

Tesis Doctoral

Identificación y caracterización de genes de la cascada de Ubiquitinación involucrados en el control del proceso de migración e invasión celular

Rossi, Fabiana Alejandra

2018

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rossi, Fabiana Alejandra. (2018). Identificación y caracterización de genes de la cascada de Ubiquitinación involucrados en el control del proceso de migración e invasión celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6358_Rossi

Cita tipo Chicago:

Rossi, Fabiana Alejandra. "Identificación y caracterización de genes de la cascada de Ubiquitinación involucrados en el control del proceso de migración e invasión celular". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6358_Rossi

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Identificación y caracterización de genes de la cascada de Ubiquitinación involucrados en el control del proceso de migración e invasión celular.

Tesis presentada para optar al Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas.

Lic. Fabiana Alejandra Rossi

Director de tesis: Dr. Mario Rossi

Consejera de Estudio: Dra. Anabella Srebrow

Lugar de trabajo: Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires – CONICET – Instituto Partner de la Sociedad Max Planck

Buenos Aires, 2018

*One doesn't discover new lands without consenting to lose sight,
for a very long time, of the shore.*

André Gide, Les faux-monnayeurs (1925)

AGRADECIMIENTOS

Gracias Mario por la confianza y el apoyo para trabajar todos estos años, y los que vendrán. A mis compañeros de mesada actuales y pasados, gracias por la ayuda (experimental y no tanto) para hacer este trabajo: Fanta, Eze y Bochi. Como parte del IBioBA, gracias a los integrantes de los grupos vecinos por las discusiones, y por darme un gran grupo de amigos *mushingas*. Gracias a mis amigos de la facultad (a los que están cerca y en otros continentes), a mis amigas del colegio y de hockey. También a Paul, Fede y Robbie Craig por nunca dudar de mí. A mi familia: gracias por estar cada día y seguir bancándome en todas. A Esteban mil veces.

Identificación y caracterización de genes de la cascada de Ubiquitinación involucrados en el control del proceso de migración e invasión celular.

A pesar de los formidables avances logrados en el tratamiento, prevención y detección temprana de un gran número de cánceres, el desarrollo de procesos metastásicos en pacientes afectados con esta enfermedad continúa representando una reducción significativa en su supervivencia y calidad de vida restante. De hecho, la diseminación metastásica de un tumor primario a un segundo sitio es la causa principal de muertes por tumores sólidos. El desarrollo de metástasis requiere que las células tumorales completen una cascada de acontecimientos constituida por etapas bien definidas, que implican interacciones muy diversas entre las células tumorales y el organismo hospedador. El potencial invasivo de las células malignas depende de tres fenómenos: alteraciones en la adhesión celular, degradación proteolítica localizada de la matriz extracelular y movilidad de las células tumorales. Dicho potencial puede verse modificado por alteraciones genéticas en las células tumorales que podrían constituir posibles puntos de intervención terapéutica.

La ubiquitinación representa una de las modificaciones post-traduccionales cuyo estudio ha despertado un creciente interés en el ámbito de la oncología molecular, debido a su gran potencial a nivel terapéutico en el tratamiento del cáncer. Prueba de esto último es el hecho que, en muchos casos, alteraciones en distintos componentes de la cascada de ubiquitinación están asociadas a la transformación maligna de células tumorales y al desarrollo de procesos metastásicos. La cascada de ubiquitinación consiste en una red compleja de enzimas que median la unión covalente de múltiples unidades de ubiquitina a las proteínas, y representa una de las vías metabólicas más importantes que participa en el control de la proteostasis a nivel celular. Por lo tanto, el estudio de los mecanismos moleculares que rigen esta cascada enzimática, junto con el desarrollo de compuestos que inhiben o activan componentes específicos, posee un gran potencial a nivel terapéutico.

En el contexto de lo señalado en los párrafos anteriores, el objetivo de esta tesis doctoral es identificar y caracterizar componentes de la cascada de ubiquitinación que representen potenciales nuevos blancos moleculares que puedan ser utilizados en futuros desarrollos y mejoras de las terapias antitumorales actuales. A tal fin se realizó un *screen* genético utilizando tecnología de ARN de interferencia (shARN) para encontrar nuevos genes relacionados con el proceso de ubiquitinación que regularan positivamente el potencial migratorio de células tumorales. En particular se focalizó la atención en células derivadas de Cáncer de Mama Triple Negativo (CMTN), una neoplasia maligna que posee un mal pronóstico, presenta alto riesgo de recurrencia metastásica y para la cual no se posee en la actualidad una terapia eficaz y específica.

Mediante este procedimiento se identificó USP19, una enzima deubiquitinasa (DUB), como un nuevo regulador de los procesos de migración e invasión celular. Asimismo se validó, tanto *in vitro*, como así también en modelos animales *in vivo*, el rol que este gen cumple en el control de procesos de tumorigénesis resaltando su alto potencial como posible futuro punto de intervención terapéutico en el tratamiento del cáncer.

Palabras clave: *screen*, ARN de interferencia, Ubiquitinación, metástasis, migración, invasión, tumoral, USP19.

Identification and characterization of Ubiquitin related genes involved in the regulation of tumor cell migration and invasion.

Despite formidable advance in the prevention, early detection and treatment of a great number of cancers, the development of metastasis foci in patients suffering from this disease still represents a significant reduction in their survival and life quality. In fact, metastatic dissemination from a primary tumor to a secondary site is the principal cause of death from solid tumors. The invasive potential of malignant cells depends on three phenomena: alterations of cellular adhesion, localized proteolytic degradation of the extracellular matrix and tumor cell motility. The invasive ability is accomplished by a series of molecular and genetic alterations in tumor cells, which could represent putative therapeutic points of intervention.

Due to its great potential as a new therapeutic option for the treatment of cancer, ubiquitination has attracted the attentions of the scientific community working on the molecular oncology field. This is based on the observations that several alterations in the levels of different ubiquitin-pathway components are associated with malignant transformation of tumor cells and the generation of metastatic processes. The Ubiquitination cascade consists of a complex network of enzymes that link ubiquitin units to proteins, and represents one of the most important pathways that regulate cellular proteostasis. Therefore, the study of the molecular mechanisms that regulate this enzymatic pathway, together with the development of new compounds that inhibit or activate specific components, may prove extremely important for pharmaceutical intervention in therapy.

In relation to the hypothesis outlined in the previous paragraph, the focus of my PhD Thesis is to contribute to the development and improvement of anti-tumoral therapeutic strategies in cancer, by identifying and characterizing components of the Ubiquitination cascade that regulate tumor cell migration and invasion. To this end I performed a genetic screen using the shRNA technology using cells derived from Triple Negative Breast Cancers (TNBC), a malignant disease with poor prognosis, a high metastatic risk and for which there is no specific or effective treatment available.

Using this strategy we identified USP19, a deubiquitinase enzyme (DUB), as a new regulator of cellular migration and invasion. Moreover, its role in tumorigenesis was validated both *in vitro* as well as in animal models *in vivo*, highlighting its potential as a possible future therapeutic intervention point for the treatment of cancer.

Key words: *screen, shARN, Ubiquitination, metastasis, migration, invasion, tumoral, USP19.*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	Error! Bookmark not defined.
UBIQUITINACIÓN	11
Sistema Ubiquitina-Proteasoma (<i>UPS</i>)	11
Enzimas deubiquitinantes (DUBs)	15
Proteasa de Ubiquitina Específica 19 (USP19)	15
Ubiquitinación y relación con cáncer	17
CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO (CMTN)	19
Características generales	19
Tratamientos	21
MIGRACIÓN, INVASIÓN, METÁSTASIS Y SU RELACIÓN CON EL <i>UPS</i>	23
Migración	23
Invasión y metástasis	28
Ubiquitinación en el contexto de metástasis	29
SCREENS GENÉTICOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	Error! Bookmark not defined.
Líneas celulares	34
Transfecciones	34
Transducción de plásmidos	35
Ensayo de migración en <i>transwells</i>	36
Preparación de las muestras para secuenciación	37
Secuenciación Illumina y análisis de datos	40
Síntesis de cADN	41
qPCR	42
Western Blot	42
Preparación de bacterias competentes y plásmidos	43
Ensayo de invasión - gota de agar noble	44
Ensayo de migración - cierre de herida	45
Ensayo clonogénico (2/3 dimensiones)	45
Determinación de tasas de duplicación (espectrometría/microscopía)	46
Sensibilidad a drogas quimioterapéuticas	46
Generación de líneas celulares <i>knock out</i> para el gen <i>usp19</i> mediante CRISPR	47

Validación <i>in vivo</i>	47
Análisis estadístico de los datos	49
Análisis de imágenes	49
RESULTADOS	Error! Bookmark not defined.
SCREEN	51
Factibilidad	51
Puesta a punto del ensayo de migración celular en <i>transwells</i>	53
Procedimiento general – selección de células “no migradoras”	57
Preparación de muestras para secuenciación	60
Secuenciación	64
VALIDACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GEN CANDIDATO: USP19	70
VALIDACIÓN	70
Expresión de USP19	70
Curvas de proliferación	71
Migración.....	73
CARACTERIZACIÓN	76
ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	76
Invasión	77
Potencial tumorigénico	78
Sensibilidad a drogas	80
ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	81
Crecimiento tumoral	81
Metástasis experimental	83
EXPERIMENTOS UTILIZANDO OTRAS LÍNEAS CELULARES.....	85
GENERACIÓN DE LÍNEAS <i>KNOCK OUT</i>	89
DISCUSIÓN	Error! Bookmark not defined.
CONCLUSIONES	92
Screen funcional	92
Validación y caracterización de gen candidato: <i>usp19</i>	92
DISCUSIÓN	94
Uso de <i>transwells</i> como estrategia funcional para realizar screens de migración.....	94
Uso de shARNs como herramienta para realizar <i>screens</i>	96
Selección de una población con bajo potencial migratorio a partir de la línea celular	
MDAMB231.....	99

Secuenciación e interpretación de los resultados.....	99
Elección de usp19 como gen candidato a validar y caracterizar	100
Estudios <i>in vitro</i>	100
Estudios <i>in vivo</i>	102
Estudios en otras líneas celulares	102
Posible mecanismo molecular de acción de USP19.....	104
Perspectivas y futuras direcciones.....	106
MATERIAL SUPLEMENTARIO	Error! Bookmark not defined.
Detalle de genes silenciados por la biblioteca de shARNs	108
Detalle de oligonucleótidos utilizados en la preparación de las muestras para secuenciación por NGS Illumina.....	128
Detalle de oligonucleótidos utilizados en qPCR.....	129
Macros de Image J-FIJI	129
Determinación de número de shARNs por célula	132
BIBLIOGRAFÍA	Error! Bookmark not defined.

INTRODUCCIÓN

UBIQUITINACIÓN

Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS)

El genoma humano contiene menor información que la pensada originalmente, con un estimado de 20.000 genes [1]. No obstante, el proteoma es altamente complejo y representa de modo más preciso la identidad de una célula, su estado y comportamiento. Esta complejidad es producto de diversos mecanismos que modifican el producto génico como ser modificaciones post-transcripcionales (ej: *splicing* alternativo) y modificaciones post-traduccionales. Estas últimas alteran las propiedades de las proteínas, regulando su actividad, localización subcelular, interacción con otras moléculas, etc. Actualmente se han descrito alrededor de 300 tipos de modificaciones post-traduccionales y entre ellas, la ubiquitinación emerge como un regulador esencial de la homeostasis celular [2].

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos que se encuentra en todas las células eucariotas, y se une covalentemente a sus proteínas blanco mediante un enlace isopeptídico entre su glicina en la posición C-terminal y un residuo lisina del sustrato aceptor [3].

La ubiquitina pertenece a una familia de modificadores proteicos que poseen una alta homología de secuencia. Estas proteínas, llamadas UBLs (por su nombre en inglés *Ubiquitin-like Proteins*), comparten la estructura terciaria del plegamiento de ubiquitina [4]. Existen 17 proteínas UBLs que pertenecen a 9 clases filogenéticamente diferentes: NEDD8, SUMO (por su nombre en inglés *small ubiquitin-like modifier*), ATG8 (por su nombre *autophagy 8*) y ATG12, Ufm1 (*ubiquitin-fold modifier 1*), URM1 (*ubiquitin-related modifier 1*), ISG15 (*interferon-stimulated gene product of 15 kDa*), FAT10 (*HLA-F adjacent transcript 10*), FAU y un grupo diverso de proteínas que contienen plegamientos relacionados desde un punto de vista estructural, que se unen a otros dominios [5-9].

La ubiquitinación de proteínas ocurre mediante una cascada enzimática que involucra a enzimas activadoras (E1), enzimas conjugadoras (E2) y enzimas ligasas (E3) [10]. Es un proceso secuencial, que puede revertirse mediante reacciones catalizadas por enzimas deubiquitinantes (DUBs). En la **figura 1** se esquematiza el proceso de ubiquitinación.

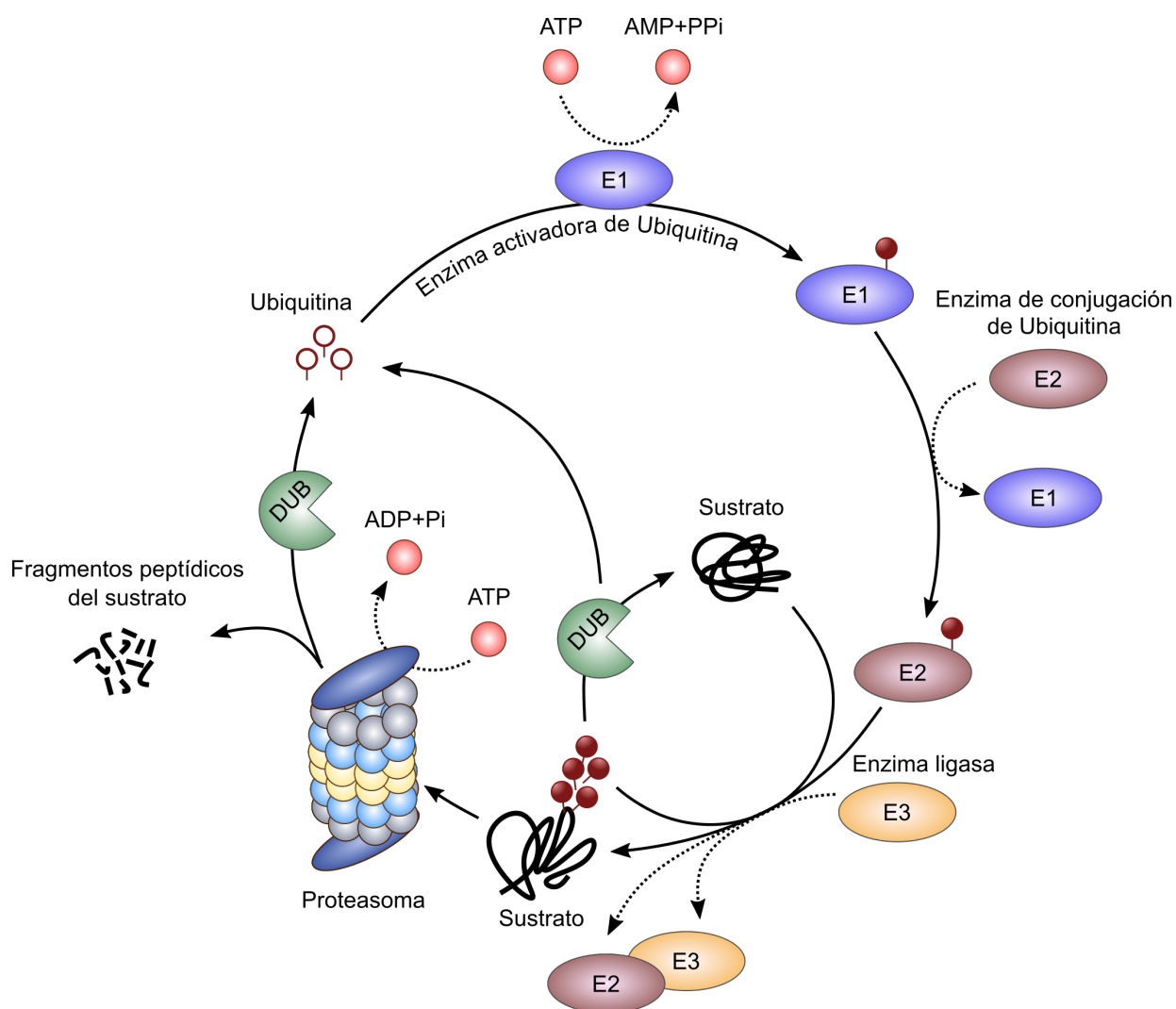


Figura 1. Cascada de ubiquitinación: La ubiquitina (Ub) es activada por la enzima activadora E1 en un paso dependiente de ATP. Se genera un intermediario tioéster E1-S-Ub. La ubiquitina es luego transferida a una enzima conjugadora E2 (E2-S-Ub) y finalmente al sustrato, a través de una E3 ligasa. Conjunciones sucesivas de moléculas de ubiquitina dan lugar a cadenas poliubiquitina sobre el sustrato. Este sustrato poliubiquitinado es reconocido y degradado por el proteasoma 26S. Las enzimas deubiquitinantes (DUBs) son las responsables de reciclar las moléculas de ubiquitina.

En mamíferos existen dos genes que codifican para enzimas E1 (UBA1 y UBA6) [11]. Esta clase de enzimas hidrolizan ATP para activar a la molécula de ubiquitina que luego se une a las enzimas E2. Existen alrededor de 40 genes que codifican para enzimas E2 [12, 13], y cada una coopera individualmente con varias enzimas E3 ligasa. Las enzimas E2 cumplen un rol importante en la determinación del tipo de unión de la cadena de ubiquitinas, mientras que las enzimas E3 ligasa son las responsables de reconocer a los sustratos en modo específico [14]. Cada sustrato, a su vez, puede ser reconocido por varias E3 ligasa [3]. Las enzimas E3 ligasas se unen simultáneamente a los sustratos y a las enzimas E2, poniéndolos en contacto. De este modo, la molécula de ubiquitina es transferida desde la E2 al sustrato

directamente, o a través de un paso intermedio en el que la ubiquitina se une (mediante enlace tioéster) a la E3 ligasa, dependiendo del tipo de E3 ligasa involucrada en la reacción.

Existen alrededor de 700 genes que codifican para enzimas E3 ligasas. Según su mecanismo molecular de acción las mismas pueden dividirse principalmente en dos categorías, HECT y RING. Las E3 ligasas HECT (de la traducción de “*C-terminal Homologous to E6-AP Carboxy-Terminus*”) aceptan ubiquitinas desde enzimas E2 en un residuo cisteína, previo a la conjugación de la ubiquitina al sustrato [3, 15]. Las enzimas RING (de la traducción “*Really Interesting New Gene*”), así definidas por contener dominios *RING finger*, representan el grupo más numeroso (existen alrededor de 600 genes codificantes en humanos). Estas enzimas carecen de actividad catalítica intrínseca y funcionan acercando el sustrato a la enzima E2 [3, 10, 16-18]. Estas E3 ligasas pueden funcionar como proteínas simples o como parte de complejos polipeptídicos. Recientemente también se han encontrado otros dominios parecidos a RING que poseen actividad E3 ligasa: U-box, proteínas *Leukemia Associated Protein (LAP) finger*, dominio *Plant Homeo (PHD)* y la familia de dominios *Ring Between Ring fingers (RBR)* [15, 18-21].

Las ubiquitinas pueden unirse a sus sustratos como monómeros (una o varias unidades, decorando la proteína) o formando cadenas de diferente largo. Pueden unirse a otras ubiquitinas o proteínas blanco mediante la metionina inicial (formando cadenas lineales) [22] o a través de los residuos lisina. Dado que la proteína ubiquitina posee 7 residuos lisina, estas cadenas pueden presentar diferente topología [23]. Existen cadenas homotípicas (el tipo de unión entre ubiquitinas es mediante el mismo aminoácido) o mixtas (se utilizan distintos aminoácidos lisina de las ubiquitinas que forman la cadena). A su vez, las cadenas pueden ser homólogas (cadenas de ubiquitinas únicamente) o heterólogas (cadenas de ubiquitinas y otras moléculas semejantes a ubiquitinas) [24]. Estos distintos formatos de ubiquitinación regulan diferentes procesos celulares [25], que se detallan y explican brevemente en la **figura 2**.

