitios de restricción para *XbaI* (*primer* sentido, fw1 skil) y *Sall* (*primer* antisentido, rv skil), los cuales están presentes en el vector pGL3control, y en los cuales se introdujo el fragmento de interés, para generar la construcción *skil*/3'UTRshort(748)-Luc.

RT-PCR y clonación del 3'UTR *long* de SnoN: Se sintetizó el cDNA a partir de 2 µg de RNA total (obtenido de células HepG2 estimuladas con TGF-β por 2 h). Mediante PCR se amplificó la secuencia blanco utilizando un *primer* sentido específico de la secuencia conocida del gen (*primer* sentido fw4 CDS skil) y la

región del extremo 3' del UTR del transcrito de *skil* (*primer* antisentido *rv10 skil*), que no contiene las últimas 60pb del transcrito, utilizando la enzima TaKaRa LA. La identificación de la identidad del amplicón se realizó mediante digestión enzimática. El producto de amplificación se clonó en pCARTOPO4.0 TA; se verificó la identidad de la clona mediante digestiones enzimáticas. La subclonación en el vector reportero pGL3 control utilizando un producto amplificado con *primers* que contienen sitios de restricción para *XbaI* (*primer* sentido, *fw1 skil*) y para *Sall* (*primer* antisentido, *rv10 skil*) no se logró.

Ensayo de luciferasa: se transfectó a las células AD293 transitoriamente por el método de precipitación con fosfato de calcio, con el plásmido *skil3'UTRshort(744)-Luc* que contiene al 3'UTR corto de SnoN, para evaluar su expresión bajo el estímulo con TGF- $\beta$  (100pM) previo ayuno de 4 h, así como con el plásmido que contiene al gen de la  $\beta$ -galactosidasa para evaluar la eficiencia de transfección y normalizar los datos de la luciferasa.

Inmunoprecipitaciones (IP) y Western blot (WB): los extractos de proteína y Western blots se llevaron a cabo de acuerdo a lo reportado por Macías-Silva et al. (2002). La lisis de las células se efectuó con el amortiguador TNTE 0.5% con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los extractos de proteína se mezclaron 15 min en agitación a 4°C, para centrifugarse a 12,000 rpm por 15 min. Los extractos celulares se cuantificaron por el método de Bradford. Se utilizaron 800  $\mu$ g de proteína para las inmunoprecipitaciones de los extractos totales y se incubaron con 3  $\mu$ l de anticuerpo correspondiente contra SnoN o Ski (Santa Cruz) toda la

noche. Posteriormente, se adicionaron 30µl de proteína G-agarosa (Invitrogen) diluida 1:5 con el amortiguador TNTE 0.1%, incubando 2 h. Se realizaron 3 lavados de los complejos con la proteína G con el amortiguador TNTE 0.1% durante 30 s a 12,000 rpm. Las pastillas de proteína G se solubilizaron en 20 µl de solución Laemmli y las muestras se hirvieron 5 min. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 7.5% y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las membranas se incubaron toda la noche con anticuerpos primarios específicos (dilución 1:1000), y posteriormente se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a la enzima peroxidasa (dilución 1:10,000), que se detectó empleando el ensayo de quimioluminiscencia (Immobilon Western *Chemiluminescent* HRP Substrate, Millipore).

Fluorescencia: las células se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS a 37°C y se incubaron 15 min a la misma temperatura. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS estéril. Las células fueron permeabilizadas con tritón al 0.1% en PBS e incubadas 10 min a 4°C en agitación. Tras un lavado con agua, se montaron en portaobjetos con solución de montaje (Vectashield, Vector). Se observaron las muestras con un microscopio de epifluorescencia.

Plásmidos: el plásmido MGP155 (Addgene plasmid 26527), contiene el Exon 2 del gen BIC, el cual codifica para miR-155. El vector en el cual está clonado es pMSCV puro, el cual contiene al marcador de selección puromicina, así como resistencia a ampicilina. El plásmido pCMV21 (Addgene plasmid 20381) contiene la secuencia del gen MIR21, la cual codifica para el miR-21, clonado en

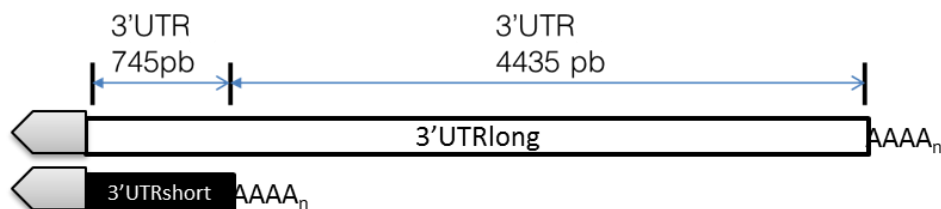


el vector pCMV-PL. Este plásmido cuenta con resistencia a ampicilina, y no posee marcador de selección.

## 8. Resultados

### *Análisis bioinformático de la región no traducida 3' (UTR) de SnoN.*

El análisis de la secuencia del 3'UTR del transcrito de SnoN de humano (número de acceso en el *GenBank* NM\_001248008.1), nos permitió identificar 2 sitios de corte y poliadenilación, correspondientes a los sitios 3509 y 7196 del cDNA de SnoN, los cuales darían lugar a dos tamaños diferentes del transcrito de SnoN debido a la longitud del 3'UTR (3'UTR de 745pb y 3'UTR de 4435pb). La secuencia obtenida mediante amplificación corresponde al transcrito con sitio de corte en la posición 3509 es el 3'UTR corto de 745 pb.



**Fig. 9.** El transcrito de SnoN posee dos sitios de corte y poliadenilación, cuya consecuencia es la generación de 2 transcritos de diferente longitud.

El alineamiento de los 3'UTR de skil de humano (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*) y rata (*Rattus norvegicus*) en MAFFT, arrojó la siguiente matriz de porcentaje de identidad (Tabla 1):

**Tabla 1. Matriz de porcentaje de identidad entre *skil* de humano (*Homo sapiens*), de ratón (*Mus musculus*) y de rata (*Rattus norvegicus*).**

<b>Matriz de porcentaje de identidad</b>	<b><i>Homo sapiens</i></b>	<b><i>Mus musculus</i></b>	<b><i>Rattus norvegicus</i></b>
<b>1: <i>Homo sapiens</i></b>	100.00	72.13	71.89
<b>2: <i>Mus musculus</i></b>	72.13	100.00	89.18
<b>3: <i>Rattus norvegicus</i></b>	71.89	89.18	100.00

EL 3'UTR de humano comparte 72.13% con el 3'UTR de ratón, y un porcentaje muy similar con el 3'UTR de rata (71.89%), un porcentaje de identidad alto. Entre las secuencias de ratón y rata, el porcentaje de identidad es aún mayor, de 89.18%, lo cual sugiere que el potencial de regulación de sus respectivos transcritos podría ser más similar entre ambos que entre humano y ratón/rata.

Una comparación de secuencias de nucleótidos de diferentes clases de vertebrados que divergieron hace más de 300 millones de años reveló la distribución de regiones no traducidas altamente conservadas, y demostró que las regiones predominantemente funcionales son generalmente más fuertes en las regiones 3' no traducidas que en los intrones. Es común que las regiones UTRs altamente conservadas están involucradas en procesos post-transcripcionales (Jegga y Aronow, 2013).

Por otra parte, en la mayoría de los vertebrados, las regiones 3'UTRs son sustancialmente más grandes que sus contrapartes 5'UTRs, indicando un potencial significativo de regulación. En adición, la longitud promedio de las regiones 3'UTR se ha incrementado durante la evolución, sugiriendo que la utilización de estos podría contribuir a la complejidad de los organismos (Siepel, 2005).

El alineamiento del 3'UTR de SnoN de humano contra cDNAs depositados en *GenBank* mostró que el 3'UTR de SnoN se encuentra muy conservado entre mamíferos, con diferentes grados de identidad y cobertura de las secuencias. Notablemente, las secuencias de chimpancé (*Pan troglodytes*), orangután (*Pongo abelii*) y macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) poseen secuencias del 3'UTRshort de tamaño similar al del 3'UTRshort de *Homo sapiens*, de 745pb (754, 747 y 752pb, respectivamente). En la Tabla 2, se marca con una X las especies en las que se encuentran conservados los 3'UTR, tanto el largo como el corto. Todas las especies de la Tabla 2 poseen el UTR'largo.

Tabla 2. Especies en las que se encuentra conservado el 3'UTR de *skil*.

<b>Especie</b>	<b>3'UTRshort</b>	<b>3'UTRlong</b>
<b>Chimpancé (<i>Pan troglodytes</i>)</b>	X	X
<b>Bonobo (<i>Pan paniscus</i>)</b>	X	X
<b>Gibón (<i>Nomascus leucogenys</i>)</b>	X	X
<b>Macaco cangrejero (<i>Macaca fascicularis</i>)</b>	X	X
<b>Gorila (<i>Gorilla gorilla</i>)</b>	X	
<b>Papión (<i>Papio anubis</i>)</b>	X	
<b>Perro (<i>Canis lupus</i>)</b>	X	X
<b>Mono ardilla boliviano (<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>)</b>	X	
<b>Jabalí (<i>Sus scrofa</i>)</b>	X	X
<b>Hurón (<i>Mustela putorius furo</i>)</b>	X	X
<b>Toro (<i>Bos taurus</i>)</b>	X	X
<b>Orangután (<i>Pongo abelii</i>)</b>	X	
<b>Macaco Rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)</b>	X	
<b>Orca (<i>Orcinus orca</i>)</b>	X	
<b>Ardilla (<i>Spermophilus tridecemlineatus</i>)</b>	X	
<b>Yak (<i>Bos mutus</i>)</b>	X	
<b>Caballo (<i>Equus caballus</i>)</b>	X	

### Sitios de unión a RBPs

Siguiendo con el análisis bioinformático de determinaron los sitios de unión a RBPs de la secuencia del 3'UTR del mRNA de SnoN. Se utilizó la isoforma corta

completa para el análisis, y posteriormente la isoforma larga se sometió al análisis en 4 fragmentos, 3 de 1200 pb y 1 fragmento de 835 pb, ya que el algoritmo *catRAPID* sólo permite el análisis de 1200 nucleótidos.

En la siguiente tabla se muestran las proteínas para las cuales se tiene sitio de unión en la secuencia del 3'UTR del mRNA de SnoN, así como la isoforma de la región 3'UTR en la que se encuentran.

**Tabla 3. Proteínas de unión a RNA (RBPs) con sitio de unión en la región 3' no traducida del RNAm de *skil*.**

Región	RBPs
<b>3'UTRshort (745pb)</b>	SRSF4, CELF1, NOVA2, SRSF5, TRA2B, DAZP1, MBNL1, NOVA1.
<b>3'UTRlong (1200pb)</b>	SRSF4, SRSF5, SRSF9, MBNL1, DAZP1, LN28B, NOVA1, HNRPC, SNRPA, CELF1.
<b>3'UTRlong (1201-2400pb)</b>	HNRPC, HNRDL.
<b>3'UTRlong (2401-3600pb)</b>	SFPQ, HNRPQ, FMR1, ELAV4.
<b>3'UTRlong (3601-4435pb)</b>	Sin sitios de unión predichos

Para validar estos datos, se hizo un análisis bibliográfico en búsqueda de reportes que verificaran la predicción de la unión de alguna de estas proteínas al 3'UTR de *skil* con datos experimentales.

Rattenbacher y cols., reportaron en el 2010 la identificación de 613 transcritos posibles de unión a CUGBP (CELF1), entre los cuales se encuentra *skil*. Utilizaron un anticuerpo anti-CUGBP para inmunoprecipitar a esta proteína de extractos citoplasmáticos obtenidos a partir de células HeLa, y analizaron los transcritos asociados mediante un microarreglo. Estos datos experimentales corroboran la validez de la predicción de una de las proteínas de unión a RNA putativas para *skil*, sugiriendo que las demás predicciones pueden ser válidas.

Datos publicados en *ENCODE* reportan la unión de las proteínas ELAVL1 y PABPC (parálogo de ELAVL1) al 3'UTR de *skil*. Estas proteínas contienen varios motivos de unión al RNA, y se unen selectivamente a los elementos ricos en AU localizados en las regiones 3'UTR de los mRNAs; debido a que los AREs son señales de degradación para los RNA mensajeros, la unión de ELAVL1 provee de estabilidad a los RNA mensajeros que poseen AREs. Se ha implicado a este gen en diversos procesos biológicos, y ha sido relacionado con diversas enfermedades, entre las que se incluyen desórdenes neurológicos paraneoplásicos y cáncer de mama hereditario.

Elementos en *cis*- que podrían ser regulados por TGF- $\beta$ : AREs

Los elementos de estabilización de mRNA mejor caracterizados son los elementos ricos en AU (AU-rich element, ARE) que se sitúan en el 3'UTR de algunos genes; están presentes en aproximadamente 5-8% de los genes humanos. Los elementos ARE son sumamente complejos en su secuencia, debido

a que no hay un patrón único para identificar un ARE. El pentámero AUUUA y el nonámero UUAUUA(U/A)(U/A) son componentes importantes de la secuencia canónica, sin embargo, las secuencias adyacentes pueden variar entre transcritos e influenciar significativamente las interacciones de proteínas con esos sitios. Además, algunos AREs no contienen en absoluto esas secuencias, y aún así cumplen con todos o casi todos los requisitos funcionales de un ARE (Espel, 2005).

Con el uso del programa *ARED 2.0* (Adenylate Uridylate (AU)-Rich Element Database [ARED 2.0]), se examinó la secuencia del 3'UTR de *skil* completo. *ARED 2.0* evalúa la presencia de un motivo de 13pb derivado computacionalmente de una lista de ARE-mRNA funcionales, la cual es la plataforma de la base de datos que contiene entradas de *GenBank* donde el 3'UTR complementa los motivos ARE. El programa se alimentó con la secuencia completa de la isoforma larga del 3'UTR de *skil* humano. *ARED 2.0* predice la existencia de 7 AREs diferentes en el transcrito de *skil* humano, enlistados en la tabla 5:

**Tabla 4. Secuencias AREs en 3'UTR del RNAm de *skil*.**

Posición de ARE en 3'UTR de <i>skil</i> (pb)	Secuencia
<b>1554-1566</b>	agcatagaaggta
<b>880-892</b>	ttgtg tadcagt
<b>1382-1394</b>	c ctgaaactat
<b>1556-1568</b>	catagaaggta g
<b>1888-1900</b>	Gctg tctcccag



<b>2035-2047</b>	ttttagaaa caa
<b>4276-4288</b>	ttgttttacta

Los Elementos Ricos en AU (AREs) se unen a proteínas que generalmente promueven el decaimiento del RNAm en respuesta a una variedad de señales intra- y extracelulares, aunque también se ha descrito unión a proteínas que actúan regulando la traducción. Entre los genes regulados por AREs que han sido reportados, se encuentran algunas citocinas, factores de crecimiento, supresores de tumores y proto-oncogenes, así como genes involucrados en la regulación del ciclo celular, como ciclinas, enzimas, factores de transcripción, receptores y proteínas de membrana. Esta plétora de familias de genes vitales afirma lo significativo de la estabilidad del transcrito en el proceso de regulación génica (Barret 2012).

Existen algunos ejemplos de estabilización de mRNA mediada por AREs y TGF- $\beta$ : esta citocina inhibe la estabilización del mRNA de la citocina KC inducida por LPS, en línea RAW, de macrófagos murinos. En otro estudio, se describió que el TGF- $\beta$  disminuye la vida media del mRNA de IFN $\gamma$  inducido por IL-18 en la línea celular LNK5E6, debido a mecanismos de estabilización de mensajero y no a inhibición de la transcripción; TGF- $\beta$  aumenta la expresión de Cox-2 inducida por *ras* vía estabilización del mRNA, mediante secuencias AREs. La estabilización del mRNA de SnoN mediada por TGF- $\beta$  podría estar asociada a los elementos AREs presentes en la secuencia del 3'UTR de SnoN (Dai, 2003; Hayashi, 2003; Sheng, 2000).

### Sitios de unión a miRNAs

Utilizando el programa *miRWalk* se detectaron los posibles miRNAs los cuales poseen una secuencia blanco en el 3'UTR del transcrito de SnoN. El programa se alimentó con los datos de los transcritos más largos para el gen *skil* de *Homo sapiens* (NM\_001248008.1) y de *Mus musculus* (NM\_011386.3). *miRWalk* arrojó una lista de 277 candidatos para el 3'UTR de *H. sapiens* (Anexo 1) y 535 candidatos para el 3'UTR de *M. musculus*.

Aunado a esto, se realizó un análisis bibliográfico de miRNAs que son regulados por TGF- $\beta$ ; en la siguiente tabla aparecen los miRNAs que poseen secuencia blanco en el 3'UTR de SnoN de humano que son reguladas por esta citocina, así como los programas que predicen dichos sitios, marcados con una X.

