

UCH-FC
Biotecnología
K 436
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



“Expresión de RNAs mitocondriales no codificantes durante proliferación y diferenciación de mioblastos de ratón”

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

FRANKO RESTOVIC CARVAJAL

Julio, 2007
Santiago - Chile



Director de Memoria de Título: Dr. Luis O. Burzio Eriz



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

“Expresión de RNAs mitocondriales no codificantes durante proliferación y diferenciación de mioblastos de ratón”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

FRANKO RESTOVIC CARVAJAL

Director Seminario de Título

Dr. Luis Burzio E.



Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Miguel Allende C.
Presidente Comisión

Dra. Verónica Palma A.
Correctora



Santiago de Chile, _____ de 2006



Es bastante sorprendente acordarse de los primeros momentos dentro de esta Universidad y darse cuenta del largo camino recorrido. Ha sido mucho lo dado, pero es mayor lo recibido. No sólo conocimiento concreto, sino una enseñanza de vida, imborrable.

Durante esta senda no estuve sólo, conocí personas que sé estarán en mi vida por siempre, y aprendí a valorar a esas que siempre han estado conmigo. Por eso no tengo palabras para agradecer a mi Familia por el eterno apoyo incondicional. A mis amigos, tanto de la universidad como del colegio, por ser un soporte importante en mi vida. A todas las personas del laboratorio, ya que sin Uds. esta tesis no hubiese sido posible. Al Dr. Burzio, por darme esta increíble oportunidad. Y por último, te agradezco a ti Dani. Eres lo mejor que ha pasado en mi vida, si tan sólo existiesen palabras para agradecerte todo lo que me das...

Es el fin de un camino, pero el inicio de algo mejor. Orgulloso cargo conmigo lo que significa esta Universidad y camino, seguro de que podré representar sus valores de la mejor manera posible.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
RESUMEN	6
ÁBSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
- DNA mitocondrial.....	8
- RNAs Mitocondriales No Codificantes.....	10
- Diferenciación Celular.....	14
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	16
- General.....	16
- Específicos.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
- Cultivo celular.....	17
- Extracción de RNA total de líneas celulares.....	17
- Extracción de RNA total de células somáticas de ratón.....	18
- Determinación de concentración de RNA.....	18
- PCR de transcripción reversa.....	19
- Determinación del largo del repetido invertido de los RNAmtnc.....	20
- Electroforesis en geles de agarosa.....	21



- Marcaje no radioactivo de oligonucleótidos.....	21
- Hibridación in situ.....	22
- Inmunocitoquímica.....	23
- Tratamiento RNAsa A.....	24
- Purificación de productos de RT-PCR.....	24
- Preparación de células competentes.....	25
- Ligación de productos de PCR en PGem-T.....	26
- Transformación de células competentes.....	26
- Preparación de plasmidios recombinantes.....	27
- Identificación de clones portadores de inserto por PCR.....	28
- Secuenciación.....	28
- Northern blot.....	30
RESULTADOS.....	32
- Nueva caracterización del RNA Mitocondrial No Codificante sentido.....	32
- Expresión del RNAmtno sentido y antisentido en células de ratón.....	38
- Caracterización del RNA Mitocondrial No Codificante antisentido.....	42
- Expresión de los RNAmtno durante miogénesis.....	45
DISCUSIÓN.....	51
- RNAs Mitocondriales No Codificantes de ratón.....	51
- Expresión de los RNAs Mitocondriales No Codificantes.....	54
- Diferenciación y expresión de los RNAmtno.....	55
CONCLUSIONES.....	58
REFERENCIAS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Mapa genético del DNA mitocondrial.....	9
<i>Figura 2.</i> Estructura del RNAmtn de ratón.....	11
<i>Figura 3.</i> Estructura de los RNAmtn humanos.....	13
<i>Figura 4.</i> Caracterización del RNAmtn sentido expresado en mioblastos de ratón.....	33
<i>Figura 5.</i> Secuencia del RNAmtn sentido murino.....	34
<i>Figura 6.</i> El RNAmtn sentido contiene una larga región doble hebra.....	37
<i>Figura 7.</i> Expresión de los RNAmtn en tejidos normales de ratón.....	39
<i>Figura 8.</i> Co-expresión de los RNAmtn sentido y antisentido con PCNA.....	40
<i>Figura 9.</i> Expresión diferencial de los RNAmtn en células tumorales de ratón.....	41
<i>Figura 10.</i> Caracterización del RNA mitocondrial no codificante antisentido expresado en mioblastos de ratón.....	43
<i>Figura 11.</i> Secuencia del RNAmtn antisentido murino.....	44
<i>Figura 12.</i> Determinación de las condiciones de diferenciación de las células C2C12...	46
<i>Figura 13.</i> Expresión de los RNAmtn sentido y antisentido en células C2C12 y en los miotúbulos resultantes de la diferencia miogénica.....	47
<i>Figura 14.</i> Expresión de los RNAmtn sentido y antisentido durante la diferenciación miogénica.....	49
<i>Figura 15.</i> Co-expresión de los RNAmtn y PCNA en células diferenciadas.....	50



LISTA DE ABREVIATURAS

BCIP: 5-bromo,4-cloro,3-indolilfosfato.

D.O.: Densidad óptica.

ddNTP: Dideoxinucleótidos.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Médium.

DNA: Ácido desoxiribonucleico.

DNAc: DNA complementario.

DNAm: DNA mitocondrial.

dNTPs: Deoxinucleótido trifosfato.

DTT: Ditioneitol.

EDTA: ácido etilendiaminotetracético.

G: Gramos

H: Horas.

HIS: Hibridación *in situ*

Id: Inhibidores de diferenciación celular.

IPTG: Isopropil-thio-b-D-galactopiranosido.

L: Litros

M: Molar

Min: Minutos.

NBT: Tetrazolio de nitroazul.

Nts: Nucleótidos.

Pb: Pares de bases.

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular.

RI: Repetido invertido.

RNA: Ácido ribonucleico.

RNAmt: RNA mitocondrial.

RNAmtnc: RNA Mitocondrial No Codificante.

RNAmtr: RNA mitocondrial ribosomal.

RNAnc: RNA no codificante.

RNAt: RNA de transferencia.

Rpm.: Revoluciones por minuto.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

TA: Temperatura ambiente.

UV: Ultravioleta.

V: Volts

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido.

RESUMEN

Los RNAs Mitocondriales No Codificantes (RNAmnc) constituyen una familia de nuevos transcritos mitocondriales en los cuales el RNA mitocondrial 16S sentido o antisentido están unidos a fragmentos del RNA complementario o repetidos invertidos (RI). En consecuencia, estos transcritos tienen horquillas de diferente tamaño y asas de longitud variable. Estos transcritos requieren de transcripción mitocondrial para su síntesis, pero no están codificados directamente en el DNAm. Hemos sugerido que la síntesis de los RNAmnc es una reacción post-transcripcional. Llamamos RNAmnc sentido al transcrito que presenta un RI unido al extremo 5' del 16S sentido y RNAmnc antisentido al transcrito que contiene un RI unido al extremo 5' del 16S antisentido.

Células normales humanas en proliferación expresan tanto el RNAmnc sentido como el RNAmnc antisentido a diferencia de células quiescentes, que no expresan ninguno. En contraste, las células tumorales expresan el RNAmnc sentido y reprimen la expresión del RNAmnc antisentido. Por lo tanto, un cambio drástico en la expresión de los RNAmnc antisentido ocurre durante la transformación y diferenciación neoplásica. Para determinar la expresión de estos transcritos durante la diferenciación de una célula normal, se utilizó como modelo la diferenciación de mioblastos de ratón (C2C12) a miotúbulos *in vitro*. Previamente se determinó y caracterizó la estructura de los transcritos sentido y antisentido del ratón. Las células C2C12 expresan tanto el RNAmnc sentido como el antisentido. Al diferenciarse, en la gran mayoría de miotúbulos se observa represión de ambos transcritos. También se comprobó el fenotipo neoplásico humano de los RNAmnc en células tumorales de ratón.

ABSTRACT

The Non Coding Mitochondrial RNA (ncmtRNA) constitutes a family of novel mitochondrial transcripts in which the sense or antisense 16S mitochondrial RNA are joined to a complementary fragment of RNA or inverted repeat (IR). These transcripts have loops of different sizes and stems of variable length. They require mitochondrial transcription for their synthesis, but they are not directly coded in the DNAm_t, so we suggest that the synthesis of the ncmtRNA is a post-transcriptional reaction. We have named the transcript that presents an IR joined to the sense 16S 5' end, sense ncmtRNA; and the transcript that contains an IR joined to the antisense 16S 5' end, antisense ncmtRNA.

Human normal proliferating cells express both the sense and antisense ncmtRNAs, in contrast to the quiescent cells which repress both. On the other hand, tumor cells express the sense ncmtRNA and repress the antisense ncmtRNA. This means that a drastic change in expression of the antisense ncmtRNA occurs during neoplastic transformation and differentiation. To determine the change in expression of these transcripts during normal cell differentiation, we used as a differentiation model the *in vitro* C2C12 mouse myoblast conversion to myotubules. The structure of the mouse sense and antisense ncmtRNA was also determined and characterized. After differentiation, a marked repression of both transcripts is observed in the newly formed myotubules. We also confirmed the ncmtRNA neoplastic phenotype in mouse tumor cells.

INTRODUCCIÓN

DNA Mitocondrial

El DNA mitocondrial de ratón es una molécula de doble hélice circular cerrada que consta de 16.500 pares de base (pb) y cuya secuencia se conoce en su totalidad (Bibb y col, 1981). Este DNA codifica para 37 genes que corresponden a los dos RNAs ribosomales 16S y 12S, 22 RNAs de transferencia y 13 polipéptidos componentes de los complejos respiratorios de la membrana interna mitocondrial. La cadena pesada (H) del DNA mitocondrial codifica los dos RNAs ribosomales, 14 RNAs de transferencia y 12 polipéptidos, mientras que la cadena liviana (L) contiene solamente información para 8 RNAs de transferencia y la subunidad ND6 del complejo I. Entre los RNAs de transferencia de fenilalanina (RNAtPhe) y de prolina (RNAtPro) existe un segmento no codificante de alrededor de 1121 pb denominado D-loop, donde se encuentran los promotores que regulan la transcripción de las hebras H y L (Anderson y col, 1981., Clayton y col, 1992., Shadel y col, 1997., Taanman, 1999) (Figura 1).

dejado la zona de origen de replicación OL en forma de cadena sencilla. La síntesis de la cadena naciente L termina después que ha terminado la cadena pesada (Clayton, 1992).

RNAs Mitocondriales No Codificantes

Al determinar la naturaleza de los RNAs enriquecidos en el espermatozoide mediante análisis de bibliotecas de DNAm de ratón, se encontró una nueva familia de RNAs mitocondriales no codificantes. Este transcrito tiene un repetido invertido (RI) de 121 nucleótidos (nts) covalentemente unido al extremo 5' del RNA ribosomal mitocondrial 16S (RNAmtr 16S) (Villegas et al., 2000). El RI es totalmente complementario a la región correspondiente al RNA ribosomal 16S, desde la posición 241 a la 360, por lo que formaría una horquilla con una región doble hebra de 121 pb y un asa de 120 nts (Figura 2). Los estudios han demostrado que este transcrito no corresponde al producto de un pseudogen mitocondrial, ni tampoco es codificado directamente por el genoma de la mitocondria. Por tal motivo, hemos postulado que la síntesis de este RNA requiere de los transcritos de las hebras H y L del DNAm. Como la transcripción de ambas hebras está regulada por dos promotores distintos e independientes, se llamó anteriormente a este transcrito RNA quimérico (Villegas et al., 2000), pero dado que este término puede llevar a confusión, en este trabajo se le denominará como RNA mitocondrial no codificante (RNAmnc).

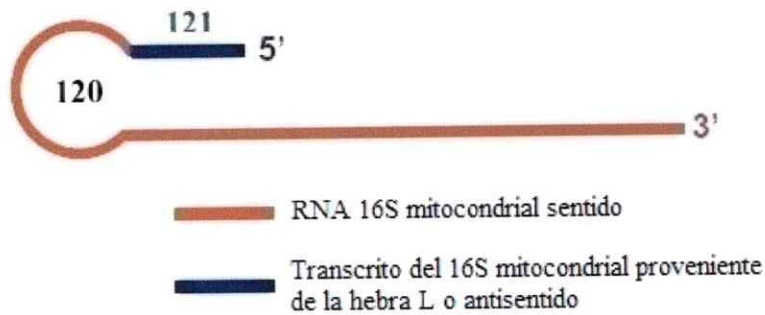


Figura 2. Estructura del RNAmtnc de ratón. El RNAm 16S (rojo) se encuentra covalentemente unido a un repetido invertido de 121 nts (azul).

Dos formas de este RNAmtnc fueron encontradas en tejidos de ratón. En la posición 121, la cual corresponde al último nucleótido en el extremo 3' del RI, justo en el lugar del empalme con el 16S RNAm, el transcrito contiene ya sea una U o una C, convirtiéndose en la primera evidencia de un proceso de edición de un RNA ribosomal mitocondrial en mamíferos (Villegas et al., 2002).

Mediante amplificación por PCR de DNAc e hibridación *in situ* (HIS), se ha demostrado la expresión del RNAmtnc, tanto en líneas tumorales humanas (HeLa, HL60, SiHa, HepG2, DU145, PC-3, Ramos, Jurkat, MCF/7, Devernell, Caco-3, B16 y NSO/2), como en células cancerígenas presentes en biopsias humanas (tumores de mama, pulmón, colon, próstata, cuello uterino, tumor gástrico) (Burzio y col, 2005, PCT).

Contrario a la estructura del RNAmtnc de ratón, el transcrito humano contiene RI de 815 nucleótidos unidos al extremo 5' del RNA mitocondrial 16S. Por lo tanto, contiene una larga estructura doble hebra de 815 pb y un asa de 40 nucleótidos (Burzio y

col, 2005, PCT). Por hallazgos que se describirán a continuación, hemos denominado a este transcrito como RNAmtns sentido.

El análisis de células normales humanas, como HUVEC, AMG-3, HFK (queratinocitos de prepucio humano) y linfocitos circulantes estimulados con fitohemaglutinina, revelan además de la expresión del RNAmtns sentido, la expresión de un RNAmtns antisentido (Figura 3). Ambos RNAmtns, sentido y antisentido, no son detectados en células no proliferantes o quiescentes. El RNAmtns antisentido corresponde a una nueva familia de RNAs que poseen un repetido invertido de longitud variable unido al extremo 5' del RNA 16S mitocondrial antisentido, el cual es transcrito desde la hebra L del DNAmtn (Burzio y col, 2005, PCT). En resumen, el RNAmtns sentido se expresa tanto en células proliferantes normales y tumorales, mientras que el antisentido se expresa en células normales y es reprimido en células tumorales. Para poder establecer la secuencia de estos, se diseñaron nuevas estrategias experimentales, ya que con los métodos convencionales de clonamiento de RNAs no se obtienen resultados satisfactorios, agregándole a lo anterior problemas en la secuenciación. Estos problemas se originan por el desplazamiento durante la replicación (*replication slippage*) que ocurre cuando existen horquillas muy estables en los RNAs (Viguera y col, 1999; Viguera y col, 2001).

