

## Diseño y construcción de una secuencia esponja anti-miR-33 dirigida a hepatocitos para terapia génica contra la hipercolesterolemia

Sánchez-Cedillo Jorge<sup>1</sup>, Oseguera Guerra Berenice<sup>1</sup>, Alarcón-Hernández Ernesto<sup>1</sup>,  
Peralta-Zaragoza Oscar<sup>2</sup>, Ibáñez-Hernández Miguel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorios de Terapia Génica y Genética Molecular, Dpto. Bioquímica, ENCB-IPN, Prol. Carpio y Plan de Ayala s/n. Santo Tomas, Del, Miguel Hidalgo, México, D.F. CP 11340.

<sup>2</sup>Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública. Av. Universidad 655, Santa María Ahuacatlán. Cuernavaca, Morelos, México, CP. 62100.

sanchez20890@gmail.com

Fecha de aceptación: 13 de agosto de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

### RESUMEN

La aterosclerosis es actualmente un problema de salud y la principal causa de muerte en México y a nivel mundial, debido a los malos hábitos alimenticios y al estilo de vida. El microRNA-33 (miR-33) juega un papel importante en el metabolismo de lípidos, ejerce una regulación negativa en varios transportadores ABC, incluyendo ABCA1 y ABCG1, que están involucrados en el transporte del colesterol y favorecen el aumento en la síntesis de las lipoproteínas HDL en los hepatocitos. En este trabajo se diseñó una construcción genética que contiene una secuencia esponja específica anti-miR-33 para expresarse exclusivamente en hepatocitos. El análisis *in silico* de la secuencia esponja anti-miR-33 mostró 2 diferentes formas de interacción del miR-33 con cada sitio de unión de la esponja anti-miR-33, una de forma parcial y una complementaria, y puede ser blanco de otros miRNAs pero principalmente y con mayor fuerza con los miR-33a y miR-33b. Esto indica que la secuencia esponja anti-miR-33 puede reprimir la acción del miR-33, lo que podría disminuir el riesgo aterogénico.

**Palabras clave:** aterosclerosis, terapia génica, esponja anti-miR-33, miR-33, colesterol, HDL.

### ABSTRACT

Atherosclerosis is currently a health problem and the leading cause of death in México and worldwide, due to poor eating habits and lifestyle. The microRNA-33 (miR-33) plays a role in lipid metabolism, exerts a negative regulation on several ABC transporters, including ABCA1 and ABCG1, which are involved in cholesterol transport and favor an increase in the synthesis of HDL hepatocytes. In this work was designed a genetic construct containing a sequence specific sponge anti-miR-33 is expressed exclusively in hepatocytes. The *in silico* analysis of sequence sponge anti-miR-33 showed two different ways of interaction with miR-33 binding site each sponge anti-miR-33, and a partially complementary, and it can be targeted by multiple miRNAs but mainly of miR-33a and miR-33b more strongly, this indicates that the sequence sponge anti-miR-33 can suppress the action of miR-33, reducing atherogenic risk.

**Key words:** atherosclerosis, gene therapy, sponge anti-miR-33, miR-33, cholesterol, HDL.

## INTRODUCCIÓN

La aterosclerosis es la principal causa de muerte en México y a nivel mundial, y el número de personas que la sufren va en aumento, debido a los malos hábitos alimenticios y al ritmo de vida.

La aterosclerosis es una enfermedad de las arterias en la cual el material graso, principalmente colesterol, se deposita en la capa íntima de estos vasos sanguíneos (ateromas) y ocasiona un deterioro progresivo y una reducción del flujo sanguíneo en las arteriolas lo que puede desencadenar en un infarto. Se ha demostrado que el desbalance entre el aumento del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) y la disminución del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) en el plasma, desencadena la formación de ateromas (Asztalos, 2004).

En la membrana celular se encuentran los transportadores ABCA1 y ABCG1, que están involucrados en el transporte del colesterol al exterior de cualquier tipo de célula y favorecen el aumento en la síntesis de las HDL en los hepatocitos, por lo que una deficiencia de estos transportadores promueven una aterosclerosis acelerada (Movva y Rader, 2008).

Los microRNAs son secuencias cortas de RNA de 22 nucleótidos y tienen un papel importante en la regulación de diversas vías metabólicas, tal es el caso del microRNA-33 (miR-33) que juega un papel importante en el metabolismo de lípidos, ejerce una regulación negativa en varios transportadores ABC, incluyendo ABCA1 y ABCG1 (Martínez-González, 2011). Hay 2 miembros de esta familia llamados miR-33a y miR-33b, que están localizados en regiones intrónicas de 2 genes que codifican para las proteínas SREBP-2 y SREBP-1 respectivamente. Se han realizado estudios de terapia génica para inhibir la función del miR-33, mediante el uso de RNA antisentido, observándose un aumento en las HDLs y la disminución de los niveles de colesterol en el plasma en ratones (Dell'Oca y Stoll, 2014).