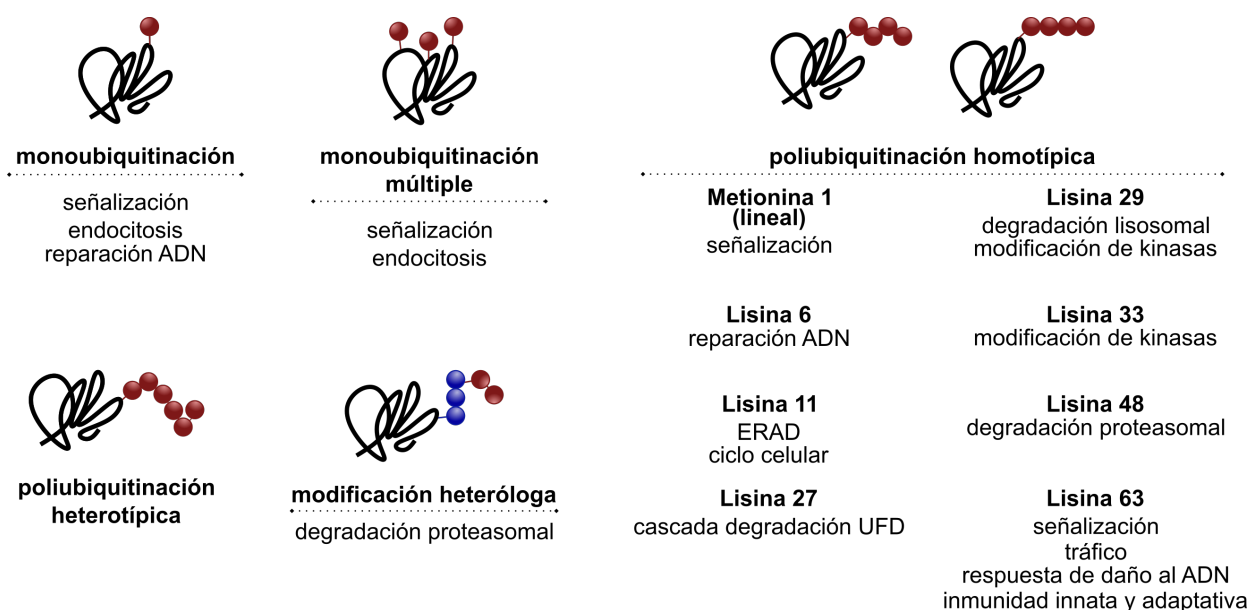


Figura 2. Topología de ubiquitinación: Existe gran diversidad de formatos en los que la ubiquitina puede unirse a sustratos, desde la unión de una molécula de ubiquitina en un único o varios lugares (monoubiquitinación o monoubiquitinación múltiple), hasta la unión en forma de cadenas homólogas (de moléculas de Ub) o heterólogas (Ubs + Ubls), homotípicas (se usa el mismo tipo de unión entre moléculas) o heterotípicas (cadenas ramificadas, se usan distinto tipo de uniones entre moléculas). La topología de la modificación determina los posibles resultados en cascadas de señalización.

Las cadenas de poliubiquitina unidas mediante lisinas 48 son el tipo de cadenas más estudiadas, y promueven el reconocimiento y degradación de la proteína blanco por el proteasoma 26S [26, 27]. El proteasoma 26S es un complejo macromolecular compuesto por un core cilíndrico 20S que tiene, en sus dos extremos, estructuras 19S que funcionan como “tapas” [28]. La partícula reguladora 19S reconoce sustratos del proteasoma y cataliza su entrada al core 20S, donde son degradados (**figura 1**). Cada partícula 19S contiene una estructura 6-ATPasa en forma de anillo que une las cadenas de poliubiquitinas de los sustratos, y que usa la hidrólisis de ATP para desplegar y traslocar la proteína sustrato al core 20S, de manera secuencial. En simultáneo ocurre el reconocimiento de sustratos y remoción de las moléculas de ubiquitina de los mismos mediante enzimas deubiquitinantes (DUBs) asociadas: RPN11 [29], UCH37 [30], y USP14 [31, 32].

El correcto funcionamiento de esta cascada se logra por una regulación muy específica de cada uno de los componentes involucrados. A su vez, éstos pueden ser regulados temporoespacialmente por la acción de otras modificaciones post-traduccionales, incluyendo la ubiquitinación misma [33, 34].

Enzimas deubiquitinantes (DUBs)

Como cualquier otra modificación post-traducciona l dinámica, la ubiquitinación es un proceso reversible. La degradación del enlace entre una molécula de ubiquitina y su sustrato es llevada a cabo por enzimas deubiquitinantes (DUBs).

El genoma humano codifica para alrededor de 100 DUBs, que se dividen en 6 familias: UCH (hidrolasas de C-terminal de ubiquitina), USP (Proteasas específicas de ubiquitina), OTU (proteasas con dominio tumor de ovario), MJD (proteasas con dominio Machado-Josephin), MCP1P (proteína inducida por proteína quimiotáctica de monocito) y JAMM (metalo peptidasa con dominio JAMM/MPN) [35]. Las mismas actúan tanto sobre cadenas de ubiquitinas como de UBLs y cumplen varias funciones en la cascada de ubiquitinación: funcionan activando pro- proteínas de ubiquitina, reciclando ubiquitinas y revirtiendo ubiquitinación de sustratos [36].

Asimismo, se ha demostrado que las DUBs están involucradas en diversos procesos celulares: regulación del ciclo celular [37], degradación de sustratos vía proteasoma y lisosomas [38, 39], expresión génica [40], reparación del ADN [41], activación de kinasas [38, 42], patogénesis microbia l [43, 44] y, su desregulación está asociada a distintas patologías como por ejemplo el cáncer o desórdenes neurológicos [45, 46].

Al ser enzimas degradativas, las DUBs están finamente reguladas mediante diversos mecanismos. Su actividad catalítica (en la mayor parte de los casos) es críptica, es decir, que se activa sólo cuando encuentra a su sustrato [36, 47]. Asimismo, las DUBs son controladas por distintas modificaciones post-traduccionales como fosforilación, ubiquitinación y sumoila ción [36, 48]. Por otro lado, pueden regularse transcripcionalmente ante diversos estímulos, y proteínas *scaffold* pueden reclutarlas al sitio de acción y/o aumentar su actividad. Por último, es importante destacar que las DUBs pueden tener dominios específicos para interactuar con determinados sustratos y dominios que aumenten su actividad de modo intrínseco [48].

Proteasa de Ubiquitina Específica 19 (USP19)

USP19 pertenece a la familia más grande de DUBs, las USPs. Ésta es una enzima de 150 kDa que posee un dominio USP canónico con una tríada catalítica compuesta por los residuos C506, H1157 y D1189, y por un dominio MYND (*Myeloid traslocation protein 8, Nery, and DEAF-1*) que puede mediar interacciones proteína-proteína. Cerca de la región N terminal, USP19 tiene dos dominios p23-like CHORD y Sgt1 (p23/CS) que podrían funcionar como chaperonas. Adicionalmente, USP19 es una de las pocas DUBs que tienen un dominio transmembrana (TM). El mismo se localiza cerca de extremo C-terminal y ancla la proteína a la membrana del retículo endoplásmico. Su estructura proteica se muestra en la **figura 3**.

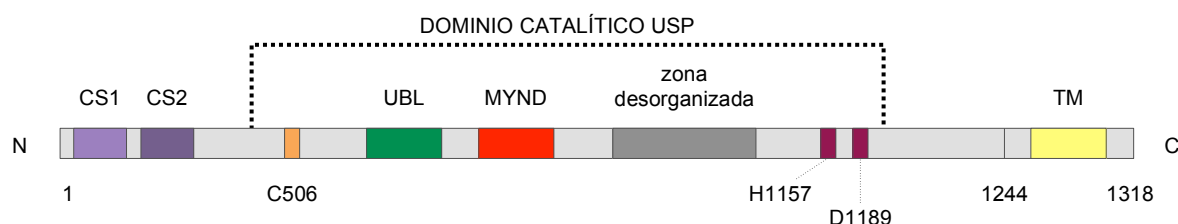


Figura 3. Estructura proteica de USP19: La región N terminal de USP19 tiene dos dominios p23-like CHORD y Sgt1 (p23/CS). El dominio MYND y la tríada catalítica se encuentran en el dominio USP. El dominio TM se encuentra cerca del extremo C-terminal.

Del mismo modo que otras DUBs, USP19 puede regular su propia ubiquitinación y si bien se sabe que está regulada a nivel transcripcional y post-traducciona, los mecanismos involucrados son aún desconocidos. En particular se ha descrito que USP19 expresa diversas variantes de *splicing alternativo*, dando lugar a distintas isoformas proteicas, algunas de las cuales no poseen el dominio transmembrana. Las distintas isoformas de USP19 participan de diversos procesos celulares, y la variante soluble es mayoritaria [49].

Entre los sustratos de USP19 soluble se encuentran Ataxin 3 y Huntingtin (proteínas que poseen trectos de poli Glutaminas). La acción catalítica de USP19 sobre estas proteínas produce un aumento de sus niveles proteicos y por ende su agregado [50].

Modulaciones de la actividad de USP19 fueron vinculadas también con alteraciones del músculo esquelético, y se demostró que su expresión aumenta durante atrofia muscular y otros fenómenos que alteran condiciones catabólicas [51]. En este sentido se vio que la isoforma transmembrana de USP19 regula la diferenciación de mioblastos. Asimismo se demostró que la actividad catalítica de USP19 es imprescindible para esta regulación y que su expresión inhibe la diferenciación mioblástica a través de la inhibición de la síntesis de CHOP (una proteína de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), que se activa durante la diferenciación) [52]. Por otro lado, se ha demostrado que la función de USP19 está regulada por estradiol, y que esto podría contribuir a las diferencias de masa muscular que existen entre sexos [53, 54].

Entre las funciones asociadas a USP19 se destaca el rol que su isoforma transmembrana cumple en la proteólisis asociada al retículo endoplásmico (ERAD). USP19 se induce en condiciones de estrés del retículo endoplásmico [55] y regula a HRD1 y MARCH6 (E3 ligasas del ERAD), aumentando su estabilidad [56, 57]. Asimismo, la isoforma transmembrana de USP19 rescata a diversas proteínas de su degradación proteasomal como

CFTR Δ F508, TCR α y LRP6 [55, 58]. En otros casos, USP19 recluta a proteínas mal plegadas a la superficie del retículo para deubiquitinarlas, y promueve su empaquetamiento en endosomas y exportación [59]. En todos estos casos se ha demostrado que la actividad catalítica de esta enzima es imprescindible para su funcionamiento en el contexto analizado.

Por otro lado, se ha demostrado que la actividad DUB de USP19 estabiliza a una E3 ligasa (KPC1) que regula a la proteína p27 en la fase del ciclo celular G1. Sin USP19, p27 aumenta y se enlentece el ciclo celular. Los autores de este trabajo concluyeron que un aumento excesivo de USP19 podría ser la causa de la proliferación desregulada observada en muchos cáncer [60]. Años más tarde, los mismos autores realizaron silenciamientos de USP19 en diversas líneas celulares y demostraron que los cambios en los niveles de p27 ocurrían en células normales, mientras que la depleción de USP19 no afectaba la proliferación de líneas celulares tumorales [61].

Si bien en la mayoría de los casos la actividad catalítica de USP19 es imprescindible para su rol en distintos procesos celulares, se ha demostrado que dicha proteína también posee funciones no catalíticas. En este sentido se observó que USP19 interacciona con cIAP1 y cIAP2 (E3 ligasas que regulan apoptosis) [62] y con la subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1 α) en condiciones hipóxicas [63], y regula su estabilidad independientemente de la actividad deubiquitinasa.

Ubiquitinación y relación con cáncer

La desregulación de componentes de la cascada de ubiquitinación está asociado con diversas patologías. No obstante, dado que el sistema ubiquitina-proteasoma (*UPS*) es esencial para el correcto funcionamiento de un gran número de procesos celulares, existía un gran escepticismo acerca del valor terapéutico de inhibidores del proteasoma (o de componentes relacionados) [64]. Sin embargo actualmente existen drogas cuyos blancos moleculares son distintos componentes del sistema *UPS*, que poseen alta eficacia terapéutica y que son utilizadas en la clínica para tratar diversos tipos de cáncer [65, 66].

En sentido existen distintos fármacos con efectos directos sobre el proteasoma que actualmente están aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*, agencia de regulación Estadounidense) para el tratamiento de mieloma múltiple. El Bortezomib [67] es un caso emblemático y actualmente también se encuentra en fase pre-clínica y clínica para el tratamiento de cáncer de mama [64, 68].

Asimismo, se ha demostrado que distintos fármacos que se utilizan actualmente como

quimioterápicos pueden aumentar o disminuir la actividad del proteasoma. En la primera categoría se encuentran los compuestos como el ácido retinoico, los derivados de camptotecinas y de geldanamicina, fulvestran, etc., y en la segunda el trióxido de arsénico, entre otros [64].

También se han desarrollado drogas contra distintas enzimas E1, activadoras de UBLs. Debido a su falta de especificidad o calidad farmacológica, por el momento sólo unas pocas han entrado en fase clínica. Lo mismo sucede con drogas desarrolladas contra las enzimas E2: los compuestos CC0651, NSC697923 o BAY 11-7082 no se han podido optimizar para su uso en la clínica, o tienen efectos *off target* [69].

Dada la universalidad del UPS, se espera que las enzimas E3 ligasas provean nuevos blancos terapéuticos más específicos para el desarrollo de compuestos farmacológicos [66]. El desarrollo de inhibidores para este tipo de enzimas presenta un desafío para la industria farmacológica puesto que en su mayoría no presentan un sitio catalítico “*druggable*”. No obstante, se han generado compuestos que tienen como blanco enzimas ligasas que afectan el ciclo celular (como SKP2, MDM2, IAPs), algunos de los cuáles están en fase clínica de investigación [69, 70].

Dado que las enzimas E2 y la mayoría de las enzimas E3 ligasas carecen de sitios catalíticos, los estudios para realizar intervenciones terapéuticas a nivel del UPS en la actualidad se están focalizando en las DUBs [71].

CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO (CMTN)

Características generales

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es una neoplasia maligna caracterizada por la ausencia de la expresión de los receptores de estrógeno (RE), de progesterona (PR) y que no exhibe amplificación del receptor 2 de factor de crecimiento epidermal HER2. Representa un 10-20% del cáncer de mama total y son un grupo heterogéneo de tumores que comparten una característica distintiva: son de naturaleza agresiva, de mayor tamaño, con altas tasas de recurrencia, menor supervivencia sin metástasis (comparado con otros tipos de cáncer de mama) y carecen de un blanco molecular distintivo. Afectan más frecuentemente a pacientes jóvenes, de descendencia Afro-americana, tienen grado histológico mayor y están asociados con mutaciones en el gen BRCA. La supervivencia media de pacientes con CMTN metastásico es menor a un año, y la mayoría es refractario al tratamiento con quimioterapia sistémica [72, 73]. Las metástasis de los CMTN suelen ser más agresivas que otro tipo de subtipos de cáncer de mama, y ocurren principalmente en las vísceras, particularmente en los pulmones y cerebro, con menor tendencia a la aparición en los huesos [74-77].

Los CMTN muestran gran superposición con los cáncer de mama basales. No obstante, no todos los CMTN son basales, ni todos los cáncer basales son CMTN [75, 78].

La identificación de blancos moleculares específica es crítica para la mejora del tratamiento de pacientes con CMTN. El mayor obstáculo para lograr este objetivo es la gran heterogeneidad que presenta esta enfermedad, tanto intra como inter-tumoral, resultado de alteraciones genéticas, epigenéticas y transcripcionales. Aun cuando la morfología está asociada a un patrón de aberraciones moleculares, también es claro que CMTN con el mismo tipo histológico tiene comportamientos clínicos muy diferentes [78].

Desde un punto de vista molecular y de expresión génica, distintos autores han tratado de estudiar las principales características de esta heterogénea enfermedad. Lehmann y colaboradores estudiaron los perfiles de expresión génica de CMTN provenientes de 21 bases de datos públicas, y describieron 6 sub-categorías dentro de los CMTN: 2 tipo-basales (*basal-like*): BL1 con patrones en la expresión génica relacionadas al ciclo celular y respuesta de daño al ADN, y BL2, enriquecido en señalización por factores de crecimiento y marcadores mioepiteliales; 2 tipo-mesenquimales, con alta expresión de genes involucrados en diferenciación y cascadas de factores de crecimiento (M y MSL); un tipo inmunomodulatorio (IM); y un subtipo luminal (LAR), caracterizado por señalización de andrógeno [73]. En la **tabla 1** se indican las principales patrones moleculares de cada subtipo, así como también las

posibles drogas para tratarlos.

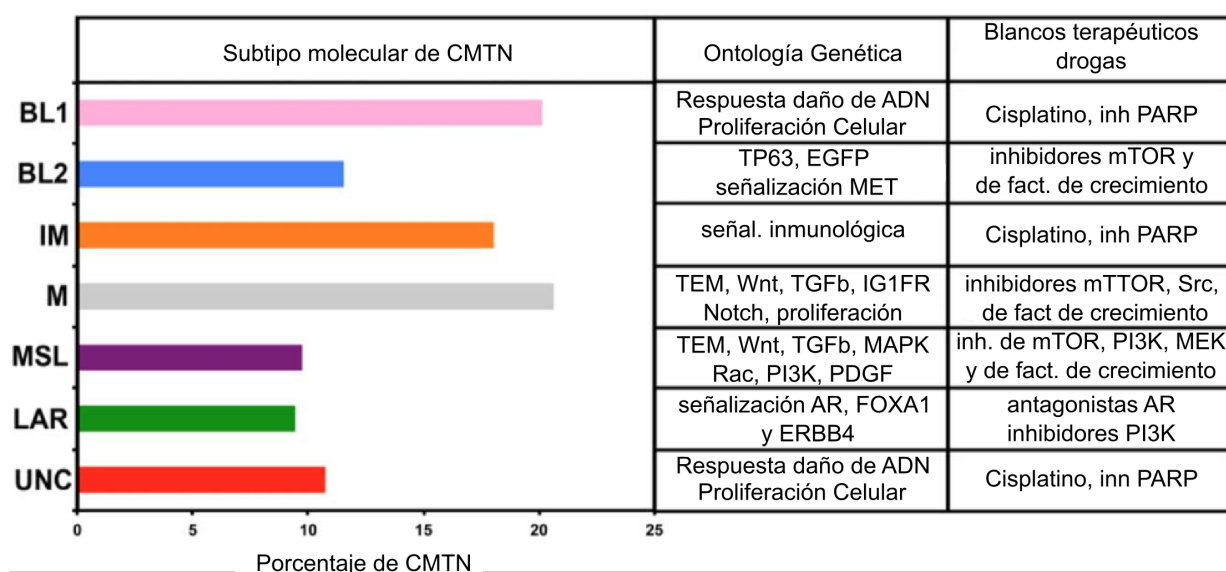


Tabla 1. Subtipos de CMTN según Lehmann y colaboradores: Se ilustra la distribución de los distintos subtipos de CMTN según el “Cancer Genome Atlas” con su ontología genética y potenciales blancos terapéuticos de cada categoría. Las barras representan el porcentaje de cada subtipo en CMTN. BL1: subtipo basal 1, BL2: subtipo basal 2, IM: inmunomodulatorio, M: mesenquimal, MSL: tipo-mesenquimal, LAR: subtipo luminal, UNC: sin clasificar. TEM: transición epitelio-mesenquimal. Modificado de Abramson y colaboradores, 2015 [72].

Estos mismos autores asociaron diferentes líneas celulares a cada subtipo de CMTN y evaluaron la sensibilidad a inhibidores farmacológicos de vías de señalización específicas, presuntivamente asociadas a cada subtipo de CMTN. Los resultados de su investigación validaron la categorización de las distintas líneas celulares (**tabla 2**).

Subtipo CMTN	Línea celular	Histología	Mutaciones
Basal			
BL1	HCC2157	DC	BRCA1; STAT4, UTX
	HCC1599	DC	BRCA2; TP53; CTNND1; TOP2B; CAMK1G
	HCC1937	DC	BRCA1; TP53; MAPK13; MDC1
	HCC1143	IDC	TP53
	HCC3153		BRCA1
	MDAMB468	DC	PTEN; RB1; SMAD4; TP53
	HCC38	DC	CDKN2A; TP53
BL2	SUM149PT	INF	BRCA1
	CAL-851	IGA	RB1; TP53
	HCC70	DC	PTEN; TP53
	HCC1806	ASCC	CDKN2A; TP53; UTX
	HDQ-P1	IDC	TP53
IM	HCC1187	DC	TP53, CTNNA1; DDX18; HUWE1; NFKBIA
	DU4475	DC	APC; BRAF; MAPK2A; RB1

Subtipo CMTN	Línea celular	Histología	Mutaciones
Mesenquimal			
M	BT549	IDC	PTEN; RB1; TP53
	CAL-51	AC	PIK3CA
MSL	CAL-120	AC	TP53
	HS587T	CS	CDKN2A; HRAS; TP53
	MDAMB157	MBC	NF1; TP53
	SUM15PT	ANC	PIK3CA; TP53; HRAS
	MDAMB436	IDC	BRCA1; TP53
	MDAMB231	IDC	BRAF; CDKN2A; KRAS; NF2; TP53; PDGFRA
LAR			
LAR	MDAMB453	AC	PIK3CA; CDH1; PTEN
	SUM185PE	DC	PIK3CA
	HCC2185		PIK3CA
UNC	CAL-148	AC	PIK3CA; RB1; TP53; PTEN
	MFM-223	AC	PIK3CA; TP53
	HCC1395	DC	ATR; BRCA2; CDKN2A; PTEN; FGFR1; PDGFRB; TP53
	BT20	IDC	CDKN2A; PIK3CA; TP53
	SW527		

Tabla 2. Asignación de líneas celulares a subtipos de CMTN según Lehmann y col.: Se asignaron líneas celulares a los distintos subtipos de CMTN de acuerdo a los patrones de expresión compartidos por dichas líneas y los subtipos determinados por estos autores. Las mutaciones de las líneas celulares se tomaron de la base de datos de COSMIC. AC, adenocarcinoma; ANC, carcinoma anaplástico; ASCC, carcinoma de células escamosas acantolítico; C, carcinoma; CS, carcinosarcoma; DC, carcinoma ductal; IDC, carcinoma ductal invasivo; IGA, adenocarcinoma invasivo galactotrópico; INF, carcinoma ductal inflamatorio; MC, carcinoma metastásico y MBC, cáncer de mama medular. Modificado de Lehmann y colaboradores, 2011 [73].

Por otro lado, Burstein y colaboradores definieron (en función de expresión génica y secuencia de ADN) 4 subcategorías en las que pueden dividirse los CMTN que no se superponen completamente con las del trabajo de Lehmann [79]. A pesar de las discrepancias, estos investigadores marcan una correlación entre la expresión de distintos componentes del sistema inmunológico y el desenlace de la enfermedad, y afirman la importancia de la caracterización de la enfermedad y sub-clasificación para el diseño racional del esquema de tratamiento.