**Tabla 5. miRNAs regulados por TGF- $\beta$  con sitio de unión en la región 3' no traducida del RNAm de *skil*.**

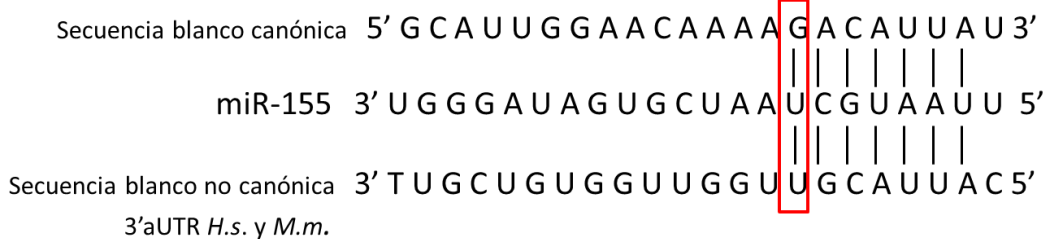
miRNA	Diana-microT	miRanda	miRDB	PICTAR	PITA	RNA22	miRWalk	Targetscan
miR-382		X						
miR-142		X						
miR-106b		X			X			
miR-93		X					X	
miR-20a		X			X			
miR-23b		X					X	

miR-146a		x					x	
miR-130a		x			x			
miR-182		x						

*Selección de miRNAs candidatos mediante análisis bibliográfico y alineamiento manual y por algoritmo StarMir*

miR-155

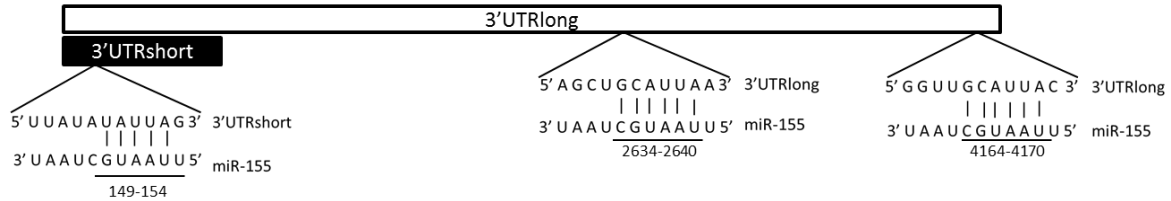
En un estudio de mapeo de sitios de unión para miR-155 en microarreglos, llevado a cabo en linfocitos T CD4+ de ratón, se reportó la unión de miR-155 en la región 3'UTR de *skil*. La región en la que se encuentra enriquecido miR-155 presenta una secuencia blanco no canónica para unión a miR-155, la cual está presente en el 3'UTR de *H. sapiens* (Loeb, 2012).



**Fig. 10. Secuencia blanco canónica de miR-155, miR-155 y secuencia no canónica presente en la región 3'UTR de *H. sapiens* y *M. musculus*.** En el cuadro rojo se marca el nucleótido diferente.

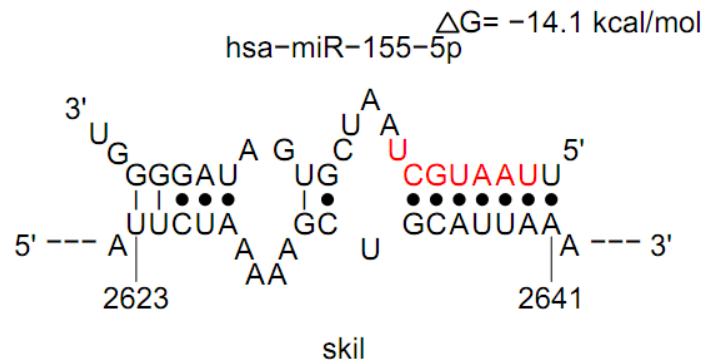
Esta evidencia sugiere que en el 3'UTR de *skil* de *H. sapiens* también podría darse la unión entre miR-155, y podría ejercer sus efectos en la regulación

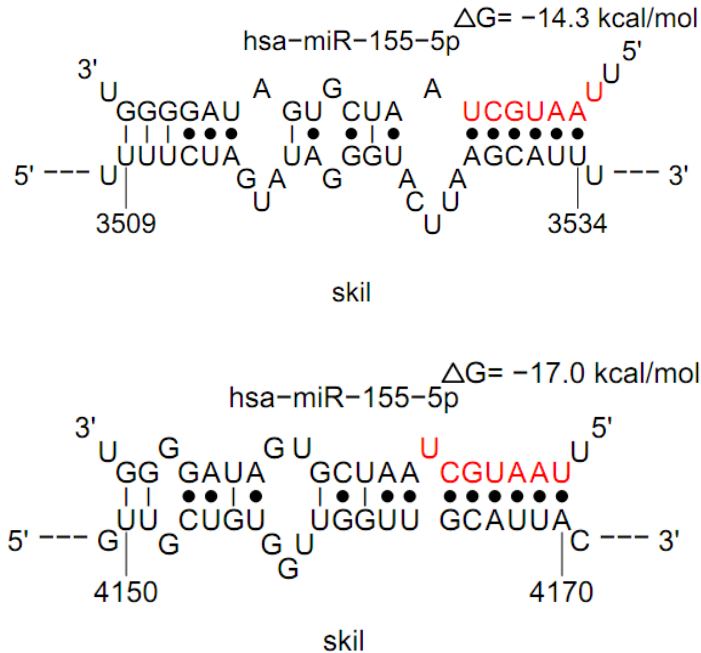
de la estabilidad de éste transcrito (20). Además, se identificaron varias secuencias de unión no canónicas, de las cuales el 3'UTR posee 3 sitios de unión (2 sitios 5'UGCAUUA3' en el 3'UTRlong y una secuencia 5'AUAUUA3' en el 3'UTRshort).



**Fig. 11. Sitios de unión a miR-155 no canónicos en 3'UTR de SnoN.** El alineamiento muestra la secuencia del 3'UTR y su respectivo apareamiento con el miR-155.

Mediante el uso del programa *StarMir*, el cual considera estructura secundaria para la predicción de sitios de unión miRNA:mRNA, se obtuvieron 3 diferentes predicciones de sitios de unión a miR-155, de los cuales 2 sitios corresponden a los predichos por *miRWalk*.





**Fig. 12 Esquemas que muestran la conformación híbrida entre miR-155:mRNA-*skil*.** Se indica en rojo el sitio de unión de miR-155, los puntos indican la unión entre moléculas, la localización del sitio de unión en el transcrito, así como la  $\Delta G$  calculada para tal unión.

Se realizó un alineamiento de la región en donde se encuentra la secuencia blanco no canónica (4135-4435nt de la región 3'UTRlarga de *Homo sapiens*). El análisis reveló, además de las especies previamente identificadas que contienen el 3'UTRlargo y *Mus musculus*, 4 especies que contienen el sitio de unión no canónico para miR-155 (*Rattus norvegicus*, *Chrysemys picta bellii*, *Gallus gallus* y *Chlorocebus aethiops*).

miR-155 es regulado por TGF- $\beta$ ; la regulación de TGF- $\beta$  sobre la expresión de miR-155 es dependiente de contexto celular. Los niveles de miR-155 aumentan en NMuMG (células normales epiteliales de glándula mamaria de ratón), y disminuyen en fibroblastos de pulmón humano tras el estímulo con esta citocina. miR-155 está relacionado con diferenciación del linaje hematopoyético, inmunidad, inflamación, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Kong, 2008; Levati, 2011).

Existe evidencia experimental de que miR-155 ejerce un efecto sobre SnoN: en fibroblastos cardíacos de ratón se observa una disminución de aproximadamente 30% en el mRNA de SnoN cuando se sobreexpresa miR-155, sin embargo, no se sabe si ésta regulación está mediada directamente por interacciones de miR-155 sobre el 3'UTR de SnoN (Kishore, 2013). En otro estudio, realizado en células de melanoma humanas, los niveles de mRNA de SnoN no se modifican con la sobreexpresión de miR-155 (Levati, 2011), lo cual es evidencia de que la regulación por este miRNA es dependiente del contexto celular.

miR-155 se encuentra desregulado en varios tipos de cáncer, entre los que se encuentran el cáncer de mama, de páncreas y de pulmón. El 3'UTR de SnoN presenta varios sitios de unión para este miRNA, y hay evidencia experimental de que se une al transcrito de SnoN, por lo cual se eligió como candidato para evaluar su efecto en la modulación mediada por las isoformas del extremo 3'UTR del mRNA de SnoN (Faraoni, 2009).

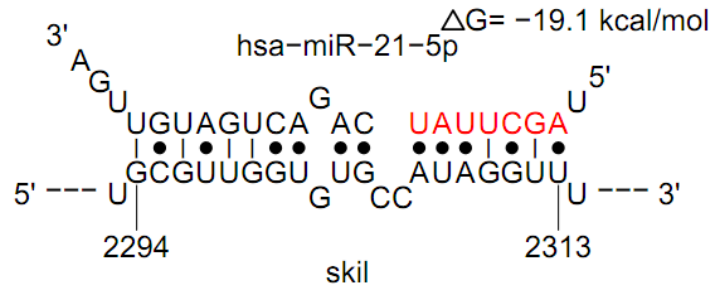
## miR-21

miR-21 es un microRNA que ha ganado mucha atención en los últimos años debido a que se ha identificado como uno de los miRNAs más sobresalientes y consistentes en un amplio número de experimentos diseñados para la detección de miRNAs desregulados en cáncer. miR-21 es un miRNA cuya expresión se encuentra elevada en casi todos los tumores sólidos derivados de células epiteliales, incluyendo cáncer de mama, páncreas, pulmón, gástrico, de próstata,

colon, cabeza y cuello, así como cánceres esofágicos. También se ha reportado que se encuentra elevado en tumores hematológicos como leucemia, linfoma y mieloma múltiple. miR-21 también se encuentra elevado en glioblastoma, osteosarcoma y seminoma espermatocítico. miR-21 parece ser el único miRNA que se encuentra sobreexpresado en todas las clases principales de cánceres humanos derivados de células epiteliales, tejidos conectivos, células hematopoyéticas, células germinales o células nerviosas, apoyando la premisa de que es un oncogén ubicuo. A través de estudios de supresión funcional, se ha implicado a miR-21 en cada evento de la oncogénesis; la promoción de proliferación celular, invasión y metástasis, inestabilidad genómica y mutaciones, inflamación, autorenovación infinita, metabolismo anormal, angiogénesis y evasión de apoptosis, destrucción inmune y supresores de crecimiento (Becker Buscaglia, 2011).

El TGF- $\beta$  es un regulador post-transcripcional de miR-21; tras estimulación con esta citocina, en cultivo primario de células humanas de músculo liso de la arteria pulmonar, los transductores específicos Smad1 y Smad2/3 son reclutados a pri-miR-21 en complejo con p68, una RNA helicasa que es parte del complejo Drosha. Esto lleva a un rápido procesamiento de pri-miR-21 a pre-miR-21, seguido por la subsecuente maduración, resultando en la molécula activa miR-21 (Krichevsky, 2009).

Para este trabajo, se eligió a miR-21 como control negativo, ya que el análisis informático no arrojó evidencia de sitios de unión al 3'UTR de *skil*. *StarMir* predice varios sitios de unión independientes de semilla para este miRNA, en la fig. 12 se muestra la estructura de una de estas predicciones.



**Fig. 13. Esquema que muestra la conformación híbrida independiente de sitio semilla entre miR-21:mRNA-skil.** Se indica en rojo el sitio de unión de miR-21, los puntos indican la unión entre moléculas, la localización del sitio de unión en el transcrito, así como la  $\Delta G$  calculada para tal unión.

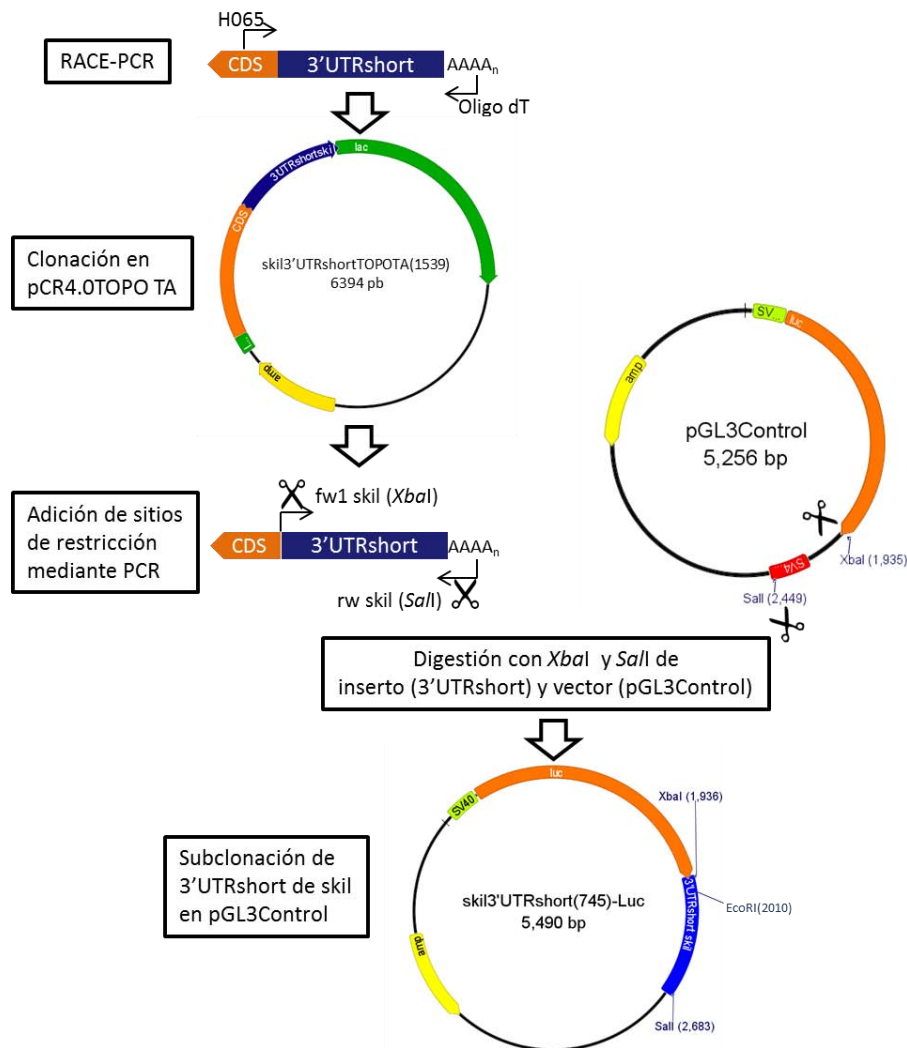
### miRNAs que se unen al 3'UTR de *skil*

Existen varios miRNAs reportados en la literatura que se unen a *skil*; de acuerdo a los datos proporcionados por *miRTarBase*, una base de datos curada con información experimental, los miRNAs hsa-miR-124-3p, hsa-miR-26b-5p y hsa-miR-30b-5p se unen a *skil*, descritos mediante tecnología de microarreglos (miR-124 y miR-26b) y de secuenciación de siguiente generación (miR-30b). Recientemente, se describió que miR-17 se une a la región 3'UTR de *skil*, y disminuye los niveles de luciferasa en células HEK293T; la mutación de este sitio de unión recupera los niveles de expresión de luciferasa. No se ha descrito que alguno de estos miRNAs sea regulado por la acción de TGF- $\beta$ , ni si esta unión es funcional y causa modificación en la expresión de los niveles de mensajero y/o proteína de SnoN (Hamilton, 2014).

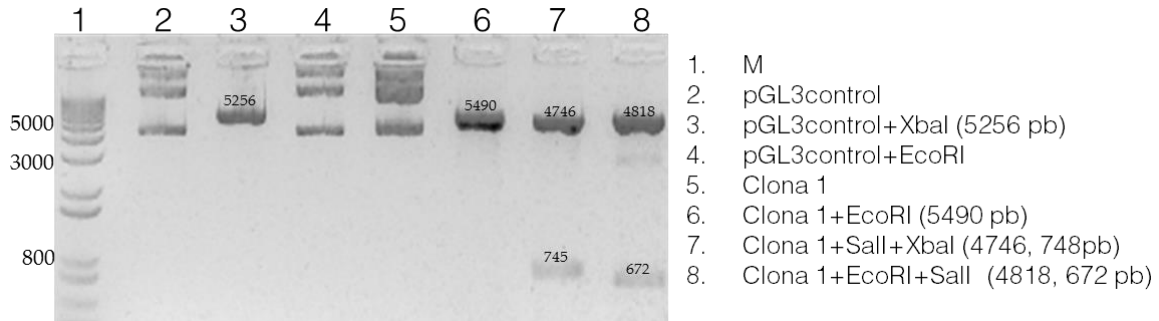


## Subclonación de la región no traducida 3' (UTR) corta del mRNA de *SnoN* en *pGL3Control*

Se construyó un vector reportero que contiene al 3'UTR corto de *skil*; en la sección de material y métodos se describió la estrategia de obtención de ésta construcción, a la cual se llamó *skil*/3'UTRshort(744)-Luc.



