

Diseño *in silico* de un vector de expresión que contiene un poli-miR-122 para el tratamiento del hepatocarcinoma por terapia génica

Montaño Samaniego Mariela¹, Peralta-Zaragoza Oscar², Oseguera Guerra Berenice¹,
Ibáñez Hernández Miguel¹

¹Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Escuelas Biológicas, Departamento de Bioquímica.
Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n
Colonia Santo Tomás, México D.F. CP 11340.

²Instituto Nacional de Salud Pública, Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas,
Dirección de Infecciones Crónicas y Cáncer. Av. Universidad 655
Santa María Ahuacatlán. Cuernavaca, Morelos, México. CP 62100.

mariela.mont3091@gmail.com

Fecha de aceptación: 12 de agosto de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

El uso de microRNAs (miRNAs) en terapia génica, ha surgido como una poderosa herramienta para la regulación de genes implicados en enfermedades genéticas adquiridas como el cáncer, con lo que se pretende diseñar tratamientos que eliminen selectivamente a las células cancerosas. El miR-122 es específico de hígado y el más abundante en este órgano, se ha demostrado su función como supresor de tumores, pues participa en la represión de algunos genes implicados en el proceso de tumorigénesis. Se sabe que los niveles de este miRNA se encuentran significativa y específicamente disminuidos en el hepatocarcinoma (HCC). Por tal motivo, en este trabajo se diseñó una construcción genética que contiene un poli-miR-122, regidos bajo el promotor de la α -fetoproteína (AFP), que está activo exclusivamente en las células de este carcinoma. Con esta construcción genética, se pretende dirigir la expresión únicamente en las células del HCC y por tanto, su eliminación selectiva, sin afectar a los hepatocitos sanos.

Palabras clave: terapia génica, microRNA, miR-122, hepatocarcinoma, promotor AFP.

ABSTRACT

Use of microRNAs (miRNAs) in gene therapy has emerged as a powerful tool for regulation of genes involved in genetic diseases such as cancer, with which it is intended to design treatments selectively eliminating cancer cells. The miR-122 is a liver-specific miRNA and the most abundant within this organ from which has been shown to function as a tumor suppressor since it participates in the repression of some genes involved in the tumorigenesis process. It is known that levels of this miRNA decrease significant and specifically in hepatocellular carcinoma (HCC). In this work it was designed a genetic construct containing poly-miR-122 governed under the α -fetoprotein promoter (AFP), which is active exclusively in this carcinoma cells. With this construction it is intended to direct the expression only in HCC cells and to eliminate them selectively.

Key words: gene therapy, microRNA, miR-122, hepatocellular carcinoma, AFP promoter.

INTRODUCCIÓN

El hepatocarcinoma (HCC) es la sexta neoplasia más común y la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo (GLOBOCAN 2012, IARC). Actualmente, los tratamientos contra el HCC han resultado insuficientes en el mejoramiento de la calidad de vida y supervivencia de los pacientes con este tipo de neoplasia maligna. La terapia génica contra el cáncer, es un campo emergente que busca diseñar procedimientos que eliminen selectivamente las células cancerosas. Esta técnica terapéutica consiste en la inserción de un gen funcional en las células de un paciente, para corregir un defecto genético, causante de una determinada enfermedad. Dentro de este campo, el uso de microRNAs (miRNAs) ha surgido como una poderosa herramienta para la regulación de genes implicados en enfermedades genéticas adquiridas como el cáncer. El miR-122 es específico de hígado y el más abundante en este órgano, se ha demostrado su función como supresor de tumores pues participa en la represión de la traducción de algunos genes implicados en la regulación de la proliferación celular y en el proceso de tumorigénesis (Gramantieri *et al.*, 2007; Jacob *et al.*, 2004).