Tratamientos

Aun cuando se ha incrementado el conocimiento acerca de los CMTN en los últimos años, el tratamiento disponible para tratarlos es aún muy poco eficaz.

En los casos donde es posible, los CMTN primarios se tratan primeramente con

resección quirúrgica [80]. Es importante mencionar que dado que no existe un blanco terapéutico específico para el CMTN, la quimioterapia (antraciclina/taxanos) es el único tratamiento sistémico que existe para mejorar el desenlace luego de su diagnóstico [80]. En particular se ha demostrado que este tipo de cáncer es muy sensible a la terapia neoadyuvante y que prolonga la supervivencia libre de enfermedad en pacientes, como así también la supervivencia total [76]. No obstante y a pesar de su sensibilidad inicial, la supervivencia total y libre de enfermedad es menor que otros tipos de cáncer de mama debido al alto riesgo de recurrencia cuando el tumor no es erradicado totalmente [76].

Además de la terapia convencional, existen distintos procesos moleculares y *drivers* biológicos que se han empezado a utilizar como posibles blancos terapéuticos en pacientes con CMTN. Entre ellos se encuentran tratamientos que tienen como blanco al factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), a mecanismos de reparación del ADN ineficientes (PARP), al factor de crecimiento epidermal (EGFP, también llamado HER1), al blanco de rapamicina mamífero (mTOR), a la cascada de oncogen Src, a la deacetilasa de histonas (HDAC), al receptor de andrógenos, a las cascadas de NOTCH, Hedgehog y Wnt/ β -catenina [76, 78, 80-82]. Estas terapias alteran la cascada apoptótica, inhibiendo la progresión tumoral.

Como conclusión, aun cuando hay terapias disponibles, las mismas no son suficientes ni eficaces para el tratamiento de pacientes con CMTN. Se espera entonces que un mejor entendimiento de los biomarcadores moleculares de cada subgrupo de CMTN, que permitan predecir sensibilidad a nuevas drogas y drogas ya aprobadas, podría lograr una mejoría en su manejo clínico [83].

MIGRACIÓN, INVASIÓN, METÁSTASIS Y SU RELACIÓN CON EL UPS

Las células cancerosas poseen un amplio espectro de mecanismos de migración e invasión, individual o colectiva, que varían de acuerdo a diferentes condiciones ambientales. La habilidad de las células de migrar e invadir les permite alcanzar el torrente sanguíneo o vasos linfáticos para diseminarse a nuevos tejidos [84].

Migración

Características generales

Para poder migrar, una célula tiene que ser capaz de cambiar su forma y rigidez para poder interactuar con las estructuras circundantes. La matriz extracelular (MEC) provee a estas células de un sustrato sobre el cuál moverse, así como también representa una barrera que impide su dispersión. El movimiento resulta de un ciclo continuo de pasos interdependientes [85] (**figura 4**): en primer lugar la célula se polariza y elonga, se forma entonces un pseudópodo en el frente que avanza y se adhiere a la MEC. Luego zonas en dicho frente (o el cuerpo entero celular) se contraen para generar fuerza de tracción que mueve el cuerpo de la célula y frente rezagado hacia delante. Las protrusiones que reconocen la MEC pueden ser diferentes en morfología y dinámica (se las llama lamelipodios, filopodios, pseudópodos o invadopodios [86]). Las mismas contienen filamentos de actina y varias proteínas estructurales. La propulsión inicial y elongación de los pseudópodos se debe a polimerización de moléculas de actina y el ensamblado de filamentos (no se requiere adhesión a la MEC o tracción en este paso).

Las protrusiones tocan luego la MEC e inician la unión mediante integrinas α y/o β [87]. Las mismas se unen al citoesqueleto de actina mediante proteínas adaptadoras, y se agrupan para formar complejos focales, y luego contactos focales de mayor envergadura [87-89]. Estos contactos focales cambian en su composición y dinámica de ensamblado, y se adhieren establemente acorde la célula se desplaza [89-92]. De acuerdo a los componentes de la MEC, se pueden formar contactos focales de distintos tipos de integrinas, y también pueden unirse otros receptores no-integrina como CD26 y 44 [93-96]. Posteriormente, proteasas de superficie se reclutan a los sitios de unión y degradan la MEC que se encuentra en íntima proximidad con la superficie celular como por ejemplo las Metaloproteasas 1/2 (MMP1/2).

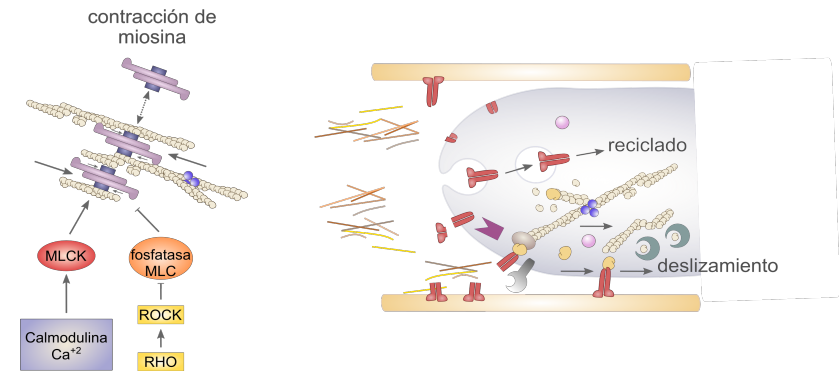
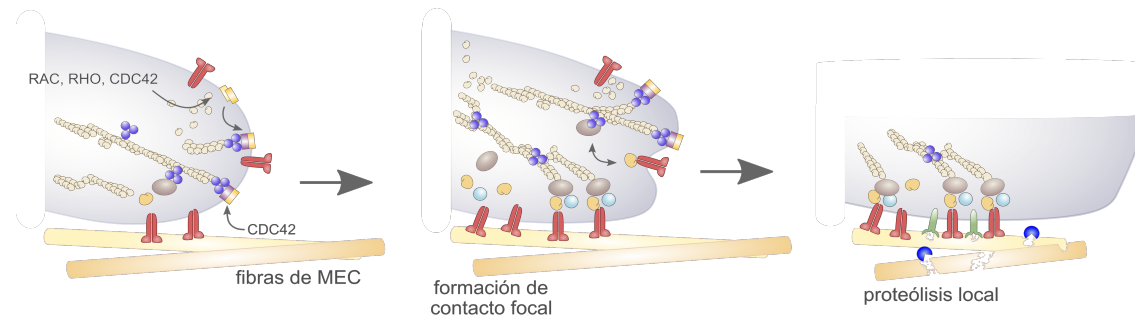
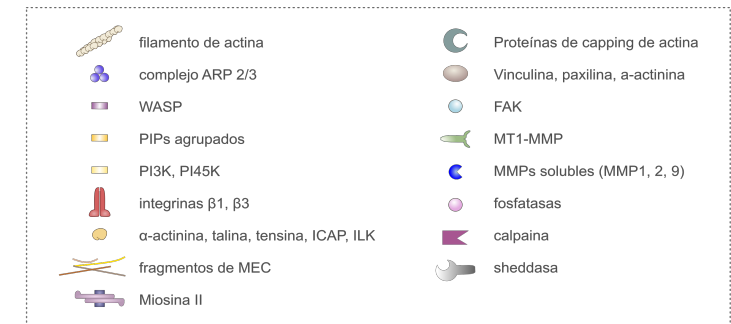
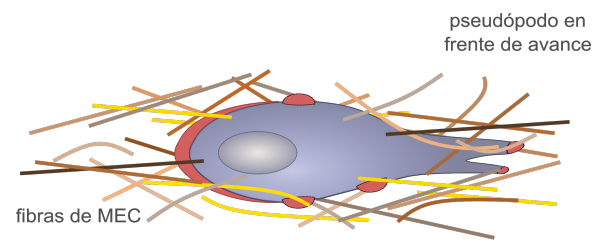


Figura 4. Modelo de migración celular: La migración celular se da por una serie de 5 pasos. Paso 1- Protrusión del frente de avance: filamentos de actina que se están desarrollando se conectan a través del complejo ARP2/3 con proteínas adaptadoras (WASP) y empujan la membrana hacia fuera. El complejo ARP2/3/WASP se conecta a la membrana interna de la membrana plasmática mediante fosfatidilinosítoles (PIPs), allí insertados, y lateralmente con filamentos de actina pre-existentes. Además, los PIPs se unen y activan GEFs que pueden regular la actividad de RAC, CDC42 y RHO, así como también a RAS. En otra cascada señáletica, CDC42 se une a WASP y PIPs, que activa a WASP e induce consecuentemente la extensión de filopodios. Paso 2- Interacción con MEC y formación de contactos focales: las integrinas entran en contacto con ligandos de la MEC y se agrupan en la membrana celular, reclutan proteínas adaptadoras y de señalización mediante sus dominios intracelulares, e inducen la fosforilación y defosforilación de señales en la célula. El ensamblado de contactos focales esta directa e indirectamente inducido por varias cascadas de señalización como PI3K actina, PKC y RHO GTPasas. Paso 3- Proteasas de superficie se concentran cerca de los sitios de unión al sustrato. Muy cerca de la superficie celular, las proteasas clivan componentes de la MEC, tal como colágeno, fibronectina, lamininas, así como también pro-MMPs (pro-metaloproteasas) para crear MMPs solubles activas. Paso 4- La proteína miosina II activa se une a filamentos de actina y genera contracción de actino-miosina. La quinasa de miosina calcio y calmodulina dependiente (MLCK) fosforila la cadena liviana de miosina (MLC), lo cual activa a la miosina II. Las MLC fosfatasa realizan el paso inverso. Paso 5- En el frente rezagado se desarman los contactos focales a través de gelsolina, cofilinas, fosfatasa, proteasas, sheddasa, etc. Luego de que los contactos focales se desarman, las integrinas se reciclan (Modificado de Friedl y col., 2003 [84]).

Mientras se desarrollan los contactos focales, los filamentos de actina se elongan y ensamblan a través de proteínas como ser α -actinina, miosina II, etc [97, 98]. La red de actina pegada a la membrana celular se denomina actina cortical, y los cables de filamentos de actina elongados se denominan fibras de estrés [98]. El ensamblado y contracción de estas fibras -controlado por miosina II [99, 100]- es inducido por RHO y su efector ROCK [99, 101]. La actina cortical, por el contrario, es controlado por MLCK. El número y composición de contactos focales no sólo depende de la MEC, de cada tipo celular, sino que también puede depender de las condiciones ambientales. La velocidad que se genera en los ciclos de migración está limitada por la tasa de adhesión y despegado de contactos focales, y produce una relación inversa entre la fuerza de las adhesiones focales y la velocidad de migración [102-104].

Existen gran cantidad de factores ambientales que pueden promover la migración: citoquinas o factores de crecimiento que promueven la migración la inducen y mantienen vía la cascada de transducción de señales de PI3K, RAC y RHO [105-113]. Las metaloproteasas MMPs también generan fragmentos de MEC que funcionan como quimiotácticos. Muchos de estos factores que aumentan la migración (como EGF o IGF1) pueden además promover otras funciones como la proliferación [112].

Mecanismos de migración

Las células tumorales pueden diseminarse como células individuales (migración individual) o en forma de *clusters* o agrupamientos (migración colectiva) (**figura 5**). En muchos tumores se pueden dar ambos tipos de migración en simultáneo.

- **Migración individual**

Dependiendo del tipo celular, las integrinas involucradas, la estructura del citoesqueleto y la producción de proteasas, la migración individual puede ser del tipo ameboide o mesenquimal.

La migración ameboide es más rápida que la migración mesenquimal, y se da en células que presentan una morfología más redondeada. Se da principalmente por interacciones de vida media corta y débiles con el sustrato [114, 115].

La migración mesenquimal es característica de células tumorales de tejido conectivo y en cánceres epiteliales desdiferenciados [116-118]. Las células que migran con fenotipo mesenquimal presentan una morfología ahusada y dependen de dinámicas de adhesión de

integrinas [93-96, 119]. Su movimiento es relativamente lento [119] y las distintas proteasas se localizan en las puntas de las fibras para degradar proteínas. En este tipo de migración, las proteínas RHO, ROCK y MLCK son muy importantes [113, 120-122].

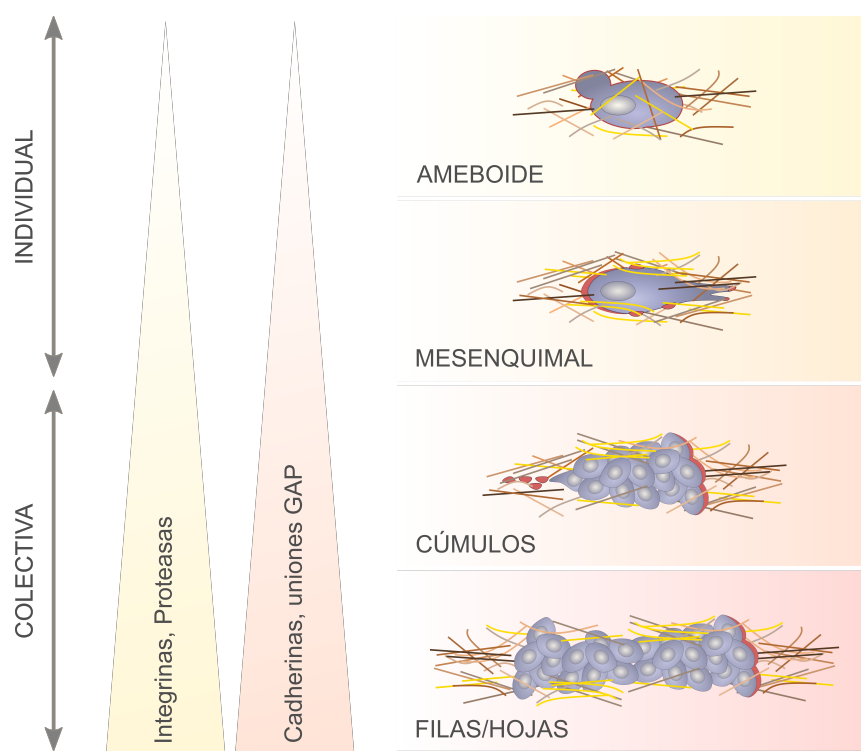


Figura 5. Diversidad de mecanismos de migración: Las estrategias de migración individual o colectiva están determinadas por distintos programas moleculares (triángulos). Desde los movimientos individuales (arriba) hasta los colectivos (abajo) están controlados por una creciente interacción célula-MEC, provista por las integrinas y las proteasas degradativas de la matriz. La adhesión célula-célula mediante cadherinas y otros receptores de adhesión, así como la comunicación célula-célula (vía uniones GAP) son características específicas del comportamiento colectivo (Modificado de Friedl y colaboradores, 2003 [84]).

• Migración colectiva

Las células también pueden migrar en forma de cadenas. En este tipo de migración existe una célula “líder” que invade, y las células que la siguen forman una cadena [119]. Este tipo de migración es característica de melanomas y algunos tipos de cáncer de mama y ovario [123, 124].

Por último, existe la migración colectiva en forma de hojas de células. En este caso la actina cortical se dispone de una manera particular entre las uniones celulares, y células en el frente de movimiento arrastran a células que van por detrás [125]. Puede ocurrir con las hojas de células adheridas o no al tumor primario.

• Transición entre mecanismos de migración

Los patrones de migración son plásticos y pueden cambiar en células tumorales de acuerdo a las condiciones ambientales (**figura 6**). El más claro ejemplo de estos procesos plásticos está asociado a la transición epitelio-mesenquimal, en la que las células pasan de un fenotipo migratorio colectivo a migrar de manera individual.

En otros casos, las células pueden realizar la transición mesenquimal-ameboide [116]. Esto resulta en una distribución alterada de integrinas, reorganización del citoesqueleto de actina, y cambios en el modo de afrontar barreras. En general estas alteraciones ocurren por inhibición de proteasas degradativas, disminución de las uniones célula-MEC o inhibición de cascadas de señalización RHO. Finalmente, cuando se inhiben las integrinas las células pueden pasar de un tipo de migración colectiva a ameboide individual [84].

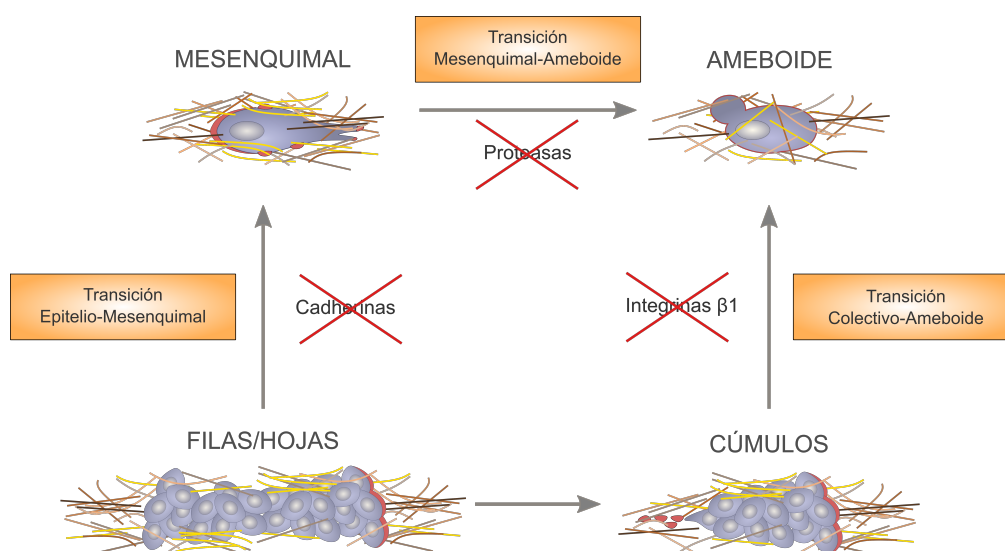


Figura 6. Plasticidad en el proceso de migración: Las células pueden adoptar reacciones de adaptación de acuerdo a cambios en sus patrones de migración. En el comportamiento colectivo tal como las hojas o filas de células, células individuales que pierden interacciones célula-célula (como consecuencia de una inhibición en las funciones de cadherinas, por ejemplo) pueden desprenderse y usar integrinas y proteasas para desarrollar un comportamiento en el movimiento del tipo mesenquimal (Transición Epitelio-Mesenquimal). Cuando las proteasas, tales como las metaloproteasas (MMPs), serin-proteasas y catepsinas son bloqueadas en células que se mueven con migración mesenquimal, las mismas pueden adaptarse y utilizar el movimiento del tipo ameboide (Transición Mesenquimal-Ameboide). Este último tipo de migración, a su vez, puede convertirse en migración del tipo colectivo en cúmulos si se perturba la función de integrinas $\beta 1$. Todas estas transiciones pueden inducirse con drogas diseñadas para inhibir la migración de células tumorales, tal como antagonistas de integrinas y cadherinas, así como también inhibidores de proteasas (Modificado de Friedl y colaboradores, 2003 [84]).

Invasión y metástasis

La mortalidad de pacientes con tumores sólidos surge de la disrupción de las funciones biológicas por diseminación de células tumorales. En el contexto particular del cáncer de mama, la supervivencia en los 5 años siguientes al diagnóstico baja de un 100% a un 25% cuando se descubren metástasis. Por este motivo, es sumamente importante encontrar blancos terapéuticos que funcionen como reguladores de este proceso [126].

Para que las células tumorales puedan diseminarse a un sitio distante, deben primero desprenderse del tumor primario, invadir localmente y viajar hacia un nuevo sitio lejano. A lo largo de este proceso deben poder sobrevivir y proliferar. La diseminación ocurre a través de 3 vías: (1) invasión local de tejido normal adyacente al tumor, (2) infiltración del sistema linfático drenante o (3) metástasis por vía sanguínea [127]. Aun cuando pueden encontrarse gran cantidad de células cancerosas circulantes en un animal con tumor, la metástasis es un proceso muy ineficiente [128]. Esto se debe a que la diseminación requiere que se completen varios pasos en una compleja secuencia de eventos. La naturaleza interrelacionada y secuencial de esta cascada metastásica disminuye la probabilidad de que cualquier célula tumoral pueda dar lugar a una lesión metastásica.

Existen 3 principios básicos que determinan la eficacia con la que las metástasis distales se forman: (1) interacción tumor-huésped: estas interacciones controla la progresión metastásica dado que las células tumorales parten de la lesión primaria y entran en un nuevo ambiente (estímulos quimiotácticos y remodelado tisular); (2) estructura tisular y biomecánica: la estructura tisular y biomecánica de la vasculatura determina la ruta y distribución de células tumorales circulantes (zonas hipóxicas o normóxicas determinan rutas de entrada/salida; la rigidez de los sustratos proveen de señales biomecánicas); y (3) determinantes moleculares pro-metastásicos ausentes en el tumor primario. Éstas pueden adquirirse mediante una plasticidad transitoria tal como la transición epitelio-mesenquimal [129], o una selección de cambios genéticos y marcas epigenéticas [130]. Entre estos cambios, es necesario que las células sean resistentes a la apoptosis y anoikis, que sean plásticas y que evadan el sistema inmune [131].

Muchos componentes o eventos de la cascada metastásica son considerados como posibles blancos de intervención terapéutica: *seeding* (salir del tumor primario), *dormancy* (estado de latencia), colonización metastásica (requiere lesiones adicionales), quemoquinas, lisil oxidasa, comunicación vía exosomas, metástasis sitio-específicas con determinadas moléculas asociadas [132]. Todos estos procesos involucran una regulación diferencial de la motilidad celular y por lo tanto la migración de células tumorales es un tópico de intensa investigación en el campo de la oncología molecular, y representa un blanco terapéutico viable

para el tratamiento de procesos metastásicos [130].