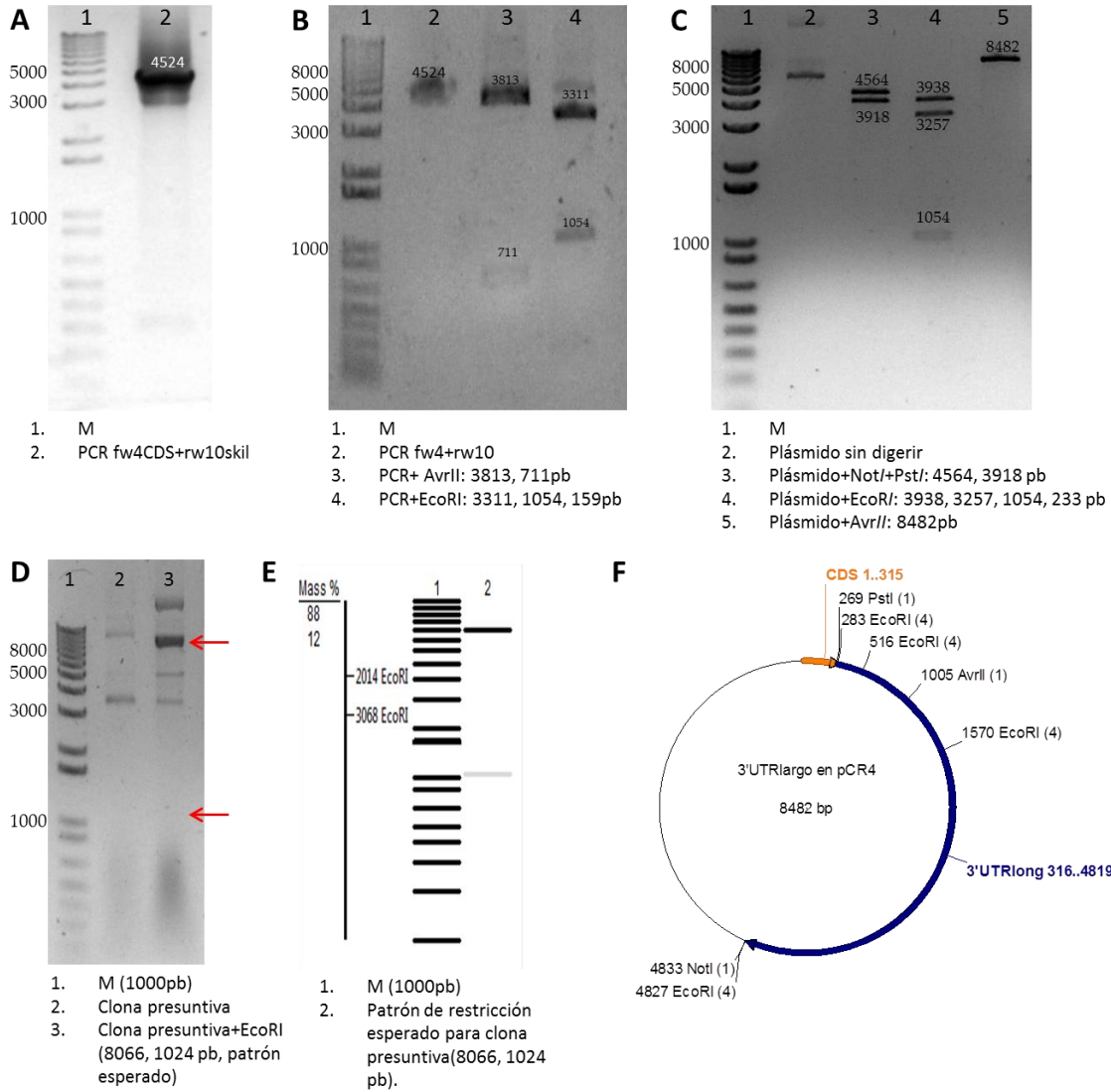
**Fig. 14. Esquema de la estrategia de la subclonación del 3'UTRshort de *skil* en *pGL3Control*.** Se muestra el CDS (naranja) y el 3'UTRshort de *skil* (azul), así como los sitios de restricción empleados para la verificación de identidad de la construcción.



**Fig. 15. Subclonación de la región no traducida 3' (UTR) corta del gen *skil* en pGL3Control.** Verificación de la identidad de la clona que contiene al fragmento 3'UTRshort de *skil* en pGL3Control, mediante la obtención del patrón de restricción esperado tras previa digestión con enzimas con sitios de corte conocidos dentro de la construcción (Sall+Xbal, EcoRI+Sall).

### *Clonación de la región no traducida 3' (UTR) larga del mRNA de SnoN en pCR4.0TOPO TA*

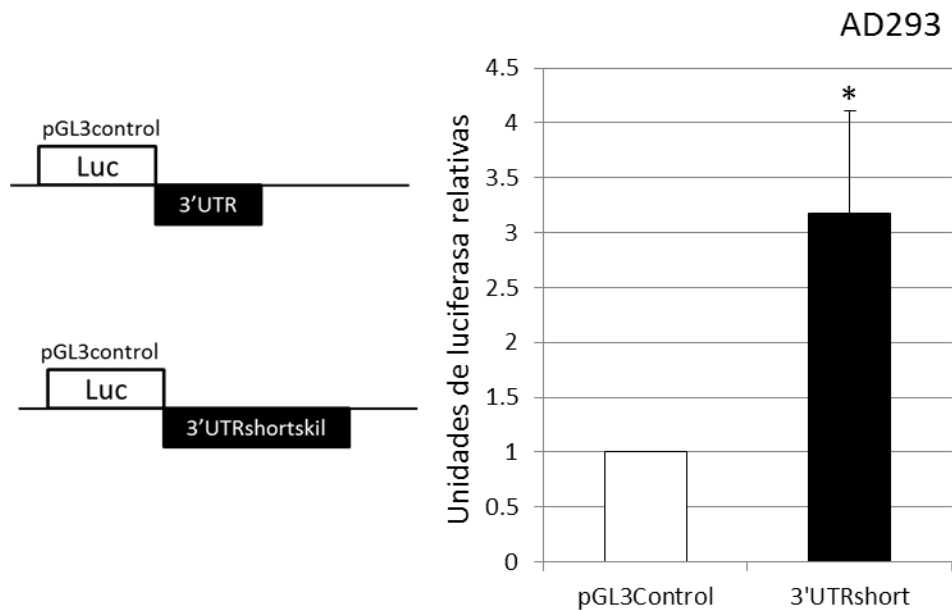
La estrategia para obtener la construcción 3'UTRlargo-pCR4.0, la cual contiene al 3'UTR largo de *skil* se describió previamente en la sección de Material y métodos de esta tesis. No se obtuvo la subclonación de esta secuencia en el vector reportero pGL3Control debido a problemas en la estrategia de clonación, sin embargo, podrían emplearse otras estrategias experimentales para la subclonación de esta región, como clonación de extremos romos, o subclonar al 3'UTRlargo en fragmentos.



**Fig. 16. Clonación del 3'UTR largo de *skil* en pCR4.0TOPO TA.** A) Amplificación del 3'UTRlargo de *skil*. B) Verificación de la identidad del fragmento mediante la obtención del patrón de restricción esperado tras la digestión con enzimas con sitios de corte conocidos dentro del fragmento (*AvrII* y *EcoRI*). C) Verificación de la identidad de la clona que contiene al fragmento 3'UTRlong de *skil* en pCR4.0TOPO TA mediante la obtención del patrón de restricción esperado tras previa digestión con enzimas con sitios de corte conocidos dentro de la construcción (*NotI*+*PstI*, *EcoRI* y *AvrII*). D) Verificación de la identidad de la clona que contiene al fragmento 3'UTRlong de *skil* en pGL3Control, mediante la obtención del patrón de restricción esperado tras previa digestión con enzimas con sitios de corte conocidos dentro de la construcción (*EcoRI*). Con flechas rojas se indica la posición de las bandas esperadas. E) Patrón de restricción esperado para la clona presuntiva de 3'UTRlong de *skil* en pGL3Control. F) Mapa de la construcción *skil*3'UTRlargo en pCR4.0TOPO TA. Están representados el CDS (naranja) y el 3'UTRlargo de *skil* (azul), así como los sitios de restricción empleados para la verificación de identidad de la construcción.

*El reemplazo del 3'UTR de pGL3control por el 3'UTRshort de skil aumenta la actividad de luciferasa en células AD293.*

Se generó una construcción que contiene el 3'UTRshort del gen *skil* para investigar su papel en la regulación de la expresión de SnoN. El vector vacío (pGL3control) y la construcción que contiene al 3'UTRshort de *skil* fueron transfectados mediante la técnica de fosfato de calcio en células AD293 (células transformadas de riñón humano). Después de 48 horas, se determinó la expresión de actividad de luciferasa relativa, normalizada con la expresión de  $\beta$ -galactosidasa. El vector pGL3 control contiene al promotor SV40, y en su región 3'UTR contiene una secuencia *enhancer*, las cuales resultan en expresión robusta de luciferasa en varios tipos de células de mamífero. De manera inesperada, cuando reemplazamos la región 3'UTR del vector con la región 3'UTRshort de *skil*, la actividad de luciferasa aumentó hasta 3 veces (fig. 17).

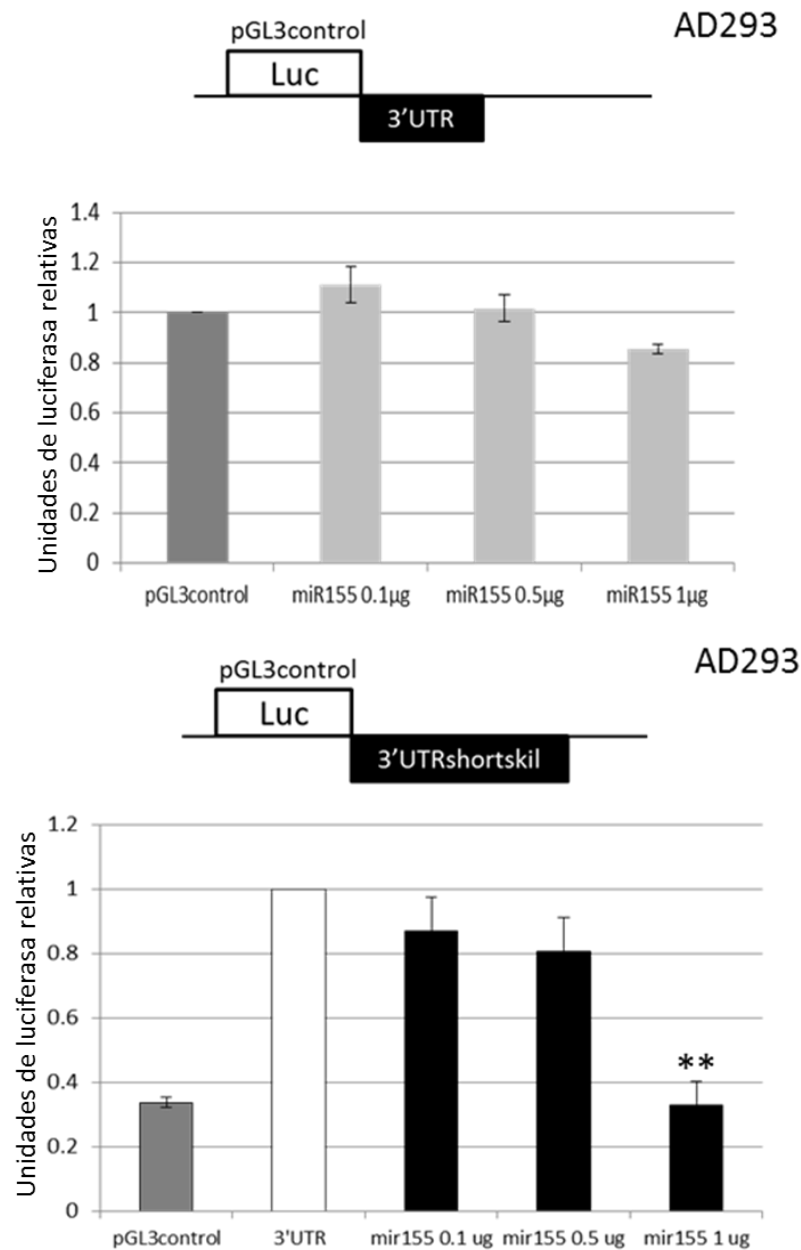


**Fig. 17. La construcción que contiene el 3'UTRshort de skil muestra un aumento en la actividad de luciferasa comparado con el vector vacío, en células AD293.** En la izquierda se encuentran los esquemas del plásmido vacío con su 3'UTR nativo y de la construcción *skil*3'UTRshort(744)-Luc. Los datos están expresados como la media ± error estandar con una N=3 (por triplicado). \*,  $p < 0.05$  comparado con el control (pGL3Control).

#### *Efecto de miR-155 en la región 3'UTRshort de SnoN.*

miR-155 es un posible miRNA regulador de la expresión de SnoN, de acuerdo con los datos obtenidos mediante el análisis de la secuencia y los datos experimentales. Para determinar si la región involucrada en esta regulación es el 3'UTR, se realizaron ensayos de reportero utilizando el 3'UTRshort de SnoN, el cual contiene un sitio de unión no canónico para miR-155. Los datos obtenidos mediante este ensayo muestran reducción en la actividad de luciferasa en células AD293, indicando que SnoN es blanco de miR-155. Como control negativo, se realizó el mismo experimento con el vector vacío, cuyos niveles de actividad de

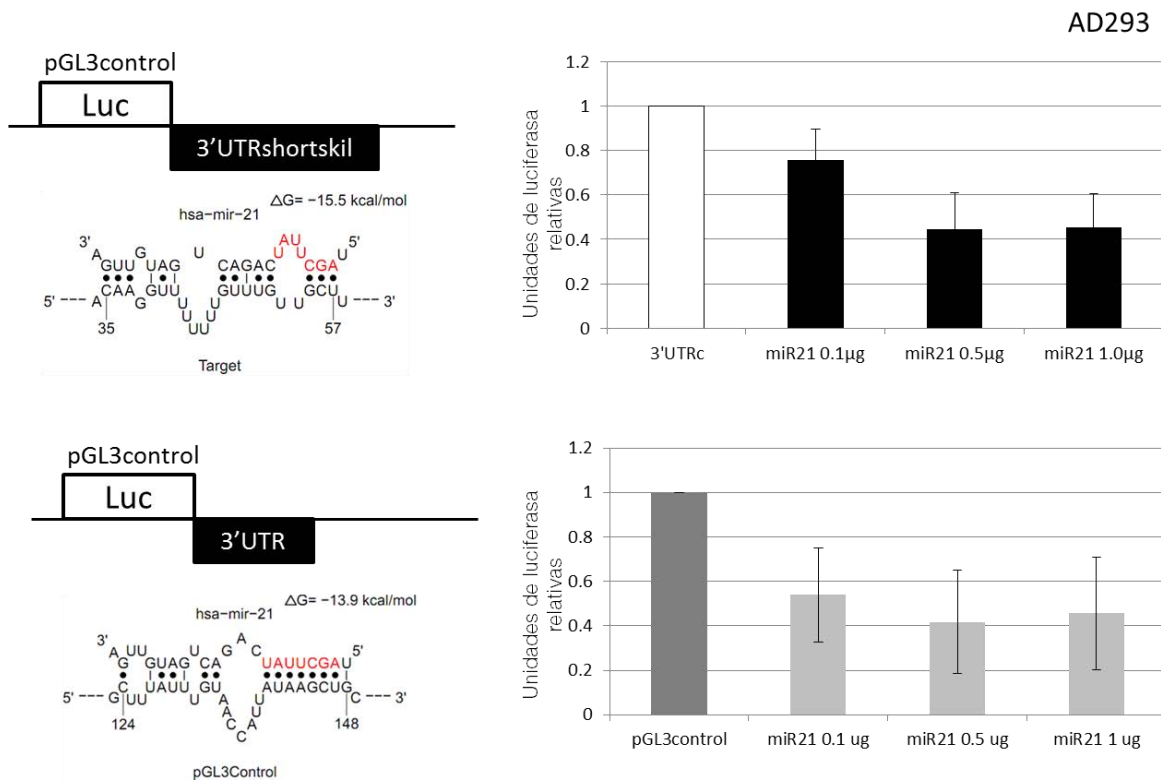
luciferasa variaron muy poco, concluyendo que el efecto de disminución de la actividad de luciferasa por el miR-155 es debido al 3'UTR de *skil* (fig. 18).



**Fig. 18. En presencia de miR-155, disminuye la actividad de luciferasa de la construcción que contiene a 3'UTR short de *skil*.** Gráficas de actividad de luciferasa de la construcción *skil*3'UTRshort(744)-Luc y del vector vacío con cantidades crecientes del plásmido MGP M155, que codifica para miR-155. En cada gráfica se muestran los esquemas del plásmido control con su 3'UTR nativo y de la construcción *skil*3'UTRshort(744)-Luc. Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estandar con una N=3 (por triplicado). \*\*,  $p < 0.01$  comparado con el control (3'UTR).