La terapia génica es una técnica experimental que usa los ácidos nucleicos para el tratamiento o prevención de enfermedades genéticas. Para llevar a cabo la terapia génica, el material genético debe superar diversas barreras celulares para poder llegar al citoplasma e introducirse al núcleo para su correcta expresión. En este sentido, el uso de liposomas catiónicos, como vehículos genéticos, se justifica por su preparación simple, porque interactúan al 100% con el material genético de interés, por su capacidad de transfectar una gran variedad de líneas celulares y por presentar una baja inmunogenicidad, lo que permite su aplicación segura *in vivo* (Farhood *et al.*, 1995).

Los liposomas catiónicos son ideales para transferir un gen terapéutico que contenga un promotor órgano-específico para dirigir la expresión genética solamente en las células blanco en donde sea activo el promotor. La enzima fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK), es una enzima que cataliza la conversión irreversible del oxaloacetato a fosfoenolpiruvato, un importante paso inicial y específico de la gluconeogénesis hepática, por lo que el promotor PEPCK, que regula la transcripción de ese gen, es "exclusivamente" funcional en células hepáticas (Pérez-Mendoza, *et al.*, 2012).

Por lo que en este trabajo se diseñó una construcción genética compuesta de una secuencia esponja específica anti-miR-33 regida bajo el promotor PEPCK que se exprese exclusivamente en hepatocitos, para aumentar los niveles de los transportadores ABCG1 y ABCA1, permitiendo una reducción en los niveles de colesterol en plasma y, a su vez, incrementar la síntesis de las HDL, para reducir el riesgo aterogénico.

## OBJETIVO

Diseñar y construir una secuencia esponja anti-miR-33, regida bajo el promotor de la enzima fosfoenolpiruvato carboxicinas, específico de hígado.

## METODOLOGÍA

Se realizó el diseño de una secuencia esponja anti-miR-33 por el método de Kluiver (Kluiver *et al.*, 2012), a la cual se le introdujeron 2 sitios de unión para el miR-33. Se le colocaron sitios de enzimas de restricción diferentes en cada extremo, para darle direccionalidad a la clonación

Con el análisis bioinformático se seleccionó una secuencia de 100 nucleótidos, debido a limitaciones de longitud de las secuencias en los programas utilizados, que incluyó un fragmento del promotor PEPCK a partir del sitio de inicio de la transcripción, la secuencia esponja anti-miR-33 y un fragmento de la región IRES, para obtener el fragmento de mRNA funcional y poder realizar el análisis de funcionalidad de la secuencia esponja anti-miR-33. Se analizó mediante los softwares PITA y STarMiR, para posteriormente realizar la síntesis automatizada en el IBT de la UNAM. Los oligonucleótidos obtenidos se analizaron por electroforesis de poliacrilamida para verificar la correcta formación del dúplex de DNA. Además, se realizó el diseño de los iniciadores para amplificar el fragmento del promotor PEPCK mediante el software VectorNTI Advance® de Invitrogen, a los cuales se les introdujeron dos sitios de restricción de las enzimas de Ase I y Bgl II, se amplificó el promotor PEPCK por PCR a partir del plásmido pPEPCK-hGH y se realizó la construcción del plásmido recombinante pPEPCK-IRES2-EGFP. La secuencia esponja anti-miR-33, regida bajo el promotor PEPCK, se utilizará para insertarla en el vector de expresión pIRES2-EGFP y formar el plásmido recombinante pPEPCK-anti-miR-33-IRES2-EGFP.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

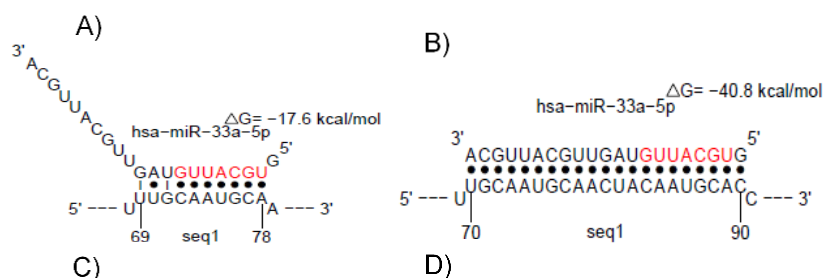
El diseño de la secuencia esponja, de acuerdo a Kluiver y colaboradores, se realizó tomando en cuenta los 2 sitios antisentido de unión al miR-33 y también sitios de corte para las enzimas de restricción Sac I y Xma I (Figura 1), para controlar la direccionalidad en la clonación y asegurar la correcta expresión (transcrito) de la secuencia esponja.