Se sabe que los niveles del miR-122 se encuentran significativa y específicamente disminuidos en el HCC (Kutay *et al.*, 2006), mientras que su sobreexpresión, reduce las propiedades cancerígenas en líneas celulares de este tipo de cáncer (Bai *et al.*, 2009). Debido a esto, se ha puesto especial interés en el uso de este miRNA, bajo distintos métodos de expresión inducida, para el tratamiento del HCC (Tsai *et al.*, 2012; Hsu *et al.*, 2013). Sin embargo, estos métodos también requieren de dosis repetidas del tratamiento, con ciertos efectos adversos como, inflamación y dolor en el sitio de administración, además de tener igualmente, restricciones de aplicación en determinados tipos de cánceres, como son aquellos con múltiples crecimientos tumorales, que son difíciles de tratar.

Para llevar a cabo la terapia génica, el material genético a introducir en el organismo debe superar diversas barreras para llegar al núcleo y lograr su expresión, para lo cual se requiere de los denominados vehículos genéticos. A pesar de los logros que se han conseguido en el desarrollo de éstos, aún resta por superar la falta de especificidad tisular cuando se administran por vía sistémica, como en la aplicación en los casos de HCC que no pueden ser tratados de otra manera.

En este trabajo, se diseñó una secuencia poli-miR-122 para utilizarla en una construcción genética, y cuya expresión está regida por el promotor de la α -fetoproteína (AFP), para su empleo en el tratamiento específico contra células del HCC. Con esta construcción, se pretende dirigir la expresión únicamente en células tumorales, ya que el promotor del gen de la AFP, activo normalmente solo en la etapa fetal, se reactiva en el 80% de los casos de HCC (Saffroy *et al.*, 2007), por lo que se espera que la secuencia poli-miR-122 se exprese en células de HCC sin afectar a los hepatocitos sanos, ya que no tienen activo este promotor debido a la falta de los factores de transcripción.

Se pretende aplicar esta construcción genética diseñada, primero, en ensayos *in vitro* en líneas celulares de HCC y, posteriormente, *in vivo* en un modelo murino, donde se espera la inhibición o detención de la proliferación de células del HCC y/o del tumor, sin causar daño alguno a los hepatocitos sanos. Con lo anterior se proyecta el desarrollo de una estrategia terapéutica segura y específica para el tratamiento del HCC.

METODOLOGÍA

Se diseñó una secuencia de polimiR-122, la cual consiste en cadenas específicas correspondientes al precursor del miR-122 (pre-miR-122). Se asignó una región de 15 nucleótidos (nt) como separación entre cada pre-miRNA. Además, se le insertó una secuencia AGATCT en el extremo 5' y GAATTC en el 3', los cuales son sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción Bgl II y Eco RI, respectivamente, para su posterior clonación en un vector. A dicha secuencia (un total de 213 nt), se le

realizó un análisis de predicción de la estructura secundaria con ayuda del Servidor Web mfold (Zuker, 2003), del Instituto de RNA de la Universidad del Estado de Nueva York en Albania.

Por otra parte, se diseñó el plásmido recombinante empleando el programa Vector NTI Advance, a partir del vector de expresión pIRES2-EGFP (BD Clontech), al cual se le removió el promotor del CMV y se le insertó el promotor de la AFP. Posteriormente, se diseñó el plásmido recombinante completo pIRES2-APF-poli-miR-122-EGFP, que contiene al promotor tumor-específico de la AFP y la secuencia diseñada de poli-miR-122.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secuencia de poli-miR-122 diseñada, la cual consiste en cadenas específicas correspondientes al pre-miR-122 de 57 nt cada una, colocadas en tándem, con modificaciones para la eliminación de bases complementarias en la zona de formación de la horquilla, para obtener la estructura característica de tallo-asa, que tienen todos los precursores de miRNAs. Se asignó una región de 15 nucleótidos (nt), como separación entre cada pre-miRNA, con la finalidad de facilitar el espacio para la formación de la estructura secundaria de tallo-asa al momento de la transcripción, visualizando a futuro, que dicha construcción sea aplicada. Además, se insertó una secuencia AGATCT en el extremo 5' y una GAATTC en el 3', las cuales son sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción Bgl II y Eco RI, respectivamente, para que pueda ser insertado posteriormente en el sitio de multiclonación en el vector de expresión y dar direccionalidad a la clonación (Tabla 1). El resultado del análisis de predicción de la estructura secundaria de la secuencia poli-miR-122, muestra la formación de las tres estructuras de tallo-asa, correspondientes a cada cadena de pre-miR-122. Cabe resaltar que para el análisis de esta secuencia de RNA, se insertó un fragmento del exón del gen de la AFP de 24 nt en el extremo 5', debido a que la transcripción de este gen comienza antes de terminar la secuencia del promotor, por lo que dicho exón se sobrepone a la región de su promotor y el transcrito final del gen de interés, regido por este promotor, incluirá dicha secuencia. El valor del ΔG del análisis de predicción obtenido, de la secuencia analizada, fue negativo, lo que indica que la formación de estructuras de tallo-asa se realizará de forma espontánea (Figura 1).