### *Efecto de miR-21 en la región 3'UTRshort de SnoN.*

Se eligió a miR-21 como control negativo, ya que no presenta sitios de unión en la secuencia 3'UTR de *skil*. Se realizaron ensayos de luciferasa con el 3'UTRshort de *skil* en células AD293. La actividad de luciferasa se vió disminuida tanto en el vector control como en la construcción que transcribe al 3'UTR de *skil* (fig. 19). Un análisis de la secuencia 3'UTR del vector pGL3 control reveló que posee un sitio de unión para el miR-21, sin embargo, ésta secuencia no está presente en la construcción *skil*3'UTRshort(744)-Luc, ya que se reemplaza la secuencia nativa con la secuencia problema. No existen sitios de unión no canónicos para miR-21 en la secuencia 3'UTRshort de *skil*. Tras someter la secuencia del transcrito al análisis en la base de datos StarMir, esta secuencia presentó un sitio de unión independiente de semilla, en una parte del transcrito que corresponde al 3'UTR del plásmido, lo que puede explicar la disminución de la actividad de luciferasa observada con el plásmido vacío.



**Fig. 19. Efecto de miR-21 sobre el 3'UTR short de SnoN.** Gráficas de actividad de luciferasa de la construcción *ski*3'UTRshort(744)-Luc y del vector vacío con cantidades crecientes del plásmido pCMV-miR21, que codifica para miR-21. miR-21 disminuye los niveles de luciferasa de 3'UTRshort de skil, así como los niveles del vector vacío. Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estandar con una N=3 (por triplicado).

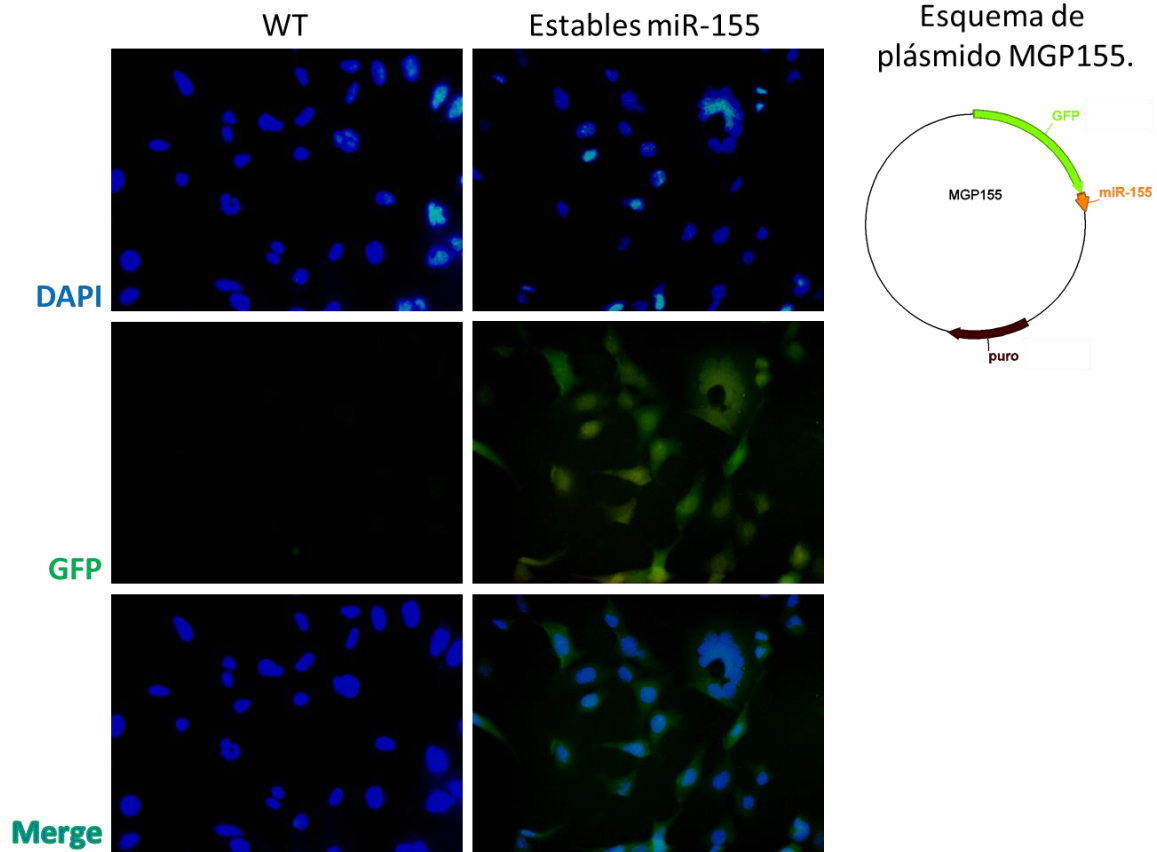
*Efecto de miR-155 expresado establemente en la regulación de SnoN endógeno.*

Con el propósito de evaluar la modulación ejercida por miR-155 sobre el transcrito y la proteína de SnoN endógenos sobre una población que exprese de manera homogénea a miR-155, se diseñó y construyó la línea celular AD293 que expresa establemente a miR-155. Mediante microscopía de fluorescencia se detectó la expresión de GFP en las células AD293 con expresión estable de miR-155. Este experimento se diseñó para obtener evidencia indirecta de la expresión del miR-155; en el plásmido usado para la transfección, el miR-155 se encuentra



clonado río abajo del codón de paro de la GFP. Se detectó la expresión de GFP en las células de la línea AD293 con una expresión estable de miR-155.

## AD293



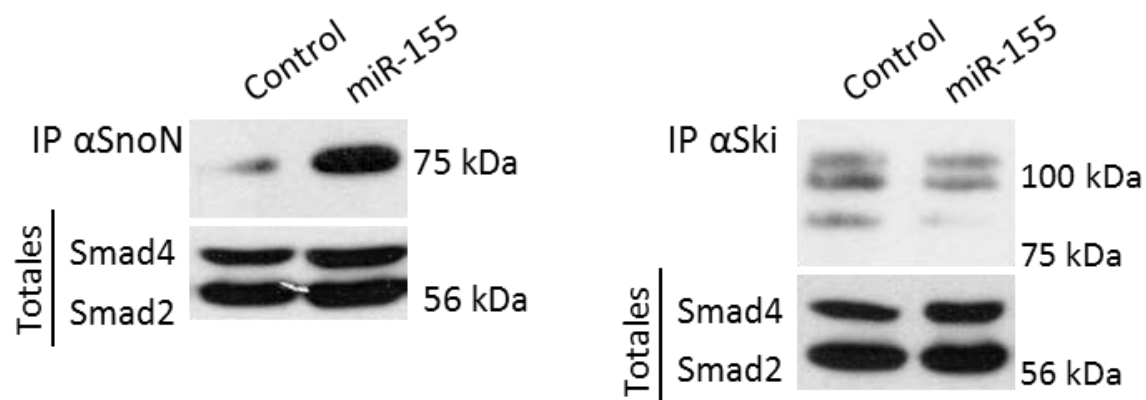
**Fig. 20.** Las células AD293 expresan de manera estable al plásmido que contiene el cassette de expresión de miR-155. Se muestra también el esquema del plásmido MGP155.

Tras verificar que la línea celular expresaba establemente el *cassette* que contiene la secuencia para miR-155, se realizó un IP contra SnoN seguido de un WB en células AD293 (control y estables para miR-155). La IP reveló un aumento en los niveles basales de la proteína SnoN en células con expresión estable de miR-155. Como control se utilizó a Ski; la IP contra Ski reveló disminución de esta

proteína en las células con expresión estable de miR-155, como había sido reportado previamente para Ski en células de melanoma con sobre-expresión de miR-155 (Levati, 2011).

Una posible explicación al aumento observado en los niveles basales de la proteína SnoN en la línea celular AD293 con expresión estable de miR-155, sería que alguna proteína involucrada en la regulación negativa de SnoN estuviera disminuida debido a la expresión del miR-155. Se ha reportado previamente que miR-155 disminuye los niveles endógenos de la proteína Smad2 en una línea celular de monocitos (THP1-155) con expresión estable de miR-155 (Louafi, 2010). En este mismo trabajo se reportó que los niveles de la proteína Smad4 no se alteran en este modelo, a pesar de que el 3'UTR del transcrito de Smad4 posee un sitio de unión canónico para miR-155. Smad2 y Smad4 juegan un papel importante en la regulación de SnoN, ya que reprimen al promotor de SnoN en estado basal, y tras un estímulo con TGF- $\beta$ , Smad2 y Smad4 son necesarios para llevar a la poliubiquitinación de SnoN y a su degradación vía el proteasoma. Con estos antecedentes, se decidió evaluar los niveles de las proteínas Smad2 y Smad4 en extractos totales de proteína de células AD293 control y con una expresión estable del miR-155. El WB reveló que los niveles de ambas proteínas se encuentran sin alteraciones, indicando que el aumento de SnoN no se debe a la disminución de los niveles de Smad2 y Smad4 (fig. 21).

## AD293



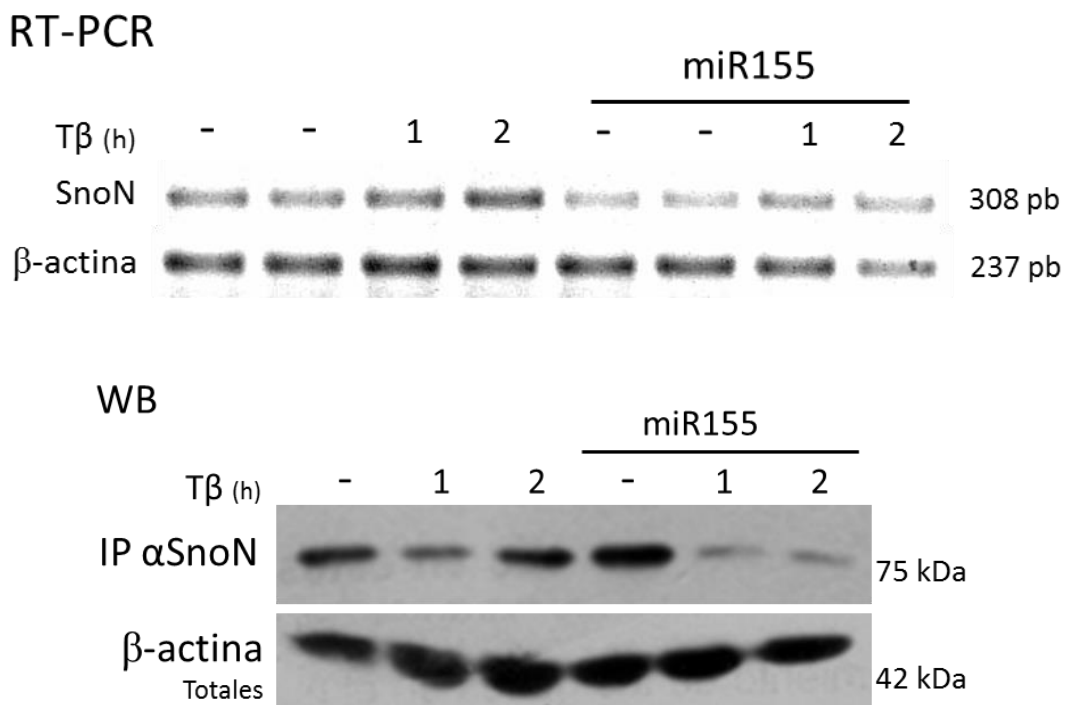
**Fig.21. El nivel de SnoN aumenta en células con expresión estable de miR-155, mientras que los niveles de Smad4 y Smad2 se mantiene estables.** IP contra SnoN (n=3) y blot contra Smad2 y Smad4 en extractos totales (N=2), en células AD293 control (carril 1) y con expresión estable de miR-155 (carril 2) [primer panel]. IP contra Ski (N=3) y blot contra Smad4 y Smad2 (N=2) en extractos totales, en células AD293 control (carril 1) y con expresión estable de miR-155 (carril 2) [segundo panel].

Para investigar la contribución de TGF- $\beta$  en las células con expresión estable del miR-155, se realizaron cursos temporales con TGF- $\beta$ . Similar a experimentos previos, utilizamos RT-PCR para analizar los niveles del transcrito de SnoN, así como ensayos de IP seguidos de WB para analizar la expresión de proteínas.

Posterior al estímulo de TGF- $\beta$ , observamos una disminución de los niveles basales del mensajero en las células con sobre-expresión del miR-155, y una ligera inducción posterior al estímulo con TGF- $\beta$ , la cual pareciera ser menos intensa que en los controles (fig. 22, panel superior). La disminución de los niveles basales del transcrito de SnoN concuerda con la disminución observada en los ensayos de luciferasa con la región 3'UTRshort del transcrito, aunque la disminución no es tan drástica como en ese ensayo, debido a que en los ensayos de luciferasa analizamos un par de componentes (3'UTRshort y miR-155) sobre-

expresados del complejo de moléculas que regulan la expresión del transcrito de SnoN.

En cuanto a los niveles de expresión de la proteína SnoN, la cinética normal es la siguiente: después del estímulo de TGF- $\beta$ , a los 60 min disminuyen los niveles de la proteína, los cuales se recuperan a las 2h. En las células con expresión estable del miR-155, observamos la disminución de la proteína a los 30 min de tratamiento, sin embargo, no observamos la recuperación esperada a las 2h posteriores a la estimulación con la citocina (fig. 22, panel inferior).



**Fig.22 . Efecto del TGF- $\beta$  en los niveles del mensajero y la proteína de SnoN en células AD293 que expresan establemente a miR-155.** Curso temporal de TGF- $\beta$  en células AD293 control (carriles 1-4) y con expresión estable de miR-155 (carriles 5-8) (N=3); los niveles de mensajero se evaluaron con RT-PCR (panel superior). Curso temporal de TGF- $\beta$  en células AD293 control (carriles 1-3) y con expresión estable de miR-155 (carriles 4-6) (N=3), los niveles de proteína se evaluaron con IP contra SnoN seguido de WB, y blot contra  $\beta$ -actina en extractos totales (panel inferior) (N=3).

Una posible explicación de estos datos la ofrece la observación de que miR-155 disminuye los niveles de transcrito de SnoN a través de la unión con la región 3'UTR del RNAm de SnoN. La proteína SnoN forma parte del complejo represor del promotor de su gen; cuando se degrada, su gen se transcribe y se recuperan los niveles de su proteína; sin embargo, aunque exista inducción de la transcripción de su mensajero inducida por TGF- $\beta$ , el mensajero se estaría degradando por efecto del miR-155, y como consecuencia no se observa la recuperación esperada de la proteína SnoN después de 2h del tratamiento con la citocina.

## **9. Discusión**

*La región 3'UTRshort de skil está altamente conservada, lo cual sugiere un alto potencial de regulación*

La región 3' no traducida, situada río abajo de la secuencia que codifica para la proteína, está involucrada en numerosos procesos regulatorios de los RNAm al que pertenecen, incluyendo corte, estabilidad y poliadenilación, así como la traducción y localización, todos ellos críticos en la determinación del destino de un mRNA. En comparación con la región no traducida 5', la cual contiene secuencias responsables del inicio de la traducción, las secuencias contenidas dentro del 3'UTR podrían ser menos conservadas, resultando en un mayor potencial para la evolución de elementos regulatorios. Sin embargo, existen regiones altamente conservadas; los 3'UTR contienen algunos de los elementos

más conservados dentro del genoma de los mamíferos (Siepel, 2005). Un análisis *in silico* entre varios mamíferos reveló que, a diferencia de la región promotora, los motivos de los 3'UTR están conservados en una hebra del DNA, lo cual es consistente con la característica de los 3'UTR de regular la expresión genética a nivel post-transcripcional (Xie, 2005). Esta regulación post-transcripcional mediada por los 3'UTR es llevada a cabo principalmente por elementos que actúan en *cis*, como las proteínas de unión a RNA y los miRNAs (Barret, 2012).

Con el empleo de diversos algoritmos, se llevó a cabo el análisis de la región 3' no traducida de *skil* de humano. Entre los resultados más relevantes, se encuentra el dato de que ésta región está altamente conservada, en particular, el 3'UTRshort, por lo que nos enfocamos en la caracterización de ésta región para hacer el análisis *in vitro*.

*miR-155 es un probable regulador negativo del transcrito de skil mediante su interacción con su región 3'UTRshort*

El regulador transcripcional SnoN fue descrito como un inhibidor de la señalización y de las respuestas del TGF- $\beta$ ; existe evidencia experimental de que SnoN posee además un papel fundamental en la homeostasis celular. Debido a su papel en la señalización mediada por TGF- $\beta$ , se han estudiado los efectos de la proteína SnoN, sin embargo, no hay muchos reportes sobre los reguladores de ésta proteína, cuyos niveles de expresión se ven alterados en condiciones patológicas. En este trabajo se logró la clonación de la isoforma corta de la región 3' no traducida (3'UTR) del mRNA de SnoN, con el propósito de evaluar si ésta

región contribuye a la regulación de los niveles de la proteína. Mediante ensayos de reportero en células AD293, se observó que el 3'UTRshort de SnoN aumenta la expresión de la luciferasa hasta 3 veces, indicando que ésta región le confiere estabilidad al mensajero de la luciferasa, lo cual se traduce en un aumento de los niveles de la proteína reportera luciferasa.