Diseño de la secuencia esponja antimir-33	
3'-ACGUUACGUUGAUGUUACGUG-5'	miR-33a
Secuencia oligonucleótido dúplex microRNA esponja antimir-33	
5'-AGATCTTGCAATGCAACTACAATGCACAATTGCAATGCAACTACAATGCACCCCGGG-3'	
3'-TCTAGAACGTTACGTTGATGTTACGTGTTAACGTTACGTTGATGTTACGTGGGGCCC-5'	
SacI	XmaI
<p style="text-align: center;"> <span style="margin-right: 100px;">Sitio antisentido 1 de unión a miR-33</span>                 Sitio antisentido 2 de unión a miR-33             </p>	

**Figura 1.** Diseño de la secuencia esponja anti-miR-33.

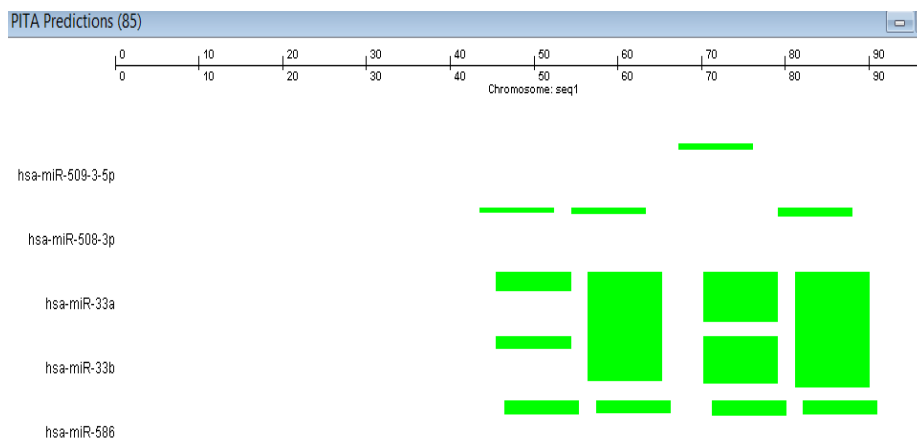
El análisis bioinformático con el software online StarMiR, arrojó 2 diferentes formas de interacción del miR-33 en cada sitio de unión de la esponja anti-miR-33, una de forma parcial y una complementaria. En el primer sitio de unión se muestran 2 formas diferentes de interacción, una de forma parcial con un  $\Delta G = -22.4$  kcal/mol y la segunda interacción de forma complementaria con un  $\Delta G = -41.6$  kcal/mol en el sitio antisentido 1. En el sitio antisentido 2, se mostró un comportamiento similar, una interacción parcial con un  $\Delta G = -17.6$  kcal/mol y una complementaria con un  $\Delta G = -40.8$  kcal/mol (Figura 2). Los valores negativos de  $\Delta G$  indican que la interacción entre el miR-33 y los sitios antisentido sería fuerte, lo que

significa que existe una gran posibilidad que se lleve a cabo la interacción con una alta funcionalidad para atrapar al miR-33.



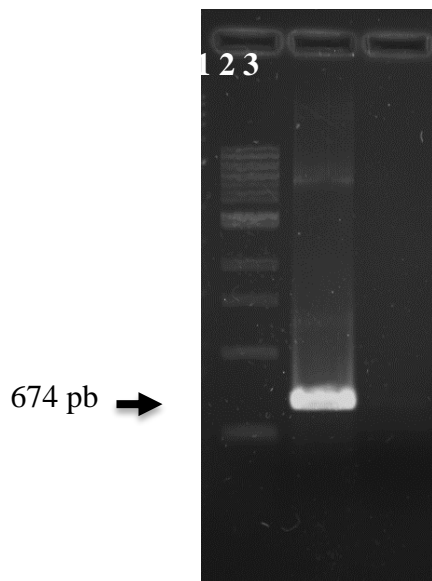
**Figura 2.** Análisis de funcionalidad de la secuencia esponja anti-miR-33 con el software online StarMiR. A) y B) Corresponden a la interacción del miR-33 con la 1ra secuencia de la esponja. C) y D) Corresponden a la interacción del miR-33 con la 2da secuencia de la esponja.

En el análisis bioinformático con el software PITA, se encontró que la secuencia esponja anti-miR-33 se puede unir parcialmente con otros miRNAs, en ambos sitios antisentido, pero la unión con mayor fuerza se presenta con los miR-33a y miR-33b. Por lo que la secuencia esponja diseñada podría ser muy efectiva como secuencia específica anti-miR-33 para bloquear el efecto de los miR-33a y b en los hepatocitos (Figura 3).