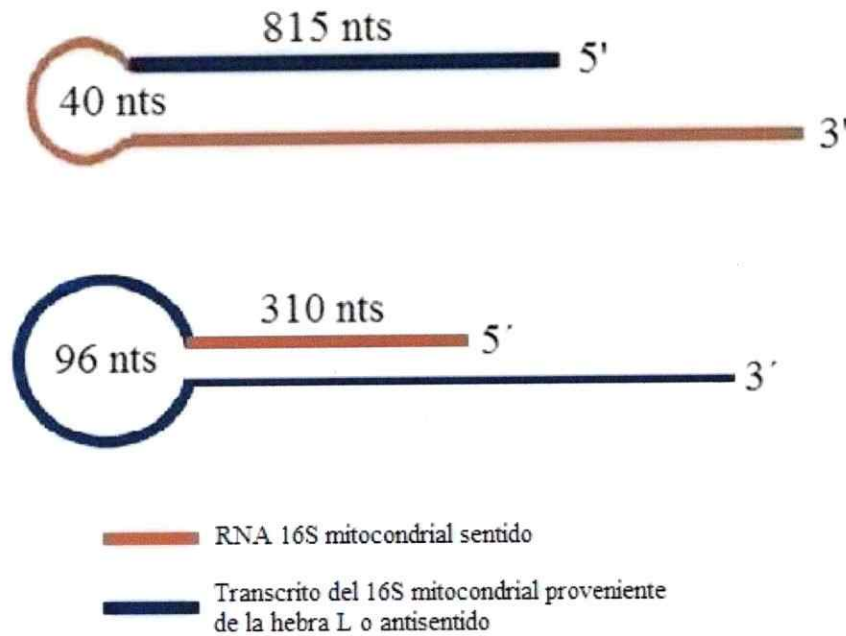


Figura 3. Estructura de los RNAmtnc humanos sentido y antisentido, respectivamente. En rojo se presenta la secuencia proveniente de la hebra H del genoma mitocondrial y en azul la proveniente de la hebra L.

Los resultados anteriores permiten plantearse el porqué de la gran diferencia estructural entre el RNAmtnc sentido de humano y el RNAmtnc sentido de ratón. Además, es razonable preguntarse si también en células normales en proliferación de ratón, se expresa un RNAmtnc antisentido y cual es la estructura de él. Como se describió anteriormente, una característica aparentemente universal de las células tumorales humanas, es la represión del RNAmtnc antisentido. Si esta represión del RNAmtnc antisentido es una característica general de las células neoplásicas, se debería esperar que esta expresión diferencial también debería ocurrir en células tumorales de ratón.

Diferenciación Celular

Como se describió anteriormente, existe una estrecha relación entre la expresión de los RNAmtnc y el proceso de proliferación celular, ya que estos transcritos tienen bajos niveles de expresión en células no proliferantes. Como el proceso de diferenciación está relacionado con una disminución en la proliferación celular, nos planteamos que ocurriría con la expresión de estos RNAs en un modelo de diferenciación en células de ratón. Las células C2C12 tienen la capacidad de diferenciarse irreversiblemente a miotúbulos contráctiles (Yaffe D y Saxel O, 1977). La salida del ciclo celular en mioblastos es promovida por la expresión de MyoD y moléculas del tipo hélice-asa-hélice (Yun y col., 1996), las cuales son generalmente factores de transcripción de genes que favorecen la diferenciación. Por su parte, los inhibidores de la diferenciación (Id), entre los cuales encontramos algunos proteoglicanos, son estimulados por factores de crecimiento, presentes en suero fetal bovino (Gauthier-Rouviere y col, 1996). Cuando las células son privadas de estos mitógenos, los niveles de los Id decrecen (Benezra y col., 1990). El proceso de diferenciación de las células C2C12 puede ser dividido en cuatro eventos temporalmente diferentes. Primero, el compromiso con la vía miogénica representada por el aumento de los niveles de miogenina; segundo, la salida irreversible del ciclo celular coincidente con la inducción de p21; tercero, la diferenciación fenotípica; y por último, la fusión celular (Andrés y col., 1996). Es de vital importancia la regulación positiva del inhibidor de la ciclina dependiente de quinasa p21, ya que la expresión de esta proteína, constituye el punto sin retorno del proceso de miogénesis

(Andrés y col., 1996). Por lo tanto, este modelo representa una potente oportunidad para determinar la expresión de los RNAmtnc durante la diferenciación celular.

HIPOTESIS

Durante el proceso de diferenciación miogénica de células C2C12, la expresión de los RNAmnc es reprimida.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de los RNAmnc durante el proceso de diferenciación miogénica de células C2C12

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Re-evaluación del largo del RI del RNAmnc sentido de ratón.
2. Identificación del putativo RNAmnc antisentido de ratón.
3. Determinar la expresión conjunta de los RNAmnc con marcadores de proliferación.
4. Determinar la expresión diferencial de los RNAmnc en células de mieloma (NSO/2) y de melanoma (B16) de ratón.
5. Definir protocolo de cultivo óptimo para lograr diferenciación en C2C12.
6. Determinar la expresión de los RNAmnc durante la diferenciación de células C2C12 en miotúbulos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo Celular

La línea celular de mioblastos de ratón C2C12 fue cultivada en medio DMEM (Gibco) conteniendo 10% de suero fetal bovino, 2mM de glutamina, 50µg/ml de penicilina y estreptomicina y 0,1 mM de aminoácidos no esenciales. Para inducir diferenciación a miotúbulos, se cambió a un medio de diferenciación cuando las células se encontraban a un 80% de confluencia aproximadamente. Este medio contiene DMEM con 5% de suero de caballo, 2mM de glutamina, 50µg/mL de penicilina y streptomycin, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales y 10µM de insulina bovina recombinante. Las líneas celulares tumorales NSO/2 y B16 fueron cultivadas con el mismo medio de crecimiento ocupado con las C2C12.

Extracción de RNA total de líneas celulares

RNA total de células C2C12 y de testículo de ratón, fue extraído con Trizol (Invitrogen). Siguiendo las instrucciones del proveedor, se utilizó 1 ml por cada 10 cm² de superficie de cultivo. Posterior a una incubación por 3 min, se añadió 0,2 volúmenes de cloroformo. Luego de homogenizar por inversión, se procedió a centrifugar por 15 min a 14.000 x g a 4°C. A continuación, se rescató el 75% de la fase acuosa, para luego

precipitarla con 1 volumen de isopropanol, durante 10 min a temperatura ambiente (TA) o 2 h a -20°C. Posteriormente, se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones por 10 min y se lavó el sedimento con etanol frío al 75%. El precipitado fue centrifugado a 8.000 x g por 5 min, se secó durante 15 min a TA, se resuspendió en agua estéril libre de nucleasas y se guardó a -80°C hasta su uso.

Extracción de RNA total de células somáticas de ratón

Un ratón adulto fue sacrificado por dislocación cervical y se extrajeron los testículos. Se colocaron éstos últimos en Trizol y se trituraron utilizando el “Ultraturax” a máxima velocidad en hielo. Una vez homogeneizados, se incubaron por 10 min a 37°C, con el objeto de lograr la total lisis celular. Se procedió a centrifugar por 10 min a 12.000 x g, con el objeto de eliminar el material no disuelto. Posteriormente, para extraer el RNA del sobrenadante, se trató según lo descrito en el punto anterior.

Determinación de concentración de RNA

Para estimar la concentración del RNA obtenido, se procedió a determinar la absorbancia de una alícuota de éste, diluido en agua. Para calcular la concentración, se consideró que 1 D.O. a 260 nm, equivale a 40 µg/ml de RNA (Sambrook y col.,1989). El

grado de contaminación con proteínas se consideró apropiado, si la razón 260nm/280nm, se encontraba entre 1,6 y 2,0.

PCR de transcripción reversa

La transcripción reversa se llevó a cabo con 100 ng de RNA total fresco, al cual se adicionó 2 μ L de hexámeros al azar (25 ng/ μ L), y hasta 12 μ L final con agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó por 5 min a 80°C, se enfrió de inmediato en hielo y luego de incubarse por 5 min, se agregaron 4 μ L de tampón de reacción MMLV 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 250 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 2,5 mM espermidina), 2 μ L de 50 mM DTT, 1 μ L de mezcla 10 mM dNTPs y 1 μ L de MMLV transcriptasa reversa (200 U/ μ L). La mezcla se incubó 10 min a 25°C, seguida de una incubación final a 37°C por 50 min. Las muestras se guardaron a -80°C hasta su uso. Para la reacción de la polimerasa en cadena se utilizaron 2 μ L de DNAc, a los cuales se agregaron 5 μ L de tampón de reacción 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1% Tritón X-100), 1.5 μ L de 50 mM Mg₂Cl, 1 μ L de la mezcla 10 mM de dNTPs y 1 μ L de cada partidior sentido y antisentido de concentración 50 pmoles/ μ L. Se llevó a un volumen final de 49,5 μ L con agua estéril, se selló con una gota de aceite mineral y luego se realizó un programa de desnaturación progresiva consistente en 5 min a 95°C. A cada tubo de reacción se agregaron 2,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen) al término de los 5 min a 95°C. La amplificación se realizó con un programa que consideró 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, apareamiento entre 56 y 60°C por 1 min,

dependiendo de la sonda utilizada, y polimerización a 72°C por 1 min. Se terminó a 72°C por 10 min, para completar la elongación de las cadenas de DNA inconclusas.

Determinación del largo del repetido invertido de los RNAmtn

Para determinar la extensión del RI de los RNAmtn, se aisló RNA total de células C2C12 a un 80% de confluencia y se amplificó usando el protocolo de RT-PCR anteriormente revisado, usando el partidor 1, el cual está posicionado en la región del asa, y un conjunto de partidores antisentidos a lo largo del extremo 3' del RNAmtn. Es interesante notar, que todos estos partidores (incluido el partidor 1) son antisentidos para el 16S y ambos apuntan al mismo extremo de éste, por lo tanto, son específicos para el RNAmtn (figura 4a). Vale recordar que el RNAmtn, no se encuentra codificado como tal en el genoma, por lo tanto, como control negativo, bastaría hacer una reacción sin la presencia de la transcriptasa reversa (figura 4). El partidor 2, corresponde al extremo 5' del RI de 121 nts descrito anteriormente (Villegas et al., 2000). Para el RNAmtn antisentido, se realizó la misma aproximación, esta vez con el partidor 11, el cual está posicionado en la región del asa monohebra en combinación con los partidores 12, 13, 14, 15 o 16. Estos últimos, se encuentran a través del RI putativo (figura 10a).

Electroforesis en geles de agarosa

Con el objeto de visualizar los productos de amplificación, una alícuota de 10 μL de la mezcla de reacción, se mezcló con 1/10 de volumen de tampón de carga (0,25% azul de bromofenol y 30% glicerol en agua). La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 2% p/v en tampón TAE 1X (50X: 2 M Tris-base, 1 M ácido acético glacial y 50 mM EDTA pH 8.0) a 60 volts por 60 min. Finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio por 15 min y fueron visualizados en un transiluminador de luz UV (Sambrook y col., 1989).

Marcaje no radioactivo de oligonucleótidos

Las sondas utilizadas, entre 20 a 24 mer, se marcaron en el extremo 3' con digoxigenina-11-dUTP, utilizando la enzima TdT. Para ello, en un volumen final de reacción de 10 μL , se agregaron 2 μL de tampón de reacción 5X (500 mM cacodilato de potasio, pH 6.8, 5 mM CoCl_2 , 0,5 mM DTT), 1 μL 9 mM dATP, 1 μL 1 mM digoxigenina-11-dUTP, 1 μL de sonda 35 pmoles/ μL y 1 μL de TdT (19 U/ μL , Promega). La mezcla se incubó a 37°C por 30 min en un baño de agua, se detuvo en frío y se adicionó 1 mM final EDTA para evitar degradación por nucleasas. Las sondas marcadas se guardaron a -20 °C hasta su uso posterior.

Hibridación in situ (HIS)

Las células C2C12, NSO/2 y B16-F10 fueron cultivadas en placas de cultivo de 35mm (Corning) hasta llegar a un 70-80% de confluencia. Se lavaron con buffer TBS tres veces, para luego ser fijadas con paraformaldehído al 4% por 10 min a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas posteriormente dos veces con TBS por 5 min y permeabilizadas por 10 min con HCL 0,2N a temperatura ambiente. Se lavó de la misma manera anterior y después se realizó la pre-hibridación por 30 min o más, a 37°C, en una solución que contenía 4x SSC (SSC: 0,15M NaCl, 15 mM de citrato de sodio, pH 7,0), 10% dextrano sulfato, 150 µg/ml de RNAt de levadura y DNA de espermios de arenque, 50% formamida y 1x de solución de Denhardt (0,2 mg/ml Ficoll tipo 400, 0,2 mg/ml polivinilpirrolidona y 0,2 mg/ml BSA). Posteriormente, la hibridación fue realizada por 15 h a 37°C en el mismo buffer de pre-hibridación, conteniendo además 3,5 pmoles de sonda, ya sea sentido o antisentido. Los óligos estaban marcados con biotina en el 5' (Invitrogen) o se marcaron en el extremo 3' con digoxigenina-11-dUTP (Boehringer) y transferasa terminal (Promega). El exceso de sonda fue eliminado con lavados de 2x SSC por 10 min y luego con 1x SSC por 10 min, ambos a temperatura ambiente. A continuación, las muestras fueron lavadas con 0,2x SSC por 30 min entre 42-45°C, y finalmente, con 0,2x SSC por 10 min a temperatura ambiente. Las células fueron subsiguientemente incubadas por 30 min con solución de bloqueo (1% BSA, 0,3% Triton X-100 en TBS) y posteriormente, por 2 h a TA con la estreptavidina o el anticuerpo monoclonal anti-digoxigenina, ambos conjugados a fosfatasa alcalina (Boehringer). El anticuerpo fue diluido 1:250 en solución de bloqueo para digoxigenina y 1:500 para la

estreptavidina. Para finalizar, las placas fueron lavadas 2 veces con TBS y la detección fue realizada con la mezcla de sustratos BCIP/NBT (0,24 mg/mL NBT y 0,18 mg/mL BCIP) (DAKO), previa incubación con buffer FAL (Tris Base 12,1 g/L, NaCl 5,9 g/L y MgCl₂ 1 g/6 H₂O, pH 9,5). Se ocuparon dos tipos de sondas para las HIS; las complementarias a la región 16S de ambos RNAm_{tn}c, y las sondas de la región de empalme. Estas últimas consisten en 12 nts complementarios al extremo 5' del RNAm_t 16S, seguido por 6 nts complementarios al extremo 3' del RI, las cuales bajo la condición de estrictez utilizada (50% formamida), son específicas para la región de empalme entre el 16S y el RI de los RNAm_{tn}c.

Inmunocitoquímica

Para determinar la coexpresión de los RNAm_{tn}c y del marcador de proliferación celular PCNA durante diferenciación celular, se utilizaron las líneas celulares C2C12 fijadas por el método descrito en la HIS. Luego, fueron permeabilizadas con una solución de TBS 1x con 0,2% de Triton X-100 por 10 min a TA. Posterior, al lavado con TBS 1x, las células fueron pre-hibridadas, tal cual fue descrito en la HIS. Se incubó toda la noche con oligos sentido y antisentido biotinilados (50 μM), en una dilución 1:200 a 37°C. Posterior a esto, se hicieron los lavados con SSC descritos en la HIS, para después bloquear (2% BSA y 0,2% Triton X-100 en TBS 1x) por 1 h a TA. Subsiguientemente, se incubó con el primer anticuerpo anti-PCNA, en solución de bloqueo, por 2 h a TA. Se lavó con TBS 1x por 5 min, y se incubó con los siguientes anticuerpos secundarios: anti-

IgG de ratón conjugado a Alexafluor 488 para detectar el PCNA y la estreptavidina unida a rodamina para detectar los oligos biotinilados (Invitrogen), a diluciones de 1:200 y 1:500, respectivamente. Posteriormente se lavó con TBS 1x, se montó con Dabco y se observó en el microscopio de epifluorescencia Olympus BX51.