A través de análisis bioinformáticos y bibliográficos se seleccionó a miR-155 y miR-21 como candidatos para probar, experimentalmente, su efecto en la regulación de la región no traducida 3' del transcrito de SnoN. Se sabe que el TGF- $\beta$  desempeña un papel importante en la regulación de la estabilidad del transcrito de SnoN, por lo tanto, la selección del candidato que podría estar regulando ésta estabilidad se llevó a cabo utilizando diversos criterios, entre ellos que tuviese un sitio de unión en la región 3'UTR del transcrito de SnoN, y que fuese blanco del TGF- $\beta$ . La co-transfección del vector reportero (luciferasa) que contiene al 3'UTRshort de SnoN y un plásmido que contiene la secuencia para expresar al miR-155, causa una disminución de la actividad de luciferasa aproximadamente del 60%. Estos datos sugieren que el miR-155 puede regular negativamente la expresión de SnoN, un componente clave de la vía de señalización de TGF- $\beta$ . Para corroborar esta interacción, será necesario introducir una mutación, mediante mutagénesis dirigida, en la secuencia blanco del miR-155 en el 3'UTRshort que está subclonado en el vector reportero.

### *Existen frecuentes sitios de unión no canónicos funcionales de miRNAs*

Debido a que sólo existe complementariedad parcial entre miRNAs y sus blancos en células animales, la identificación de genes blanco específico para determinado miRNA (y viceversa) representa un reto en el entendimiento de la función de los miRNAs. Sin embargo, con el advenimiento de la secuenciación masiva, se han generado diversas bases de datos con información sobre la unión miRNA:mRNA, y se han dilucidado diversos criterios importantes para la formación de los híbridos miRNA:mRNA. En un estudio reciente, mediante CLASH (Crosslinking, Ligation, and Sequencing of Hybrids) se obtuvo un mapa del interactoma humano de miRNA:mRNA, en el cual, solamente el 37% de las interacciones involucran apareamiento Watson-Crick ininterrumpido. Este número es sorprendentemente bajo, pero es consistente con muchas observaciones de sitios de unión no canónicos de miRNAs. Incluso se reportó la existencia de interacciones que no involucran contactos con la región semilla, las cuales constituyen el 16% de las interacciones mapeadas (Krichevsky, 2009; Helwak, 2013). Un ejemplo de interacciones entre secuencias miRNA:mRNA no canónicas funcionales lo constituye miR-24, el cual regula la expresión de E2F2, MYC, AURKB, CCNA2, CDC2, CDK4 y FEN1 (Lal, 2009).

Esto podría explicar la disminución en la actividad de luciferasa de la construcción que contiene al 3'UTRshort de *skil* en presencia de miR-21; quizá exista una interacción funcional en un sitio de unión no canónico para miR-21 en la secuencia del 3'UTRshort de *skil*. Si ésta modulación es funcional y repercute en



los niveles de mensajero y/o de la proteína endógena de SnoN es una pregunta que queda abierta en este trabajo.

*miR-155 expresado establemente regula la estabilidad de la proteína SnoN mediante un mecanismo indirecto*

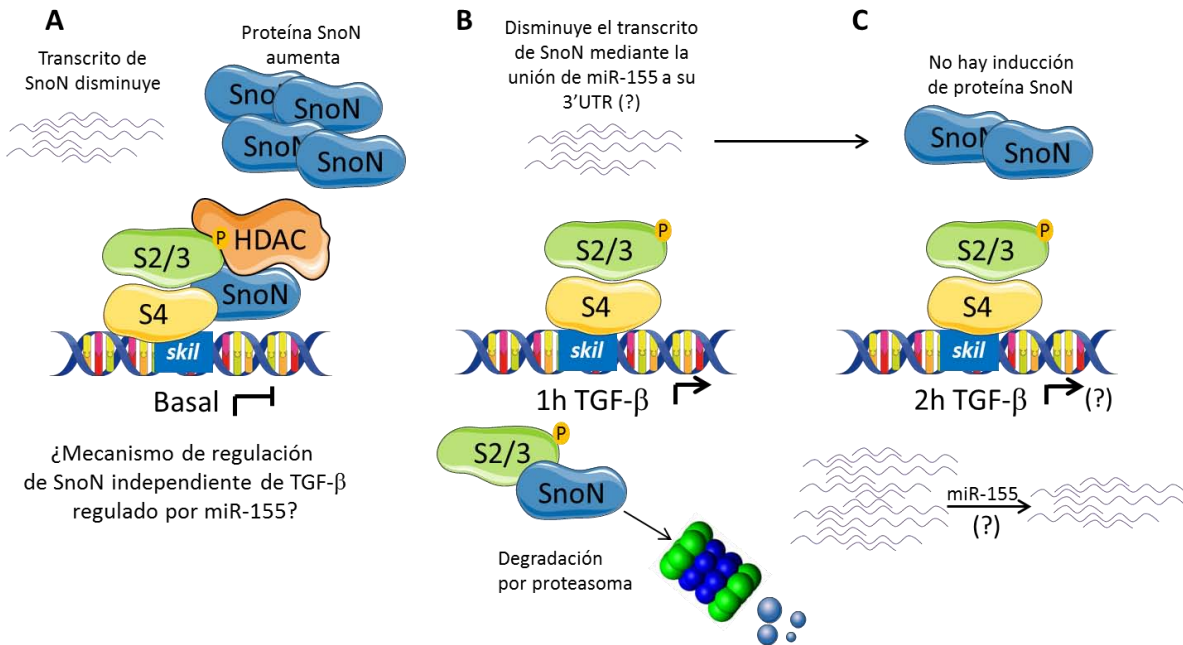
Se diseñó y construyó una línea con expresión estable de miR-155 en las células AD293; para discernir si el efecto de miR-155 sobre el SnoN endógeno es a nivel transcripcional o a nivel traduccional, se realizaron ensayos de RT-PCR, así como de IP seguidos de WB. Los niveles basales del transcrito de SnoN experimentan una disminución en las células que sobre-expresan al miR-155, en concordancia con la disminución observada en el ensayo de luciferasa del 3'UTRshort de *skil*. Sin embargo, los niveles de la proteína SnoN aumentan en las mismas células.

Un miRNA tiene la habilidad de regular un gran número de genes debido a que la complementariedad requerida es de aproximadamente 8 nucleótidos en la región semilla, o que existe una alta complementariedad aunque no sea en la región semilla. En adición, un RNAm puede ser regulado por diferentes miRNAs, expandiendo el repertorio de la expresión de un RNAm de manera dependiente del contexto celular (Barret, 2012). Al sobre-expresar al miR-155, otros posibles genes blanco de este miRNA, además de *skil*, podrían estar alterados, y en consecuencia, los niveles de las proteínas para las cuales codifican. Alguna de las proteínas alteradas, como consecuencia de los altos niveles de miR-155, podrían ser las responsables del aumento de los niveles de la proteína SnoN.

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren el siguiente modelo de regulación de la expresión de SnoN por el miR-155 (fig. 23): en células que expresan establemente al miR155 se observa que los niveles del mensajero de SnoN se encuentran ligeramente disminuidos con respecto a los niveles basales (ausencia del miR155 en células controles) por la unión del miR-155, que se ha sobre-expresado, a la región 3'UTR del RNAm de SnoN, sin embargo, la proteína SnoN se encuentra elevada. Esta aparente contradicción puede explicarse por la existencia de un mecanismo independiente de TGF- $\beta$  regulado por miR-155 que podría controlar la estabilidad de la proteína SnoN.

SnoN reprime la expresión de su propio gen; tras el estímulo con TGF- $\beta$ , SnoN se disocia de su promotor y se degrada vía proteasoma, con lo que permite un aumento en la transcripción de su gen y el consecuente incremento en los niveles de la proteína SnoN. Sin embargo, cuando miR-155 se encuentra sobreexpresado, los niveles del RNA mensajero de SnoN se mantienen bajos a pesar del tratamiento con TGF- $\beta$ , y tampoco ocurre el incremento de la proteína. Es importante tratar de dilucidar en el futuro, los mecanismos implicados en este tipo de regulación.

### Sobreexpresión de miR-155



**Fig. 23. La sobreexpresión de miR-155 impide la recuperación de los niveles de la proteína SnoN tras estímulo de TGF-β.** Modificaciones en la regulación de SnoN a nivel basal (A) y con estímulo de TGF-β (B y C) cuando miR-155 se encuentra sobreexpresado.

Con la creciente información referente a los miRNAs, se hace evidente que son un componente vital del control genético. Las vías de señalización son candidatos ideales para la regulación mediada por miRNAs debido a que sus efectos dependen de su grado de activación. Sin embargo, cada miRNA posee numerosos blancos que participan en diversas funciones, haciendo difícil experimentalmente acotar su contribución en determinados procesos celulares.

## **10. Conclusiones**

- La región 3'UTR de SnoN está ampliamente conservada, lo que sugiere un alto potencial de regulación.
- miR-155 es un posible regulador del 3'UTRshort del transcrito de SnoN.

## **11. Perspectivas**

1. Subclonar la isoforma larga del 3'UTR del transcrito de SnoN de humano en un vector reportero (pGL3 control).
2. Realizar mutagénesis dirigida en los sitios de unión de miR-155 en el 3'UTRshort del transcrito de SnoN.
3. Evaluar el efecto de los miR-155 y miR-21 sobre el 3'UTRshort, así como sobre el transcrito y la proteína endógena de SnoN en diferentes contextos celulares.

## 12. Bibliografía

**Agostini F., Zanzoni A., Klus P., Marchese D., Cirillo D. y Tartaglia G.G.** 2013. *catRAPID* omics: a web server for large-scale prediction of protein-RNA interactions. *Bioinformatics*. 29(22):2928-30.

**Bakheet T., Williams B.R.G y Khabar K.S.A.** 2003. *ARED 2.0*: an update of AU-rich element mRNA database. *Nucleic Acids Res.* 31 (1): 421-423.

**Barrett L.W., Fletcher S. y Wilton S.D.** 2012. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell. Mol. Life Sci.*69:3613–3634.

**Becker Buscaglia L.E. y Li Y.** 2011. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin J Cancer.* 30(6): 371–380.

**Butz H., Rácz K., Hunyady L. y Patócs A.** 2012. Crosstalk between the TGF- $\beta$  signaling and the microRNA machinery. *Trends Pharmacol Sci.*33(7): 382-393.

**Dai Y., Datta S., Novotny M. y Hamilton T.A.** 2003. TGF $\beta$  inhibits LPS-induced chemokine via mRNA stabilization. *Blood.* 102: 1178-1185.

**Davis B.N., Hilyard A.C., Nguyen P.H., Lagna G., Hata A.** 2010. Smad Proteins Bind a conserved RNA Sequence to Promote MicroRNA Maturation by Drosha. *Molecular Cell.* 39: 373–384.

**Deheuninck J. y Luo K.** 2009. **Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF- $\beta$  signaling.** *Cell Res.* 1:47-57 **Shi Y. y Massagué J.** 2003. Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685-700.

**Dweep H., Sticht C., Pandey P. y Gretz N.** 2011. *miRWalk*--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform.*44(5):839-47.

**Espel E.** 2005. The role of the AU-rich elements of mRNAs in controlling translation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16: 59–67.

**Faraoni I., Antonetti F.R., Cardone J. y Bonmassar E.** 2009. *miR-155* gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta.* 1972: 497-505.

**Hamilton M.P., Rajapakshe K., Hartig S.M., Reva B., McLellan M.D., Kandath C., Ding L., Zack T.I., Gunaratne P.H., Wheeler D.A., Coarfa C. y McGuire S.E.** 2013. Identification of a pan-cancer oncogenic microRNA superfamily anchored by a central core seed motif. *Nat Commun.* 2013;4:2730. doi: 10.1038/ncomms3730.

**Hayashi H., Inoue Y., Tsutsui H., Okamura H., Nakanishi K. y Onozaki K.** 2003. TGF $\beta$  down-regulates IFN- $\gamma$  production in IL-18 treated NK cell line LNK5E6. *Biochem Biophys Res Commun.* 300(4):980-985.

**Heldin C.H. y Moustakas A.** 2012. Role of Smads in TGF $\beta$  signaling. *Cell Tissue Res.* 347:21-36.

**Helwak A., Kudla G., Dudnakova T. y Tollervey D.** 2013. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell.* 25;153(3):654-65.

**Hinck A.P.** 2012. Structural studies of the TGF- $\beta$ s and their receptors - insights into evolution of the TGF- $\beta$  superfamily. *FEBS Lett* 586:1860-1870.

**Hsu S.D., Tseng Y.T., Shrestha S., Lin Y.L., Khaleel A., Chou C.H., Chu C.F., Huang H.Y., Lin C.M., Ho S.Y., Jian T.Y., Lin F.M., Chang T.H., Weng S.L., Liao K.W., Liao I.E., Liu C.C. y Huang H.D.** 2014. miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 42: D78–D85. Database issue. doi:10.1093/nar/gkt1266.

**Inui M., Martello G. y Piccolo S.** 2010. MicroRNA control of signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 252-263.

**Jahchan N., Wang D., Bissell M.J. y Luo K.** 2012. SnoN regulates mammary gland alveologenesis and onset of lactation by promoting prolactin/Stat5 signaling. *Development.* 139:3147-3156.

**Jahchan N., Ouyang G. y Luo K.** 2013. Expression Profiles of SnoN in normal and cancerous human tissues supports its tumor suppressor role in human cancer. *PLoS.* 8 (2): e55794.

**Jegga A. G. y Aronow J.** 2013. Evolutionarily conserved noncoding DNA. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd:Chichester.

**Jia J., Yao P., Arif A. y Fox P.L.** 2013. Regulation and dysregulation of 3'UTR-mediated translational control. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 23:29-34.

**Kishore R., Verma S.K., Mackie A.R., Vaughan E.E., Abramova T.V., Aiko I. y Krishnamurthy P.** 2013. Bone Marrow Progenitor Cell Therapy-Mediated Paracrine Regulation of Cardiac miRNA-155 Modulates Fibrotic Response in Diabetic Hearts. *PLoS ONE.* 8(4):e60161.

**Kong W., Yang H., He L., Zhao J.J., Coppola D., Dalton W.S. y Cheng JQ.** 2008. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol.* 28(22):6773-84.

**Krichevsky A.M. y Gabriely G.** 2009. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J. Cell. Mol. Med.* 13(1):39-53.

**Lal A., Navarro F., Maher C.A., Maliszewski L.E., Yan N., O'Day E., Chowdhury D., Dykxhoorn D.M., Tsai P., Hofmann O., Becker K.G., Gorospe M., Hide W. y Lieberman J.** 2009. miR-24 inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. *Molecular Cell.* 35, 610–625.

**Levati L., Pagani E., Romani S., Castiglia D., Piccini E., Covaciu C., Caporaso P., Bondanza S., Antonetti F.R., Bonmassar E., Martelli F., Alvino E. y D'Atri S.** 2011. MicroRNA-155 targets the SKI gene in human melanoma cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res.*24:538-550.

**Loeb G.B., Khan A.A., Canner D., Hiatt J.B. Shendure J., Darnell R.B., Leslie C.S. y Rudensky A.** 2012. Transcriptome-wide miR-155 binding map reveals widespread noncanonical microRNA targeting. *Molecular Cell.* 46: 760-770.

**Louafi F., Martinez-Nunez R.T. y Sanchez-Elsner.** 2010. MicroRNA-155 Targets SMAD2 and Modulates the Response of Macrophages to Transforming Growth Factor- $\beta$ . *J. Biol. Chem.*, 285:41328-41336.

**Luo K.** 2004. Ski and SnoN: negative regulators of TGF- $\beta$  signaling. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 14:65-70.

**Massagué J., Seoane J., y Wotton D.** 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19 :2783-2810.

**O'Connell R.M., Chaudhuri A.A., Rao D.S. and Baltimore D.** Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *PNAS.* 106(17):7113-8.

**Pan D., Zhu Q., Coboy M., Conboy I.M. y Luo K.** 2012. SnoN activates *p53* directly to regulate aging and tumorigenesis. *Aging Cell* 11:902-911.

**Pearson-White S:** Snol, a novel alternatively spliced isoform of the ski proto-oncogene homolog, sno. *Nucleic Acids Res.* 21:4632-4638, 1993.

**Pot I., Ikeuchi B. S., y Bonni A.** 2010. SnoN: Bridging neurobiology and cancer biology. *Curr. Mol. Med.* 10:667-663.

**Rattenbacher B., Beisang D., Wiesner D.L., Jeschke J.C., von Hohenberg M., St Louis-Vlasova I.A. y Bohjanen P.R.** 2010. Analysis of CUGBP1 targets identifies GU-repeat sequences that mediate rapid mRNA decay. *Mol Cell Biol.* 30(16):3970-80.

**Rennie W., Liu C., Carmack C.S., Wolenc A., Kanoria S., Lu J., Long D. y Ding Y.** 2014. STarMir: a web server for prediction of microRNA binding sites. *Nucleic Acids Res.* Advance Access published. doi: 10.1093/nar/gku376.