En este sentido, terapias que específicamente regulen la movilidad de células tumorales podrían mejorar el tratamiento del cáncer, removiendo la amenaza de enfermedad sistémica y disminuyendo la dependencia de terapias con efectos secundarios indeseados, limitando la invasión local. Los pacientes con metástasis secundarias se beneficiarían por el bloqueo de futuras diseminaciones y la restricción de la movilidad de las células tumorales podría limitar la “evolución” del tumor primario hacia un tumor de fenotipo metastásico [130].

En la industria farmacéutica hay muchas drogas en fase clínica I y II para inhibir la migración celular [130]. Asimismo, se han identificado diversos blancos moleculares que funcionan como promotores de metástasis, para las cuales se han desarrollado drogas moduladoras [133]. Entre los blancos que promueven procesos metastásicos se encuentran: AMF (*autocrine motility factor*), HGF/SF (*Hepatocyte growth factor*, también conocido como *scatter factor*), TGF- β (*transforming growth factor beta*), MMPs (*matrix metalloproteinases*), uPA (*urinary-type plasminogen activator*), β -catenina. Por otro lado se han identificado genes con funciones anti metastásicas cuya expresión posee un alto valor pronóstico: NM23, KiSS-1, MKK4, E-cadherina, NDRG1 (*N-myc downstream regulated gene 1*), KAI1, RKIP, BMRS1 [133], [126]. Este gran número de desarrollos farmacológicos pone de manifiesto el alto potencial que los procesos de migración e invasión celular poseen como posibles puntos de intervención terapéutica en el tratamiento del cáncer.

Ubiquitinación en el contexto de metástasis

La ubiquitina regula distintos aspectos de la migración celular y dinámica del citoesqueleto. Los receptores que sensan ligandos que disparan la migración celular, así como también diversos componentes del citoesqueleto, proteínas adaptadoras y de señalización, son modificadas post-traduccionalmente por ubiquitina para señalar su posterior degradación vía lisosoma, internalización y reciclado por ERAD o cambio de localización [134].

Tal como se indicó anteriormente, la transición epitelio-mesenquimal es un proceso importante en la regulación de la migración celular que permite a las células adaptarse a cambios en las condiciones ambientales [129]. Durante la ejecución de dicho proceso aumenta la expresión de determinados marcadores mesenquimales específicos, y disminuye la regulación de proteínas asociadas al fenotipo epitelial. Las cascadas señaléticas de Wnt, TGF- β , Notch, Hedgehog, EGFP y PDGFR, mTOR, tirosina kinasas, etc. son fundamentales para la TEM y todas tienen componentes regulados por el UPS [135].

SCREENS GENÉTICOS

Uno de los mayores impedimentos para el tratamiento efectivo contra el cáncer es su heterogeneidad intrínseca y la gran variedad de respuestas clínicas consecuentes. Por tal motivo es de suma importancia el desarrollo de drogas dirigidas contra ciertos blancos moleculares, cáncer específico, y biomarcadores o indicadores de susceptibilidad para el tratamiento de distintos tipos de cáncer. Los *screens* genéticos utilizando ARN de interferencia pueden servir para atender éstos problemas, y se basan en la pérdida de función génica [99]. También existen *screens* genéticos que utilizan cADN y se basan en la ganancia de función. Existe una gran variedad de tipos de *screens*: cascada-específicos, fenotípicos, letal-sintéticos [136], *in vitro* o *in vivo*, diseñados para encontrar biomarcadores de resistencia a drogas, genes importantes para el crecimiento y proliferación [137], o para encontrar nuevos blancos moleculares que permitan el mejoramiento de las terapias actuales [99, 138]. En particular, se han realizado distintos *screens* para encontrar genes importantes en la regulación de la migración e invasión, en distintos tipos celulares, y mediante distintos experimentos y herramientas moleculares (**tabla 3**).

Proceso	Línea celular	Herramienta molecular	Blanco Molecular	Ensayo funcional	Cita
Migración	HDLEC, HMBEC (c. endoteliales)	siARN	Genoma humano	Ensayo de cierre de herida	[139]
Invasión	B16-F0 (melanoma)	shARN	Genoma murino	Cultivos 3D	[140]
Migración	A431 (carcinoma de c. escamosas)	siARN	E1, E2, E3, DUBs (humano)	Microscopía: cambios en citoesqueleto de actina	[141]
Invasión	U87 (glioblastoma)	shARN	Genoma humano	<i>Transwells</i> con Matrigel®	[142]
Migración	HCT116 (colon) MDAMB231 (CMTN)	Variantes estructurales de ubiquitina	E3 HECT ligasas (humano)	Ensayo de cierre de herida y <i>transwells</i>	[143]
Invasión	EpH4	cADN de céls pEik3.1 (retrovirus)	genes (murinos) expresados en pEik3.1	<i>Transwells</i> con Matrigel®	[144]
Migración	MCF10A	cADN de céls MCF7 (retrovirus)	genes expresados en MCF7	<i>Transwells</i>	[145]
Migración	MCF10A (c. epiteliales de mama)	siARN	Proteasas Kinasas (humano)	Ensayo de cierre de herida	[146]

Tabla 3. Screens genéticos utilizando si/shARN para estudiar la migración/invasión de células *in vitro*: En los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios para estudiar la migración e invasión de células, principalmente tumorales, utilizando la tecnología de siARN o shARN para bloquear la expresión génica. Se detallan, en cada caso, las líneas celulares utilizadas y ensayos funcionales utilizados.

En la era de la terapia dirigida y el diseño personalizado de tratamientos resulta imprescindible definir el *signature* molecular de los pacientes antes de tratarlos para maximizar los beneficios [147]. Como se ha mencionado anteriormente, y dado que aún no existe un tratamiento curativo efectivo para tratar pacientes con cáncer de mama triple negativo, este tipo de *screen* representa una herramienta invaluable para encontrar posibles nuevos blancos terapéuticos. En el contexto de esta tesis doctoral nos propusimos realizar un *screen* genético para encontrar genes del sistema de ubiquitinación que pudieran estar involucrados en el proceso de migración e invasión en células tumorales derivadas de este tipo de tumor, utilizando la tecnología de shARN. Usamos como modelo la línea celular MDAMB231, una línea celular epitelial derivada de una efusión pleural de un CMTN, que presente características del tipo mesenquimal [148].

Dicha tecnología se explica brevemente en la **figura 7**.

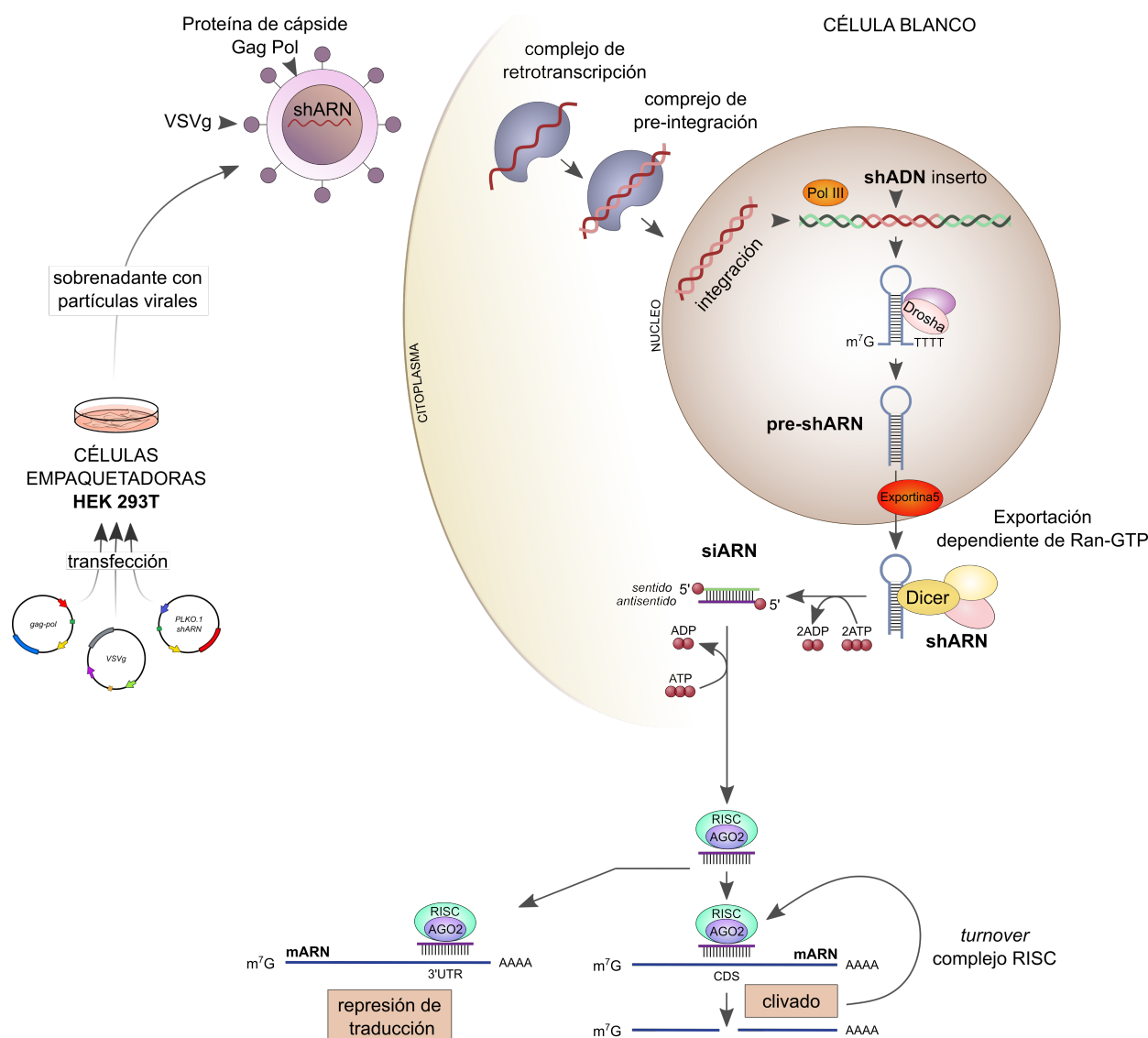


Figura 7. Tecnología shARN: Un shARN es una molécula artificial de ARN con un hairpin que puede ser utilizado para silenciar la expresión génica de genes blanco mediante ARN de interferencia [149]. Los vectores que contienen el shARN llegan a las células blanco mediante transducción con partículas lentivirales. Para que esto sea posible, es necesario generar previamente las partículas virales en células HEK293T. Los lentivirus se integran en zonas de la cromatina transcripcionalmente activas, y son propagados en las células hijas. Una vez que el vector se ha integrado en el genoma de la célula blanco, el shARN se transcribe en el núcleo. El producto imita un pri-miARN y es procesado por Drosha. El pre-shARN resultante se exporta del núcleo mediante la exportina 5. Este producto es luego procesado por Dicer y cargado en el complejo RISC. Luego la cadena sentido se degrada, y la antisentido dirige a RISC al mRNA cuya secuencia es complementaria. En el caso de complementariedad perfecta, RISC cliva al mRNA. En el caso de que no sea 100% complementaria, RISC reprime la transcripción de ese mRNA; en ambos casos se produce el silenciamiento génico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

En esta tesis se utilizaron las siguientes líneas celulares humanas: HEK293T (embrionarias renales); MDAMB231, MDAMB436 (mamarias de cáncer de mama triple negativo RE⁻/PR⁻/HER2⁻) y MCF7 (mamarias RE⁺/RP⁺).

Todas ellas fueron cultivadas rutinariamente con medio DMEM (alta glucosa) o RPMI, suplementado con L-glutamina (2mM), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 g/ml y suero fetal bovino (FBS) al 10%, según especificaciones del ATCC (*American Type Culture Collection*). Todos los reactivos fueron adquiridos en Invitrogen salvo el suero, adquirido en Natocor.

Transfecciones

Las transfecciones se realizaron con PEI (polietilenimina, SIGMA) o Lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Brevemente, se describe el procedimiento: se colocó la masa correspondientes de ADN plasmídico en un tubo *ependorf* con cloruro de sodio 100mM u OptiMEM (Invitrogen) (en el caso de PEI o Lipofectamina 2000, respectivamente). En simultáneo se colocó el agente de transfección en un segundo tubo *ependorf* con cloruro de sodio u OptiMEM (para transfecciones con PEI o lipofectamina, respectivamente) y se incubó por 5 min. Posteriormente se transfirió la mezcla de ADN plasmídico al tubo con el agente de transfección y se mezcló vigorosamente. Se permitió la formación de complejos entre el ADN y el agente de transfección por incubación durante 15 minutos, luego de lo cual se agregó la mezcla sobre las células por goteo. Luego de 6 horas para las transfecciones con lipofectamina, y 12 horas en el caso de PEI, se cambió el medio por DMEM 10% SFB.

Las masas de ADN, medio y agentes de transfección para cada línea celular se indican en la siguiente tabla:

Línea celular	Placa	Masa de ADN	Volumen NaCl	Volumen PEI	Volumen NaCl
Hek293T	24 pocillos	0,5 µg	25 µl	3 µl	25 µl
	P 60 mm	2,5 µg	125 µl	15 µl	125 µl
	P 100 mm	5 µg	250 µl	30 µl	250 µl

Línea celular	Placa	Masa de ADN	Volumen OptiMEM	Volumen Lipofectamina	Volumen OptiMEM
MDAMB231 MCF7	P60 mm	0,2 µg	25 µl	1,2 µl	25 µl

Tabla 4: Protocolo de transfección. Se indican las masas de ADN, medio y agentes de transfección para las distintas líneas celulares utilizadas.

Transducción de plásmidos

Síntesis de partículas lentivirales

Se transfectaron células HEK293T que se encontraban en un 70-80% de confluencia, utilizando reactivo PEI, con los plásmidos pVSVG – psPAX – plásmido de interés (shARN/gARN/Flag-Cas9) en una proporción 2:2:1. Se reemplazó el medio luego de 6 horas por DMEM 10% SFB, y colectó el sobrenadante 48 horas después. El mismo contenía las partículas virales en suspensión, que fueron filtradas con filtros de jeringa de 0,22 µm de tamaño de poro. Dichos sobrenadantes fueron utilizados inmediatamente o guardados a -80°C hasta su uso.

Infección de líneas celulares y posterior selección

La transducción se realizó mediante incubación (durante 48 hrs) de las células blanco con el sobrenadante con partículas lentivirales. Luego de este tiempo se renovó el medio y agregó DMEM suplementado con el agente de selección determinado (blasticidina o puromicina, según el caso).

La concentración de uso del compuesto blasticidina fue de 2 µg/mL, y 0,5 µg/mL para la puromicina.

En todos los casos las líneas celulares fueron seleccionadas durante al menos dos semanas previo a su uso para experimentación, luego de lo cual la concentración del agente de selección se redujo al medio (concentración de mantenimiento).

La línea celular MDAMB231 utilizada para realizar el *screen* genético se generó utilizando un título viral tal que permitiera la supervivencia del 10-15% de las células blanco luego de la selección con puromicina. Este porcentaje aseguró que en cada célula se encontrara un único shARN (ver material suplementario).

Se utilizaron $4,4 \times 10^6$ células totales para realizar la infección de la biblioteca de shARNs. Al utilizar una dilución de las partículas virales se infectó el 11,5% del total, es decir que se infectaron $\sim 5 \times 10^5$ células. Esto aseguró una cobertura mayor a 200 veces la complejidad de la biblioteca de shARNs.

El resto de las infecciones llevadas a cabo en esta tesis se realizó utilizando un título viral que permitió la supervivencia de aproximadamente el 95% de las células luego de la selección con puromicina.

Ensayo de migración en *transwells*

Procedimiento general

Se crecieron las células hasta un porcentaje de confluencia equivalente al 70-80% y luego se hambreadon durante 24 horas con DMEM 0,1% SFB (con el objeto de arrestar su proliferación). Transcurrido ese tiempo, se las tripsinizó y enjuagó con DMEM 10% SFB, seguido de un segundo enjuague con DMEM 0,1% SFB. Se utilizaron 5×10^4 células en 150 μ l para realizar el ensayo de migración en *transwells* de placas de cultivo de 24 pocillos (catálogo 351152 o 353097, BD-Corning), y $6,6 \times 10^5$ células en 400 μ l en el caso de los *transwells* de placas de cultivo de 6 pocillos (catálogo 353093, BD-Corning). Las mismas fueron sembradas en el compartimento interior del *transwell*, y se colocaron 350 o 500 μ l de DMEM 10% SFB en el compartimento inferior formado por la placa de 24 o 6 pocillos, respectivamente.

Para aquellos experimentos realizados en placas de 24 pocillos se procedió de dos maneras posibles: en aquellos casos donde se trabajó con *transwells* de membrana opaca (Fluoroblok®, 351152, BD-Corning), se fijaron las células a uno y otro lado de la membrana porosa utilizando 500 μ l de metanol durante 15 minutos; en aquellos casos donde se trabajó con membranas transparentes, se removieron las células a uno u otro lado de la membrana previo a su fijación, haciendo uso de un hisopo de algodón con mango de madera. Por el contrario, y para aquellos experimentos realizados en placas de 6 pocillos, se removieron las células “migradoras” con el uso de un hisopo de algodón humedecido (estéril), se enjuagó el *transwell* con PBS1X y luego recuperaron las células que no habían migrado y se encontraban en el interior del mismo mediante tripsinización y recolección sobre nuevas placas de cultivo. Las células se utilizaron luego para nuevos ensayos de selección y/o se tomaron muestras de 5×10^5 células para ser utilizadas como muestras de secuenciación.

Considerando que el porcentaje inicial de células de nuestro interés (“no migradoras”) en la población parental era del ~30%, se utilizaron 8 *transwells* en placas de 6 wells por cada ciclo de selección, lo cual aseguró una cobertura mínima de la complejidad de la biblioteca equivalente a 800 veces.

Tinción de transwells y evaluación de porcentaje de migración

Una vez fijadas las células sobre las membranas de los *transwells* se las enjuagó con PBS1X y luego se las tiñó con 2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamida (DAPI) 1µg/ml en PBS1X. Dicho colorante es un marcador fluorescente con afinidad por regiones enriquecidas en ADN, y por lo tanto tiñe predominantemente los núcleos celulares. Dicha coloración permitió la cuantificación de células adheridas a ambos lados de las membranas de los *transwells* (en el caso de los *transwells* Fluoroblok®), o adheridas a un lado (membranas transparentes). Se tomaron fotografías con un microscopio Zeiss AxioObserver Z1, utilizando un objetivo 10X, y utilizando la herramienta “tiling” que el mismo posee. Dicha herramienta posibilita la adquisición automática de fotografías que recorren un área determinada (de mayor tamaño a la contemplada en una única fotografía), y posterior ensamblado de las mismas en una única imagen de mayor tamaño. En el caso de los *transwells* de placas de 24 pocillos, se tomaron 64 fotografías (8x8) con el objetivo 10X.

Preparación de las muestras para secuenciación

La preparación de las muestras consistió en utilizar ADN genómico y dos ciclos de PCR para aislar el *cassette* de shARN. Se preparó una hebra simple del mismo mediante corte con enzima de restricción XhoI en la región “bucle” del shARN. Este paso es crítico dado que las estructuras secundarias del shARN no son compatibles con NGS, y que los shARN utilizados no presentan un bucle suficientemente largo como para posibilitar la amplificación por PCR de un brazo del shARN en una reacción única.

Los pasos seguidos se ilustran en el **esquema 1**.



Esquema 1

Extracción de ADN

Se utilizó el kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, 69506) con el objeto de purificar ADN genómico a partir de pellets de células, siguiendo las instrucciones del proveedor.

PCR #1

El primer paso de la preparación de las muestras para secuenciación es el cálculo de la cantidad de ADN que tiene que utilizarse para la PCR #1.

Asumiendo que cada célula humana contiene 6 pg de ADN y que la población mixta parental contenía aproximadamente 2000 shARNs diferentes (con un shARN por célula), entonces 6 µg de ADN representa una cobertura de la complejidad de la biblioteca de 500 veces.

La PCR #1 se realizó para aislar y amplificar el *cassette* de shARN, utilizando la enzima polimerasa Phusion. Los oligonucleótidos usados para esta PCR se alinean con regiones dentro de los LTRs, por lo tanto son comunes a todos los clones de la biblioteca y deberían, en consecuencia, amplificar todos los *cassettes* de la biblioteca por igual.

Cada reacción de PCR #1 contenía los siguientes componentes: 10 µl de buffer HF de enzima Phusion), 1 µl de dNTPs (10mM cada uno), 2,5 µl de *primers* pLKO.1 Fw y Rv (10µM cada uno, ver detalles en material suplementario), 1µl de enzima polimerasa Phusion, 500 ng de ADN genómico y agua para alcanzar 50 µl finales por reacción. Las condiciones del ciclado fueron: 1 ciclo a 98°C durante 5 minutos, seguido de 26 ciclos de la secuencia 98°C-30 segundos, 70°C-30 segundos y 72°C 30 segundos, y con un ciclo final de 72°C durante 7 minutos. Se minimizó el número de ciclos para evitar la aparición de productos secundarios.

Se corrieron 5 µl de cada producto de la PCR #1 en un gel de agarosa TAE 2% a fin de visualizar la banda esperada de 497 pares de bases.

La PCR #1 fue realizada 12 veces, de modo tal de amplificar 6 µg de ADN genómico. Se colectaron luego todas las reacciones y se las purificó haciendo uso del kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen-28104).