Tratamiento RNAsa A

Se incubaron 500 ng/ μ L de RNA total de C2C12 en 2X SSC y RNAsa A (50 μ g/ml) por no más de 10 min. La reacción se paró con 4 volúmenes de Trizol y posterior extracción de RNA descrita anteriormente. Como control negativo, se incubó el RNA en agua, ya que bajo estas condiciones se pierde la estructura secundaria que protege al RNA de la acción de la RNAsa A. La pella resultante se trató con DNAsa Turbo (Ambion) siguiendo el protocolo del fabricante. La reacción se detuvo con la extracción del RNA mediante fenol, para evitar que la DNAsa actúe sobre la reacción de RT-PCR.

Purificación de productos de RT-PCR

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el Kit comercial Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen). Para empezar, se escindieron las bandas de DNA del gel de agarosa con un bisturí, para luego pesarlas y colocarlas en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y agregar 3 volúmenes de la solución QX1 del kit. Posteriormente, se agregó el QIAEX II

según indicaciones del proveedor. Se solubilizó la agarosa a 50 °C, se centrifugó a 10.000 x g y se lavó con buffer QX1, para sacar los restos de agarosa, y con buffer PE, para eliminar sales residuales. Se secó el precipitado a TA, para posteriormente, resuspenderlo en 20 µL de agua tratada con 0,2% DEPC.

Preparación de células competentes

Se cultivaron células de *E. coli* DH5α en placas de agar al 1,5% en medio LB (10 g/L peptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, pH 7.5, 15g de agar sólo para placas) a 37°C durante la noche. Se tomó una colonia desde la placa con un asa estéril y se inoculó a 10 ml de medio LB que contenía 100 µg/mL de Ampicilina. Se incubó a 37°C a 225 rpm durante la noche. De este cultivo primario, se tomaron 500 µL para inocular 50 ml de medio LB, y se crecieron con agitación constante a 250 rpm a 37°C, hasta que alcanzó una OD de 0,6 a 600 nm. Posteriormente, el medio de cultivo se diluyó con 50 mL de NaCl recién diluido desde un stock de 4M NaCl, y se mezcló por inversión. La mezcla se traspasó a un tubo estéril y se centrifugó a 1500 x g por 10 min a 4°C. El sedimento bacteriano fue resuspendido en 25 mL de 75 mM CaCl₂ frío y se incubó en hielo por espacio de 30 min. Este procedimiento, se repitió una vez más. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 3 mL de 75 mM CaCl₂, y después se agregó glicerol a una concentración final de 14% v/v. Se mezcló usando una pipeta automática y se dejó incubando por 2 hrs en hielo y luego se dividió la suspensión en

alícuotas de 500 μL , las cuales se congelaron en un baño de etanol absoluto, frío con hielo seco, para posteriormente, almacenarlas a -80°C hasta su uso posterior.

Ligación de productos de PCR en pGem-T

En un volumen final de 10 μL se mezclaron 6 μL del producto fresco de PCR, 2 μL de tampón de ligación 5X (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 50% glicerol (v/v)), 1 μL del vector pGEM®-T vector (50 ng) y 1 μL de DNA ligasa del fago T4 (3 unidades Weiss/ μL , Invitrogen). Se mezclaron por pipeteo y se procedió a incubar la mezcla por 12 h a 4°C . Posteriormente, ésta se centrifugó brevemente y se guardó a -20°C hasta su uso.

Transformación de células competentes

Se procedió a descongelar un tubo de células competentes, y a 100 μL se agregaron 6 μL de la mezcla de reacción de ligación obtenida en el punto anterior y se incubó en hielo por 30 min. Posteriormente, se dió un golpe térmico por 30 seg. a 42°C y se volvió a dejar en hielo por 2 min. A esta mezcla, se agregaron 400 μL de medio LB y se incubaron a 37°C por 1 hr, a 225 rpm, y se dejó en hielo. De esta mezcla, se tomaron 200 μL y se esparcieron sobre placas LB, previamente preparadas con 5 μL de 840 mM

IPTG y 80 μ L de 20 mg/mL de X-Gal. Se incubaron a 37°C toda la noche. Posteriormente, se trasladaron a 4°C por 2 hrs para permitir el desarrollo del color.

Preparación de plasmidios recombinantes

Entre 10 a 15 colonias de transformantes putativos de DH5 α , se tomaron con asa y se trasladaron por separado a un tubo Nunc conteniendo 3 mL de medio LB. Se crecieron a 37°C, a 225 rpm toda la noche. Los cultivos se centrifugaron por 5 min a 10.000 x g y después de eliminar el sobrenadante, se agregaron a la pella 250 μ L de la solución de resuspensión de células (50 mM Tris -HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA y 100 μ g/ml RNAasa A) y se resuspendió mediante pipeteo. Se procedió a agregar 250 μ L de la solución de lisis celular (0,2M NaOH y 1% SDS) y se incubó hasta que la solución se esclareció (5 min a TA). Posteriormente, se agregaron 10 μ L de la solución de proteasa alcalina y se mezclaron por 4 inversiones manuales de los tubos. Se incubaron por 5 min a TA. Para parar la reacción, se agregó solución de neutralización (4,09M guanidina hidroclicorada, 0,759M acetato de potasio y 2,12M ácido acético glacial). Se mezcló 4 veces por inversión manual. Luego, se centrifugó a 14.000 x g por 10 min en una microcentrífuga y se colectó el sobrenadante. Se insertó una mini spin-column dentro de un tubo colector de 2 ml, ambos partes del kit. Se transfirió el lisado anterior a la columna (850 μ L aproximadamente), se centrifugó a 14.000 x g por 1 min y se descartó la fase acuosa. Se reinsertó la columna al tubo colector y se agregaron 750 μ L de solución de lavado de columnas (162,8 mM acetato de potasio, 22,6 mM Tris-HCl (pH

7,5) y 0,109 mM EDTA (pH 8)). Se centrifugó a 14.000 x g y se adicionó 250 µL de solución de lavado de columnas para después centrifugar por 2 min a la misma velocidad anterior. A continuación, se transfirió la columna a un tubo estéril Eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 100 µL de agua DEPC, para después centrifugar por 1 min a 14.000 x g, y recuperar el DNA plasmidial. El DNA recuperado se guardó a -80 °C para su uso posterior.

Identificación de clones portadores de inserto por PCR

Con el objeto de caracterizar plasmidios portadores de insertos, 1 µL de la preparación de plasmidios obtenida según el punto anterior, se trasladó a un tubo de 0,5 mL y se sometió a PCR utilizando las condiciones descritas anteriormente, excepto que se utilizó una desnaturalización inicial de 10 min a 100°C. Como partidores, se utilizaron los oligonucleótidos correspondientes a los extremos 5' y 3' del inserto, con el objeto de amplificar la totalidad de éste y también se utilizaron los partidores sentido y antisentido del fago M13, los cuales flanquean el fragmento de PCR clonado.

Secuenciación

Para determinar la secuencia de cada fragmento purificado se utilizó el sistema PE Applied Biosystems, con el sistema para secuenciar DNA "Bigdye terminator",

basado en el método de Sanger y Coulson (Sanger y Coulson, 1975). Este sistema incluye los dideoxinucleótidos marcados con moléculas fluorescentes (ddA con dicloro [R6G], ddC con dicloro [ROX], ddG con dicloro[R110] y ddT con dicloro [TAMRA]. Siguiendo las indicaciones del protocolo, se tomaron 20 ng de templado, 3.2 pmol de uno de los dos partidores (sentido o antisentido), 8 µl de la mezcla de reacción que incluye sustrato y enzima, y se ajustó a 20 µl con agua bidestilada estéril. Se utilizó el programa de PCR sugerido que incluye 96°C durante 10 seg, 50°C durante 5 seg, 60°C durante 4 min y luego se purificó la mezcla de fragmentos mediante precipitación, agregando al producto de PCR, 20 µl de agua bidestilada estéril más 60 µl de isopropanol 100%. Después de una incubación de un mínimo de 15 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 14.000 rpm, se descartó el sobrenadante con pipeta y se lavó dos veces con 250 µl de isopropanol 75%. El precipitado se resuspendió en 20 µl de TSR (Template Suppression Reagent). El producto de PCR, ya purificado, se desnaturalizó por 2 min a 95°C, y después de enfriar en hielo, se cargó en la bandeja para realizar la electroforesis capilar según el módulo Seq POP6, que indica un tiempo de inyección de 30 seg a 2.5 KV, un voltaje de corrida de 12.2 KV, una temperatura de corrida de 50°C, un tiempo de 120 min y se usó un filtro virtual E. Para el análisis de la secuencia, se utilizó el software Sequence Analysis.

Northern blot

Para empezar, se limpió con NaOH, de 2 horas hasta toda la noche, la cámara de electroforesis. Después se enjuagó con agua DEPC. Teniendo la cámara limpia, se procedió a preparar la agarosa al 1%, agregando TAE 1x hecho con agua DEPC. Se calentó en el microondas hasta que estuviese totalmente disuelto, para dejar enfriar hasta 60-70 °C. Inmediatamente se vertió y se dejó como mínimo 30 minutos para solidificación. El tampón de corrida consistió en TAE 1x. Se usaron entre 4 y 10 ug de RNA total por carril. Éstos se llevaron a 10 ul con agua DEPC, se agregó 0,1 volúmenes de tampón de carga y 1 ul del inhibidor de ribonucleasas RNASEout (Invitrogen). Antes de cargar el RNA, se corrió el gel por unos 15 minutos para homogeneizar. La solución con el RNA se calentó por 5 minutos a 90 °C, para luego enfriar en hielo por 2 a 3 minutos. Se cargó y se corrió el gel entre 70 y 100 V (50 – 70 mA) hasta alcanzar aproximadamente 2/3 del gel, para lograr una separación óptima. El gel posteriormente fue incubado con bromuro de etidio entre 15 y 20 minutos para luego ser visualizado y fotografiado junto a una regla en un transiluminador. El gel a continuación fue lavado dos veces con SSC 5x por 5 minutos cada una.

El gel fue transferido por capilaridad a una membrana de nylon (Hybond-XL), usando como tampón de transferencia 5x SSC (20x SSC: 3 M NaCl, 300 mM citrato de sodio, pH 7,0) y 10 mM NaOH. Una vez transferido el RNA (12-15 horas), se lavó la membrana con 5x SSC por 5 minutos, tras lo cual se secó sobre papel filtro a TA. La membrana seca se expuso a luz UV por 3 minutos para fijar los RNA.

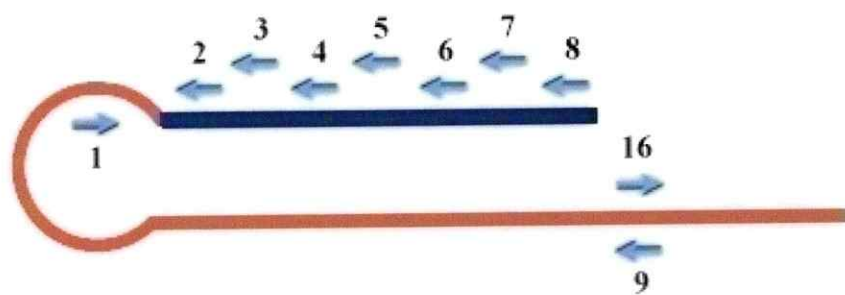
Posteriormente se prehibridó por 1 hora (5x SSC, 50% formamida, 10% dextrano sulfato, solución de Denhart, 150 ug/ml de DNA de espermios de arenque) a 42 °C. Posteriormente se agregó la sonda marcada con biotina (50 uM) a una dilución de 1:200. Después de la hibridación (16-18 horas) a 42°C, se lavó con 2x SSPE/0,5% SDS y 0,2x SSPE/0,5% SDS. Los lavados con el primero fueron 2 x 15 minutos a TA, y con el segundo 2 x 30 minutos a 42 °C. Luego se lavó por 5 minutos con 1x SSPE. A continuación se bloqueó por 1 hora (1x TBS, 2% BSA, 0,3% Triton X-100) para después agregar la streptavidina unida a fosfatasa alcalina (Invitrogen) en dilución 1:1000 e incubar por 2 horas. Se lavó después 2 veces por 5 minutos con TBS 1x y una vez con solución FAL por 5 minutos. Para la detección se incubó con CDP-Star Chemiluminescent Substrate (KPL) y se reveló.

RESULTADOS

Nueva caracterización del RNA Mitocondrial No Codificante sentido.

Anteriormente, se determinó que el RNA mitocondrial no codificante murino, poseía un RI de 121 nts, unido al extremo 5' del 16S RNAm (Villegas et al., 2000). Este resultado, contrasta con el largo RI de 815 nts del correspondiente transcrito humano. Esta marcada diferencia en la longitud de los RI de ratón y humano, podría ser propia de cada especie, o que los clones de DNAc de ratón contenían un RI truncado. Por lo tanto, para definir la extensión del RI, se utilizó un partidor antisentido, localizado en el asa del transcrito, en combinación con diferentes partidores sentidos, como se ilustra en la figura 4a. El partidor 2, corresponde al extremo 5' del RI de 121 nts descrito anteriormente, y que con el partidor 1 genera un amplicón de 154 nts (Villegas et al., 2000). La amplificación, mediante RT-PCR de RNA total de células C2C12 con los partidores 3, 4, 5, 6, 7 y 8, en combinación con el partidor 1, generó amplicones de aproximadamente 230, 350, 450, 550, 650 y 750 pb, respectivamente (figura 4b). Con la pareja 1 y 9, no se obtuvo producto de amplificación, lo que sugiere que el extremo 5' del RI (o del transcrito completo), está posicionado entre el partidor 8 y el 9. Los controles negativos, sin la transcriptasa reversa, no generaron productos de amplificación con ningún par de partidores (figura 4c).

a)



b)



c)



Figura 4. Caracterización del RNAmtnc sentido, expresado en mioblastos de ratón.

a) Estructura teórica del RNAmtnc sentido y estrategia de amplificación. El partidor 1 (*forward*) está posicionado en el asa y cercano al extremo 5' del RNA 16S (posición 11-31), mientras que los partidores restantes (*reverse*) se encuentran a lo largo del putativo RI. Amplificación de RNA total de C2C12 con (b) o sin (c) transcriptasa reversa. M, estándar de DNA de 100 pb. Los carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, corresponden a los partidores de la misma denominación que se indican en a).

La secuencia del fragmento, de aproximadamente 750 pb, obtenido con los partidores 1 y 8, mostró un RI de 732 nts, unido a los primeros 33 nts del 16S RNAm sentido (figura 5). La secuencia de los amplicones de 230, 350, 450, 550 y 650 pb, mostró que estos fragmentos, son parte del RI de 732 nts, y todos muestran la misma secuencia, en la región de empalme entre el RI y el 16S RNAm (resultados no mostrados). Los mismos resultados fueron obtenidos a partir del DNAC de testículo de ratón.