**Shen Z., Jiang X., Zeng C. , Zheng S., Luo B. , Zeng Y., Ding R. , Jiang H. , He Q., Guo J. y Jie W.** 2013. High expression of ubiquitin-conjugating enzyme 2C (UBE2C) correlates with nasopharyngeal carcinoma progression. *BMC Cancer.* 13:192.

**Sheng H., Shao J., Dixoni D.A., Williams C.S., Prescottti S.M., DuBois R.N., y Beauchamp D.R.** 2000. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Enhances Ha-ras-induced Expression of Cyclooxygenase-2 in Intestinal Epithelial Cells via Stabilization of mRNA. *J. Biol. Chem.* 275:6628-6635.

**Siepel A., Bejerano G., Pedersen J.S., Hinrichs A.S., Hou M., Rosenbloom K., Clawson H., Spieth J., Hillier L.W., Richards S., Weinstock G.M., Wilson R.K., Gibbs R.A., Kent W.J., Miller W., y Haussler D.** 2005. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res.* 15(8):1034-50.

**Stroschein S. L., Bonni S., Wrana J.W., y Luo K.** 2001. Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes Dev.* 15:2822–2836.

**Tecalco-Cruz A.C., Sosa-Gorrocho M., Vázquez-Victorio G., Ortiz-García L., Domínguez-Hüttinger E., y Macías-Silva M.** 2012. Transforming Growth Factor/Smad target gene *skil* is negatively regulated by the transcriptional cofactor complex SnoN-Smad4. *J. Biol. Chem.* 287:26764-26776.

**Tian B. y Manley J.L.** 2013. Alternative cleavage and polyadenylation: the long and short of it. *TIBS.* Núm. de páginas: 9. Artículo en prensa.

**Xie X., Lu J., Kulbokas E.J., Golub T.R., Mootha V., Lindblad-Toh K., Lander E.S., Kellis M.** 2005. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 434:338–345.

**Xu P., Liu J., y Derynck R.** 2012. Post-translational regulation of TGF- $\beta$  receptor and Smad signaling. *FEBS Lett* 586:1871-1884.

**Zeng Y., Cullen B.R.** 2003. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA.* 9(1):112-23.

**Zhu Q., Pearson-White S. y Luo K.** 2005. Requirement for the SnoN oncoprotein in Transforming Growth Factor  $\beta$ -induced oncogenic transformation of fibroblasts cells. *Mol Cell Biol* 2005, 25(24):10731.

**Zhu Q. y Luo K.** 2012. SnoN in regulation of embryonic development and tissue morphogenesis. *FEBS Lett* 586:1971-1976.

**Zi Z., Chapnick D.A., y Liu X.** 2012. Dynamics of TGF- $\beta$ /Smad signaling. *FEBS Lett* 586:1921-1928.



## Apéndice.

Predicción de miRNAs con sitio de unión a *skil* de humano (NCBI Ref Seq: NM\_001248008.1). Algoritmo miRWalk.

Gene Name	MicroRNA	Seed Length	Start	Sequence	End
SKIL	hsa-miR-15a	12	3404	AGCAGCACAUA	3393
SKIL	hsa-miR-15b	10	3404	AGCAGCACA	3395
SKIL	hsa-miR-494	10	2967	GAAACAUACA	2958
SKIL	hsa-miR-497	10	3405	CAGCAGCACA	3396
SKIL	hsa-miR-195	9	3404	AGCAGCACA	3396
SKIL	hsa-miR-497	9	3404	AGCAGCACA	3396
SKIL	hsa-miR-559	9	3269	AAAGUAAAU	3261
SKIL	hsa-miR-579	9	2951	UUCAUUUGG	2943
SKIL	hsa-miR-15a	8	3408	UAGCAGCA	3401
SKIL	hsa-miR-16	8	3408	UAGCAGCA	3401
SKIL	hsa-miR-16	8	3404	AGCAGCAC	3397
SKIL	hsa-miR-23a	8	3502	AUCACAUU	3495
SKIL	hsa-miR-26a-1*	8	2767	CUAUUCUU	2760
SKIL	hsa-miR-16	8	3408	UAGCAGCA	3401
SKIL	hsa-miR-16	8	3404	AGCAGCAC	3397
SKIL	hsa-miR-15b	8	3408	UAGCAGCA	3401
SKIL	hsa-miR-23b	8	3502	AUCACAUU	3495
SKIL	hsa-miR-146a	8	3309	GAGAACUG	3302
SKIL	hsa-miR-195	8	3408	UAGCAGCA	3401
SKIL	hsa-miR-26a-2*	8	2767	CUAUUCUU	2760
SKIL	hsa-miR-302b*	8	2779	CUUUAACA	2772
SKIL	hsa-miR-302d*	8	2779	CUUUAACA	2772
SKIL	hsa-miR-340	8	3162	UAUAAAGC	3155
SKIL	hsa-miR-335*	8	2957	UUUUCAUU	2950
SKIL	hsa-miR-424	8	3405	CAGCAGCA	3398
SKIL	hsa-miR-146b-5p	8	3309	GAGAACUG	3302
SKIL	hsa-miR-495	8	2821	AACAAACA	2814
SKIL	hsa-miR-545*	8	3346	UCAGUAAA	3339
SKIL	hsa-miR-569	8	3251	GUUAAUGA	3244
SKIL	hsa-miR-569	8	3215	GUUAAUGA	3208
SKIL	hsa-miR-579	8	2950	UCAUUUGG	2943
SKIL	hsa-miR-548b-5p	8	3270	AAAAGUAA	3263
SKIL	hsa-miR-548a-5p	8	3270	AAAAGUAA	3263
SKIL	hsa-miR-548c-5p	8	3270	AAAAGUAA	3263
SKIL	hsa-miR-548c-3p	8	3467	AAAAAUCU	3460
SKIL	hsa-miR-548d-5p	8	3270	AAAAGUAA	3263

SKIL	hsa-miR-548d-5p	8	3270	AAAAGUAA	3263
SKIL	hsa-miR-1301	8	3084	UUGCAGCU	3077
SKIL	hsa-miR-1301	8	2734	UUGCAGCU	2727
SKIL	hsa-miR-1283	8	2893	UCUACAAA	2886
SKIL	hsa-miR-548j	8	3270	AAAAGUAA	3263
SKIL	hsa-miR-548k	8	3072	AAAAGUAC	3065
SKIL	hsa-miR-548k	8	2978	AAAAGUAC	2971
SKIL	hsa-miR-1261	8	3124	AUGGAUAA	3117
SKIL	hsa-miR-548n	8	3270	AAAAGUAA	3263
SKIL	hsa-miR-548h	8	3270	AAAAGUAA	3263
SKIL	hsa-miR-548h	8	3270	AAAAGUAA	3263
SKIL	hsa-miR-548h	8	3270	AAAAGUAA	3263
SKIL	hsa-miR-548h	8	3270	AAAAGUAA	3263
SKIL	hsa-miR-548i	8	3270	AAAAGUAA	3263
SKIL	hsa-miR-548i	8	3270	AAAAGUAA	3263
SKIL	hsa-miR-548i	8	3270	AAAAGUAA	3263
SKIL	hsa-miR-548i	8	3270	AAAAGUAA	3263
SKIL	hsa-miR-1279	8	3088	CAUAAUUGC	3081
SKIL	hsa-miR-1283	8	2893	UCUACAAA	2886
SKIL	hsa-miR-664	8	2952	AUUCAUUU	2945
SKIL	hsa-miR-23a	7	3501	UCACAUU	3495
SKIL	hsa-miR-29a*	7	2991	CUGAUUU	2985
SKIL	hsa-miR-32	7	3086	UAUUGCA	3080
SKIL	hsa-miR-92a	7	3086	UAUUGCA	3080
SKIL	hsa-miR-92a	7	3086	UAUUGCA	3080
SKIL	hsa-miR-93*	7	3423	ACUGCUG	3417
SKIL	hsa-miR-101*	7	2871	AGUUAUC	2865
SKIL	hsa-miR-103	7	3407	AGCAGCA	3401
SKIL	hsa-miR-103	7	3404	AGCAGCA	3398
SKIL	hsa-miR-103	7	3407	AGCAGCA	3401
SKIL	hsa-miR-103	7	3404	AGCAGCA	3398
SKIL	hsa-miR-107	7	3407	AGCAGCA	3401
SKIL	hsa-miR-107	7	3404	AGCAGCA	3398
SKIL	hsa-miR-7-1*	7	2822	CAACAAA	2816
SKIL	hsa-miR-7-1*	7	3434	AACAAAU	3428
SKIL	hsa-miR-7-2*	7	2822	CAACAAA	2816
SKIL	hsa-miR-7-2*	7	3434	AACAAAU	3428
SKIL	hsa-miR-212	7	2776	UAACAGU	2770
SKIL	hsa-miR-216a	7	2914	UAAUCUC	2908
SKIL	hsa-miR-222*	7	3347	CUCAGUA	3341
SKIL	hsa-miR-223	7	2803	UGUCAGU	2797
SKIL	hsa-miR-23b	7	3501	UCACAUU	3495
SKIL	hsa-miR-130a*	7	3501	UCACAUU	3495

SKIL	hsa-miR-132	7	2776	UAACAGU	2770
SKIL	hsa-miR-138-2*	7	3102	GCUAUUU	3096
SKIL	hsa-miR-140-3p	7	3108	ACCACAG	3102
SKIL	hsa-miR-9*	7	3161	AUAAAGC	3155
SKIL	hsa-miR-9*	7	3161	AUAAAGC	3155
SKIL	hsa-miR-9*	7	3161	AUAAAGC	3155
SKIL	hsa-miR-186	7	2971	CAAAGAA	2965
SKIL	hsa-miR-302a*	7	3170	ACUUAAA	3164
SKIL	hsa-miR-302c*	7	2778	UUUAACA	2772
SKIL	hsa-miR-330-3p	7	2831	CAAAGCA	2825
SKIL	hsa-miR-323-3p	7	3323	CACAUUA	3317
SKIL	hsa-miR-335*	7	3515	UUUUUCA	3509
SKIL	hsa-miR-424	7	3407	AGCAGCA	3401
SKIL	hsa-miR-424	7	3404	AGCAGCA	3398
SKIL	hsa-miR-410	7	3164	AAUAUAA	3158
SKIL	hsa-miR-410	7	3041	AAUAUAA	3035
SKIL	hsa-miR-495	7	3435	AAACAAA	3429
SKIL	hsa-miR-495	7	2818	AAACAAA	2812
SKIL	hsa-miR-524-5p	7	2892	CUACAAA	2886
SKIL	hsa-miR-524-5p	7	2973	UACAAAG	2967
SKIL	hsa-miR-520d-5p	7	2892	CUACAAA	2886
SKIL	hsa-miR-520d-5p	7	2973	UACAAAG	2967
SKIL	hsa-miR-520g	7	3277	ACAAAGU	3271
SKIL	hsa-miR-520h	7	3277	ACAAAGU	3271
SKIL	hsa-miR-503	7	3408	UAGCAGC	3402
SKIL	hsa-miR-513a-3p	7	3265	UAAAUUU	3259
SKIL	hsa-miR-513a-3p	7	3265	UAAAUUU	3259
SKIL	hsa-miR-545*	7	2801	UCAGUAA	2795
SKIL	hsa-miR-545*	7	3345	CAGUAAA	3339
SKIL	hsa-miR-92b	7	3086	UAUUGCA	3080
SKIL	hsa-miR-557	7	3053	GUUUGCA	3047
SKIL	hsa-miR-567	7	3255	GUAUGUU	3249
SKIL	hsa-miR-577	7	2857	AGAUAAA	2851
SKIL	hsa-miR-582-3p	7	3306	AACUGGU	3300
SKIL	hsa-miR-548b-5p	7	3072	AAAAGUA	3066
SKIL	hsa-miR-548b-5p	7	2978	AAAAGUA	2972
SKIL	hsa-miR-548a-5p	7	3072	AAAAGUA	3066
SKIL	hsa-miR-548a-5p	7	2978	AAAAGUA	2972
SKIL	hsa-miR-548c-5p	7	3072	AAAAGUA	3066
SKIL	hsa-miR-548c-5p	7	2978	AAAAGUA	2972
SKIL	hsa-miR-627	7	3136	UGAGUCU	3130
SKIL	hsa-miR-548d-5p	7	3072	AAAAGUA	3066
SKIL	hsa-miR-548d-5p	7	2978	AAAAGUA	2972

SKIL	hsa-miR-548d-3p	7	2811	AAAAACC	2805
SKIL	hsa-miR-548d-5p	7	3072	AAAAGUA	3066
SKIL	hsa-miR-548d-5p	7	2978	AAAAGUA	2972
SKIL	hsa-miR-548d-3p	7	2811	AAAAACC	2805
SKIL	hsa-miR-655	7	2797	UAAUACA	2791
SKIL	hsa-miR-1301	7	3083	UGCAGCU	3077
SKIL	hsa-miR-1301	7	2733	UGCAGCU	2727
SKIL	hsa-miR-1283	7	2892	CUACAAA	2886
SKIL	hsa-miR-1298	7	3294	UUCAUUC	3288
SKIL	hsa-miR-1298	7	2955	UUCAUUC	2949
SKIL	hsa-miR-892a	7	3374	CACUGUG	3368
SKIL	hsa-miR-374b	7	2917	AUAUAAU	2911
SKIL	hsa-miR-922	7	3406	GCAGCAG	3400
SKIL	hsa-miR-944	7	3507	AAAUUUAU	3501
SKIL	hsa-miR-297	7	3256	UGUAUGU	3250
SKIL	hsa-miR-548j	7	3072	AAAAGUA	3066
SKIL	hsa-miR-548j	7	2978	AAAAGUA	2972
SKIL	hsa-miR-548k	7	3071	AAAGUAC	3065
SKIL	hsa-miR-548k	7	2977	AAAGUAC	2971
SKIL	hsa-miR-548l	7	3270	AAAAGUA	3264
SKIL	hsa-miR-548l	7	3072	AAAAGUA	3066
SKIL	hsa-miR-548l	7	2978	AAAAGUA	2972
SKIL	hsa-miR-1246	7	2887	AAUGGAU	2881
SKIL	hsa-miR-1261	7	2886	AUGGAUA	2880
SKIL	hsa-miR-548n	7	3072	AAAAGUA	3066
SKIL	hsa-miR-548n	7	2978	AAAAGUA	2972
SKIL	hsa-miR-548h	7	3072	AAAAGUA	3066
SKIL	hsa-miR-548h	7	2978	AAAAGUA	2972
SKIL	hsa-miR-548h	7	3072	AAAAGUA	3066
SKIL	hsa-miR-548h	7	2978	AAAAGUA	2972
SKIL	hsa-miR-548h	7	3072	AAAAGUA	3066
SKIL	hsa-miR-548h	7	2978	AAAAGUA	2972
SKIL	hsa-miR-548h	7	3072	AAAAGUA	3066
SKIL	hsa-miR-548h	7	2978	AAAAGUA	2972
SKIL	hsa-miR-548h	7	3072	AAAAGUA	3066
SKIL	hsa-miR-548h	7	2978	AAAAGUA	2972
SKIL	hsa-miR-548i	7	3072	AAAAGUA	3066
SKIL	hsa-miR-548i	7	2978	AAAAGUA	2972
SKIL	hsa-miR-548i	7	3072	AAAAGUA	3066
SKIL	hsa-miR-548i	7	2978	AAAAGUA	2972
SKIL	hsa-miR-548i	7	3072	AAAAGUA	3066
SKIL	hsa-miR-548i	7	2978	AAAAGUA	2972
SKIL	hsa-miR-548i	7	3072	AAAAGUA	3066
SKIL	hsa-miR-548i	7	2978	AAAAGUA	2972
SKIL	hsa-miR-1283	7	2892	CUACAAA	2886

Alineamiento de los 3'UTRs del RNAm de SnoN de humano (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*) y rata (*Rattus norvegicus*).