Tabla 1. Diseño de la secuencia poli-miR-122. Consiste en 3 cadenas específicas del pre-miR-122 (resaltadas en rosa), con 15 nt de separación entre ellas (en gris) y sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción Bgl II y Eco RI (subrayados).

GGAAGAUCUUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGACUAUAUAACAAACGCCAUUAUCACACUAAAUA CUCAAUAGAAGAUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGACUAUAUAACAAACGCCAUUAUCACACUAAAUA CAACUCAAUAGAAGAUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGACUAUAUAACAAACGCCAUUAUCACACUAAA UAGAAUUCGG	
hsa-miR-122a	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG * secuencia madura del miR-122

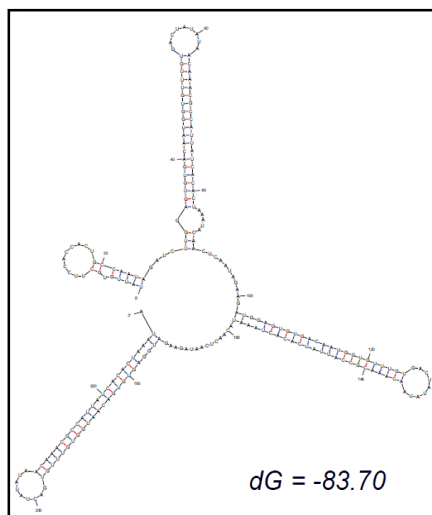


Figura 1. Análisis de predicción de la estructura secundaria de la secuencia de poli-miR-122. Se muestra el valor negativo del ΔG .

Por otra parte, se diseñó el plásmido recombinante empleando el programa Vector NTI Advance de Invitrogen, este diseño se hizo a partir del vector de expresión pIRES2-EGFP (BD Clontech). Dicho plásmido tiene la característica de poder emplearse como vector de expresión bicistrónico, debido a que contiene en su secuencia, al promotor fuerte del citomegalovirus (CMV), seguido del sitio de multiclonación, donde se puede insertar el gen de interés. Además, cuenta con una región IRES (sitio interno de unión al ribosoma), que precede al gen de la proteína verde fluorescente (GFP) y que es utilizado como gen reportero.

Para la construcción del plásmido recombinante, al plásmido original se le removió el promotor del CMV y se le insertó el promotor de la AFP. Posteriormente, se procedió a insertar la secuencia del poli-miR-122, para obtener finalmente el plásmido recombinante completo pIRES2-AFP-polimiR-122-EGFP de 5174 pb (Figuras 2 y 3).