Digestión con *Xho*I

Se digirió 1 µg del ADN resultante con *Xho*I (ThermoScientific FD0694) ON a 37°C. Las reacciones de digestión contenían 3,5 µl de buffer FD 10X, µl de *Xho*I (20.000 U/ml), 1 µg ADN y agua hasta alcanzar un volumen final de 35 µl.

Dado que la biblioteca utilizada presenta dos sitios de corte de la enzima *Xho*I en el casete amplificado con la PCR #1, el producto final luego de la digestión enzimática contiene fragmentos de 271, 183 y 43 pares de bases.

A continuación, y a fin de purificar el fragmento de 271 pares de bases, se corrió la totalidad del producto de la digestión en un gel de agarosa TAE 2%. Luego se utilizó el kit comercial Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen 28704) para purificar el taco de agarosa que contenía la banda de interés, siguiendo las instrucciones del proveedor.

Es importante indicar que la enzima *Xho*I no se inactivó con calor, y que la disolución del taco de gel de agarosa se realizó a una temperatura de 30°C (para preservar la estructura de doble hebra de los *cassettes* de shARN, que podrían tener dificultades para realinearse luego de temperaturas elevadas).

Ligación con *barcoded linkers*

Los *barcoded linkers* son los fragmentos de ADN con secuencia única, que posibilitan la identificación del origen de cada muestra. Se sintetizaron *barcoded linkers* únicos para cada muestra (ver detalle en material suplementario).

Se prepararon los *linkers* necesarios para la ligación con la banda de 271pb obtenida luego de la digestión mediante la resuspensión de los oligonucleótidos liofilizados en buffer ST (10 mM Tris pH 8, 50mM NaCl) hasta alcanzar una concentración de 200 µM. Luego se tomó un volumen de cada oligo (de modo tal que se alcanzara una concentración final de 100 µM de cada uno), se calentó la mezcla a 94°C durante 10 minutos y finalmente se la dejó enfriar paulatinamente (para asegurar un alineamiento adecuado de las hebras). Se removieron los oligonucleótidos simples utilizando las columnas ilustra MicroSpin G-25 (GE Healthcare UK-27-5325-01, 215 Buckinghamshire, UK).

Los *linkers* fueron agregados a la reacción de ligación del siguiente modo: 100ng del producto de 271pb purificado, 3,5 µl del buffer 10X de la enzima T4 ADN ligasa (Thermo Scientific EL0011), 4 µl del *linker* 1 µM, 1 µl de la enzima T4 ADN ligasa y agua hasta alcanzar un volumen de 35 µl. Las ligaciones se realizaron ON a una temperatura de 16°C.

Se corrió la totalidad del producto de ligación en un gel de agarosa TAE 2%, y la banda resultante de 312 pb fue purificada a partir del taco de agarosa, como explicado anteriormente utilizando las columnas QIAquick gel extraction kit.

PCR #2

El paso final en la preparación de las muestras es la segunda PCR con los adaptadores necesarios para la secuenciación por *Illumina*. En esta PCR, al igual que la PCR #1, se minimizó el número de ciclos para evitar productos secundarios que pudiesen afectar la secuenciación.

Cada reacción de PCR #2 contenía los siguientes componentes: 10 µl de buffer HF 5X de enzima Phusion), 1 µl de dNTPs (10mM cada uno), 2,5 µl de cada uno de los adaptadores *Illumina* (10µM, ver detalle en material suplementario), 1µl de enzima polimerasa Phusion, 10 ng de ADN genómico ligado a los *linkers* y agua para alcanzar 50 µl finales por reacción. Las condiciones del ciclado fueron: 1 ciclo a 98°C durante 2 minutos, seguido de 2 ciclos de la secuencia 98°C-30 segundos, 62°C-30 segundos y 72°C 30 segundos, y con 7 ciclos finales de la secuencia 98°C-30 segundos y 72°C-30 segundos, con un paso final de 72°C durante 3 minutos. El producto final de 141pb se purificó a partir de un gel de agarosa TAE 2% como explicado anteriormente.

Secuenciación *Illumina* y análisis de datos

Se analizó la pureza de las bibliotecas preparadas para secuenciación utilizando Qubit (Thermo Scientific). Se juntaron las 12 muestras, cada una con un *barcoded linker* diferente y a una concentración de 10ng/µl, y se las secuenció en un equipo HiSEQ 2500 HT Mode V4 Chemistry con una corrida simple de 50 ciclos (1x50). Se determinó la frecuencia de los diferentes shARNs permitiendo 1 *mismatch* en la secuencia específica de 21 nucleótidos, obteniendo en promedio $1,2 \times 10^6$ lecturas por muestra (>600X complejidad de biblioteca de shARNs).

Síntesis de cADN

Extracción ARN

Se partió de *pellets* congelados (-80°C) que provenían de $0,5-1 \times 10^6$ células para realizar extracción de ARN y posterior síntesis de cADN.

Se utilizó el reactivo TriReagent (Sigma, T9424), siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, se agregaron 400 μ l a las muestras y se homogeneizaron con el uso de una pipeta. Los lisados se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2-5 minutos, luego de lo cual se les agregaron 100 μ l de cloroformo. Se agitó la mezcla vigorosamente durante 15 segundos, luego se dejó reposar durante 5 minutos y luego se centrifugó la mezcla resultante a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. La centrifugación separó la muestra en 3 fases; se tomó la fase no coloreada, superior, que contenía el ARN y se la colocó en un nuevo tubo con 250 μ l de isopropanol. La suspensión resultante se mezcló y dejó reposar durante 5-10 minutos a temperatura ambiente y luego se la centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. Luego de descartar el sobrenadante, se enjuagó el pellet con 500 μ l etanol 75% y centrifugó nuevamente a 4°C. Se descartó el sobrenadante resultante, dejó secar el pellet de ARN durante 5-10 minutos y resuspendió el mismo en 50 μ l de agua estéril, libre de ARNasas. Se cuantificó el ARN con el uso de un nanodrop (Nanodrop lite, Thermo Fisher Scientific), y se lo guardó a -80°C hasta su uso posterior.

RT-PCR

El protocolo para la obtención de ADN copia a partir de ARN se detalla a continuación, y consiste en el protocolo provisto por el fabricante de la enzima Transcriptasa Reversa (MMLV-RT, Promega) con leves modificaciones.

Se desnaturalizaron 5 μ l de ARN colocándolo 5 min a 55°C, luego de lo cual se los colocó el hielo inmediatamente. Se agregaron 7 μ l de mezcla de reacción a cada tubo, la cual contiene: 4 μ l de buffer de RT 5X; 0,25 μ l de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP); 0,5 μ l de inhibidor de ARNasas 40 U/ μ l; 0,5 μ l de oligo dT 100 μ M (oligo de 12-18 nucleótidos); 1,5 μ l de enzima M-MLV RT 200 U/ μ l y H₂O c.s.p. 15 μ l. Finalmente se incubaron las muestras 1 h a 37°C para que ocurra la reacción, luego de lo cual se las incubó 5 minutos a 95°C para frenar la reacción.

qPCR

Expresión génica

Se realizó qPCR a partir de cADN, utilizando el kit FastStart Essential DNA Green Master de Roche, siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, se agregó 1,5 µl de muestra de cADN a una *master mix* con 300 nM de *primers* específicos en una reacción de 15 µl finales.

Las condiciones del ciclado fueron: 1 ciclo a 95°C durante 10 minutos, seguido de 35 ciclos de la secuencia 95°C-30 segundos, 60°C-30 segundos y 72°C 30 segundos. El detalle de los *primers* utilizados se encuentra en el material suplementario.

Estimación de focos metastásicos

Se realizó qPCR a partir de ADN genómico utilizando el kit ABsolute Blue QPCR Mix, SYBR Green de ThermoFisher, siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, se agregaron 600 ng de muestra de ADN genómico a una *master mix* con 400nM de *primers* específicos en una reacción de 25 µl finales.

Las condiciones del ciclado fueron: 1 ciclo a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de la secuencia 95°C-30 segundos, 65°C-30 segundos y 72°C 30 segundos. El detalle de los *primers* utilizados se encuentra en el material suplementario.

Western Blot

Preparación de los extractos celulares

Las muestras fueron colectadas y utilizadas inmediatamente o congeladas a -80° hasta su uso. A fin de preparar los extractos celulares, se lisaron las mismas con el buffer de lisis de Cloruro de Sodio 250 mM (Tris pH7,4 50mM, NaCl 250mM, NaF 25 mM, EDTA 2mM y Triton-X 0,1%). Luego se las cuantificó con el kit comercial BCA Protein Assay Kit (PIERCE), según especificaciones de Thermo Fisher Scientific, y posteriormente se las lisó en Laemmli buffer 2X (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% m/v SDS, 10% glicerol y 5% v/v β-mercaptoetanol). Los lisados fueron calentados a 95°C por 5 min antes de sembrarlos en geles de poliacrilamida.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), electrotransferencia y revelado

Las muestras fueron resueltas en geles de poliacrilamida 8% desnaturalizantes en *buffer* Tris-Glicina-SDS (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, 0,1% SDS) y se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Marker Kaleidoscope (BioRad). Se realizó la corrida electroforética a 120 volts durante 60 minutos, y luego la transferencia de las proteínas a membranas de PVDF de 0,45 μ m de poro a 100 V durante 90 minutos en *buffer* de transferencia a 4°C (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, 20% metanol). A continuación, se tiñeron transitoriamente las membranas con rojo *Ponceau* para corroborar la presencia de proteínas en las mismas, así como también para comparar cualitativamente las masas sembradas en cada calle.

La incubación con los anticuerpos primarios se llevó a cabo durante la noche a 4°C en agitación, y las diluciones de los mismos fueron preparadas en 3% m/v BSA en PBS-Tween 0,1%. Se usó el anticuerpo primario anti USP19: cat. A301-587A de Bethyl labs, hecho en conejo en una dilución 1:2000; y el anticuerpo primario anti TUBULINA: cat. 398103 de Santa Cruz, hecho en ratón en una dilución 1:3000. Luego se lavaron las membranas tres veces durante 5 min con PBS-Tween 0,1% y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario de la especie apropiada acoplado a peroxidasa de rabanito (HRP) (Amersham, GE Healthcare) en una dilución 1:5000 en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente (en agitación). Luego de tres lavados de 5 minutos con *buffer* PBS-Tween 0,1% y un cuarto lavado con *buffer* PBS, la unión de los anticuerpos fue detectada con el kit de quimioluminiscencia SuperSignal West Femto y West Pico (Pierce). Las señales inmunoreactivas fueron analizadas de forma digital utilizando el programa ImageJ (NIH).

Preparación de bacterias competentes y plásmidos

Para generar bacterias competentes se utilizó la cepa DH5 α de *Escherichia coli*, y un protocolo tradicional basado en CaCl₂ y otras sales. Brevemente, las bacterias fueron sembradas en una placa de LB-agar libres de antibiótico (5 gr/L extracto de levadura, 10 gr/L peptona, 10 gr/L NaCl, 20 gr/L agar; pH 7) suficientemente diluidas como para obtener colonias individuales, e incubadas a 37°C por 16h. Una colonia fue picada y crecida durante 16h en 5ml de medio LB (5 gr/L extracto de levadura, 10 gr/L peptona, 10 gr/L NaCl; pH 7) en agitación (200rpm, 37°C). Una vez alcanzada la saturación, se inocularon 200ml del LB nuevo que se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 medida a 600nm para estimar el crecimiento del cultivo. Luego se centrifugó por 10min a 3000rpm y el pellet bacteriano se resuspendió en 100ml de CaCl₂ 100nM frío. La suspensión de bacterias se centrifugó nuevamente a 4°C por 10 min a 3000rpm. El pellet fue resuspendido en 5ml de

CaCl₂ 100nM e incubado en hielo por 30min. Posteriormente, 200µl de la suspensión de bacterias fueron alicuotadas en tubos *ependorf* con el agregado de glicerol hasta alcanzar una concentración final del 15%. Finalmente, las bacterias fueron conservadas a -80°C.

Se obtuvieron bacterias con una eficiencia de aproximadamente 10⁶ - 10⁷ UFC/µg.

Las bacterias fueron transformadas según métodos convencionales basados en el protocolo de Hanahan [150]. Se incubaron 1-2 µl de una solución de plásmido con 50 µl de una suspensión de bacterias competentes. Dicha incubación se realizó a 4°C sobre hielo durante 30 minutos, luego se aplicó un shock térmico a 42° durante 60 segundos, y luego se las incubó nuevamente a 4°C (hielo) durante 3 minutos. Se las dejó recuperar 60 minutos a 37°C con el agregado de LB fresco, y luego se sembraron de 50 µl de la suspensión de bacterias transformadas sobre placas LB agar suplementadas con el antibiótico de selección presente en el plásmido transformado (100 µg/ml ampicilina o 50 µg/ml kanamicina). Se incubaron las mismas a 37°C durante 16 horas, aproximadamente, luego de lo cual se evaluó la presencia de colonias transformantes aisladas. Utilizando un tip estéril, se tomó una muestra de las colonias aisladas que se querían amplificar, y se colocaron las bacterias en 3-4 ml de LB líquido suplementado con el antibiótico de selección. Luego de 16-20 horas, y una vez que el cultivo líquido hubiese adquirido turbidez, se realizó la técnica de preparación de plásmido para pequeños volúmenes (miniprep). Se utilizó el kit comercial de columnas QIAprep Spin Miniprep kit de Qiagen, siguiendo las indicaciones del proveedor.

Ensayo de invasión - gota de agar noble

Se evaluó la capacidad de células de invadir una matriz de agar. A tal fin, se preparó una solución 1% de agar noble en PBS1X y luego esterilizó con autoclave. Una vez esterilizada y previo a su solidificación, se sembró una gota de 5 µl en la zona central de cada pocillo de una placa de 96 posiciones. Se dejó solidificar el agar durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se sembraron 5x10³ células en 100 µl de DMEM 10% SFB suplementado con Hoeschst 33258 (ThermoScientific) 1 µg/ml por pocillo. Luego de 1 hora (necesarias para que las células se asentaran sobre el fondo de los pocillos de la placa), se procedió a tomar fotografías de los bordes de las gotas de agar noble cada 20 minutos durante 18 horas. Las fotografías fueron tomadas con un objetivo de aire 10X de un microscopio de fluorescencia Axio Observer Z1 (Zeiss), equipado con una cámara CCD AxioCam HRm3 digital, y la cámara de incubación XLmulti S1 (D) y el módulo de temperatura XL S1 (D) para mantener las condiciones de cultivo a 37°C y 5% de CO₂. La adquisición se controló con el programa Zen Blue 2011 (Zeiss).

Ensayo de migración - cierre de herida

Se sembraron $2,5 \times 10^5$ células por cada posición de una placa de 24 pocillos, y al día siguiente se hambreadon las mismas con DMEM 0,1% SFB durante 24 horas. Una confluencia del 95-100% era requerida en todos los casos para poder realizar este ensayo. Se realizó una herida en la monocapa de células haciendo uso de un tip de 20-200 μ l colocado en posición perpendicular al plano de crecimiento de las células. Luego se cambió cuidadosamente el medio, y se agregó DMEM 3% SFB. Se tomaron fotografías de los bordes de las heridas cada 15 minutos durante 12 horas en una atmósfera controlada de temperatura y %CO₂. Se utilizó el microscopio de fluorescencia Zeiss AxioObserver Z1 con Sistema *Live Imaging*, descripto anteriormente.

Ensayo clonogénico

Ensayo clonogénico en dos dimensiones

Se sembraron 1×10^3 células en placas de 100 mm y cambió el medio regularmente cada 3 días durante 15 días. Luego de transcurridas las dos semanas, se enjuagaron las colonias formadas con PBS1X y luego fijaron con metanol durante 15 minutos. Posteriormente se volvieron a enjuagar y se las tiñó durante 1 hora con una solución de cristal violeta 0,03%, luego de lo cual se las sumergió en agua corriente para remover el exceso de colorante, se las dejó secar y se las fotografió.

Ensayo clonogénico en tres dimensiones-anoikis

Este experimento evalúa la capacidad de las células de crecer sin adhesión a un sustrato. Su preparación consistió en el recubrimiento de placas de 6 pocillos con 4 ml de una mezcla de DMEM 2X, agar noble esterilizado 1,8% y agua estéril en una proporción 1:2/3:1/3. Luego se dejó solidificar la mezcla 30 minutos a temperatura ambiente. Por encima de esa primer capa de agar y DMEM, se colocaron 2 ml de una mezcla de DMEM 2X, agar noble 1,8% y 5×10^3 células en PBS1X en una proporción 1:1/3:2/3. Es importante destacar que todos los pasos se realizaron con materiales pre-calentados en baños termostáticos a 55°C (salvo las células). Se agregaron 150 μ l de medio fresco cada 3-4 días, y dejaron crecer las células durante 6 semanas, luego de lo cual se tomaron fotografías.

Determinación de tasas de duplicación

Técnica espectrofotométrica (Cristal violeta)

Se sembraron 1×10^4 células placas de 96 pocillos por cuadruplicado. Luego de 24, 48, 72 y 96 hrs se removió el medio y se fijaron las células con 150 μ l de metanol durante 15 minutos. Posteriormente se enjuagó cada pocillo con agua por inmersión, se colorearon las células con 150 μ l de una solución de cristal violeta 0,06% durante 15 minutos, y luego de remover el excedente del colorante (nuevamente por inmersión en agua), se resuspendieron los cristales violetas agregando 150 μ l de metanol. La tasa de proliferación se determinó calculando la pendiente de la curva formada por la absorbancia a 595 nm de cada punto relativo al tiempo $t=24$ hrs.

Técnica de microscopía (Área celular)

Se sembraron 1×10^3 células placas de 96 pocillos e incubaron a 37°C durante 16 hrs para asegurarse que las mismas estuvieran pegadas. A continuación, se tomaron fotografías en posiciones fijas en cada pocillo cada 6 horas durante 3 días, en una atmósfera controlada de temperatura y %CO₂. Al igual que los experimentos de microscopía en tiempo real explicados anteriormente, se utilizó el microscopio de fluorescencia Zeiss AxioObserver Z1 con Sistema *Live Imaging* (descrito anteriormente). La tasa de proliferación se estimó midiendo el área ocupada por las células en cada posición a lo largo del tiempo, asumiendo que el área cubierta aumenta de modo lineal y proporcional a la tasa de duplicación para porcentajes de confluencia celular inferiores al 70%.

Sensibilidad

Se sembraron $1,5 \times 10^4$ células placas de 96 pocillos. Al día siguiente se les cambió el medio por 200 μ l de DMEM suplementado con distintas concentraciones de Doxorrubicina o Bortezomib, según cada experimento. Luego de 5 días de tratamiento se removió el medio y se fijaron las células con 150 μ l de metanol durante 15 minutos. Posteriormente se enjuagó cada pocillo con agua por inmersión, se colorearon las células con 150 μ l de una solución de cristal violeta 0,06% durante 15 minutos, y luego de remover el excedente del colorante (nuevamente por inmersión en agua), se resuspendieron los cristales violetas agregando 150 μ l de metanol. La dosis letal-50 (LD50) se estimó midiendo absorbancia a 595 nm.

Generación de líneas celulares knock out para el gen usp19 mediante CRISPR

A fin de obtener clones celulares que tuvieran el gen usp19 silenciado, se utilizó la tecnología CRISPR [151, 152].

Para ello, se estableció primero una línea MDAMB231 estable que expresara la enzima Cas9-Flag. Esto se realizó por transducción de un plásmido lentiviral que contenía la secuencia necesaria para la expresión de la endonucleasa Cas9, seguido de selección con el agente blasticidina durante 15 días. Una vez obtenida la línea MDAMB231 que expresaba la enzima Cas9-Flag establemente, se utilizaron vectores lentivirales para transducir los sgARN necesarios para silenciar el gen (guías 1 y 2), así como también los controles adecuados (vector vacío y vector con secuencia *non target*). Se seleccionaron las nuevas líneas celulares con puromicina durante al menos 15 días, y finalmente se obtuvieron clones a partir de células únicas por la técnica de dilución limitante. La expresión de USP19 en cada clon se determinó con la técnica de Western Blot.

Validación *in vivo*

Transplante xenotrópico – crecimiento de tumor 1º

Se inyectó una suspensión de células (5×10^5 células en 100 μ L de PBS1X) en la 4ta almohadilla de grasa mamaria derecha de ratones hembra NOD/SCID de 7-8 semanas de edad con agujas 27G. Se utilizaron 7-11 animales por cada tratamiento, según el experimento, y los mismos fueron inoculados bajo flujo laminar estéril.

Se determinó el volumen ocupado por los tumores generados realizando mediciones de sus dimensiones cada 2-3 días. Se utilizó la fórmula $Vol = (L1^2 * L2) / 2$, donde *Vol* (volumen) es igual a la mitad del producto entre el lado de menor longitud (*L1*) al cuadrado y el lado de mayor longitud (*L2*). Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 1-1,5 cm³ se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se procedió a extirpar el tumor y los pulmones, utilizando el material de cirugía adecuado.

Los tumores fueron seccionados para su posterior análisis *ex vivo*. Una porción se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, otra sección se fijó durante 24 hrs en una solución de formaldehído neutralizado (NBF) y luego se guardó en etanol 75%, y un volumen mínimo fue utilizado para generar cultivos primarios. Los pulmones se inflaron leve y

suavemente con una solución de NBF utilizando una aguja 18G, previo a su inmersión en la solución NBF durante 24 hrs, y posterior lavado y guardado en etanol 75%.

Transplante xenotrópico – metástasis experimental

Se inyectó una suspensión de células (1×10^5 células en 200 μ l de PBS1X) en la vena caudal de ratones macho NOD/SCID de 7-8 semanas de edad con el uso de agujas 27G.