1	<u>TTTTTGGTAA</u>	<u>ACAGGCGGGG</u>	<u>TTCTTGTTTG</u>	<u>CCGAGTTCCT</u>	<u>TTTATCTTTT</u>	<u>TGGATCTTTC</u>
61	<u>CTTTAGGCAT</u>	<u>TCCGGTGTG</u>	<u>GGTTAACAGA</u>	<u>GAAGTTATAG</u>	<u>GTGGATTATT</u>	<u>TATAGTGTGA</u>
121	<u>TTATTGCCTA</u>	<u>TAGTCTGATT</u>	<u>AACTAACAAAT</u>	<u>GGTTATCCGA</u>	<u>GTTGTTATAC</u>	<u>GCGTATGTCT</u>
181	<u>GGAGAATTGG</u>	<u>AATTCTTGT</u>	<u>ACTCATACTA</u>	<u>ACAGTGTGTC</u>	<u>ATCTATAAAG</u>	<u>TTATAGATTA</u>
241	<u>ACCCAATTTT</u>	<u>AAGTTTAGGA</u>	<u>AGTTGGTGT</u>	<u>AATTATGGAA</u>	<u>TTAATGAAA</u>	<u>TTTTATGTTG</u>
301	<u>AGCTTGAACG</u>	<u>CTTTCTTTAT</u>	<u>TGGTGGCTGC</u>	<u>TTTTAGGCCT</u>	<u>ACAATGGTTA</u>	<u>AAAGCTGTTT</u>
361	<u>TGTTAATTAT</u>	<u>TCACTATTAA</u>	<u>AGGTTTTTTC</u>	<u>CGTCCAGAA</u>	<u>GAGCTGTCCC</u>	<u>TCTTTTGGCT</u>
421	<u>ATAATCTAAA</u>	<u>CTTACTTTTT</u>	<u>GATTTTGTG</u>	<u>TTTTTTTAGC</u>	<u>AAGTTAAAA</u>	<u>TTGAACTTAA</u>
481	<u>ATTCATTTTT</u>	<u>TGGGTAACCA</u>	<u>GCTATCACCA</u>	<u>AGCTCGTTAG</u>	<u>GCTTTTGACC</u>	<u>TCTACCTAAA</u>
541	<u>AATCTTCTCA</u>	<u>CTATTTTGCC</u>	<u>ACATAGACGA</u>	<u>GTTGATTCAT</u>	<u>AAAATTGTTT</u>	<u>TTAGGTAGCT</u>
601	<u>CGTTTGGTTT</u>	<u>CGGGGTTTCT</u>	<u>AGCTGTAATT</u>	<u>CTTTTAGTTA</u>	<u>GAAGTTTCT</u>	<u>AGTTAGTTCA</u>
661	<u>TTATGCAAAA</u>	<u>GGTACAAGGT</u>	<u>TTAATCTTTG</u>	<u>CTTGTCTTA</u>	<u>CTTTAATTA</u>	<u>GTCTTTCATC</u>
721	<u>TTTCCCTTGC</u>	<u>GGCACTAATC</u>	<u>CTAGCCCTAG</u>	<u>CCCTACACAA</u>	<u>ATATAATTAT</u>	<u>ACTATTATAT</u>
781	<u>AAATCAAAAC</u>	<u>ATTTATCCTA</u>	<u>CTAAAAGTAT</u>	<u>TGGAGAAAGA</u>	<u>AATTCGTACA</u>	<u>TCTAGGAGCT</u>
841	<u>ATAGAACTAG</u>	<u>TACCGCAAGG</u>	<u>GAAAGATGAA</u>	<u>AGACTAATTA</u>	<u>AAAGTAAGAA</u>	<u>CAAGCAAAGA</u>
901	<u>TTAAACCTTG</u>	<u>TACCTTTTGC</u>	<u>ATAATGAACT</u>	<u>AACTAGAAAA</u>	<u>CTTCTAACTA</u>	<u>AAAGAATTAC</u>
961	<u>AGCTAGAAAC</u>	<u>CCCGAAACCA</u>	<u>AACGAGCTAC</u>	<u>CTAAAAACAA</u>	<u>TTTTATGAAT</u>	<u>CAACTCGTCT</u>
1021	<u>ATGTGGCAAA</u>	<u>ATAGTGAGAA</u>	<u>GATTTTTAGG</u>	<u>TAGAGGTCAA</u>	<u>AAGCCTAAG</u>	<u>AGCTGGTGA</u>
1081	<u>TAGCTGGTTA</u>	<u>CCCAAAAAAT</u>	<u>GAATTTAAGT</u>	<u>TCAATTTTAA</u>	<u>ACTTGCTAAA</u>	<u>AAAACAACAA</u>
1141	<u>AATCAAAAAG</u>	<u>TAAGTTTAGA</u>	<u>TTATAGCCAA</u>	<u>AAGAGGGACA</u>	<u>GCTCTTCTGG</u>	<u>AACGGAAAAA</u>
1201	<u>ACCTTTAATA</u>	<u>GTGAATAATT</u>	<u>AACAAAACAG</u>	<u>CTTTTAACCA</u>	<u>TTGTAGGCCT</u>	<u>AAAAGCAGCC</u>
1261	<u>ACCAATAAAG</u>	<u>AAAGCGTTCA</u>	<u>AGCTCAACAT</u>	<u>AAAATTTCAA</u>	<u>TTAATTCAT</u>	<u>AATTTACACC</u>
1321	<u>AACTTCCTAA</u>	<u>ACTTAAAATT</u>	<u>GGGTTAATCT</u>	<u>ATAACTTTAT</u>	<u>AGATGCAACA</u>	<u>CTGTTAGTAT</u>
1381	<u>GAGTAACAAG</u>	<u>AATTCCAATT</u>	<u>CTCCAGACAT</u>	<u>ACGCGTATAA</u>	<u>CAACTCGGAT</u>	<u>AACCATTGTT</u>
1441	<u>AGTTAATCAG</u>	<u>ACTATAGGCA</u>	<u>ATAATCACAC</u>	<u>TATAAATAAT</u>	<u>CCACCTATAA</u>	<u>CTTCTCTGTT</u>
1501	<u>AACCCAACAC</u>	<u>CGGAATGCCT</u>	<u>AAAGGAAAGA</u>	<u>TCCAAAAAGA</u>	<u>TAAAGGAAC</u>	<u>TCGGCAACA</u>
1561	<u>AGAACCCCGC</u>	<u>CTGTTTACCA</u>	<u>AAAACATCAC</u>	<u>CTCTAGCATT</u>	<u>ACAAGTATTA</u>	<u>GAGGCACTGC</u>
1621	<u>CTGCCAGTG</u>	<u>ACTAAAGTTT</u>	<u>AACGGCCGCG</u>	<u>GTATCCTGAC</u>	<u>CGTGCAAAG</u>	<u>TAGCATAATC</u>
1681	<u>ACTTGTTCCCT</u>	<u>TAATTAGGGA</u>	<u>CTAGCATGAA</u>	<u>CGGCTAAACG</u>	<u>AGGTCCAAC</u>	<u>TGTCTCTTAT</u>
1741	<u>CTTTAATCAG</u>	<u>TGAAATTGAC</u>	<u>CTTTCAGTGA</u>	<u>AGAGGCTGAA</u>	<u>ATATAATAAT</u>	<u>AAGACGAGAA</u>
1801	<u>GACCCTATGG</u>	<u>AGCTTAAATT</u>	<u>ATATAACTTA</u>	<u>TCTATTTAAT</u>	<u>TTATTAACC</u>	<u>TAATGGCCCA</u>
1861	<u>AAAACATAG</u>	<u>TATAAGTTTG</u>	<u>AAATTTCGGT</u>	<u>TGGGGTGACC</u>	<u>TCGGAGAATA</u>	<u>AAAATCCTC</u>
1921	<u>CGAATGATTA</u>	<u>TAACCTAGAC</u>	<u>TTACAAGTCA</u>	<u>AAGTAAATC</u>	<u>AACATATCTT</u>	<u>ATTGACCCAG</u>
1981	<u>ATATATTTTG</u>	<u>ATCAACGGAC</u>	<u>CAAGTTACCC</u>	<u>TAGGGATAAC</u>	<u>AGCGCAATCC</u>	<u>TATTTAAGAG</u>
2041	<u>TTCATATCGA</u>	<u>CAATTAGGGT</u>	<u>TTACGACCTC</u>	<u>GATGTTGGAT</u>	<u>CAGGACATCC</u>	<u>CAATGGTGTA</u>
2101	<u>GAAGCTATTA</u>	<u>ATGGTTCGTT</u>	<u>TGTTCAACGA</u>	<u>TTAAAGTCTC</u>	<u>ACGTGATCTG</u>	<u>AGTTCAGACC</u>
2161	<u>GGAGCAATCC</u>	<u>AGGTCGGTTT</u>	<u>CTATCTATTT</u>	<u>ACGATTTCTC</u>	<u>CCAGTACGAA</u>	<u>AGGACAAGAG</u>
2221	<u>AAATAGAGCC</u>	<u>ACCTTACAAA</u>	<u>TAAGCGCTCT</u>	<u>CAACTTAATT</u>	<u>TATGAATAAA</u>	<u>ATCTAAATAA</u>
2281	<u>AATATATACG</u>	<u>TACACCC</u>				

Figura 5. Secuencia del RNAmnc sentido murino. Subrayados se destaca el RI (azul) y su región complementaria en el RNAm 16S. La secuencia completa del RNA 16S es sólo una deducción teórica de los experimentos de digestión con RNAsa A.

La estrategia utilizada para la amplificación del RNAmtnc sentido de ratón, aunque eficiente, presenta un problema que podría traducirse en un artefacto de amplificación. El extremo 3' del DNAc correspondiente al RNA 16S, podría aparearse con una región interna de la misma molécula formando una horquilla. Por lo tanto, el extremo 3' de la horquilla, podría servir como partidor para alargar dicha estructura, generando el largo RI. En relación a esta posibilidad, es importante mencionar que el extremo 3' del DNAc del RNA 16S, termina en la secuencia TGAT, la cual puede aparearse internamente con la misma molécula, con la secuencia ACTA entre las posiciones 2 y 5 del DNAc (a partir del extremo 3'). Aunque este apareamiento es muy inestable, en las condiciones utilizadas en la síntesis de DNAc (37°), se procedió a determinar la presencia del RNAmtnc sentido, utilizando otro enfoque experimental. El RI debería formar con el RNA 16S una horquilla con una región doble hebra de 732 pb. Esta región, debería ser resistente a la digestión con RNAsa A, no así el asa ni la región simple hebra en el 3' (figura 6a). Por lo tanto, se procedió a digerir el RNA total de células C2C12 con RNAsa A, y posteriormente, se extrajo el material resistente con fenol y posterior precipitación con etanol (ver Materiales y Métodos). El RNA obtenido, se amplificó mediante RT-PCR con el partidor 8, en conjunto con el partidor 1 o 10, como se muestra en la figura 6a. Con los partidores 8 y 10, los cuales limitan el RI, se obtuvo el amplicón esperado de 732 pb, independiente del tiempo de digestión hasta 600 segundos (figura 6b). Para determinar que el amplicón de 732 nts no se debe a contaminación del RNA con DNA mitocondrial, la misma reacción se realizó en ausencia de transcriptasa reversa. Como se muestra en la figura 6c, el fragmento de 732 pb no fue amplificado. Bajo estas mismas condiciones de digestión, no se logró amplificar con los partidores 1 y

8, lo que indica que la región simple hebra del asa fue totalmente digerida (figura 6c). Para comprobar el largo del RNAmtno sentido, se realizó un ensayo de northern blot (figura 6d) donde se muestra una marca de hibridación entre las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28S y 18S. Esta banda corresponde al RNAmtno sentido. Al realizar este ensayo con una sonda complementaria a la región 3' simple hebra, además de presentar una marca para el RNAmtno sentido, debería estar presente una marca para el RNA ribosomal 16S, ya que comparten la misma secuencia en esa región (sonda 16, figura 4a). En la figura 6d se aprecia claramente esta señal para el RNA ribosomal 16S, el cual migra de manera más rápida que el RNA ribosomal 18S.

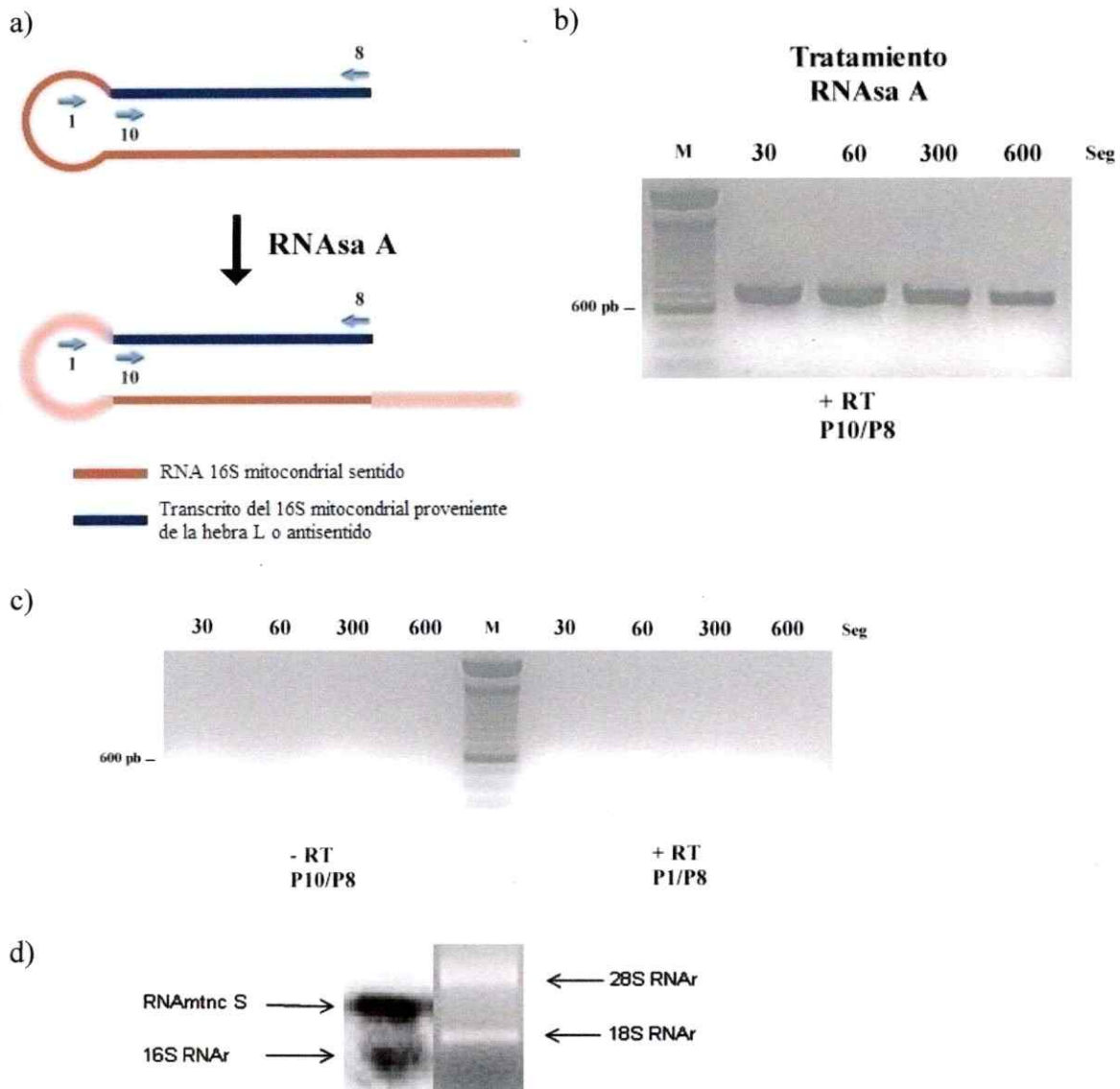


Figura 6. El RNAmtn c sentido contiene una larga región doble hebra.

a) Estrategia experimental para el tratamiento con RNase A. b) Incubación de RNA total de células C2C12 a los tiempos indicados en segundos con RNase A. La RT-PCR se hizo con los partidores 10 y 8. c) Se realizó como control de digestión, la amplificación por RT-PCR con los partidores 10 y 8, en ausencia de transcriptasa reversa (izquierda) y con los partidores 1 y 8, en presencia de transcriptasa reversa (derecha), a los tiempos de digestión indicados. El estándar utilizado corresponde a una escalera de 100 pb. d) Ensayo de northern blot (carril izquierdo) y su respectivo gel de agarosa (carril derecho). Fue revelado con una sonda contra el extremo 3' simple hebra del RNAmtn c sentido.