	1	10	20	30	40	50	60
Homo sapiens 3'UTR	AAACTGTTAAAGAGATT	CATCTGTGTATTACTG	ACAAGGTTTTTTTGT	TTTGTGCTTGC			
Mus musculus 3'UTR	GAGCTG--AAGAAGAC	ACACCTGTGTGTGTT	GACAGG--CTTTGTG	TTTGTGCTTGC			
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Homo sapiens 3'UTR	TTTGGTAATTGAATTCT	GAAGAATTTATCTGC	ATGACGATAACTAGG	CATTCTATCCATT			
Mus musculus 3'UTR	TTTGAAAATTGAATTCT	-AACATCTTATTTGC	ATGAAGGTAGCTAGG	CATTCTGTTCATT			
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Homo sapiens 3'UTR	TGTAGATCAGAGAAAGT	GAAGAGATTATATAT	TAGTACTTAAATTTT	TACATTTTCCAAA			
Mus musculus 3'UTR	TGTATGGCAGCAAAGT	GA--AGATTATATAT	TAATAC--AAAATTT	TCCAA-TTCCAAA			
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Homo sapiens 3'UTR	TGAATGAAAATGTATG	TTCTTTGTACTTTTT	TAATAAATAATCAG	CTTAGTAACAATA--	C		
Mus musculus 3'UTR	TGAATGAAAATGTATG	CTTCTTTGTACTTTT	-----CCAGTGGG	CTTGGTAATAATA	ACC		
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Homo sapiens 3'UTR	TATATGGTTTCAACTAG	TAGGTAATCTGCTTA	TATTTCTAATGCAAA	CTTAACAATTGTG			
Mus musculus 3'UTR	TGTGTAATTTGAGCCT	GTGGTCAGTCTACCT	GTATTTT-----	TAACAGTTGCA			
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Homo sapiens 3'UTR	TACTTTTTAAAGCTGCA	ATATGTGTTGAAAAT	AGCTGTGGTCAAT	TTTGTATCCATA			
Mus musculus 3'UTR	TAC-TTTCCAAAGCTG	CAGTCTGTGGTGGAG	AGTACCTGTGCCA	---TGGTATGCAATA			
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Homo sapiens 3'UTR	TTTCAGACTCAATTTAG	AACAATGGTGGCTTT	TATATTTAAGTATAT	AGAGCTACTCA			
Mus musculus 3'UTR	TTTCAGGCTCA-GCTT	AGATACAGAGT-----	AATGTTTATGATA	CAAAGCTATT--			
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Homo sapiens 3'UTR	AGGAGTTGAATCTCCC	TTTTCTCATTAAACA	AATTTTCTAAGTTG	TATGGTACTC			
Mus musculus 3'UTR	-----TTGTATC-	-----CTTCTCATT-	ACAGACTCTGGGA	AGCCGGT-----			
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Homo sapiens 3'UTR	ATTAACATACACCAA	ATTACTTTTACTTTG	TTCAGATTGTGGAAT	GAATTTCCACCAGT			
Mus musculus 3'UTR	--T-----	-----GTTAATTTG	TTCAGTTGTAGAGT	GGGTTT-CTTCTGT			
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Homo sapiens 3'UTR	TCTCTCTTTTTAATGT	TACCCTAGGAGGAAT	TTTACTGAGGTTAT	AGCATACCCCATG			
Mus musculus 3'UTR	TTCTCCTAGAGGAAT	TTGATTGATGGAAT	GATAGTACCACCTC	CCCTAACAAACAGT	GTG		
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Homo sapiens 3'UTR	AG-CACAGTGGGGAAGA	GAATGTGTTTATGTG	TGCTGCTGCTAAAC	AGAAGCAGCAGTT			
Mus musculus 3'UTR	TGTGTGTGGAGGGGAG	GGCAGCCTTTGCTG	TGCCCTGATGCTGC	ACACAAGAAGCAGTT			
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Homo sapiens 3'UTR	GTAATTTGTTTTTTCAG	TTTAAATGTGGTTAT	AGTTAGATTTTTTTT	TAAAGCAGCAACTTT			
Mus musculus 3'UTR	GTAATTTGCTTTCTG	TTAAGAGTGACTAT	CTCTAGATTGTGTG	TTT-----GTGAGACTTC			
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Homo sapiens 3'UTR	TCAAAAATAAAATGTG	ATAATTTCTGAAC	TTTTGTTGTTGTTA	ATAGTGGTGTGAAA			
Mus musculus 3'UTR	AGAAAATTAATAATG	-----ATTTCTGA	ACTTT-----TCCTG	TAAACAGTGGTGTG	GAA		
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Homo sapiens 3'UTR	AT---ATTAACGTTCT	TGAGAAAACTGATA	CCACTGTTGTGTAT	CAGTTTCTATACAA			
Mus musculus 3'UTR	GTACTCATTTCATGCT	CACGAGGAAAATGG	ATTCCACTGATGTAC	GTGGTTCCATGTAA			
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Homo sapiens 3'UTR	TCCATAATCCTCCTGT	ACAGTTTTTACATGT	AGTT---ATGAGTCT	TACTAAAATTTAT			
Mus musculus 3'UTR	CTCATAATCTTCTGT	ACAG--TTTTATATG	TAGTCTTACAAAGG	TCTTA-TGAATTTAT			
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Homo sapiens 3'UTR	ATAATGGACTTGTTTT	CTTTAAGTTGTA	AAATGTTAAACAC	CTTGAAGTTATTTT	GGAA		
Mus musculus 3'UTR	ATAATGGA-TTTTTT	CTTTAATAATAA	ATAAATACTAAAT	ATCTTGAAGATTAT	TTTGGAA		
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Homo sapiens 3'UTR	CTTCTGTATGTTTAAAT	GTGTTTACCAAAT	TTGCACGAATGGAC	CAATTTTCATTTAC			

Mus musculus 3'UTR	CTTTTGTATGTTTAAATGTTATCTT---AAAAGTGCACGAATGGACCATTA---TGAC
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	TACTTAATATCAAATCAGGAATTTACAGTCAACTGATAGTACATGATAGGTGCATATAG
Mus musculus 3'UTR	TCTTTAATCTTAAAATCAGGAATTTACAGTCAACTGATAGTACATGATAGGTGCATATAG
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	GACAGTTTAGTTACCTGCTACTAAAAGATTTTGTAGATAAGTTTGTAGAAAGATAAGGAATT
Mus musculus 3'UTR	CACAATTGAAGTATCTGCTACTAGCAGG-----AATTTTAGATGACAAATGAATT
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	CCATAGTTTCAGGAGGGACAACATCT-----TCTGCACCTTTTTTTTGCACAGAAA
Mus musculus 3'UTR	CCGTGATTTGGGAAGGGCAGCCTTTGCACCTTTCTTTGTTTTTTTGCACATAA
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	AGTCTGTCATTTCTAATGGCAAATTTTCATATTTGTTAATCTTGGCTCAAATATATTA
Mus musculus 3'UTR	AGTCTGATGTT-TTATCACCGAATTTACATTTAGCAGATGCTTGGCTTGAATTTGCTA
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	GGTAAAATCTTAGATCTGTTTTTAAAGGGAGTTTCTGAAACTATCATTAAATGACATT
Mus musculus 3'UTR	GGGAAAAT-----TTT-----CGGGAACT-----TTGTAATT
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	ATTACCCCATGGATTTTATGGGATAATAAATGTTTTTCATGTTCTCTTATAAGATACTAT
Mus musculus 3'UTR	TTT-----TGGTTTTGTT--C-----TGTTTGGCCACCACCTTTCAGGGATCCP--
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	GTATGAAATTACTTCAGAGAGCTATATTTTAAATAAATAGCTAGGGTTAAGGTT
Mus musculus 3'UTR	-----CTTGCCCTGCCCCAGTACT-----GGTTCGACAGGCCTGAG---
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	ATATCTATTTCCAGCATAGAAGGTAGATAATCTAATGGTGTAGAAAAGATCACTAGGTT
Mus musculus 3'UTR	CTCTGCCACCACCGCCCTG-TGCAGGTTTTAGGGATGTTTCTGAAAGCAGCCCT----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	GTCATTTAACCAGTTATTTTCATATTTTGCCTAATAGTACATATCCAAAAAGAAATTTGT
Mus musculus 3'UTR	-----GGCATTATCTCTGTTGCGT---GTGC---CCCG---GGCTGCTC
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	ACTTCCCCAAATGTAATTTATTTACTAAATGAGTATAACCTAAATGTGTGTTTTCTATT
Mus musculus 3'UTR	ATAGCGCTACATGCACTTGAGAT-CTGTGCTTAGGAACAACCTGGAGTTGGCTGCTACT
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	TTCCATTTAAATTTTGCTATATTAAGACTAATTTAATTCGTTGAGTCTTGGAACTCTCTC
Mus musculus 3'UTR	GTCC-----TCC-----ATGCGGTAAGACATCGGAGC----C
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	AAGGAGGAACAAATATTAATGACATGTAGAAACAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
Mus musculus 3'UTR	CTGGTTATCATACTGCTTATG-----GTCATACTTTGTTTCATAA
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	TTTTTTTTTGAGACAGAGTCTCGCTGTCTCCAGGCTGGAGTTCACTGGTGCATCTCGG
Mus musculus 3'UTR	TACTTGTTTAAAGATACT-TTCTACTTTCCAAACGGGAGTTTGTTTTCTAAATATATT
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	CTCACTGCAAGCTCTGCCTCCTGGGTTCAAGCCATTTCTCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAG
Mus musculus 3'UTR	GTGAC--CTTACT--G-----TGGATTATTTCTACTCTGCTCTATAA-----TTTAGT-G
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	CTGGGACTACAGGCACCCACCACCCTCCCGGCTAATTTTTAGAAACAAATATTTAAAAAT
Mus musculus 3'UTR	TGGTGACTTCTGTAACC-----TTGGGAGAAGCAGATAGGTGGCAGAGGACCATGTAT
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	GACATATTCTCCCAATACAATCTATTTAGATCTGGAG-AAGGAAAAATCAGATATTTATG
Mus musculus 3'UTR	GTCAT--TG-----TATTTAGATCTGGAGGAGGAAGCCACGGGCACCTGTA
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	ATATAGTTTTATTTAATTTTGAATTTTGTGTCACAGCTCAGCTTTTTGGAAGACAAA
Mus musculus 3'UTR	AAGCCGCCTTAGCTTAGTAGTCAGTCCATTGTACCCAGCTTGGCTGCGTGGGAGGCACA
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	CTCAAACACCTATAATTTCAATTTATTTCTAATTCACTTGGAACCTTTCTGCTTTATGT
Mus musculus 3'UTR	CTCAAGGACTCGCA---CCATTTATTTTCTGACAGACTCAGAAGTGTCTGCTT-----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	TACCTAGAAAAATGATAATTTGTTTAAACCCAAAACCTTCAAATAAATGCTTAATCCTTG
Mus musculus 3'UTR	-----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)	-----
Homo sapiens 3'UTR	AAATATGTTATTGGAAAATTTTAAAGCAGTGCCTTAAACACCATTAAATTTATGAACTTG
Mus musculus 3'UTR	-----GGTGTCT-----GCTTA

Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR TAATTCAGAATTGAGTAAAGAAATATTTTTCTAGTCCTTCATATATTGAAAACCTTGCCA  
Mus musculus 3'UTR TAAGTGTGA-----TTCTTCTAGTC--T-----TG-AAACTTGCCCT  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR CATGACATTGT-----ATCGTCTTCATTTCCAGAAGATGCGTTGGTGTGCCATAGGTT  
Mus musculus 3'UTR CGTGACATTGTTGAGCGGTAGTCTTCACTTTCCAGAAGATGAAATGATGTGCCATCGTTT  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR TCT-----AACTTCCTTGAAAATAGTTTTTAAGTCAATTGTAAT--ATACGTATTAT  
Mus musculus 3'UTR TCTGTCTAAACTTCCTTACAA-----TTTTTAATCAACTGTAATAGCATATCTACTGC  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR TGTAAAAGTAACTTTAA-----ACTGCAACACATAGCTTCAAAAC-AATATAGAGATTT  
Mus musculus 3'UTR TGTGAAAAGTAACTTTAATTTACATTGCATCATATAGCTTGAACCACCTTTGACATTC  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR TGTAATACCTTATAAGTGGAGTTGGCTAAAATACCTTATCCATATAAAACTTATTCTATT  
Mus musculus 3'UTR TGTAATACCCACAAAGTGACCTCTGCTAAAA-----TATCCAGATGAAGCT----TACT  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR CTTTGCATGCTTATTTGTGTGTTGGTTGCTAGCTTAAAGTTTGATTTGTTGTTACTCTT  
Mus musculus 3'UTR TCGTGCATGCTCATTTCTGTGTGCTGGTTGCTCTCGTAAGGTTGGCTTTGGTGTGAGGCTT  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR TGTGTG-----CCAAATTCAGTGGCAAGCGGATTTTCCCTCAGACTTCAAAAAATAATT  
Mus musculus 3'UTR CGTGTGCTATGCCAAGTTCAGTGGCAAGCAGATTTTCCCTCAGAGTCC-----ATACTC  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR CTTTTAAGAAAAATGTA AAAATGTTTATTCTAAAAAGCTGCATTAAGGGACACCTAT  
Mus musculus 3'UTR TGTTTAGGGAGGAATG--AGACCATTTATCTGAGAAACTATGTTTAGGAGTGAAGAAA  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR AAAAAAGTTTGTCTAGCTCATCTTTAGAAGGAAGAAGAATATTAGCTTGGGTGATGTTTA  
Mus musculus 3'UTR CACAGCGTTAGCT-----TTCATACTGAGCAAAGA-----CTGACG-TTG  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR ATTTGGGTGGCGATAGTTTCTGTAGGCTAAACTTTATGAGAAAAGTGTACCTACTCTATA  
Mus musculus 3'UTR CTATGGGTG--GTCTCTCTCTGTGGTCCAGAC---TGAGGGCTTTGCACC-----  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR AAGGTAATAATGTA AACCTCTTGTCTTATTGAGGAAGCTCTTCAACTAC---CCTAA  
Mus musculus 3'UTR AAGTACTTAAAGTGTGGAAGCTCCTG-TGCCATCAAGGAGGAGTTTAAACAAACCACCTGC  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR ATTTACAAAATGTA ACTTATAACACTATGAAAAGATTTGACCAACAATTTACGTTTGTCTG  
Mus musculus 3'UTR CAATCACAGCTGAGACTGAGCACC-----GAAAGATTCTACCAAC---TTAGGTTTGGCT  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR TGTGCTTTAGTTTTTGTGTTAAGCATATCTTTTGTCTGTAATTTCT-GTGT-TCATGAGAG  
Mus musculus 3'UTR CGGGCTTTAACAGTT-TTGAAGTATAGTCTTTAGCTTGAATCTCTTGTGTTTTTTGAAGA  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR TTAGGGTGTTTTATGCTTCTTGA ACTAATTTTATAACATATTTAATATATTACCAGTTAA  
Mus musculus 3'UTR TAAGGATGTTTTATGCTTCTTGA GCTAATTTTATAACATATTTAATATATAACCTGTTTA  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR GATATAAAATCATTTGTACATAGC-----GAATGTAAA---  
Mus musculus 3'UTR TATGTAAAATCTTTTGTACAGGGGTGGGAAGGAGTAATGAAAACCTGATTTGTACATAG  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR -GCAGCT-----ATTAAAGTAGGTGAA---ATAAAGTATATATTTGCCGGTTATCC  
Mus musculus 3'UTR TGAAGTTTATGTGCAGACCGAAGTCAGTGAACCACTGAGGTGTTTGCAGGCTCTCC  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR ATATCTTTTAGAAGTCTGACAGAACAACCAGTTTATTTGCACATAGGTAGCTTCTGTTT  
Mus musculus 3'UTR ACATCCTTCAGAGTCCGTGAAG---CGCCAGTCTGTGTG---TCTCTGGTTCTCTGTCT  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR GAAGGAAGGTAAAGTTATAAGGAAACTCAAATACTATAAGATGTG-TCAAGGTATTTCTC  
Mus musculus 3'UTR GCAGAAAAGCAAAATGAAAAGGAAGCACAAGTAATAGGAACGTGTCGCCGAGGTATTTCCC  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR CAGAATTAATGCAAAGCTAGTGTGAAGGATTTAATCAGCTTCTAAAAATTTCTTCTC  
Mus musculus 3'UTR TAGCAGGAGCTGCAAAGCTGGTCTG-GGGGTCTGCATCC-CCTCTGGAA-GGCCTGGCC  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR AATAAGGCATATGTTTTGATTACTTAGGGAAGATTCCTATTTTATTGTCCTTTATGC  
Mus musculus 3'UTR CACATGCCGT--GCTCTGAGTGAAGGGAAGGATGTGTGTTTTTGTGTTG---TTATGC  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR ATTTAATCCACATGATAGGACATTAAAAATTAATATAAAGAAAAATCGTGCTCATACT--  
Mus musculus 3'UTR ATTTACTCTTTAGGGCAGGACGTTACAACTGAT-----GGTAAATTTGTGTTTCATGCTAT  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR GTACATCTGTTTCTGTGCTTGGAACTACTTGTAAATAGTTTTTATCGAAGCTGTCAGCAA  
Mus musculus 3'UTR GTACATGTGCTCCTGAACTTGGATCTACTTGTAAAT-GGTTCATGGAAGCAATCAGCAG  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR TAAGGGACATAAACTGCTGTATTATACAT-----TGTGGAATTGA-----ATAAACAG-  
Mus musculus 3'UTR TGTGTGACAT-GAACTGCTGCATTATGTATTTACTTGTGGAAGCTGAGATATGTAACAG  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR -----CCTAATTTTTTTTTCTAGTATAGGGTACTTAAAGCATTCCACTTT  
Mus musculus 3'UTR GCTTACC'TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTAGTGTAAAATACTTAAAGCATTCCACTAT  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR TGGAAGAAAA---GTGTATTAGTATTTTATATGCAATTCATTTAAAAGGACAGTTTTTT  
Mus musculus 3'UTR TGGAAGAAAAAACATATATGGACATTTTGTATTGTATCTTGTTTAAAAGGACAGTCTTTT  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR TTTTTTTTTTGTAAATCCATTCATTGAAATGGTTCTAAACTGTATAATGTAATTTGGAG  
Mus musculus 3'UTR TT-----AATCTCCCACTTAAATGGCTTTTAAAAATATAATACAATTTGAAG  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----