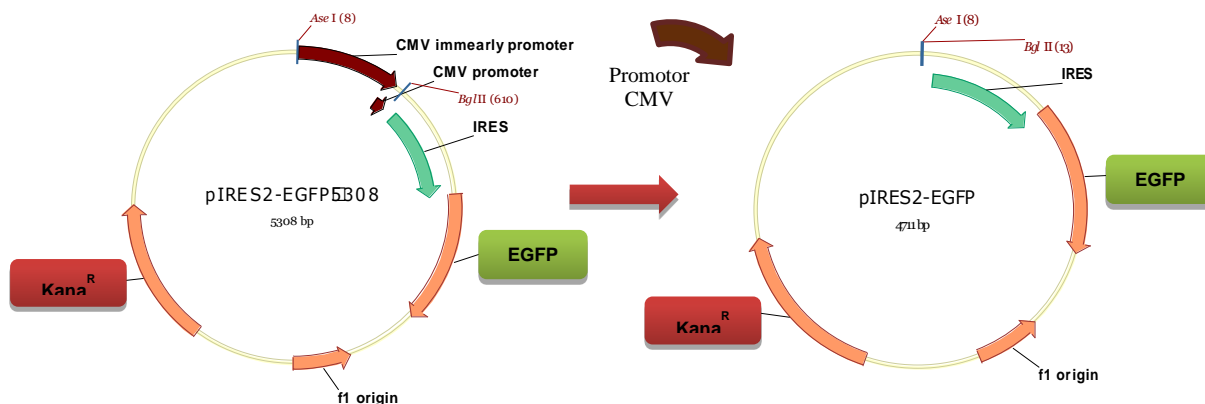


Figura 2. Plásmido original pIRES2-EGFP (5308 pb). Contiene el promotor del CMV, la región IRES2, la EGFP y el gen de resistencia a la kanamicina. Se muestra la eliminación del promotor del CMV (603 pb) y el plásmido resultante de 4711 pb.

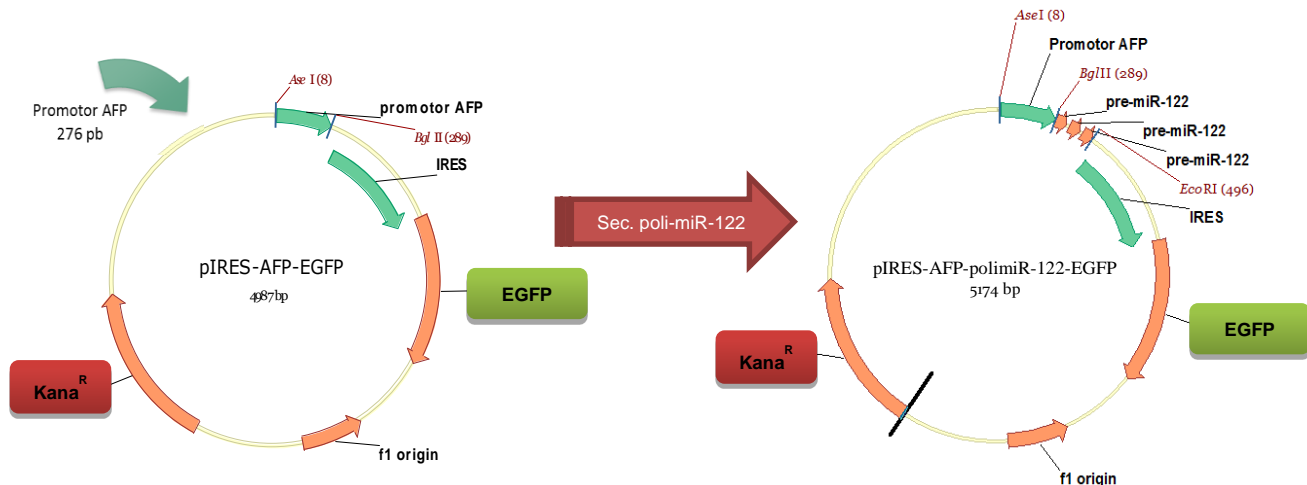


Figura 3. Diseño del plásmido recombinante pIRES2-AFP-polimiR122-EGFP. Inserción del promotor de la AFP (276 pb) y formación del plásmido recombinante pIRES2-AFP-EGFP (4987 pb). Inserción de la secuencia de poli-miR-122 y obtención del plásmido recombinante completo pIRES2-AFP-polimiR-122-EGFP (5174 pb).