Expresión del RNAm_{tn}c sentido y antisentido en células de ratón.

Como se describió en la introducción, las células humanas normales en proliferación, expresan tanto el RNAm_{tn}c sentido como el antisentido. Por lo tanto, quisimos determinar si lo mismo ocurre en células normales de ratón en proliferación, mediante HIS. Como se muestra en la figura 7, la hibridación con la sonda 9 complementaria a la región simple hebra del 3' del RNAm_{tn}c sentido de ratón (figura 4a), originó una fuerte tinción tanto en células de testículo como en un embrión de 12 días (figura 7). Lo interesante es que en este último tejido, podemos apreciar una marca concordante con lo que sería una zona endotelial, la cual es altamente proliferativa (Figura 7, flechas blancas). Cuando la hibridación se realizó con la sonda 16, que es sentido para la misma región del RNAm_{tn}c (figura 4a), se obtuvieron señales semejantes a las obtenidas con la sonda antisentido (figura 7). Estos resultados sugieren, que al igual que lo que ocurre en células humanas, en ratón también se expresa el RNAm_{tn}c sentido y antisentido, en células en proliferación. En forma similar, en células en reposo, como las de músculo esquelético, estos transcritos no se expresan (figura 7).

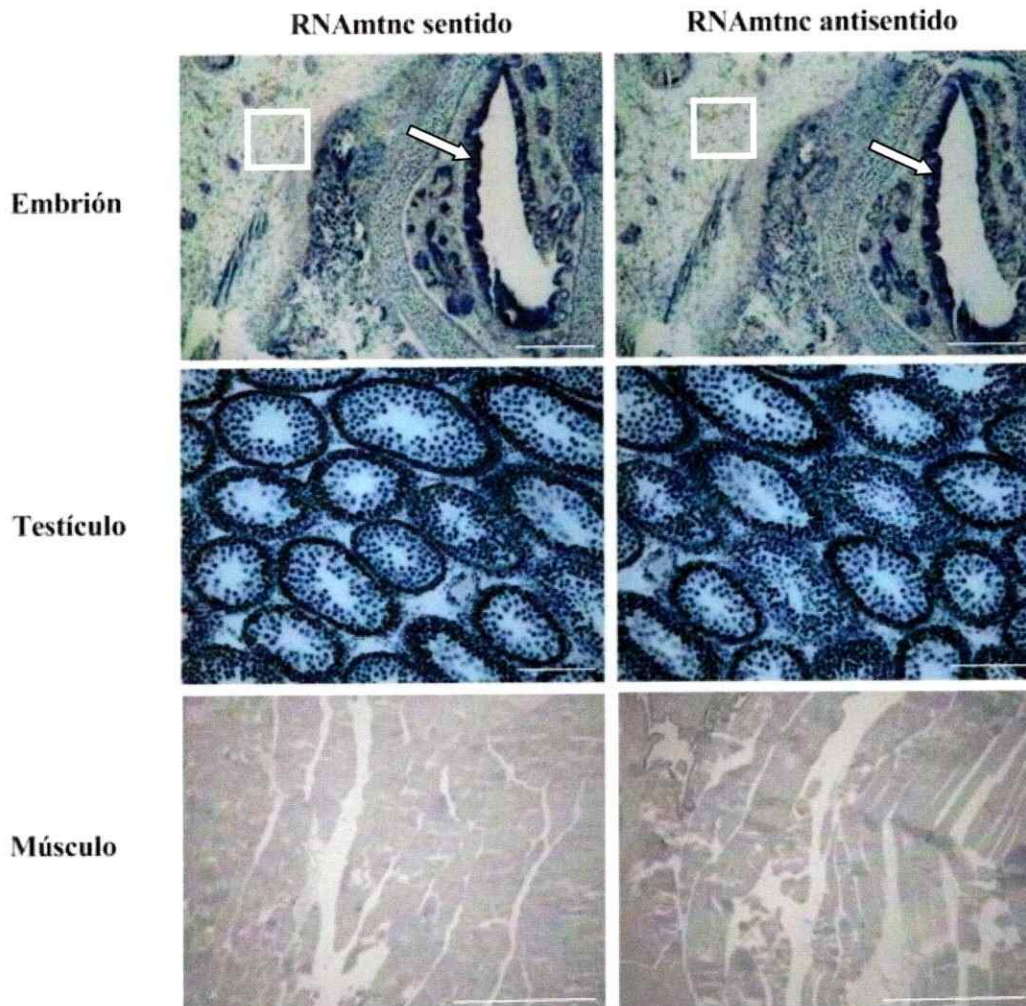


Figura 7. Expresión de los RNAmtnc en tejidos normales de ratón. Secciones seriadas de embriones de 12 días, de testículo y de músculo adulto se hibridaron con la sonda 9 o 16 (figura 4a) marcadas con digoxigenina. Posterior a los lavados, las secciones se incubaron con anti-digoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina. Flechas blancas indican zonas endoteliales. Dentro del cuadrado se observan zonas estromales. La reacción de color se realizó como se describe en Métodos. 20X. Barra: 100 μ .

Idénticos resultados se obtuvieron con células C2C12, las cuales expresan tanto el RNAmtnc sentido como el antisentido (figura 8). Para confirmar que los mioblastos estaban en proliferación, la HIS para ambos RNA se comparó con la expresión del antígeno nuclear de células proliferantes o PCNA. Como se observa en la figura 8, los mismos mioblastos que expresan PCNA también expresan el RNAmtnc sentido o antisentido.

Mioblastos

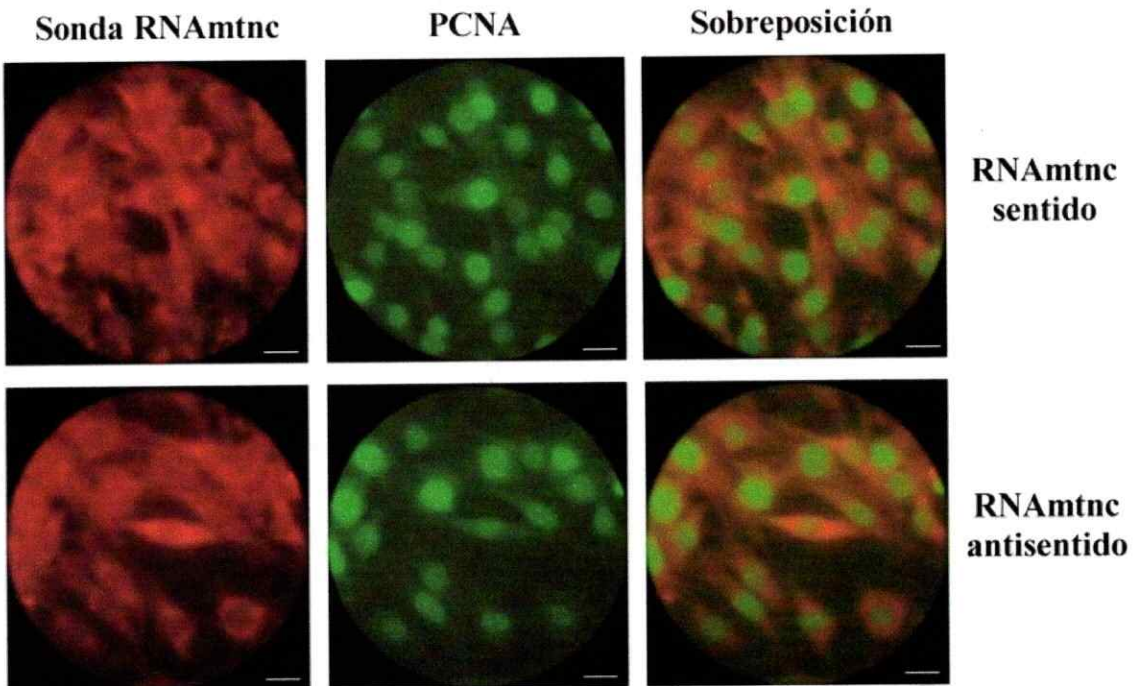


Figura 8. Co-expresión de los RNAmtn sentido y antisentido con PCNA. Cultivos paralelos de células C2C12 se hibridaron con la sonda 9 o 16 marcadas con digoxigenina. Posterior a la hibridación y lavados, las células se incubaron con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con rodamina (señal roja) y con un anticuerpo anti-PCNA unido a Alexa fluor 488 (señal verde). 40X. Barra: 20 μ m.

Nuestro laboratorio ha demostrado, que contrario a las células humanas normales en proliferación, todas las células tumorales (en cultivo o en biopsias), continúan expresando el RNAmtn sentido, pero reprimen la expresión del RNAmtn antisentido. Por lo tanto, investigamos que es lo que sucede en células tumorales de ratón. Como se muestra en la figura 9, HIS en las líneas celulares de ratón NSO/2, correspondiente a mieloma, y B16, correspondiente a melanoma, revelan una fuerte expresión del RNAmtn sentido y represión de la expresión del RNAmtn antisentido, al compararlos con células normales de ratón (figura 7).

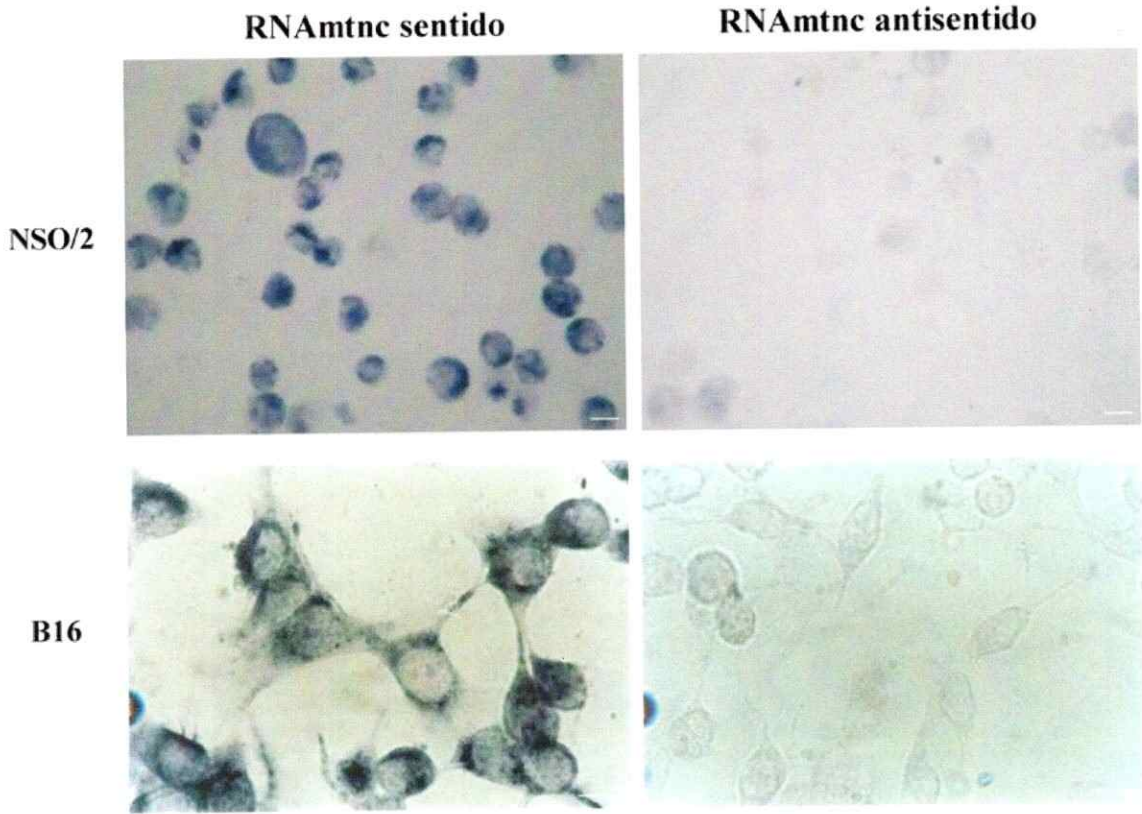
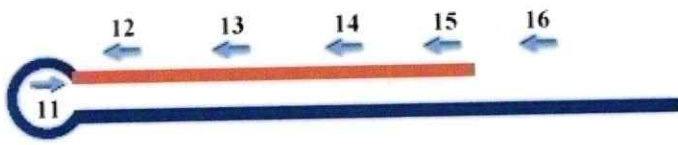


Figura 9. Expresión diferencial de los RNAmtnc en células tumorales de ratón. Se utilizaron células de mieloma (NSO/2) y de melanoma (B16) de ratón a 40X y 100X, respectivamente. La HIS se realizó con las sondas 9 y 16 como se describió en la fig. 6. Barra: 10 μ m.

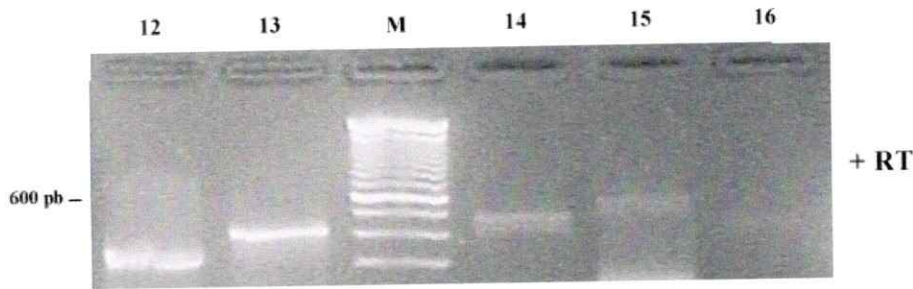
Caracterización del RNA Mitocondrial No Codificante antisentido.

Los resultados anteriores sugieren, que al igual que en células humanas, las células normales proliferantes de ratón expresan, además, del RNAmtn c sentido, un transcrito antisentido. Por lo tanto, basado en la información disponible del correspondiente transcrito humano, se utilizó la estrategia diseñada para el RNAmtn c sentido, para determinar las características del transcrito antisentido. Se diseñó un RNAmtn c antisentido teórico, con el cual se generaron partidores específicos para poder amplificarlo por RT-PCR (figura 10a). Con el partidor 11, posicionado en la región del asa, y en combinación con los partidores 12, 13, 14 y 15 se obtuvieron amplicones de 280, 380, 460 y 570 pb, respectivamente (figura 10b). Con los partidores 11 y 16, no se obtuvo producto de amplificación, lo que indica que el extremo 5' del RI, se encuentra localizado entre los partidores 15 y 16 (figura 10b). Las reacciones controles de RT-PCR realizadas en ausencia de transcriptasa reversa, no generaron productos de amplificación (figura 10c). Para comprobar el largo del RNAmtn c antisentido, se realizó un northern blot con una sonda complementaria a la región del empalme (sonda 18, figura 13a). Al ser una sonda específica contra el RNAmtn c antisentido, sólo se obtuvo una banda entre los RNA ribosomales 28S y 18S. De esta manera se comprueba que el largo total es mayor que al correspondiente al 16S, el cual migra más rápido que el RNA ribosomal 18S.