Homo sapiens 3'UTR CCTATTTAGTAATAGAATTAATGTCCCTATGTAGTGCTACAATTTTTGAAT-TAGA-AAG  
Mus musculus 3'UTR CTTGTTTAGAATAGGATTAATGTCTTATATAGTGCTACAGTTTTGGAAT-TAGA-AAG  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) -----TT--CATTGGCATTAAAAGTGT--TATTGGGAATATCATCCAATCTATACAAG

Homo sapiens 3'UTR TGATCAAATGTAAGAAAAAATTTAAAAATTCAGCCAGAAAAACAAATAGTGTATTTAA  
Mus musculus 3'UTR TGATCAACTATAAAACA----TTTTAAAATTAAGCCAGAAAAACAAATAGTGTTTAAAG  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) TTAT---ATACAAGGCA-----TGAAAAAT--GGCAAAACAGCACAAAATA-CGATTGA--

Homo sapiens 3'UTR TTAGTTAATGTAAGGAATTTATAAGATTTTTTCTCAATATA-GATACCTCAGTTG  
Mus musculus 3'UTR TTAGTTTAGTATAAAGAAATTTATAAGATTTTTTCTCAATATAAGATACCTCAGTTG  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) --GGTATAAGCTAAGAGCACAGTATGTCA-TGTTTCAATAAATATA--ATCAAAATTTG

Homo sapiens 3'UTR ---A-AAAGAAAGCACAGCATACTTAA-AGTAGTTCTAGTAAACATGTCC-TAGAAAAACA  
Mus musculus 3'UTR AGAATAAAGAAAGCACAGCACAATTAA-AGTAATCTCATGAA-AACCCCAT-TAAAATA  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) ----TAAACTAAGTA-ACCAGATAGATGAGTCAATTTTTTTAGTAAAACATATAAAAATA

Homo sapiens 3'UTR GTTGCTAAATGT-----AGGACATCTTTTGGAGAAATAGTTTATGAGAAATAAAATTT  
Mus musculus 3'UTR ATTGCTAAACCT-----A-GGACATCTTTTGGAGTTAGAGTTTGGCA--TAAA--TG  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) TTTATTTTCAATGTAGGTAGAGGACA-GTTTTGTGT--GTCGTGTAATGCACCAAC--A

Homo sapiens 3'UTR TACTTGTTTTTACTATC-CTGTTAGAAGTATTTGTTTATCTCTGATAATTTTAAAGCAACA  
Mus musculus 3'UTR TAGTCACCATTAGTTTCTCTGCTGGAAGGA----CTTACCTTGGTAAATTTTAAAGCAGTG  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) CAG-CAATTTTA--ATC----ATAAACTA----TATGCACTGGCAAATTA--TCAATC

Homo sapiens 3'UTR TAGTAGTCTTAAAT-TACTTT-TGAATTC--TAATCTGTGAAGGAGTAAATGAAATAT  
Mus musculus 3'UTR TAATAGT--TCAAT-TA-TTCTCAGTTTC--TAACCTGTGAAGGAGTAAAGTAAATGGT  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) GAGTTATGCTCAATGTAGCTAATGTGTTTCCGTAGTTGCAAGGAGCATTACATACT

Homo sapiens 3'UTR CTGTTCTGCAACTGTTGAAACAATAATTTGGCTACATTGACCATAATTTAA---AGTTAAA  
Mus musculus 3'UTR CCCCTCTGCAACTACTGAAACAA---ATTAGTACATTGAGCATAAT-----TGATA  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) GCCTTC--CCAGGTTAGAACT---GTGGGGTA-ATTGAAC-TATTACACTGCCTTAAA

Homo sapiens 3'UTR ATTTTGCCAATGATGTACAGTTTTATGGTTAAAGTTGCTG-TGGTTGGTTGCATTACA--  
Mus musculus 3'UTR ATTTTGCCAATG-CATATAGTTTTATGATTAATAATGCTG-TGGTTGGTTGCATTACA--  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) ATTA---CTACGGGAAGTCCCTCCAGCAGAAAAGCTAATGTTGACTACATGATCACAAA

Homo sapiens 3'UTR -TGAC-ACAGAAAAC-TGTCCTCTACCTCACGTGAAATAAATATT-TTATATGTTTTTAC  
Mus musculus 3'UTR -TGAC-ACACAAAAC-TGTCCTCTACCTCACGTGAAATAAATATT-TTATATGTTTTTAC  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) CTCACAACCTAAAAGGTGTCTCT-----AGATTTAGCAATTAATCTAATGGGGTGTCT

Homo sapiens 3'UTR TA--AAAAAAGACTCATGT-ATCTGGTCACCTAGTTTACAAATTTTGAAT--TATATTT  
Mus musculus 3'UTR TAAAAAAAAGACTCATCT-ATCTGGTACTTAGTTTACAAATTTGGAT--TATATTT  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) CATGAGAATTACTTTAATGTGCTGTGCTTTCTTTATTTTCAAGTGAGGTATCTTATATTG

Homo sapiens 3'UTR ATTGAAACATGACATACTGTGCTCTGAGCTTATAC----CTCAATGTATTTTGTGCTG  
Mus musculus 3'UTR ATTGAAACATGACATACTGTGCTCTGGCTTATAC----CTCAATGTATTTTGGAGATG  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) AAGAAAAATCTTATAAATTTCTTTTATACTAACTAACTTTAAACACTATTTTGTTTTC

Homo sapiens 3'UTR TTTTCC--ATTTTC--ATGCCTGTA---AATACTTGATAGATTGTGGATCAAACTACT  
Mus musculus 3'UTR TTTGCC--ATTTTC--ATGCCTGTA---CATACTTGATAGATTG--GATGATATGCC  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) TGGGCTTAATTTTAAAATGTTTGTATTTGATCACTT-TCTA-ATTCAAAACAGTAGCA

Homo sapiens 3'UTR AAATA-AAAAC'TTTAATGCCAATT--AAATTTGATTCAAGTTAAAA-----  
Mus musculus 3'UTR CAATA-AAAAC'TTTAATGCCAATG--AAGTTGGTTCAAGTCATCTTGATATCAACTGC  
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) CTATATAAGACATTTAATCTATTTCTAAACAGCTTCAAATTTGATTT-ACATATTTTAA



```

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR TAACTTTCTGTTCCCTACGATGGACATTTTCCTTTTATTATTAGCAGGTCTGTTTC
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) AAGCATTTAAGT---GGGAAGATTA AAAAAGACTGTCCTTTTA---ACAAGT---TAC

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR TATGTGTGCGAATGCCTGCATGTGTGTATGTTT-ACCATGTGAATGGCT---GGTGCCTA
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) AAT---ACAAAATACCCATATATGCTTTTCTTCCAATAGTGGAAACGCTTAAGTATTTTA

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR CA-GAGGATGGAAGAGATG-GTTGTGAGGTGCCATGTGGGTGCCCGGAACGAACCAGCG
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) CACTAGAAAAAAAAGTTAAGCTCTGTTTAAATATCTCAGTTCACGAGTATAATAAG--

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR CCTTCTGCAATAGCAGGCACGTGCACTTAACTGCTCAACTCTCCCTCTAGCCCCAGTTTC
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) --TAATGC---AGCAGTTCATATCACAT-ATTGCTGATTGCTTCCATGAAACC--ATTAA

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR TCTGTACTTTATTACGCACATATTACAAGAAATATTTATTA AAAAATTCAAACCTTTTACC
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) CAAGTAGAT-----CCAAGTTCAGGAGCAGGGGTACAGCATGGACACAATCTGTCTGTC

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR AGAATTTTGTGGTTGTCCCGC-----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) AG---TTTGT-AATGTCTGCCCTAAAGGTTAAATGCATAACGGACAAGTAAAAACAAGC

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) ATCCTTCCCTACTCACTCAAAGCATAGCATGGTGGGCAGACCTTTT CAGAAGTGGATGAAA

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) ACCCTCAGGACTAGCTGTGCAGCTCTTGCTAGGGAAATACCTCGGGCAGCTTCTTATTA

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) CTTGTGCTTCCTTTTCATTTTGCTTTTCTGCAGACAGGAGCCACAGACACAGACTAAC

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) CAGTGTTCGGCGACTCTGGAGGGATGCAGGGACCTGCAACCAATGAGTTACTCACT

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) GTTTCACCGACTTCGGTCTGCTTTATAATCACTATGTACAAATCAGTTTTTTCATTACT

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) CCTTCCCACCCTGTACAAAAGATTTTACATATAAACAGCTTATATATTA AATATGTTAT

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) AAAATTAGCTCAAGAAGCATAAAACATCCTTATTTC AAAACACAAGAGATATAAGCGAA

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) AGACTAAACTTCAAAAATGGTAAAGCCCGAACCAAGCCTAAGTTGTTGGTAGAATCTCTC

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) AGTGCTGGGTCTCAGCTGTGGTTTGTTTAAAGCCTGCTTGACGGCAGCAGGAGCTTCCAC

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) ACTTAATACCTTTACACACGTGGTACAAAAGTCCCTCAGTGTGGACCATAGAGAAAAACCAT

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) CCAGAGCAAGCATCACTCTTCACTCAGTATAAAAAGCTAACGCCTGTGTCTTCCACTCCTA

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) AACACAGCTTTTCAGAGTAAATGGTCTCATTTCCCCCTAAACAGAGGATGGACTCCGAAG

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) GGAAATCTGCTTGCCAGTGAACCTTGGCACAGCACACGAGACCTAACACCAAAGCAAACC

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) TTAAGACAGCAACCAGCACACAAGCAAGCATGCACAAGTAAGCTTCCATGGGTATTT

Homo sapiens 3'UTR -----

```

```

Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) TAGCAGAGGTCACTTGTGGAGGAGTACAGAATTTCAAAGTTGGTTTTCAAGCTATATGGT

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) GCAATGTAAATTAAGTTACTTTCAACAGTAGGAGATATGATATTTACAGCTGATTAATA

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) ATTACTTTAAAGGAAGTTTAGACAGAAAATGATGGCACATCATTTTCATCTTCTGGAAAGT

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) GAAGACTACGCTCAACAATGTCACGAGGCAAGTTTCATCAAGACTAGAAAAATCACACTT

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) ACTAAGCAGCACATAAGCAGAACACTTCTGTCCAGAAAAATAAATGGTCAAGTCTTGAG

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) TCTGCCTCCCACACAGCCAAGCACAATGAACTGACATCTAAGCTAATGCTATTTTACAAA

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) CGCCTGTGGTTTCCTTCTCCAGAGCTAAATAAAATGACATATATGGTCCCTGTGCCACTT

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) AACATGTTTCTCCCAAGGAGTTTACAAAAGTCAATACATAAATATAGAACATAGCAGAA

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) TAAAACCACATTTAGGTCAATATATTTAGGAAACAAACTCCCTTTTGGAAAGTAGAAA

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) AATTGCCTTAGACATCAGTATCATAACACAAAGTATGACCATAACAGGTGTGATAACTCT

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) GGTGTCTCACAGCGGGGAGGACAGTGCAGCCGTTTCCTTAAGTTATTCCTTAACGAG

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) ATCTCAGTCACTGCATGTAGTACCATGAGACAGCTCGGGACACATGAAACAGAAGATAA

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) TGCCACAGTGCTTTTCAGGGACATCCCAAAAGAACTGCACAGGGCCAGCGGTGGTGGGGC

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) TCATCCTGCCAACCAACACTTGGGAGACAGAGGCAAGAGGGTCTCTGCAAGCTGGAGAC

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) CAAACAGAACAAAAACAACAAGTACAAAGTTGCTAAGAATTTCCCTAGTAAATCCCAA

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) GCCAACCATCTAGTAATGTGAAATTCGATGGTAAAAATGTCAGACTTCATGTGCAAAAAA

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) CAAAACAAAGAAAAGTGCAGAGGCTGCCCTTCCCAAATCACGGAATTCATGTTCATCTA

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) CAATTCCTGCTCCTAGCAGATACTCCCACTGTGGATTATTAACCTATCACATTTTCTTAG

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) CTGACTGTAAATTCCTGATTTTAAAGATCAAAGAGTCATCATGGTCCATTTGTGCAAGTTT

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed) TAAGATAACATTTAAACATACAAAAGTCCAAAACAATATTTAAGATATTTAGTATTTTAT

Homo sapiens 3'UTR -----
Mus musculus 3'UTR -----

```

```

Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)  AATTTAAAAGAAAAATCCATTATATAAAATTCATAAGACCTTTGTAAGACTACATATAA
      Homo sapiens 3'UTR  -----
      Mus musculus 3'UTR  -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)  AAACTGTACAGAGCATTGTGAGTTACATAGGAAGCGGTGTCGGTCCGTGGGAATCCACTTT
      Homo sapiens 3'UTR  -----
      Mus musculus 3'UTR  -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)  CCTCATGCACATGAATGAGTACTTCACACCTCTATTAACAGGAAAAGTTCGGAAAGCATT
      Homo sapiens 3'UTR  -----
      Mus musculus 3'UTR  -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)  TTAATTTTCTGAAGTCACACACACATATCTAGCTATGGTCACTCTTAAACAGAAAGACAA
      Homo sapiens 3'UTR  -----
      Mus musculus 3'UTR  -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)  ATTACAACCTGCTTCTTGTGTACCATCAGAGCACAGCAAAGTGTGCCCAACCCACCCGCG
      Homo sapiens 3'UTR  -----
      Mus musculus 3'UTR  -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)  TGTATGTGGGGAGGTGCTACTAGCATTTTCATCAGGAAAACCTCCTTAGGAGGAACCAG
      Homo sapiens 3'UTR  -----
      Mus musculus 3'UTR  -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)  AGGAAACTCATCTGCAACCTGAACAAAGTAACAACAGGCTGGGTGTATAAAAGTCAAGA
      Homo sapiens 3'UTR  -----
      Mus musculus 3'UTR  -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)  GATTCTGTAATGAGAAGGCTCCAGAGTGAGTAGCTTTGTATCATAAACATTACCTGTATA
      Homo sapiens 3'UTR  -----
      Mus musculus 3'UTR  -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)  TCTACGGTCGGTCGAGCCTGAAGCAATGCATAAGAAAAGCTGACACAGGTACTTCCCACCA
      Homo sapiens 3'UTR  -----
      Mus musculus 3'UTR  -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)  CAGGATGCTGCTTTGGAAAAGTGAAGTGTAGAAATACAGGCAGACTGCCTACGGTTCAA
      Homo sapiens 3'UTR  -----
      Mus musculus 3'UTR  -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)  ACTACATAGGTTATTTATTACCAAGCCAAGTGGAAAAGTACAAGGAGCATACATTTTCA
      Homo sapiens 3'UTR  -----
      Mus musculus 3'UTR  -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)  TTCATTTGGAAATGGAAAAATCTGTATTAATATATAATCTTCACTTTTGCTGCCCTATA
      Homo sapiens 3'UTR  -----
      Mus musculus 3'UTR  -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)  AATGAACAGAATGCCTAGCTACCTTCATGCAAGTAAGATGTTAGAATTCAATTTTCAAG
      Homo sapiens 3'UTR  -----
      Mus musculus 3'UTR  -----
Rattus norvegicus 3'UTR (reversed)  CAAGTGACAAACATGAAGTCTGCCAACCAACACAGGCGGTCTCCTCTTCCGC

```

**Tabla 5. Primers utilizados en este trabajo.**

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Sentido</b>	<b>Característica</b>
<b>GeneRacer 3' Primer (Invitrogen)</b>	5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3'	Antisentido	
<b>GeneRacer Oligo dT Primer (Invitrogen)</b>	5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T) <sub>24</sub> -3'	Antisentido	Se une a cola polyA
<b>fw1 skil</b>	5'-GGCGGTCTAGAAACTGTAAAGAGA-3'	Antisentido	Sitio <i>Xba</i> I
<b>H075</b>	5'-CTTCTGCTGTATCCCAGTCTA-3'	Sentido	
<b>rv10 skil</b>	5'-GGCGGGCTGACCTATACAAGTTATTTAC-3'	Antisentido	Sitio <i>Sal</i> I
<b>fw4 CDS skil</b>	5'-AACTGAGGCAGAGATTGGACCA-3'	Sentido	
<b>rv skil</b>	5'-GGCTTGTCGACGATACGCTACGTA-3'	Antisentido	Sitio <i>Sal</i> I

La posición en la secuencia está basada en Ref Seq NM\_001248008.1.

Fw2 skil+Rv skil: no amplifica.

**Fw1 skil+Rv skil: amplifica.**

Fw4 CDSskil + Rv skil: no amplifica.

**Fw4 CDSskil+rv10skil: amplifica.**

**Fw1 skil+ rv 10 skil: amplifica (en plásmido).**

Fw2 skil+ rv10 skil: no amplifica.