Luego de 60 días se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se procedió a extirpar los pulmones, utilizando el material de cirugía adecuado. Los mismos se inflaron leve y suavemente con una solución de NBF utilizando una aguja 18G, previo a su inmersión en la solución NBF durante 24 hrs y posterior lavado y guardado en etanol 75%.

La preparación de las muestras de ADN genómico para determinar focos metastásicos se realizó haciendo uso del kit DNeasy® Blood & Tissue de Qiagen, siguiendo las instrucciones del proveedor.

En aquellos casos en los que se tiñeron los pulmones, el procedimiento utilizado fue ligeramente diferente: luego de eutanasiar los ratones, se inflaron los pulmones leve y suavemente con una solución de tinta india al 15% diluida en agua. Luego se lavó el exceso de tinta con abundante agua durante 5 minutos, y luego se transfirieron los pulmones a un recipiente que contenía solución de Fekete (700 ml etanol 100%, 32 ml formalina 37%, 40 ml de ácido acético y 228 ml agua). Se lavaron los mismos 3-4 veces con dicha solución y luego se los incubó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron los mismos con abundante PBS1X.

Establecimiento de cultivos primarios

Se partió de muestras de tumores primarios frescos, triturados en esterilidad con el uso de hojas de bisturí. Se agregaron 500 μ l de 0,075 mg/ml colagenasa tipo IA de Sigma por cada 100 μ l de tejido fresco, e incubaron durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se agregaron 15 volúmenes de DMEM 10% SFB para diluir la colagenasa, se centrifugó la muestra 5 minutos a 10000 rpm y descartó el sobrenadante. El pellet resultante fue resuspendido en 2 ml de buffer de lisis de glóbulos rojos (155mM NH_4Cl , 10mM KHCO_3 , 0,1mM EDTA; pH 7,3) e incubado 2-3 minutos a 4°C. A continuación se agregaron 5 volúmenes de DMEM 10% SFB y centrifugó nuevamente. Se descartó el sobrenadante y resuspendió el pellet resultante en 3 ml de DMEM 10% SFB. Se permitió la decantación de porciones de tejidos no digeridas, y se

sembraron las células que se encontraban en el sobrenadante. Luego de 24 hrs, se cambió el medio de los nuevos cultivos y agregó DMEM con 0,5 µg/ml puromicina.

Análisis estadístico de los datos

El tratamiento estadístico de los datos se realizó utilizando el software Graphpad prism. Se aplicaron estudios ANOVA (paramétrico) y post *test* de Dunnett, y *test* no paramétrico Kruskal-Wallis y prueba de Dunn's, según el caso, para evaluar diferencias entre tratamientos. Para comparar la respuesta de sensibilidad a drogas, se transformaron los datos de cada línea celular y luego compararon las curvas de sensibilidad con el método de suma extra de cuadrados y prueba F. Finalmente, las curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de tumor se analizaron con un test Log-Rank (Mantel-Cox) y se calculó el cociente de riesgo (Hazard Ratio o HR) con el método log rank.

Análisis de imágenes

Todas las imágenes fueron analizadas con los *software* ImageJ y ZEN Zeiss Edición Blue. Los *macros* (indicaciones) para cada experimento pueden encontrarse en el material suplementario.

RESULTADOS

SCREEN

El objetivo de la presente tesis fue encontrar nuevos genes de la cascada de Ubiquitinación involucrados en el control del proceso de migración e invasión celular, que representaran posibles nuevos blancos terapéuticos para el manejo clínico de pacientes con cáncer de mama triple negativo (CMTN). A tal fin se realizó un *screen* genético utilizando la tecnología de interferencia con shARNs dirigidos a genes relacionados al sistema ubiquitina-proteasoma (*UPS*) y el ensayo funcional de migración en *transwells*. Se buscaban reguladores positivos de la migración, cuya inhibición produjera un fenotipo “no migrador”. Por tal motivo, se seleccionó una población con alto porcentaje de células no migradoras a partir de la línea celular MDAMB231 (derivada de un CMTN) que contenían los shARNs en estudio.

Factibilidad

Previo al comienzo de la selección funcional se estimó la factibilidad de obtener células que no migraran, considerando el sistema experimental elegido, la complejidad de la biblioteca de shARNs utilizada y el porcentaje de células migratorias inicial.

Para ello consideramos un modelo sencillo en donde la población inicial de células puede pensarse como un conjunto que abarca una subpoblación celular mayoritaria “A” (con alto porcentaje de células migratorias y que contiene shARNs que no producen cambios que afecten la capacidad de migrar), y una población celular “B”, mucho menor (con alto porcentaje de células no migratorias debido a la expresión de shARNs relevantes para el fenotipo “no migrador”) (**figura 8**). Asumimos que luego de cada ciclo de enriquecimiento la subpoblación “B” se enriquecerá, mientras que la subpoblación “A” se irá perdiendo.

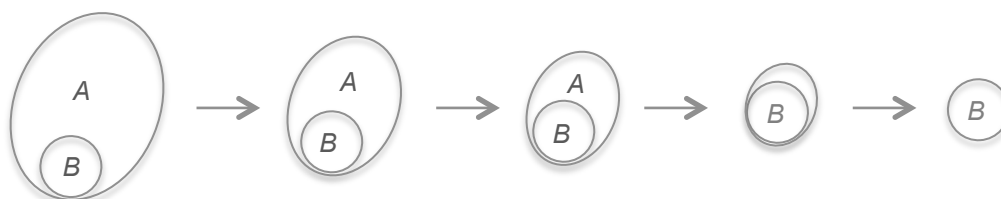


Figura 8. Modelo de selección funcional: Esquema ilustrativo del comportamiento de la población seleccionada. A es la subpoblación “migradora”, mientras que B es la subpoblación que contiene shARNs que disminuyen el potencial migratorio. De izquierda a derecha se observa la evolución de la población seleccionada: A se va perdiendo paulatinamente y B aumenta su frecuencia en la población.

Se modeló el comportamiento poblacional a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{fracción células no migradoras} = \frac{A * \alpha^n + B * \beta^n}{A * \alpha^{n-1} + B * \beta^{n-1}}$$

en donde n = ciclo de enriquecimiento, A = subpoblación celular con alto potencial migratorio (es decir, migra la mayoría de las células), B = subpoblación celular con bajo potencial migratorio (la mayoría de las células no migra debido a la presencia de shARNs de interés), α = 1-potencial migratorio de A y β = 1-potencial migratorio de B .

En este caso, α y β están determinados por los shARNs que componen ambas subpoblaciones y por las cualidades diferenciales que los mismos les otorguen respecto el proceso de migración.

Se utilizó la fórmula antes descripta para predecir el número de ciclos de selección que debieran realizarse a fin de obtener una población en la que el 85% de las células fuera “no migradora” ($\beta=0,85$). Se partió de una población que tiene un porcentaje de migración del 70% (obtenido a partir de datos experimentales), es decir que el 30% de las células no migran, y por lo tanto $\alpha=0,3$ (asumiendo que existían pocos genes candidatos y por lo tanto $A \gg B$).

Por tal motivo se modeló el comportamiento de la población a partir de distintos escenarios iniciales: con 1 shARN (1/1883 (número total de shARNs en la biblioteca)= 0,05% B y 99,95% A), con 50 shARNs (2,6% B y 97,4% A) y con 250 shARNs que inhibieran la migración (13,3% B y 86,7% A). En la **figura 9** se muestra la fracción de células “no migradoras” calculadas para distintos ciclos de los escenarios descriptos anteriormente.

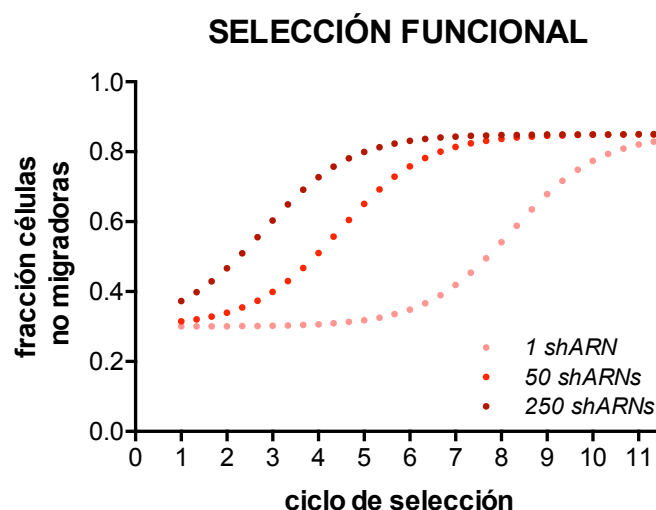


Figura 9. Fracción de células que no migran: Se utilizó la fórmula descripta anteriormente para predecir la fracción de células “no migradoras” en la población seleccionada. Se fijaron los parámetros $\alpha=0,3$ (~30% de células no migradoras en población A , “migradora”); $\beta=0,85$ (~85% de las células de la población B son “no migradoras”), y se varió la fracción de cada subpoblación A y B .

Nuestro análisis nos permitió determinar que se necesitarían, en el peor de los casos (un único shARN que inhibiera la migración de las células en estudio), al menos 11 ciclos de selección para obtener una población que tuviera un porcentaje de células no migradoras

equivalente al 85%. Como era de esperar, nuestro modelo predecía que a medida que aumentaba el número de shARNs relevantes para el fenotipo seleccionado, dicha selección se realizaría en menor cantidad de ciclos.

En experimentos pilotos determinamos que cada ciclo de selección nos demandaría un tiempo aproximado de 7 días. Por lo tanto, y aún teniendo que realizar 11 ciclos de enriquecimiento, la selección se podía llevar a cabo en un tiempo razonable.

Puesta a punto del ensayo de migración celular en *transwells*

Los *transwells* son normalmente utilizados de modo semi-cuantitativo para estimar el porcentaje de migración de una población celular en estudio. En el caso de esta tesis doctoral necesitábamos realizar ensayos de migración que pudiéramos cuantificar con alta precisión y por lo tanto fue necesario estandarizar las condiciones óptimas de este ensayo que serían luego utilizadas para realizar la selección funcional del *screen* y monitoreo del mismo.

En este tipo de ensayo es posible que los procesos de duplicación celular puedan influenciar el movimiento aparente de las células en estudio. Por tal motivo realizamos un hambreado de células previo al ensayo de migración para que todas las células en estudio fueran tratadas del mismo modo (considerando que se utiliza suero fetal bovino (SFB) como estimulante para la migración).

En primer lugar, y a fin de corroborar si la proliferación se inhibe por hambreado en la línea celular en estudio, realizamos una curva de proliferación de células previamente hambreadas con medio de cultivo suplementado con 0,1% SFB (se eligió 0,1% SFB en vez de 0% porque esta última condición de hambreado afectaba la supervivencia de las células), en medio completo. En la **figura 10** se observa que las primeras 24 horas luego de la liberación del hambreado, el número de células no varió respecto al número de células sembradas a tiempo $t=0$.

Se decidió entonces fijar 24 horas como el tiempo máximo de nuestro ensayo.

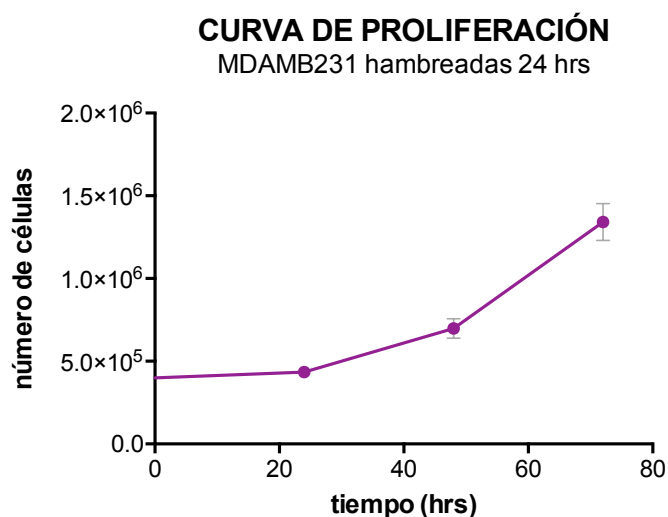


Figura 10. Curva de proliferación de células hambreadas: Se hambrearón células MDAMB231 durante 24 horas con DMEM 0,1% SFB. Luego se sembraron 5×10^5 de las mismas en distintos pocillos, y se cuantificó el número total de células luego de 24, 48 y 72 horas. El objetivo era determinar si el hambreado producía un arresto en el ciclo celular.

En segundo lugar se evaluó el porcentaje de migración a distintos tiempos de experimentación, teniendo en cuenta que el tiempo máximo que utilizaríamos sería 24 horas para evitar que las células comenzaran a proliferar (**figura 11**).

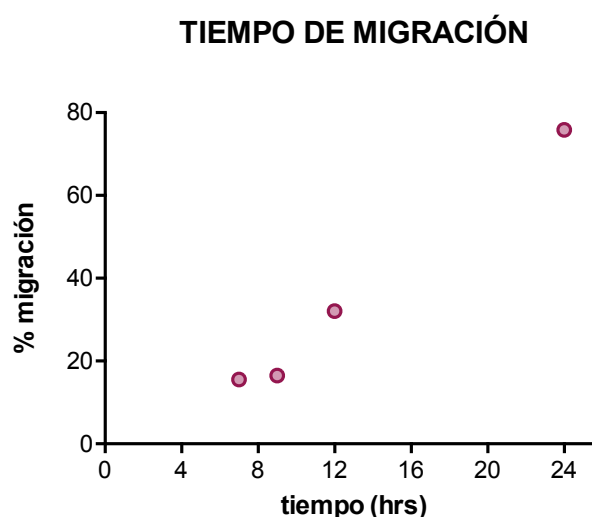


Figura 11. Tiempo de experimentación: Se evaluó el porcentaje de migración de células hambreadas a distintos tiempos.

Tal como puede verse en la **figura 11**, el porcentaje de células que migraron aumentó proporcionalmente al tiempo de experimentación durante las 10-24 horas. Para trabajar con el mayor rango dinámico posible y sin interferencia debidas a procesos de duplicación celular,

elegimos las condiciones de 24 horas como tiempo óptimo para realizar los experimentos de migración.

A continuación se probaron distintos métodos de tinción de los *transwells* que permitiesen estimar el número de células que atravesaron la membrana con la mayor precisión posible. En primer lugar se realizó el procedimiento estándar, descrito en la mayor parte de los trabajos publicados [153-155]. El mismo consiste en utilizar una solución de cristal violeta 0,5% m/v durante 15 minutos para teñir los *transwells* fijados (transparentes), y luego tomar fotografías de distintos campos de la membrana porosa. Dado que la tinción marcaba células enteras y que los límites de las mismas no era bien definido, y que además observamos un alto *background* del sistema en estudio debido el efecto de interferencias de los poros de la membrana (que se confundían con las células), estábamos obligados a utilizar un sistema manual de determinación de los límites celulares y cuantificación de células migradoras (**figura 12, fila 1**). Esta técnica, por ende, resultaba muy laboriosa, poco fiable e insumía mucho tiempo. Se decidió entonces explorar nuevas alternativas para mejorar este procedimiento. Utilizamos el colorante DAPI, que tiñe preferencialmente los núcleos celulares, de modo tal de obtener entidades bien definidas que pudiesen ser cuantificadas automáticamente utilizando programas computacionales comerciales y macros (indicaciones) diseñadas a tal fin (ImageJ) (**figura 12, fila 2**).

Durante el transcurso de los experimentos de optimización del ensayo funcional utilizamos, en una primera aproximación, *transwells* transparentes. Este procedimiento no nos permitía determinar el porcentaje de células que había migrado respecto del total sembrado, sino más bien el número de células que había atravesado la membrana. Este valor estaba influenciado por el número de células que se había adherido a la membrana en primer lugar (en el compartimento superior). Dicho de otro modo, al contar únicamente las células adheridas en la cara inferior del *transwell* (aquellas que habían migrado), no estábamos contemplando fenómenos de adhesión de las células a la membrana y, por lo tanto, no estábamos en condiciones de diferenciar bajos potenciales de migración de una línea celular versus una baja eficiencia en la adhesión de las células al *transwell*. Por tal motivo, se realizaron ensayos de migración en *transwells* con membrana opaca (*transwell Fluoroblok®*). Los mismos permiten la cuantificación de las células en ambos lados de la misma membrana porosa y resultan fundamentales para la correcta cuantificación del porcentaje de células migradoras en la población en estudio (**figura 12, fila 3**).

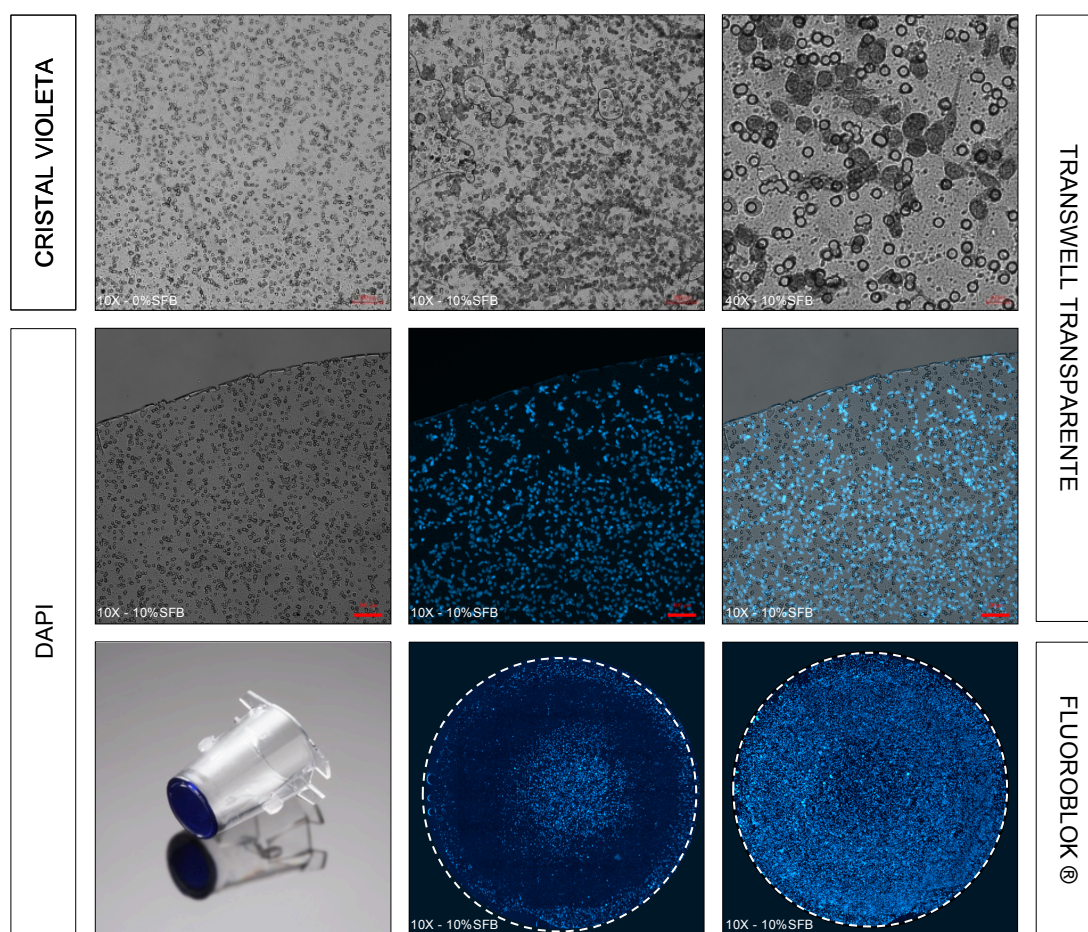


Figura 12. Optimización del ensayo en transwells, método de tinción y opacidad de membrana: Imágenes ilustrativas de membranas porosas transparentes y opacas (Fluoroblok®) teñidas con cristal violeta o DAPI. En las dos primeras filas se muestran fotografías de membranas transparentes tomadas con un objetivo 10X o 40X, teñidas con ambos colorantes. En la última fila se muestra un transwell Fluoroblok® así como también dos imágenes de “tiling” de una membrana, vista de ambos lados. Estas últimas fueron adquiridas con un objetivo 10X.

Se procedió entonces a medir el porcentaje migratorio de las células MDAMB231 que utilizaríamos en nuestro *screen* genético, usando las condiciones puestas a punto anteriormente. Para ello se usaron *transwells* de membrana opaca de 8 μm de tamaño de poro, y SFB 10% como estimulante de la migración en el medio de incubación. Como control, se utilizaron *transwells* con membranas cuyos poros medían 3 μm , que impedía el paso de las células independientemente de las condiciones ensayadas (**figura 13**).

Luego de 24 horas de experimentación, el porcentaje de células migratorias fue de 73% en condiciones de 10% SFB, y despreciable en medio 0% SFB (**figura 13**). Esto está en concordancia con los datos de literatura [156], y demuestra que esta línea celular es altamente migradora y que un medio 10% SFB es suficiente para estimular dicho proceso.