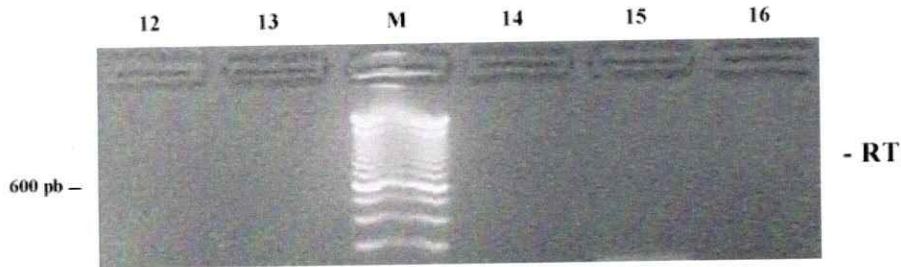
a)



b)



c)



d)

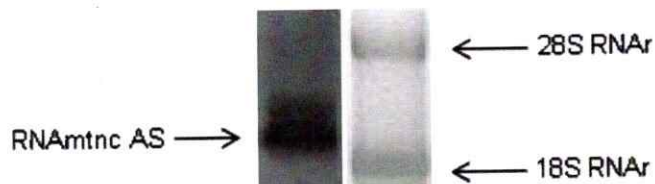


Figura 10. Caracterización del RNA mitocondrial no codificante antisentido, expresado en mioblastos de ratón. a) Estructura putativa del RNAmtnc antisentido y estrategia de amplificación. El partidor 11 está posicionado en el asa y cercano al extremo 5' del RNA 16S antisentido, mientras que los partidores restantes se encuentran a lo largo del repetido invertido. b) Amplificación de RNA total de C2C12 por medio de RT-PCR. c) Como control, se realizó la misma amplificación, en ausencia de transcriptasa reversa. El estándar utilizado corresponde a 100 pb. d) Ensayo de northern blot (carril izquierdo) y su respectivo gel de agarosa (carril derecho). Fue revelado con una sonda contra la región del empalme del RNAmtnc antisentido.

La secuencia del fragmento de aproximadamente 570 pb, reveló que un RI de 528 nts proveniente del 16S RNAm sentido, estaba unido a los primeros 33 nts del 16S RNAm antisentido (figura 11).

1	<u>AGTGAAGAGG</u>	<u>CTGAAATATA</u>	<u>ATAATAAGAC</u>	<u>GAGAAGACCC</u>	<u>TATGGAGCTT</u>	<u>AAATTATATA</u>
61	<u>ACTTATCTAT</u>	<u>TTAATTTAT</u>	<u>AAACCTAATG</u>	<u>GCCCCAAAAC</u>	<u>TATAGTATAA</u>	<u>GTTTGAAATT</u>
121	<u>TCGGTTGGGG</u>	<u>TGACCTCGGA</u>	<u>GAATAAAAAA</u>	<u>TCCTCCGAAT</u>	<u>GATTATAACC</u>	<u>TAGACTTACA</u>
181	<u>AGTCAAAGTA</u>	<u>AAATCAACAT</u>	<u>ATCTTATTGA</u>	<u>CCCAGATATA</u>	<u>TTTTGATCAA</u>	<u>CGGACCAAGT</u>
241	<u>TACCCTAGGG</u>	<u>ATAACAGCGC</u>	<u>AATCCTATTT</u>	<u>AAGAGTTCAT</u>	<u>ATCGACAATT</u>	<u>AGGGTTTACG</u>
301	<u>ACCTCGATGT</u>	<u>TGGATCAGGA</u>	<u>CATCCCAATG</u>	<u>GTGTAGAAGC</u>	<u>TATTAATGGT</u>	<u>TCGTTTGTTC</u>
361	<u>AACGATTAAT</u>	<u>GTCCTACGTG</u>	<u>ATCTGAGTTC</u>	<u>AGACCGGAGC</u>	<u>AATCCAGGTC</u>	<u>GGTTTCTATC</u>
421	<u>TATTTACGAT</u>	<u>TTCTCCCAGT</u>	<u>ACGAAAGGAC</u>	<u>AAGAGAAAAT</u>	<u>GAGCCACCTT</u>	<u>ACAAATAAGC</u>
481	<u>GCTCTCAACT</u>	<u>TAATTTATGA</u>	<u>ATAAAATCTA</u>	<u>AATAAAATAT</u>	<u>ATACGTACAA</u>	<u>CCTTCTCTAG</u>
541	<u>GTTAGAGGGT</u>	<u>GTACGTATAT</u>	<u>ATTTTATTTA</u>	<u>GATTTTATTC</u>	<u>ATAAATTAAG</u>	<u>TTGAGAGCGC</u>
601	<u>TTATTTGTAA</u>	<u>GGTGGCTCTA</u>	<u>TTTCTCTTGT</u>	<u>CCTTTCGTAC</u>	<u>TGGGAGAAAT</u>	<u>CGTAAATAGA</u>
661	<u>TAGAAACCGA</u>	<u>CCTGGATTGC</u>	<u>TCCGGTCTGA</u>	<u>ACTCAGATCA</u>	<u>CGTAGGACTT</u>	<u>TAATCGTTGA</u>
721	<u>ACAAACGAAC</u>	<u>CATTAATAGC</u>	<u>TTCTACACCA</u>	<u>TTGGGATGTC</u>	<u>CTGATCCAAC</u>	<u>ATCGAGGTCG</u>
781	<u>TAAACCTAA</u>	<u>TTGTCGATAT</u>	<u>GAACTCTTAA</u>	<u>ATAGGATTGC</u>	<u>GCTGTTATCC</u>	<u>CTAGGGTAAAC</u>
841	<u>TTGGTCCGTT</u>	<u>GATCAAAATA</u>	<u>TATCTGGGTC</u>	<u>AATAAGATAT</u>	<u>GTTGATTTTA</u>	<u>CTTTACTTGT</u>
901	<u>TAAGTCTAGG</u>	<u>TTATAATCAT</u>	<u>TCGGAGGATT</u>	<u>TTTTATTCTC</u>	<u>CGAGGTCACC</u>	<u>CCAACCGAAA</u>
961	<u>TTTCAAACCT</u>	<u>ATACTATAGT</u>	<u>TTTTGGGCCA</u>	<u>TTAGGTTTAA</u>	<u>TAAATTAAT</u>	<u>AGATAAGTTA</u>
1021	<u>TATAATTTAA</u>	<u>GCTCCATAGG</u>	<u>GTCTTCTCGT</u>	<u>CTTATTATTA</u>	<u>TATTTAGGCC</u>	<u>TCTTCACTGA</u>
1081	<u>AAGGTCAATT</u>	<u>TCACTGATTA</u>	<u>AAGATAAGAG</u>	<u>ACAGTTGGAC</u>	<u>CCTCGTTTAG</u>	<u>CCGTTTCATGC</u>
1141	<u>TAGTCCCTAA</u>	<u>TTAAGGAACA</u>	<u>AGTGATTATG</u>	<u>CTACCTTTGC</u>	<u>ACGGTCAGGA</u>	<u>TACCGCGGCC</u>
1201	<u>GTTAAACTTT</u>	<u>AGTCACTGGG</u>	<u>CAGGCAGTGC</u>	<u>CTCTAATACT</u>	<u>TGTAATGCTA</u>	<u>GAGGTGATGT</u>
1261	<u>TTTTGGTAAA</u>	<u>CAGGCGGGGT</u>	<u>TCTTGTTTGC</u>	<u>CGAGTTCCTT</u>	<u>TTATCTTTTT</u>	<u>GGATCTTTCC</u>
1321	<u>TTTAGGCATT</u>	<u>CCGGTGTTGG</u>	<u>GTTAACAGAG</u>	<u>AAGTTATAGG</u>	<u>TGGATTATTT</u>	<u>ATAGTGTGAT</u>
1381	<u>TATTGCCTAT</u>	<u>AGTCTGATTA</u>	<u>ACTAACAAATG</u>	<u>GTTATCCGAG</u>	<u>TTGTTATACG</u>	<u>CGTATGCCTG</u>
1441	<u>GAGAATTGGA</u>	<u>ATTCTTGTTA</u>	<u>CTCATACTAA</u>	<u>CAGTGTTGCA</u>	<u>TCTATAAAGT</u>	<u>TATAGATTAA</u>
1501	<u>CCCAATTTTA</u>	<u>AGTTTAGGAA</u>	<u>GTTGGTGTA</u>	<u>ATTATGGAAT</u>	<u>TAATTGAAAT</u>	<u>TTTATGTTGA</u>
1561	<u>GCTTGAACGC</u>	<u>TTTCTTTATT</u>	<u>GGTGGCTGCT</u>	<u>TTTAGGCCTA</u>	<u>CAATGGTTAA</u>	<u>AAGCTGTTTT</u>
1621	<u>GTTAATTATT</u>	<u>CACTATTAAT</u>	<u>GGTTTTTTCC</u>	<u>GTTCCAGAAG</u>	<u>AGCTGTCCCT</u>	<u>CTTTTGGCTA</u>
1681	<u>TAATCTAAAC</u>	<u>TTACTTTTTG</u>	<u>ATTTTGTTGT</u>	<u>TTTTTTAGCA</u>	<u>AGTTTAAAT</u>	<u>TGAACTTAAA</u>
1741	<u>TTCATTTTTT</u>	<u>GGTAACCCAG</u>	<u>CTATCACCAA</u>	<u>GCTCGTTAGG</u>	<u>CTTTTCACCT</u>	<u>CTACCTAAAA</u>
1801	<u>ATCTTCTCAC</u>	<u>TATTTTGCCA</u>	<u>CATAGACGAG</u>	<u>TTGATTATAA</u>	<u>AAATTGTTTT</u>	<u>TAGGTAGCTC</u>
1861	<u>GTTTGGTTTC</u>	<u>GGGGTTTCTA</u>	<u>GCTGTAATTC</u>	<u>TTTTAGTTAG</u>	<u>AAGTTTTCTA</u>	<u>GTTAGTTCAT</u>
1921	<u>TATGCAAAG</u>	<u>GTACAAGGTT</u>	<u>TAATCTTTGC</u>	<u>TTGTTCTTAC</u>	<u>TTTTAATTAG</u>	<u>TCTTTCATCT</u>
1981	<u>TTCCCTTGCG</u>	<u>GTAAGTTC</u>	<u>TATAGCTCCT</u>	<u>AGATGTACGA</u>	<u>ATTTCTTCT</u>	<u>CCAATACTTT</u>
2041	<u>TAGTAGGATA</u>	<u>AATGTTTTGA</u>	<u>TTTATATAAT</u>	<u>AGTATAATTA</u>	<u>TATTTGTGTA</u>	<u>GGGCTAGGGC</u>
2101	<u>TAGGATTAGT</u>					

Figura 11. Secuencia del RNAm_{nc} antisentido murino. Subrayado se destaca el RI (azul) y su región complementaria en el RNAm_{16S}. La secuencia completa del RNA_{16S} antisentido (en negro), es deducida por comparación con la correspondiente secuencia de los transcritos humanos.

Expresión de los RNAm_{nc} durante miogénesis.

Las células C2C12 constituyen un atractivo modelo de diferenciación celular, que nos permite determinar la variación en la expresión de los RNAm_{nc}. Al cambiar el medio de cultivo de estas células, cuando alcanzan una confluencia de alrededor 60-80%, por DMEM más 5% de suero de caballo, se gatilla la diferenciación de las células C2C12 en miotúbulos. Cuando se iniciaron estos estudios, nuestros resultados mostraron una diferenciación más lenta y con menor densidad de miotúbulos (figura 12 menos insulina). Posteriormente, encontramos que la diferenciación de las células C2C12 en miotúbulos, era fuertemente estimulada al adicionar al medio de cultivo 10 μ M de insulina. La diferenciación fue más rápida, y con una mayor confluencia de miotúbulos (figura 12 más insulina). Por lo tanto, utilizando estas condiciones de diferenciación, se determinó la expresión de los RNAm_{nc} sentido y antisentido mediante HIS.

- Insulina

+ Insulina

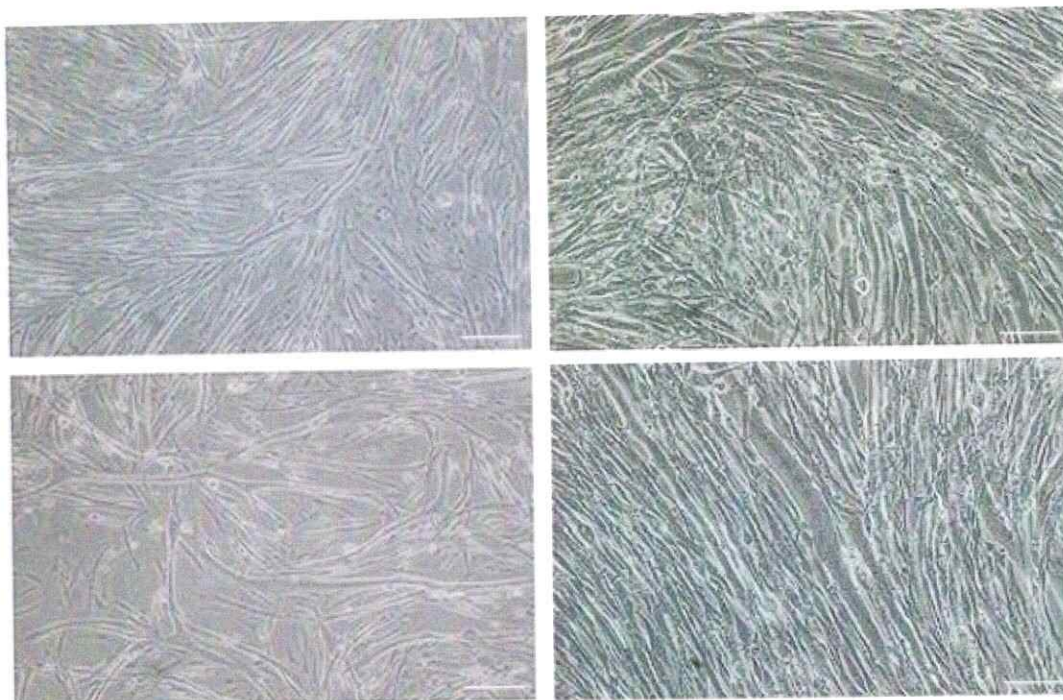


Figura 12. Determinación de las condiciones de diferenciación de las células C2C12. El medio DMEM suministrado con suero de caballo al 5% se utilizó sin o con 10 μM de insulina pancreática de origen bovino. Las imágenes fueron obtenidas después de 6 días post diferenciación. Para cada condición usada (+/- insulina) se muestran fotos de dos experimentos independientes. 40X. Barra: 50 μm .

Al utilizar como sondas los oligonucleótidos 9 (para el RNAm_{tn}c sentido) y 16 (para el RNAm_{tn}c antisentido) (figura 13a), se observó que ambos transcritos se expresan en casi el 95% de células C2C12 (figura 13b, D0). A los tres días post-adición del suero de caballo e insulina, se observa fusión de estas células y formación de miotúbulos. En paralelo, el número de células marcadas disminuye, y en general, las con señal positiva fuerte, corresponden a células C2C12 aún no fusionadas (figura 13b, D3). A los 6 días post inducción de diferenciación, se observa un dramático aumento de miotúbulos y una disminución del número de células marcadas (figura 13b, D6).