El uso de construcciones genéticas para terapia génica, que expresen a varios genes de RNAi de manera simultánea, se justifica por ser más efectivas que aquellas en las que se expresa un solo gen (Castanotto y Rossi, 2009), además, permite una mayor expresión y permite una reducción del número de dosis durante el tratamiento.

De manera natural, existen miRNAs que se encuentran en el genoma humano formando grupos, que se expresan de manera coordinada, mediante la síntesis de un transcrito policistrónico que se fragmenta para dar lugar a la producción de múltiples miRNAs, desde una sola unidad transcripcional (Bartel, 2004). Por lo anterior, se espera que la secuencia poli-miR-122 de la construcción genética diseñada, sea procesada por la vía normal de biogénesis de los microRNAs (Han *et al.*, 2004; Bohnsack *et al.*, 2004; Chimari *et al.*, 2009), cuando sea aplicada para el tratamiento específico del HCC, tanto *in vitro* como *in vivo*.

CONCLUSIONES

Se realizó la construcción del plásmido recombinante pIRES2-AFP-polimiR-122-EGFP *in silico*, que contiene un poli-miR-122, regido bajo el promotor de la α -fetoproteína (AFP), para su empleo posterior en el tratamiento específico contra el HCC. La predicción revela que el transcrito primario cuenta con estabilidad termodinámica, lo que indica que puede funcionar en el tratamiento específico contra las células cancerosas.

REFERENCIAS

- Bai S., Nasser M. W., Wang B., Hsu S. H., Datta J., Kutay H. *et al.* (2009). MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J Biol Chem*, 284: 15-27.
- Bartel D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-297.
- Bohnsack M., Czaplinski K., Gorlich D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10: 185-191.
- Castanotto D., Rossi J. J. (2009). The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*, 457: 426-433.

Chimari O., Eiki Y., Soo Jae L., Satoshi S., Jun K., Atsushi N., Tomitake T. (2009). A High-Resolution Structure of the Pre-microRNA Nuclear Export Machinery. *Science*, 326: 1275-1279.

GLOBOCAN, International Agency for Research on Cancer (IARC). (2012). Population facts sheets. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Recuperado el 23 de enero de 2015, de: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx

Gramantieri L., Ferracin M., Fornari F., Veronese A., Sabbioni S. *et al.* (2007). Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 67: 6092-6099.

Jacob J. R., Sterczer A., Toshkov I. A., Yeager A. E., Korba B. E. *et al.* (2004). Integration of woodchuck hepatitis and N-myc rearrangement determine size and histologic grade of hepatic tumors. *Hepatology*, 39: 1008-1016.

Kutay H., Bai S., Datta J., Motiwala T., Pogribny I. *et al.* (2006). Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem*, 99: 671-678.

Han J., Lee Y., Yeom K. H., *et al.* (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*, 18: 3016-3027.

Hsu S. H., Yu B., Wang X., Lu Y., Schmidt C. R. *et al.* (2013). Cationic lipid nanoparticles for therapeutic delivery of siRNA and miRNA to murine liver tumor. *Nanomedicine*, 9: 1169-1180.

Zuker M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 31: 3406-3415.

Robinson V. L. (2009). Rethinking the central dogma: Noncoding RNAs are biologically relevant. *Urol Oncol*, 27: 304-306.

Saffroy R., Pham P., Reffas M., Takka M., Lemoine A., Debuire B. (2007). New perspectives and strategy research biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Clinical Chemical Laboratory Medicine*, 45: 1169-1179.

Tsai W. C., Hsu S. D., Hsu C. S., Lai T. C., Chen S. J., Shen R., Huang Y. *et al.* (2012). MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J. Clin Invest*, 122: 2884-2897.