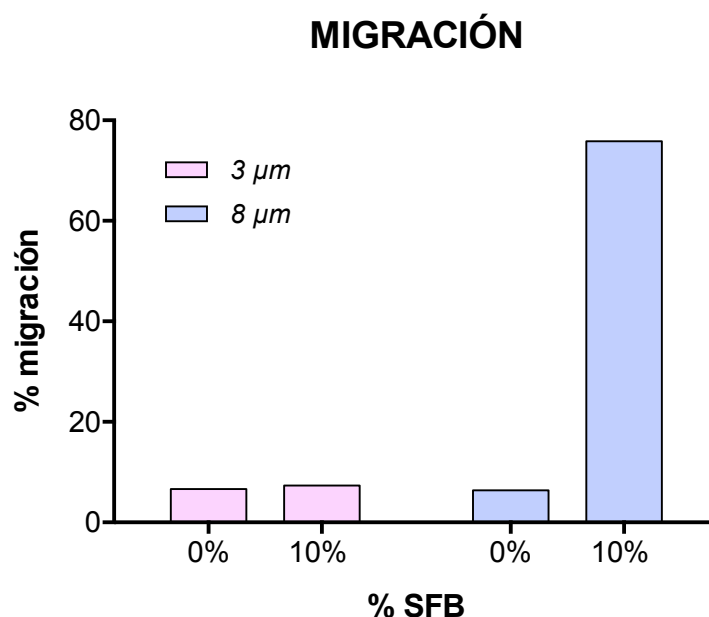


Figura 13. Caracterización funcional de la línea MDAMB231: Se evaluó el porcentaje de células que migraron a través de transwells Fluoroblok® luego de 24 horas, utilizando medio suplementado con 0 y 10% SFB.

Procedimiento general – selección de células “no migradoras”

Para la realización de nuestro *screen* funcional se partió de una población estable de la línea celular MDAMB231 que expresaba la biblioteca de shARNs dirigidos contra genes relacionados con el UPS, y como control una línea celular transducida con un vector vacío. Es importante destacar que se verificó la presencia de un único shARN por célula (ver material suplementario).

Las líneas celulares fueron sometidas a selección funcional en *transwells* de modo tal de obtener células con bajo potencial migratorio. Luego de un primer ensayo de migración se colectaron las células con bajo potencial migratorio (que se encontraban en el compartimento superior del *transwell*), se las amplificó y se dividió la población en dos: una porción se utilizó como muestra para realizar extracción de ADN genómico (para secuenciación), y otra porción se utilizó en un nuevo ciclo de selección de células con baja capacidad migratoria. Este procedimiento se repitió en lo que llamamos “ciclos de enriquecimiento” (haciendo referencia al supuesto enriquecimiento de los shARNs responsables del fenotipo “no migrador”), y en cada ciclo se utilizó la población de células “no migradoras” que provenía del ciclo de selección anterior. Esto se realizó hasta que la población de células transducidas con los shARN hubiera perdido cerca del 80% de su potencial migratorio (70%=porcentaje de células migradoras inicial → 15%=porcentaje de células migradoras final). En simultáneo se monitoreó el proceso de selección mediante ensayos en *transwells*. La **figura 14** resume el procedimiento llevado a cabo.

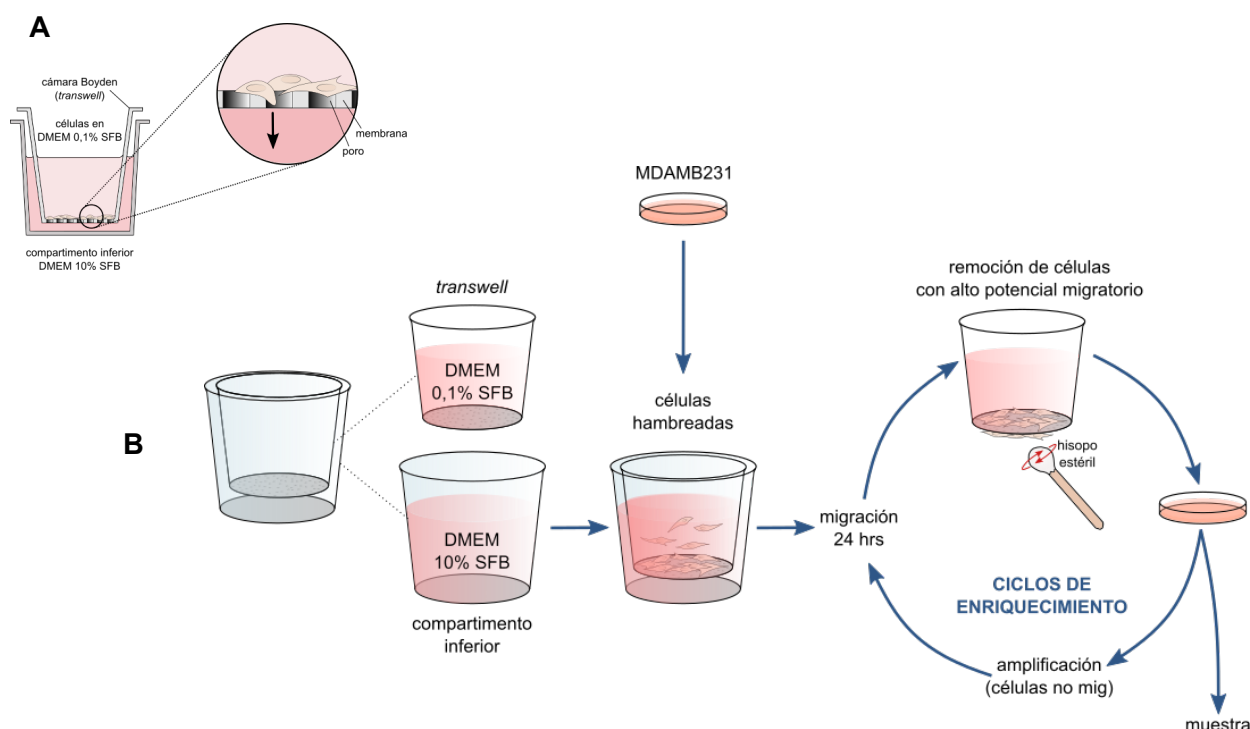


Figura 14: Esquema general de trabajo. B. Se realizó un screen genético para identificar componentes relacionados con la cascada de ubiquitinación involucrados en la regulación de la migración de células tumorales. Se utilizaron shARNs para bloquear genes específicos y transwells (mostrado en A) para seleccionar células que perdieran su potencial migratorio como consecuencia de la expresión de la biblioteca de shARNs. Se utilizó secuenciación Illumina para determinar la frecuencia relativa de cada shARN luego de la selección.

Como se observa en la **figura 15**, la población de células transducidas con la biblioteca de shARNs perdió aproximadamente un 80% de su capacidad migratoria luego de 11 ciclos de selección, mientras que la población control perdió sólo un 25%. Estos resultados nos indicaron que la población que expresaba la biblioteca de shARNs había perdido potencial migratorio debido a la expresión de shARNs específicos, y que el efecto debido a la presión de selección artificial era despreciable.

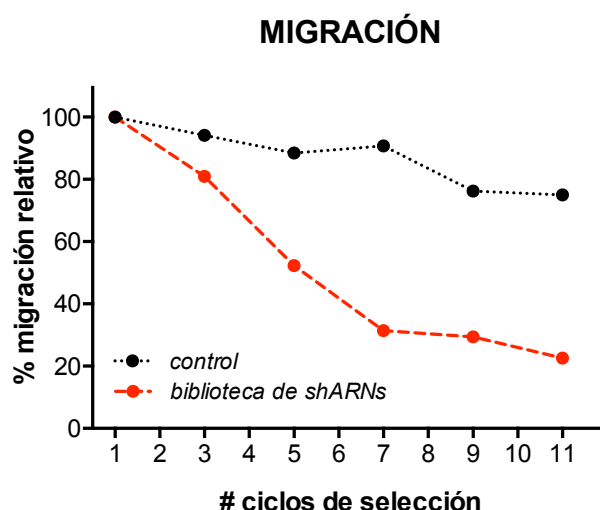


Figura 15. Monitoreo del proceso de selección: Se evaluó la capacidad migratoria de células MDAMB231 control y transducidas con la biblioteca de shARNs dirigidas a distintos componentes relacionados al UPS a lo largo de los ciclos de selección.

Al superponer los datos experimentales de la selección funcional con las curvas predichas por la fórmula descrita en el estudio de factibilidad, dedujimos que podría haber alrededor de 50 shARNs responsables del fenotipo seleccionado (**figura 16**).

Teniendo en cuenta que la disminución en la capacidad migratoria era mayor en la línea celular transducida con la biblioteca respecto la línea celular control, y que según nuestra estimación *in silico* sólo una cantidad acotada de shARNs podrían ser responsables del fenotipo seleccionado, se decidió continuar con el análisis de la identidad y frecuencia de los shARNs en las poblaciones seleccionadas.

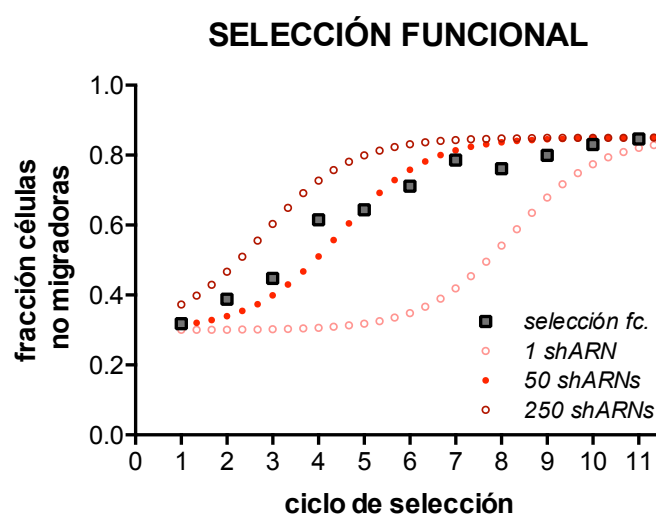


Figura 16. Fracción de células que no migran: Se superpusieron las curvas que describen, en el modelo más sencillo posible, el comportamiento de una población celular compuesta por dos subpoblaciones ("migradora" y "no migradora"), con los datos experimentales obtenidos para la línea celular transducida con la biblioteca de shARNs.

Preparación de muestras para secuenciación

La preparación de las muestras para su posterior secuenciación consistió en realizar dos ciclos de PCR para aislar el *cassette* de shARN a partir de ADN genómico. A tal fin fue necesario completar una serie de pasos que se describen en la **figura 17** donde se muestra la construcción lentiviral de cada shARN (que se integra en el genoma de la célula huésped) y los pasos y productos requeridos para producir la biblioteca de secuenciación a partir de ADN genómico.

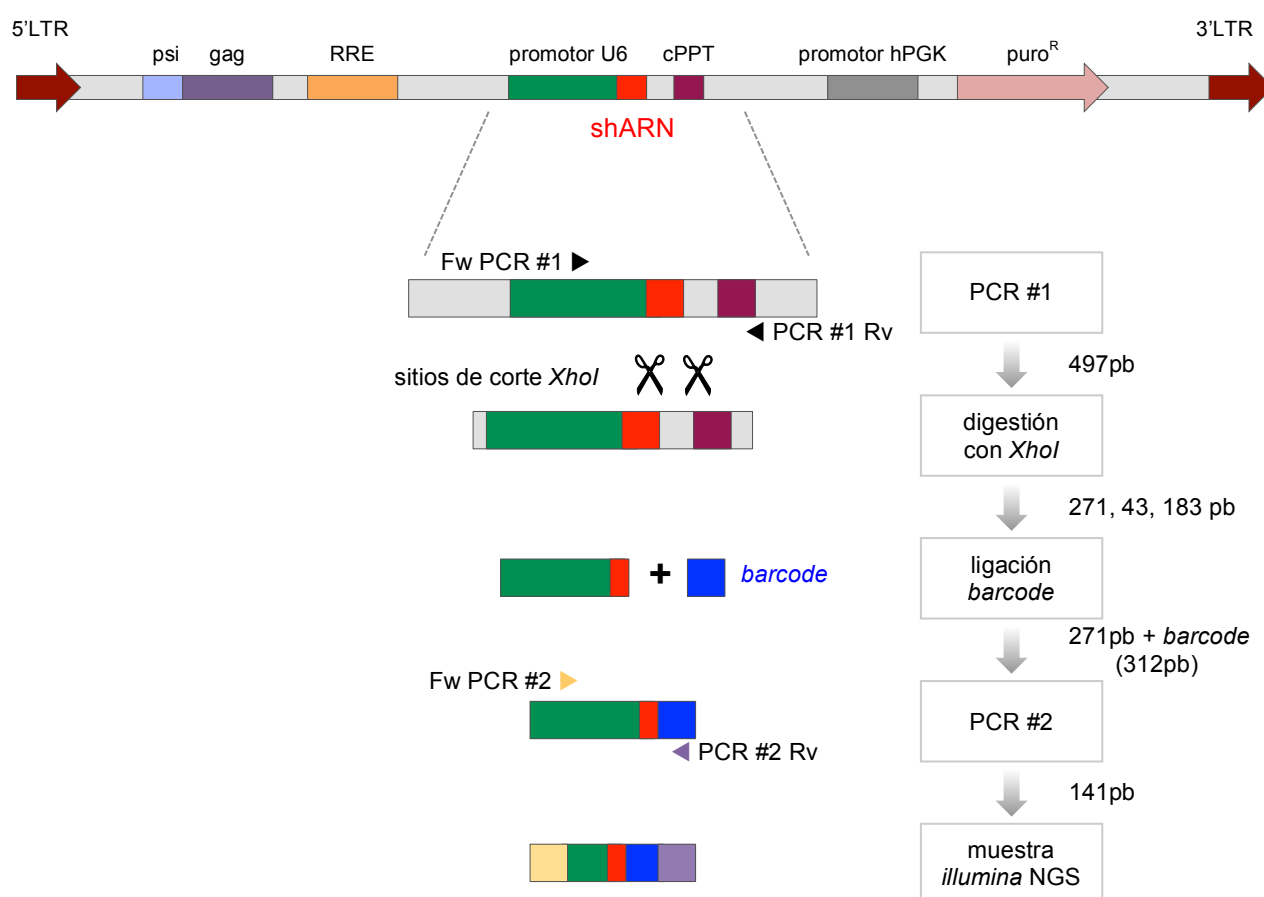


Figura 17. Construcción lentiviral de cada shARN: Pasos y productos requeridos para producir la biblioteca de secuenciación a partir de ADN genómico. Se indica además la posición de los primers de las PCR #1 y #2, los sitios de corte de la enzima XhoI, y los tamaños en pares de bases de los productos resultantes.

En primer lugar se extrajo ADN de las muestras y verificó que la cantidad e integridad del mismo fuera adecuado para realizar las reacciones de PCR #1 (**figura 18**).

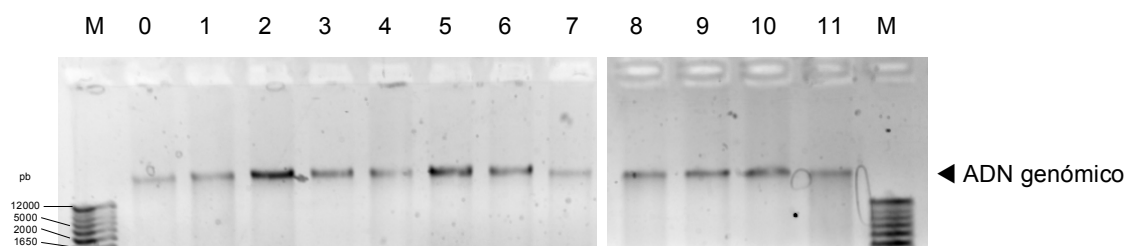


Figura 18. Muestras de poblaciones seleccionadas: Se realizó una corrida electroforética de 5 μ l de las muestras de ADN genómico en un gel 0,5% agarosa para verificar su cantidad e integridad. Se utilizó el marker 1kb plus de Thermo Scientific como patrón de bandas de tamaños conocidos (M). 0-11 se corresponden con el número de ciclo de selección funcional, 0 se corresponde con la población parental no seleccionada.

Dado que está demostrado que un número excesivo de ciclos de amplificación genera productos secundarios indeseados, fue importante poner a punto las condiciones experimentales de la primer reacción de PCR. Teniendo esto en cuenta, se realizó un monitoreo de la *performance* de la PCR #1 a distintos ciclos de amplificación, necesarios para producir la mayor cantidad de producto sin que se detectaran productos secundarios. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 19**. Utilizando como molde ADN genómico de la muestra parental, pudimos observar la banda esperada a partir del ciclo 22. La cantidad de producto generado aumentó a medida que se incrementaba el número de ciclos de amplificación, y a partir del ciclo 28 se observó la aparición de una segunda banda de mayor tamaño a la esperada, correspondiente al producto indeseado referido anteriormente. Por este motivo, se decidió realizar sólo 26 ciclos de amplificación en las reacciones de PCR #1 de todas las muestras seleccionadas (**figura 20**).

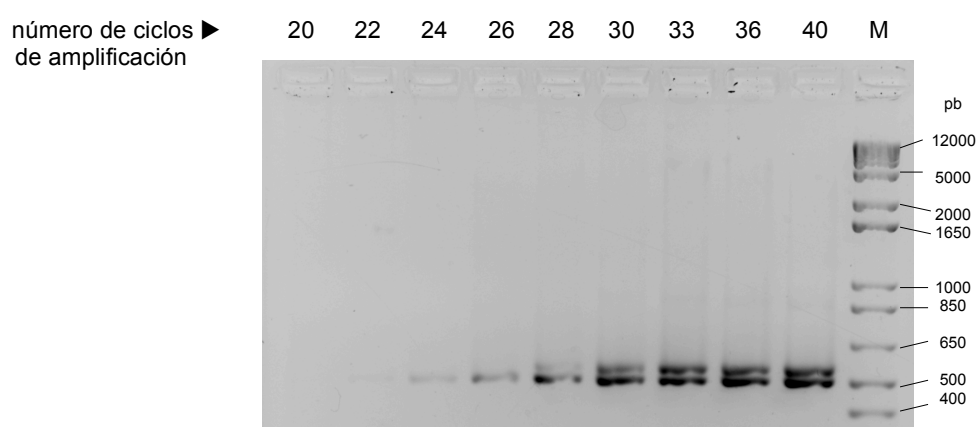


Figura 19. Puesta a punto de condiciones de PCR #1: Se probaron distintas condiciones de amplificación (distinto número de ciclos) y se realizó luego una corrida electroforética de los productos de PCR en un gel 2% agarosa para verificar su cantidad e integridad. Se utilizó el marker 1kb plus de Thermo Scientific como patrón de bandas de tamaños conocidos.

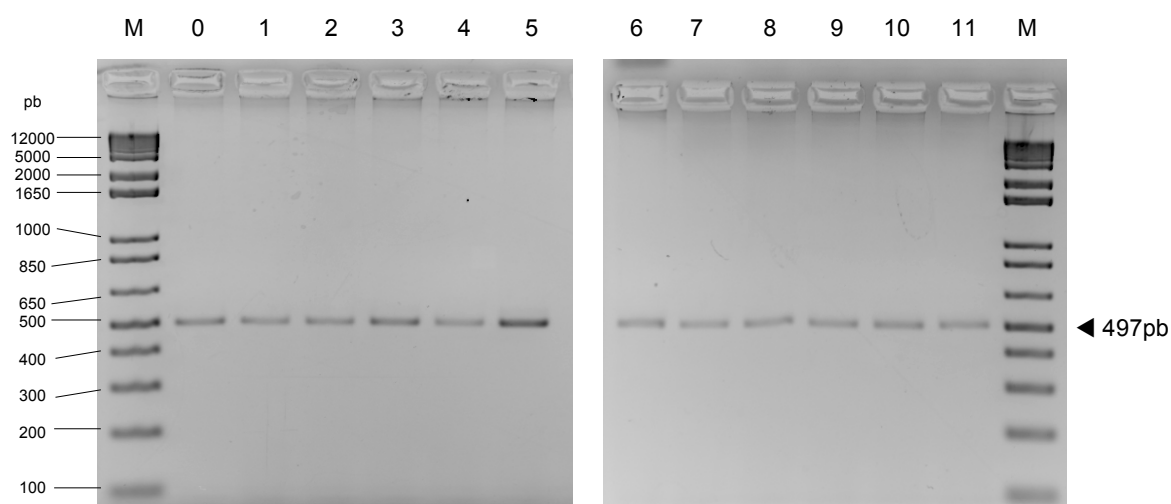


Figura 20. PCR #1: Corrida electroforética de los productos de PCR #1 en un gel 2%. M = marker, y 0-11 se corresponden con el número de ciclo de selección funcional (0 es la población parental no seleccionada).

Seguidamente se purificó el producto de PCR para cada una de las muestras, y se lo incubó con la enzima de restricción *XhoI*. Dado que todos los productos de PCR tienen dos sitios de corte para la enzima utilizada, uno en el bucle de cada shARN y otro en la secuencia plasmídica, la digestión del producto de PCR #1 generó tres productos de digestión de 43, 183 y 271 pb, respectivamente. Como se observa en la **figura 21**, la eficiencia del corte con la enzima *XhoI* fue muy alta. Se evidenciaron dos bandas intensas correspondientes a los productos de tamaño 271 y 183 pb, y una más tenue de 43 pb.