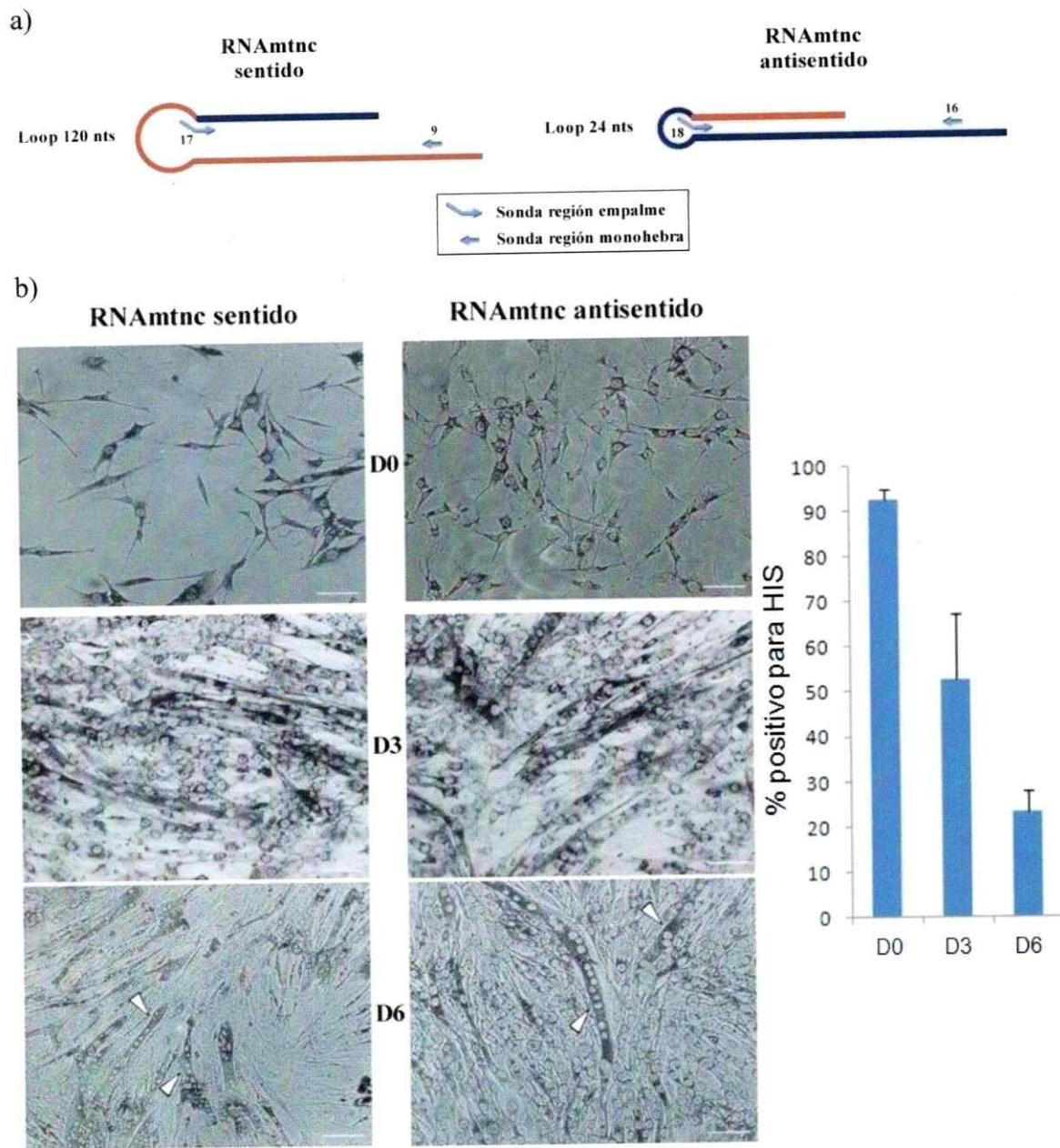


Figura 13. Expresión de los RNAmtnc sentido y antisentido en células C2C12 y en los miotúbulos resultantes de la diferencia miogénica. a) Las sondas 9 y 16 se encuentran en la región monohebra de los RNAmtnc. Las sondas fueron marcadas con digoxigenina como se describió anteriormente. b) HIS con sondas 9 (izq.) y 16 (der.), en células no diferenciadas (D0), a 3 días de comenzado el proceso de diferenciación (D3), y miotúbulos (D6). Las puntas de flecha indican miotúbulos positivos para las sondas sentido y antisentido. 40X. Barra: 50 μ m.

Las sondas utilizadas en estos experimentos, no diferencian entre los RNAm_{nc} y el RNA 16S mitocondrial. Por lo tanto, estos estudios se repitieron con sondas de oligonucleótidos complementarios a la región de empalme entre los RI y la secuencia del RNA 16S mitocondrial (sentido o antisentido) (figura 13a). Como se muestra en la figura 14 (D0), la expresión de los transcritos sentidos y antisentidos, es semejante a la descrita anteriormente. Más del 95% de los mioblastos muestran señal positiva, tanto para el RNAm_{nc} sentido como antisentido. A los 6 días post inducción de la diferenciación, de nuevo se observó una masiva formación de miotúbulos (figura 14, D6). De éstos, muy pocos mantienen la marca de hibridación, aunque se observan miotúbulos con señal de hibridación positiva en el citoplasma (figura 14, D6 puntas de flecha). Para obtener información más cuantitativa, se contaron los núcleos cuyo citoplasma circundante era negativo a la HIS, versus el total de núcleos. De esta manera, se encontró que a los 6 días post-diferenciación, alrededor del 20% de los núcleos, presentaban señales positivas de hibridación, tanto para el transcrito sentido como para el antisentido. Esto nos indica que estos miotúbulos pierden la detección de estos RNAm_{nc} mediante HIS.

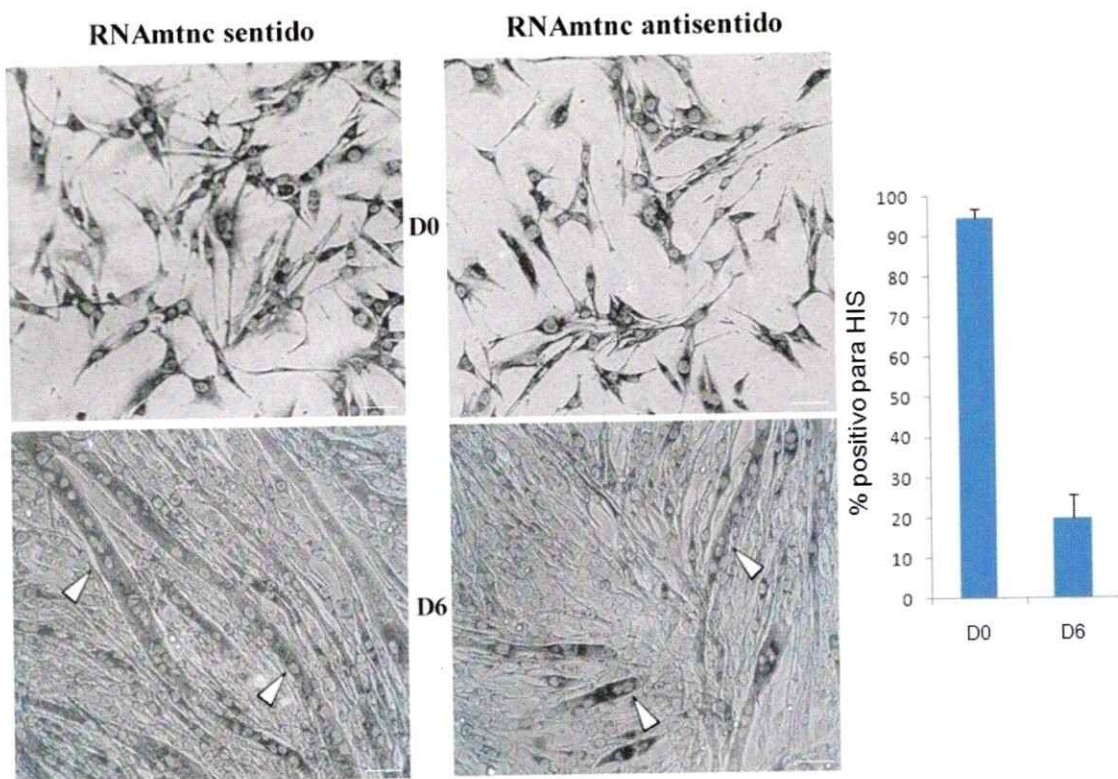


Figura 14. Expresión de los RNAmtn sentido y antisentido durante la diferenciación miogénica. La HIS se realizó con las sondas 17 (izquierda) y 18 (derecha) (ver figura 13a), que son complementarias a las regiones de empalme del RNAmtn sentido y antisentido, respectivamente. La hibridación y el revelado, se realizaron como se describió anteriormente. Las puntas de flecha indican miotúbulos positivos para las sondas sentido y antisentido. 40X. Barra: 50 μ m.

Sin embargo, un resultado sorprendente, fue observar algunos miotúbulos formados por 2 a 3 núcleos o más de 10 núcleos, donde la expresión de ambos transcritos persistía. Como se describió anteriormente, hay una fuerte correlación entre las expresiones de los RNAmtn y el factor de proliferación PCNA (figura 8). Por lo tanto, determinamos si también coincidía la expresión de PCNA, en aquellos miotúbulos que expresaban los RNAmtn. Aunque la señal de hibridación para PCNA es más débil que la observada en células C2C12, se observa una coincidencia en la expresión de ambos tipos de moléculas en ciertos miotúbulos (figura 15).

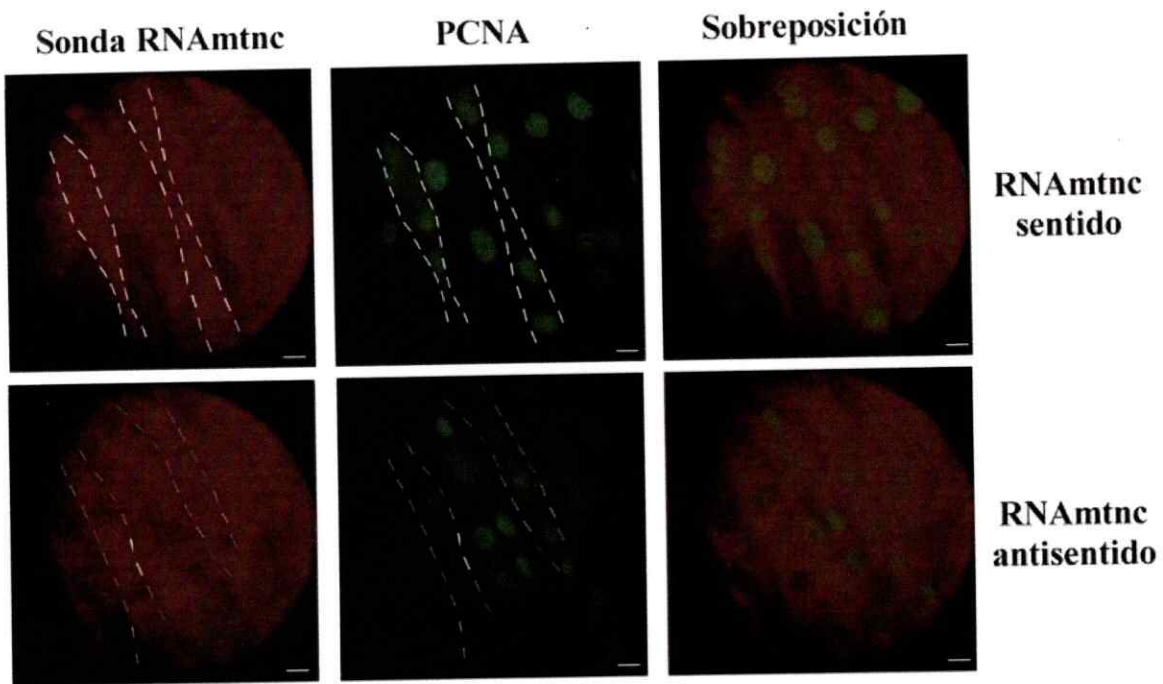


Figura 15. Co-expresión de los RNAmtn y PCNA en células diferenciadas. La hibridación fluorescente se realizó como se describió en la figura 8, utilizando las sondas 9 y 16 marcadas con digoxigenina y reveladas con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con rodamina (señal roja). El PCNA se reveló con un anticuerpo conjugado con Alexia flúor 488 (señal verde). Las líneas punteadas muestran miotúbulos positivos para los transcritos y PCNA. 40X. Barra: 10 μ m.

DISCUSION

RNAs No Codificantes Mitocondriales de ratón

Nuestro laboratorio reportó inicialmente, que el transcrito no codificante mitocondrial de ratón contenía un RI de 121 nt unido al extremo 5' del RNA 16S mitocondrial (Villegas et al., 2000; Villegas et al., 2002). Se postuló entonces, que el RI se originaba de un fragmento del RNA policistrónico transcrito desde la hebra L del DNAm_t y correspondiente al gen 16S (Taanman, J.W, 1999). La transcripción del DNAm_t, es un proceso simétrico que ocurre en ambas hebras y que depende de promotores distintos y que funcionan en forma independiente (Taanman, J.W, 1999). Por lo tanto, en esa oportunidad propusimos llamar a este transcrito como RNA quimérico (Villegas et al., 2000; Villegas et al., 2002). Sin embargo, esta designación puede ser confusa, por lo que hemos cambiado el nombre a RNA No Codificante Mitocondrial (RNAm_{tnc}).

Después de determinar la estructura del correspondiente RNA humano (Burzio y col, 2005, PCT), nos llamó la atención la gran diferencia entre estos transcritos en relación con el largo del RI. Una de las explicaciones para esta diferencia, podría ser la forma en que se obtuvieron estas estructuras. En el caso del ratón, la estructura del transcrito se derivó del aislamiento de clones de una biblioteca de DNAc de testículo, construida en fago lambda (Villegas et al., 2000). En contraste, la estructura del transcrito humano, se obtuvo a partir de un transcrito hipotético amplificado y secuenciado en

fragmentos traslapados (Burzio y col, 2005, PCT). La razón para usar una estrategia diferente, en el caso del transcrito humano, se debió a dos hechos fundamentales: 1) La búsqueda de este transcrito en bibliotecas de DNAc de testículo y de células HeLa fue infructuosa. 2) Sé pensó que esta falla se debería a deslizamiento replicativo (*replication slippage*), debido a la presencia de horquillas muy estables en el transcrito (Viguera y col, 1999; Viguera y col, 2001).