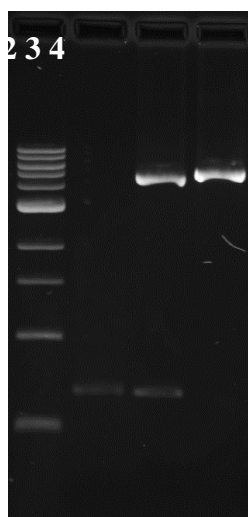
**Figura 3.** Análisis de la especificidad de la secuencia esponja anti-miR-33 con el software online PITA. Se observa la interacción con mayor fuerza de los miR-33 a los dos sitios de la esponja anti-miR-33.

Para la amplificación del promotor PEPCK, se diseñó el iniciador sentido 5'-CGCATTAATGCTTACAATCACCCCTCCC-3', con sitio de corte para la enzima Ase I y el iniciador antisentido 5'-AATAGATCTCAGAGCGTCTCGCC-3', con sitio de corte para la enzima Bgl II. Los iniciadores se analizaron con el software en línea OligoAnalyzer3.1 de Integrated Technologies DNA, para los parámetros fisicoquímicos y se encontró que no forman homodímeros y heterodímeros que afecten el desarrollo de la PCR para la amplificación del fragmento del promotor PEPCK. Por BLAST se obtuvo la especificidad que fue del 100% de identidad con la secuencia del promotor PEPCK. Se realizó la extracción y purificación del plásmido pPEPCK-hGH, con lo que se amplificó el promotor PEPCK (674 pb) (Figura 4). También se purificó el plásmido pIRES2-EGFP que se utilizará para la inserción del promotor PEPCK y de la secuencia esponja anti-miR-33 y poder obtener el plásmido recombinante pPEPCK-anti-miR-33-IRES2-EGFP.



**Figura 4.** Electroferograma de la amplificación del promotor PEPCK. 1.- Marcador de tamaño molecular, 2.- Promotor PEPCK, 3.- Control negativo.

Se realizó la digestión del plásmido pIRES2-EGFP con las enzimas Ase I y Bgl II, para la eliminación del promotor fuerte del citomegalovirus e insertar el promotor PEPCK para obtener el plásmido recombinante pPEPCK-IRES2-EGFP. Se comprobó la construcción de este plásmido recombinante mediante restricción enzimática con las enzimas Ase I y Sac I. El sitio de restricción de la enzima Sac I se encuentra en el sitio de multiclonación inmediatamente posterior al sitio de reconocimiento de Bgl II, liberándose un fragmento de 676 pb, lo que coincide con el tamaño indicado en el diseño con el software VectorNTI Advance® de Invitrogen y de similar desplazamiento electroforético con el amplificado del promotor PEPCK (674 pb) (Figura 5).



**Figura 5.** Electroferograma de la restricción enzimática del plásmido pPEPCK-IRES2-EGFP. 1.- Marcador de tamaño molecular, 2.- Promotor PEPCK, 3.- plásmido pPEPCK-IRES2-EGFP digerido con Ase I y Sac I. 4.- plásmido pPEPCK-IRES2-EGFP con Ase I.

## CONCLUSIONES

El análisis *in silico* de la secuencia esponja anti-miR-33 indica que puede ser funcional para reprimir la actividad del miR-33, para utilizarlo en el tratamiento contra la hipercolesterolemia por terapia génica.

## REFERENCIAS

Asztalos B. F. (2004). High-density lipoprotein metabolism and progression of atherosclerosis: new insights from the HDL, Atherosclerosis Treatment Study. *Current Opinion in Cardiology*, 19: 385-391.

Dell'Oca, Stoll, (2014). Metabolismo lipídico, micro RNAs y enfermedad cardiovascular – nuevas terapias génicas basadas en interferencia de ARN. *Tendencias en Medicina*, 44: 84-90.

Farhood H., Serbina N., Huang L. (1995). The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1235: 289-295.

Kluiver J. et al., (2012). Generation of microRNA sponge constructs, *Methods*, 58: 113-117.

Martínez-González J. (2011). miR-33 a/b contribuye a la regulación del metabolismo de ácidos grasos y la señalización de la insulina. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 23: 240-243.

Movva R., Rader D. J. (2008). Evaluación de la heterogeneidad y función de HDL por el laboratorio. *Clinical Chemistry*, 54: 788-800.

Pérez-Mendoza M., De Ita-Pérez, D., Díaz-Muñoz, M.-M. (2012). Gluconeogénesis: una visión contemporánea de una vía metabólica antigua. *Revista de Educación Bioquímica - UNAM*, 31: 10-20.

Rayner K. J. et al. (2011). Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis., *J. Clin. Invest.*, 121: 2921-2931.