El deslizamiento replicativo, se debe a la pobre o nula capacidad *in vitro* de las DNA polimerasas, de copiar al interior de horquillas, que no necesariamente son perfectas. Esto se debe a la pobre o nula capacidad de separación de hebras, tanto en regiones de horquillas como de estructuras cruciformes de DNAs (Viguera y col, 1999; Viguera y col, 2001). Por lo tanto, la enzima replica hasta el extremo 3' de la horquilla y posteriormente, "salta" al término 5' de la misma estructura, continuando con la replicación. Esto ocurriría, siempre y cuando exista repetidos directos cortos, a ambos lados de la horquilla; lo que da por resultado una secuencia de DNAc, en la que falta la región de la horquilla (Viguera y col., 1999; Glickman y Ripley, 1984; Madsen et al., 1993; Canceill y Ehrlich, 1996). El fenómeno de deslizamiento replicativo se ha encontrado, tanto con las enzimas clásicas utilizadas en la síntesis de DNAc y de la segunda hebra (DNA polimerasas de *E. coli* I, II y III, como también de las polimerasas fagos T3, T4 y T7), e incluso en DNA polimerasas termoresistentes (Viguera et al., 1999, Glickman y Ripley, 1984; Madsen et al., 1993; Canceill y Ehrlich, 1996). En este último caso, la nula capacidad de estas polimerasas de separar las hebras de la horquilla, se traduce en problemas de amplificación, produciéndose deleciones de las estructuras

horquillas o tipo tallo, además de consecuencias nefastas durante la secuenciación de transcritos o DNAC (Viguera et al., 2001; Hew et al., 1999; Viswanathan et al., 1999). Por lo tanto, uno de los objetivos iniciales de esta tesis, fue revisar la estructura del RNAm_{nc} de ratón utilizando la misma estrategia que se utilizó para el transcrito humano (Burzio y col, 2005, PCT). Los resultados demostraron que el transcrito murino contenía un RI de 732 nts, bastante similar a la estructura del transcrito humano, siendo la mayor diferencia, el tamaño del asa de la horquilla (121 y 40 nts, respectivamente).

La misma estrategia se utilizó, para determinar la estructura del RNAm_{nc} de ratón antisentido, que sólo se expresa en células normales en proliferación de ratón. Este transcrito, tiene un RI de 528 nts unidos al 5' del RNA 16S mitocondrial antisentido, codificado por la hebra L del DNAm_t. Pareciera que existe un segundo transcrito antisentido, pero que no fue mayormente investigado. Por lo tanto, hemos diseñado una metodología para obtener las estructuras de estos transcritos (sentido o antisentido), que podrá ser utilizada para determinar las estructuras de RNA de otros organismos.

Un aspecto importante y que no fue abordado en esta tesis, se refiere al origen de estos transcritos. Los resultados de nuestro laboratorio apoyan fuertemente, que el origen de estos RNAm_{nc} (sentido y antisentido), es mitocondrial. En primer lugar, las secuencias de estos transcritos, tanto humano como de ratón, muestran como mínimo un 99.9% de identidad con el DNAm_t. Segundo, estos RNAs se encuentran en mitocondrias aisladas de células HeLa y previamente tratadas con RNAsa A, para eliminar contaminación con transcritos citoplasmáticos. Tercero, el tratamiento de células HeLa con bromuro de

etidio o células DU145 con rodamina 6G, anulan completamente la síntesis de estos transcritos. Ambas drogas son reconocidas como fuertes inhibidores específicos de transcripción mitocondrial y que no afectan la transcripción nuclear (Hayakawa y col, 1998; Williams y col, 1999; Felty y col, 2005). Estos resultados, además de constituir fuertes demostraciones del origen mitocondrial, descartan, que estos transcritos sean productos de transcripción de pseudogenes mitocondriales del DNA nuclear (Woischnik, M. y col, 2002).

Expresión de los RNA Mitocondriales No Codificantes

La función de los RNAmtn, sentido y antisentido, no está establecida a nivel molecular. Sin embargo, y como se mostró en esta tesis, existe una estrecha correlación entre el estado proliferante de una célula de ratón (normal o tumoral) y la expresión del RNAmtn sentido. La misma correlación existe en células humanas en proliferación. Por otro lado, células en reposo o senescentes, no expresan este transcrito, lo que sugiere que la expresión del transcrito sentido es un nuevo participante en el complejo ciclo celular. Más complejo aún, es analizar la posible función del RNAmtn antisentido. Como se demostró en esta tesis, este transcrito se expresa en células normales en proliferación y es reprimido en células tumorales. Aunque especulativo en este momento, se podría pensar que la función del transcrito antisentido, es regular la función del RNAmtn sentido. Existen evidencias experimentales claras, acerca de la regulación entre transcritos, sentido y antisentido, como por ejemplo, durante el proceso de inactivación de uno de los

cromosomas X en hembras. El RNAmc Xist sería el encargado de inducir heterocromatización de uno de los cromosomas X, mientras que el transcrito no codificante Tsix, que tiene una larga porción antisentido para el Xist, inhibiría la inactivación, inducida por este último en el otro cromosoma, mecanismo que pareciera ser fundamentalmente interacción por secuencia o complementariedad entre estos dos transcritos (Carrel y Willard, 2005; Chow y Col, 2005; Okamoto y col, 2004; Plath y col, 2002). Por lo tanto, la participación positiva del transcrito sentido en proliferación celular, sería regulada o monitoreada por el antisentido, también por una interacción de secuencias. Para su sobrevivencia, la célula tumoral evita regulaciones típicas del ciclo celular, por lo tanto, pareciera ser razonable, que en estas células, esté también reprimida la expresión del transcrito antisentido.

Por otro lado, es realmente fascinante, que el fenotipo tumoral encontrado en esta tesis en líneas tumorales de ratón (represión del transcrito antisentido), sea exactamente igual a lo encontrado en células tumorales humanas. Aunque prematuro, estos resultados parecieren indicar que este fenotipo tumoral es de carácter universal, lo que constituiría un marcador que muchos laboratorios han estado buscando.

Diferenciación y expresión de los RNAmc

La hipótesis de la presente tesis proponía que durante la diferenciación de las células C2C12 o mioblastos de ratón en miotúbulos, la expresión de los transcritos

sentido y antisentido, debería reprimirse o desaparecer. Como se demostró en este trabajo, las células C2C12 expresan ambos transcritos, lo que está de acuerdo con lo encontrado en otras células normales de ratón y humano. Mas aún, se demostró que toda célula C2C12, que expresa el RNAm_{nc} sentido o antisentido, también expresa PCNA o el antígeno nuclear de proliferación celular. El PCNA fue originalmente definido como una proteína nuclear que esta correlacionada con el estado proliferativo de la célula. Es también conocido como un co-factor de la DNA polimerasa δ y es un polipéptido ácido no histónico, que se acumula en niveles altos en el núcleo durante la interfase, y que cae abruptamente durante la división mitótica, encontrándose directamente relacionado a la síntesis de DNA (Travali y col, 1989). Por otro lado, y de acuerdo a la hipótesis, el músculo esquelético adulto, al igual que las células en reposo, no expresan ninguno de estos transcritos.

Al inducir diferenciación de las células C2C12, se observó una activa fusión celular y formación de miotúbulos que contenían 10 o más núcleos. Este proceso de diferenciación fue estimulado por insulina, como se demostró en esta tesis, obteniéndose fusiones más abundantes y más tempranas. En relación con la expresión de los transcritos, sentido y antisentido, determinada por HIS, se encontró que a medida que avanzaba el proceso de diferenciación, menor era la cantidad de células marcadas positivamente para HIS. A los 6 días post inducción, alrededor del 80% de los miotúbulos no expresaban estos transcritos. Sin embargo, aún persistía la expresión de ambos transcritos, en alrededor de un 20 % de los miotúbulos. Más aún, estos mismos miotúbulos, también expresaban PCNA, aunque en menor proporción que los mioblastos.

Durante la miogénesis, uno de los primeros eventos, es la expresión de miogenina, factor de transcripción determinante del proceso de diferenciación (Alves y col, 2004). Por lo tanto, sería importante a futuro, correlacionar la expresión de miogenina con la de los RNAmtn.

En relación a lo anterior, es importante mencionar los hallazgos entre actividad mitocondrial y miogénesis (Duguez y col, 2004). Al tratar células C2C12 con cloramfenicol (inhibidor de la traducción mitocondrial), se reprime tanto la proliferación como también la fusión y posterior diferenciación en miotúbulos (Richard y col, 2000; Joulia y col, 2003). Este tratamiento, también afecta la expresión de miogenina, y se ha sugerido que existiría una conversación cruzada entre la traducción/transcripción mitocondrial y nuclear, que sería esencial durante la miogénesis (Richard y col, 2000; Duguez y col, 2002; Duguez y col, 2004). Es tentadora la hipótesis de que los RNAmtn, podrían ser el vínculo de esta conversación cruzada, pero esto requiere futuras investigaciones.

CONCLUSIONES

- La nueva caracterización del RNAmtn c sentido de ratón demostró que el repetido invertido, es de por lo menos 732 nts, indicando un símil con su contraparte humana. La única gran diferencia, observada entre el transcrito murino y el humano, es el tamaño de la horquilla (121 y 40 nts, respectivamente).
- Se caracterizó el RNAmtn c antisentido de ratón, no descrito anteriormente. Este presentó un repetido invertido de 528 nts unido al 5' del RNA 16S mitocondrial antisentido, codificado por la hebra L del DNAm t.
- La expresión de los RNAmtn c, sentido y antisentido, coincide con la expresión del marcador de proliferación PCNA en mioblastos proliferantes en cultivo, mientras que ambos son reprimidos durante el proceso de diferenciación a miotúbulos. Sin embargo, es interesante notar que en algunos miotúbulos, la expresión de los RNAmtn c persiste 6 días post diferenciación.
- Las células tumorales de ratón, al igual que las humanas, revelan una fuerte expresión del RNAmtn c sentido y una represión de la expresión del RNAmtn c antisentido, al compararlas con células normales proliferantes, las cuales expresan ambos.

BIBLIOGRAFÍA

Alves, F.A., Pires, F.R., de Almeida, O.P., Lopes, M.A., Kowaiski, L.P. 2004. PCNA, Ki-67 and p53 expressions in submandibular salivary gland tumours. *Int J Oral Maxillofac Surg.*; 33:593-597.

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Standen, R., Young, I.G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*; 290: 457-465.

Andres V, Walsh K. 1996. Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *J Cell Biol.*; 132: 657-666.

Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. 1990. *Cell.*; 61: 49-59.

Bibb, M. J., Van Etten, R., Wright, C., Walberg, M., Clayton, D.A. 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*; 26: 167-180.

Burzio LO, Villegas J, Burzio V. 2005. Markers for pre-cancer and cancer cells and the method to interfere with cell proliferation therein. Patent Cooperation Treaty (PCT/US2004/015929).

Canceill D, Ehrlich SD. Copy-choice recombination mediated by DNA polymerase III holoenzyme from *Escherichia coli*. 1996. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*; 93: 6647-6652.

Carrel L, Willard HF. 2005. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*; 434: 400-404.

Chow JC, Yen Z, Ziesche SM, Brown CJ. 2005. Silencing of the mammalian X chromosome. *Annual Review of Genomics and Human Genetic*; 6: 69-92.

Clayton, D. 1992. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int. Rev. Cytol.*; 141: 217-232.

Duguez S, Féasson L, Denis C, Freyssenet D. 2002. Mitochondrial biogenesis during skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*; 282: 802-809.

Duguez S, Sabido O, Freyssenet D. 2004. Mitochondrial-dependent regulation of myoblast proliferation. *Exp Cell Res.*; 299: 27-35.

Felty Q, Singh KP, Roy D. 2005. Estrogen-induced G1/S transition of G0-arrested estrogen-dependent breast cancer cells is regulated by mitochondrial oxidant signaling. *Oncogene*; 24: 4883-4893.

Gauthier-Rouviere C, Vandromme M, Tuil D, Lautredou N, Morris M, Soulez M, Kahn A, Fernandez A, Lamb N. 1996. Expression and activity of serum response factor is required for expression of the muscle-determining factor MyoD in both dividing and differentiating mouse C2C12 myoblasts. *Mol Biol Cell.*; 7: 719-29.

Glickman B. y Ripley L. Structural Intermediates of Deletion Mutagenesis: A Role for Palindromic DNA. 1984. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*; 81: 512-516.

Hayakawa, T., Noda, M., Yasuda, K., Yorifuji, H., Taniguchi, S., Miwa, I., Sakura, H., Terauchi, Y., Hayashi, J., Sharp, GW., Kanazawa, Y., Akanuma, Y., Yazaki, Y., Kadowaki, T. 1998. Ethidium bromide-induced inhibition of mitochondrial gene transcription suppresses glucose-stimulated insulin release in the mouse pancreatic beta-cell line betaHC9. *J. Biol. Chem.*; 273: 20300-20307. .

Hew Y, Grzelczak Z, Lau C, Keeley FW. 1999. Identification of a Large Region of Secondary Structure in the 3'-UTR of Chicken Elastin mRNA with Implications for the Regulation of mRNA Stability. *J Biol Chem.*; 274: 14415-14421.

Joulia D, Bernardi H, Garandel V, Rabenoelina F, Vernus B, Cabello G. 2003. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp Cell Res.*; 286: 263-75.

Madsen CS, Ghivizzani SC, Hauswirth WW. In vivo and in vitro evidence for slipped mispairing in mammalian mitochondria. 1993. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*; 90: 7671-7675. Erratum en: *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1993; 90: 7671-7675.

Plath K, Mlynarczyk-Evans S, Nusinow DA, Panning B. 2002. XIST RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annual Review of Genetics*; 36: 233-278.

Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E. 2004. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science*; 303: 644-649.

Rochard P, Rodier A, Casas S, Cassar-Malek I, Marchal-Victorion S, Daury L, Wrutniak C, Cabello G. 2000. Mitochondrial Activity Is Involved in the Regulation of Myoblast Differentiation through Myogenin Expression and Activity of Myogenic Factors. *J Biol Chem*; 275: 2733-2744.

Sambrook, J., Fritsch, E.T. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Edn, Cold Spring Harbord Laboratory, Cold Spring Harbord, NY.

Sanger F, Coulson AR. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*; 94: 441-457.

- Shadel, G.S. and Clayton, D.A. 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu. Rev. Biochem.*; 66: 409-435.
- Taanman, J.W. 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta* ; 1410: 103-123.
- Travali S, Ku D, Rizzo MG, Ottavio L, Baserga R, Calabretta B. 1989. Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem.*; 264: 7466-7472.
- Viguera E, Canceill D, Ehrlich SD. 2001. In vitro replication slippage by DNA polymerases from thermophilic organisms. *J Mol Biol.*; 312: 323-333.
- Viguera E, Canceill D, Ehrlich SD. 1999. Replication slippage of different DNA polymerases is inversely related to their strand displacement efficiency. *J Biol Chem.*; 274: 27481-27490.
- Villegas, J., Müller, I., Arredondo, J., Pinto, R., Burzio, L.O. 2002. A putative RNA editing from U to C in a mouse mitochondrial transcript. *Nuclei Acids Res.*; 30: 1895-1901.
- Villegas, J., Zarraga, A.M., Müller, I., Montecinos, L., Werner, E., Brito, M., Meneses, A.M., Burzio, L.O. 2000. A novel chimeric mitochondrial RNA localized in the nucleus of the mouse sperm. *DNA & Cell Biol.*; 19: 579-588.
- Viswanathan VK, Krcmarik K, Cianciotto NP. 1999. Template secondary structure promotes polymerase jumping during PCR amplification. *Biotechniques.*; 27: 508-511.
- Williams AJ, Murrell M, Brammah S, Minchenko J, Christodoulou J. 1999. A novel system for assigning the mode of inheritance in mitochondrial disorders using cybrids and rhodamine 6G. *Human Molecular Genetics.*; 8: 1691-1697.
- Woischnik, M. and Moraes, C.T. (2002) Pattern of organization of human mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome. *Genome Res.* 12, 885-893.
- Yaffe D, Saxel O. 1977. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270: 725-727. PubMed: 563524
- Yun K, Wold B. 1996. Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context. *Curr Opin Cell Biol.*; 8: 877-89.