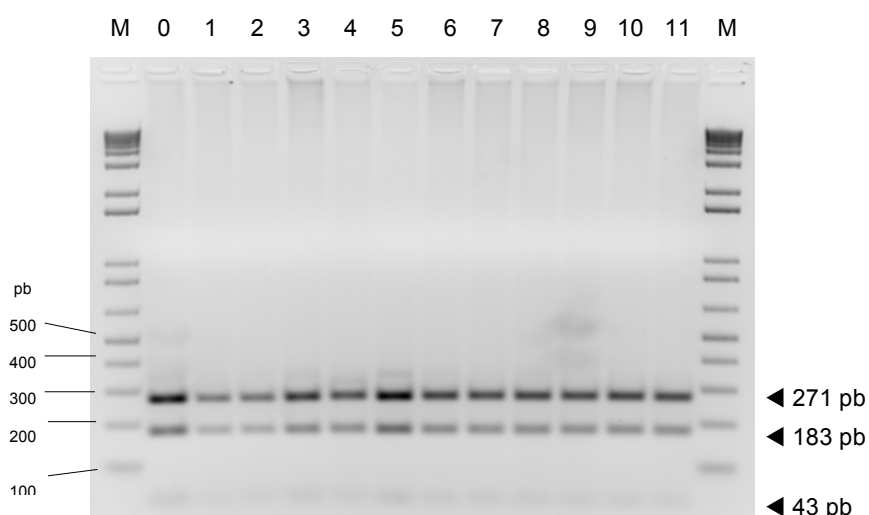


Figura 21. Digestión con *XhoI*: Corrida electroforética de los productos de digestión del producto de PCR #1. Se observan 3 bandas, de los tamaños esperados: 271 pb, 183 pb y una muy tenue de 43 pb. M= marker, 0-11 se corresponden con el número de ciclo de selección funcional.

Seguidamente se purificó el producto de 271 pb a partir del taco de gel. Se realizó una reacción de ligación entre estos productos (para cada una de las muestras) y una secuencia *barcode* específica, que nos permitiera identificar las secuencias y frecuencias relativas de cada shARN proveniente de las muestra analizadas.

El producto de ligación se corrió en un gel de agarosa 2% (**figura 22**).

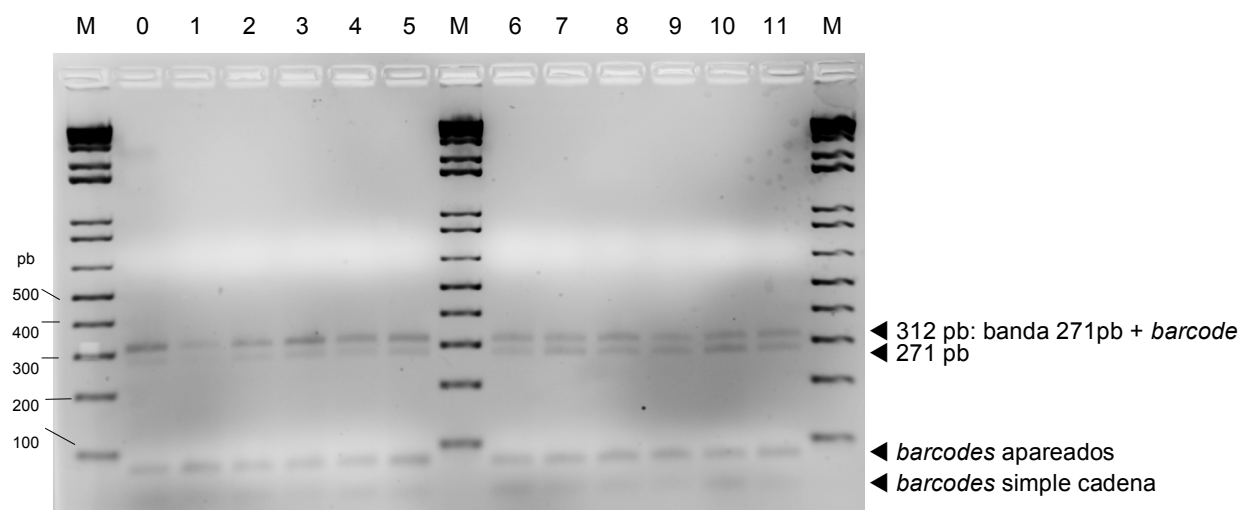


Figura 22. Ligación de barcodes: Corrida electroforética de los productos de ligación entre la banda de 271pb y los barcodes de secuencia específica para cada muestra. Se observan 4 bandas de diferente tamaño. M= marker; 0-11 se corresponden con el número de ciclo de selección funcional.

El producto de ligación (312 pb) se purificó a partir de geles y se realizó la PCR #2, necesaria para agregar los adaptadores de secuenciación *Illumina* (**figura 23**), y luego se purificó el producto final (141 pb) a partir del gel.

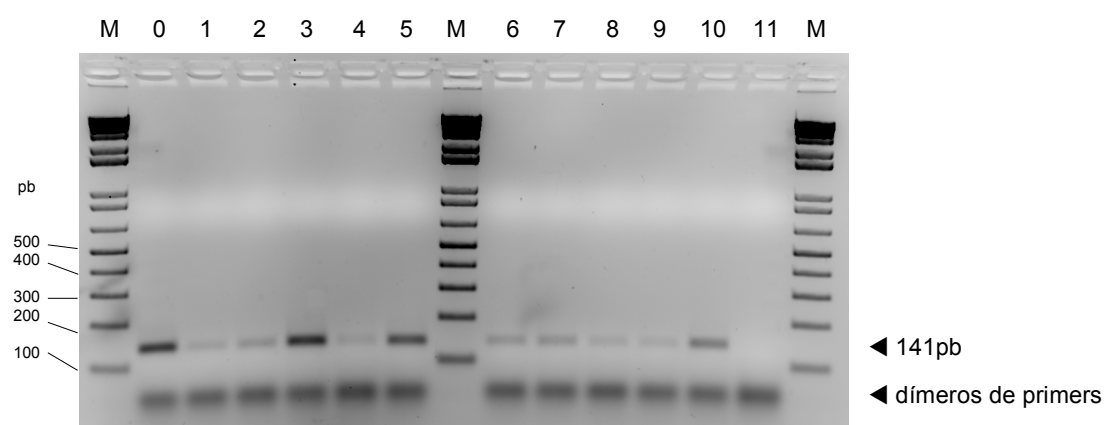


Figura 23. PCR #2: Corrida electroforética de los productos de PCR #2 en un gel 2%.

Tal como se observa en la **figura 23**, el producto de PCR #2 de la muestra 11 se encontraba muy diluido; por lo tanto se repitieron los procedimientos antes descritos para esta muestra en particular.

Secuenciación

A continuación se procesaron las muestras utilizando un equipo Illumina HiSEQ 2500 HT, el cual permite la lectura de millones de secuencias en una única corrida.

Los lecturas obtenidas fueron analizadas bioinformáticamente y se descartaron todas aquellas que no cumplieran con los parámetros de calidad. Lo primero que notamos fue que el número de shARNs presentes en la población no seleccionada (población parental “0”) era un 10% menor que el número total de shARNs de la biblioteca utilizada. Esta diferencia se debe, en su gran mayoría, a la pérdida de shARNs dirigidos contra genes que codifican para subunidades del proteasoma y es consistente con la función vital que el mismo desempeña.

Los datos obtenidos fueron luego analizados de distintas maneras.

La **figura 24** muestra la expresión relativa de cada shARN en un dado ciclo de selección relativa a su expresión en la línea celular parental (muestra de ciclo 0). Cada punto representa un shARN diferente: aquellos puntos por encima del valor cero son los shARNs que aumentaron su expresión, aquellos puntos por debajo de cero se comportaron de modo inverso.

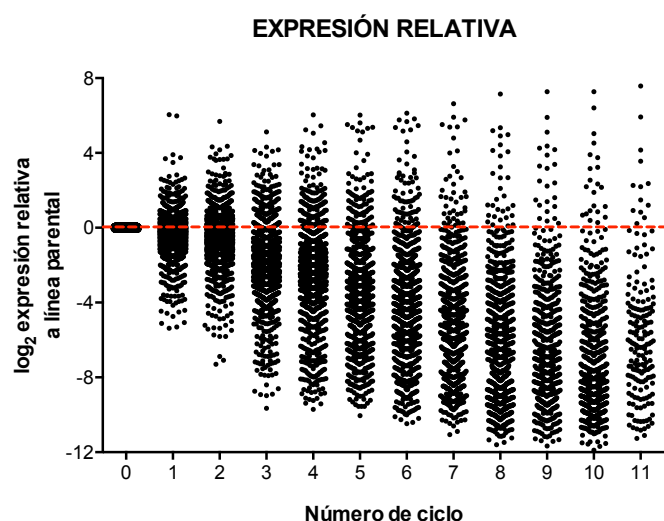


Figura 24. Expresión de cada shARN relativa a su expresión en la línea parental: Se determinó la expresión de cada shARN en los ciclos de selección y se la relativizó a su expresión en la línea celular no seleccionada. Dichos resultados se grafican como el $\log_2$.

En este gráfico se observa que en cada ciclo de selección existen pocos shARNs cuya frecuencia relativa se encuentra aumentada respecto al ciclo 0, mientras que la mayoría está menos representado. Asimismo, puede observarse que la cantidad de shARNs (representado por puntos) disminuye a medida que avanza los ciclos. Esto indica que a lo largo del proceso de selección, muchos shARNs fueron perdiendo representatividad en la población total y disminuyeron su frecuencia hasta finalmente desaparecer.

Esta pérdida de variabilidad es muy notable y se observa más claramente utilizando un gráfico circular (**figura 25**), donde el largo de cada barra es proporcional a la frecuencia de expresión de cada shARN, y cada círculo concéntrico muestra los datos de un ciclo de enriquecimiento determinado.

El círculo más interno se corresponde con la línea parental, y como es de esperar existen muchas barras (muchos shARNs), de longitudes (frecuencias) similares. El círculo más externo corresponde a la población de células seleccionada durante 11 ciclos de enriquecimiento. En este caso se observan un menor número de barras respecto la cantidad en el ciclo más interno, y en particular cuatro de ellas se corresponden con el 95% de la frecuencia total.

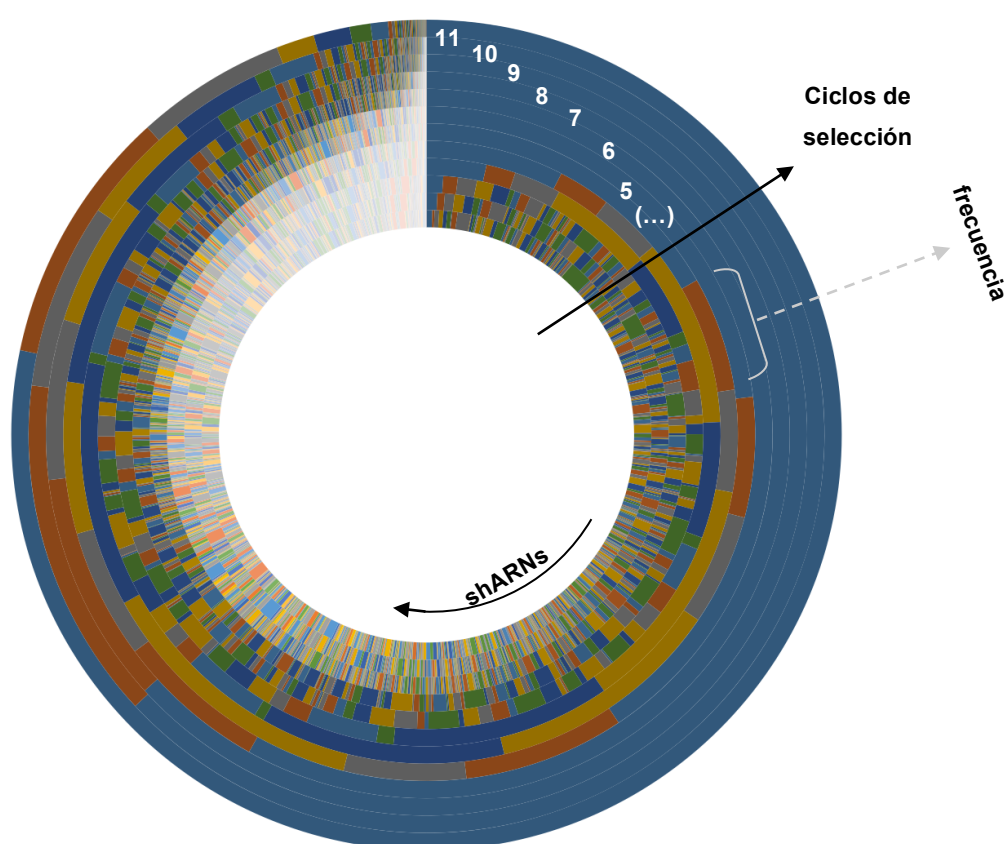


Figura 25. Frecuencia normalizada de cada shARN en cada ciclo de selección: El largo de cada barra es proporcional a la frecuencia de expresión de cada shARN, y cada círculo concéntrico muestra los datos de un ciclo de enriquecimiento determinado.

Esto mismo puede resumirse al graficar el número total de shARNs en las células luego de cada ciclo de selección (**figura 26**). Puede observarse que a medida que avanzan los ciclos de selección se pierde variabilidad de shARNs en las diferentes muestras, hasta alcanzar un total de 174 shARNs en la población de células sometidas a 11 ciclos de selección (lo cual equivale a una pérdida del 90% de los shARNs).

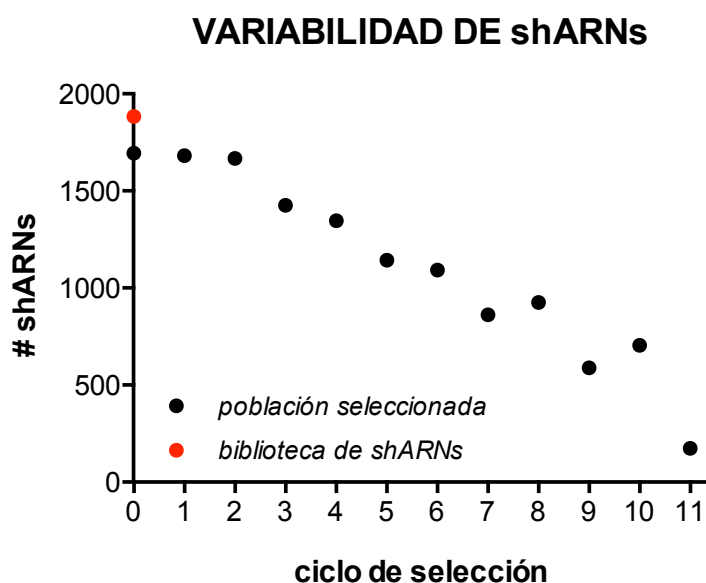


Figura 26. Variabilidad de shARNs en las poblaciones seleccionadas: Se grafica el número de shARNs en las muestras provenientes de cada ciclo de selección, y el número de shARNs totales en la biblioteca.

Debido a que está ampliamente aceptado que algunos shARNs pueden producir efectos secundarios no deseados (*off target*), un criterio que se utiliza para contrarrestar esta limitación técnica y eliminar falsos positivos es descartar aquellos genes para los cuales no se encuentren dos o más shARNs que lo silencien específicamente.

Teniendo esto en cuenta se analizaron los datos de frecuencia normalizada de todos los shARNs para cada ciclo. Para facilitar la visualización de los resultados obtenidos se realizaron minigráficos con la frecuencia de cada shARN en cada ciclo. El valor de la derecha, marcado en tonalidades de verde o rojo, indica la pendiente que correlaciona dichas frecuencias. Para aquellos shARN que aumentaran su frecuencia entre los ciclos 0-11, el valor será positivo y marcado en verde, mientras que para aquellos shARNs que bajen su frecuencia, la pendiente será negativa y estará marcada en rojo. A continuación se ordenaron los shARNs de acuerdo a estos valores (**figura 27**).

El análisis de los datos mostró que existía sólo una docena de shARNs que aumentaron su frecuencia y presentaban pendientes positivas, todos diseñados para bloquear genes diferentes. Es decir que no existía (al considerar los 11 ciclos de selección) ningún gen candidato para el cuál se encontrasen más de un shARN con pendiente positiva. Para el resto de los shARNs se observó que su pendiente era negativa, y que la frecuencia en el ciclo 11 era menor que en los ciclos anteriores. De hecho, existían muchos casos en los que los shARNs aumentaban su frecuencia y luego desaparecían de la población.

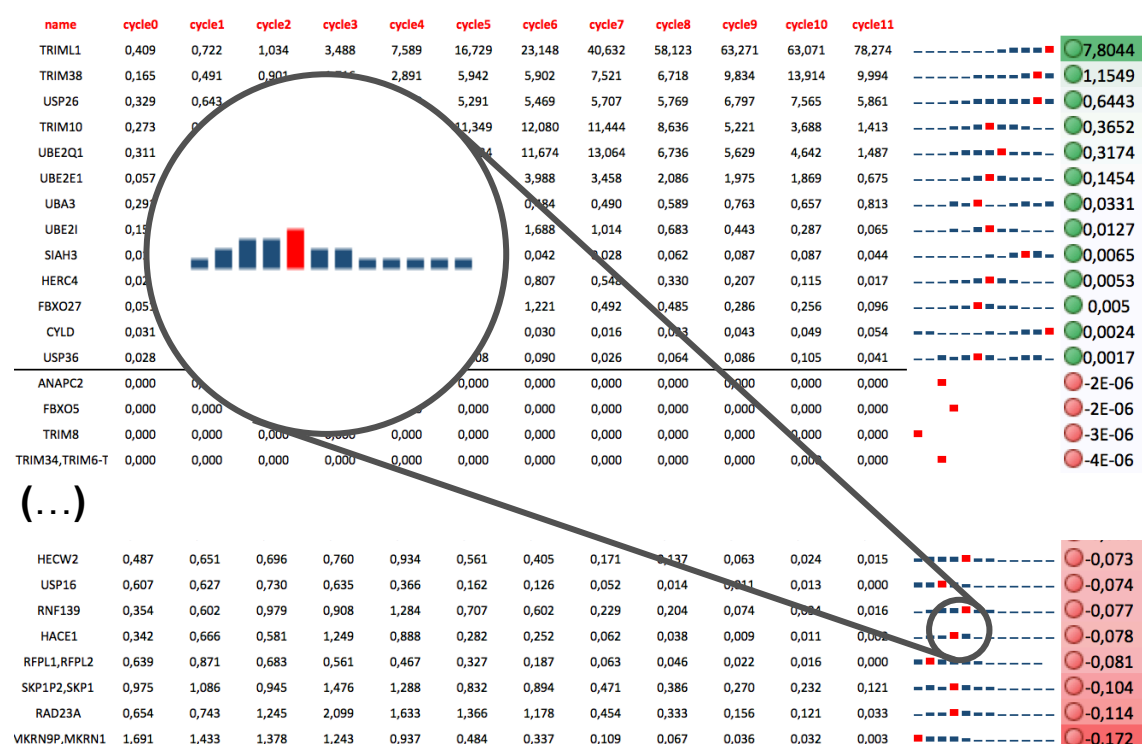


Figura 27. Frecuencia normalizada de shARNs en cada ciclo de selección: Se determinó la frecuencia normalizada de aparición de cada shARN en los ciclos de selección, y se realizaron minigráficos para determinar la pendiente que relacionaba dichas frecuencias para cada shARN a medida que avanzaban los ciclos de selección. El valor de la derecha, marcado en tonalidades de verde o rojo, indica dicha pendiente. Se ordenaron los shARNs de acuerdo a los valores de la misma: aquellos shARNs con pendientes positivas (que paulatinamente iban aumentando su frecuencia a medida que avanzaban los ciclos) muestran valores en color verde y aquellos con pendientes negativas (pérdida de frecuencia), muestran valores en color rojo. En aumento se observa el minigráfico de un shARN dado; cada barra azul se corresponde con la frecuencia normalizada para un ciclo dado y la barra roja se corresponde con la mayor frecuencia normalizada alcanzada.

En virtud de resultados obtenidos era imposible obtener una lista de genes candidatos si nos focalizábamos nuestra atención en el ciclo 11 de selección.

Teniendo en cuenta que en el ciclo 11 había un único shARN que tenía una frecuencia de 0,8, que éste junto con otros tres shARNs representaban el 95% de todos los shARNs totales secuenciados en esa muestra (ver gráfico circular), que los mismos no estaban dirigidos contra el mismo gen (y por ende, podrían haber aumentado su frecuencia debido a efectos *off target*), y que la variabilidad total de shARNs era de tan sólo el 10% respecto la población parental, se re-evaluaron los datos de frecuencia de cada shARN en ciclos de selección menores.

Se decidió entonces realizar un análisis multivariado ponderado para elegir, entre los distintos genes candidatos, aquél con mayor potencialidad (**esquema 2**).



Esquema 2

En primer lugar se utilizó como criterio estudiar los ciclos donde la variabilidad de shARNs fuera de al menos el 75% (es decir, que se hubiesen perdido sólo el 25% de los shARNs) y en donde estos 4 shARNs -que tenían una frecuencia acumulada de 0,95 en el ciclo 11- no superaran el 20% de la frecuencia en ese ciclo dado. En base a esto se descartaron los datos de los ciclos 5 a 11.

Luego, se buscaron aquellos genes que tuvieran 2 o más shARNs presentes en las muestras analizadas y cuyas pendientes de frecuencia fueran positivas entre los ciclos 0 y 4. De este modo fue posible identificar 26 genes candidatos que cumplieran con los requisitos antes mencionados. Es importante destacar que para 12 de ellos ya se encontraba descripta su relación con la migración/invasión, tumorigénesis o metástasis (BTRC [157], CBL [158], CYLD [159], DTX1 [160], FBXL19 [161], HACE1 [162], HECTD1 [163], TRIM 15 [164], TRIM 25 [165], TRIM 37 [166], TRIM 59 [167] y UCHL3 [168]). Utilizamos esta información como prueba de concepto de que nuestro proceso de selección había funcionado correctamente.

Como último paso necesario para elegir un gen candidato, se generaron líneas celulares estables que expresaran individualmente shARNs dirigidos a los 14 genes candidatos restantes (aún no publicados), y se estudiaron los cambios fenotípicos resultantes. Se razonó que cambios morfológicos podían evidenciar alteraciones en el potencial migratorio de dichas células.

Entre los genes candidatos evaluados decidimos estudiar USP19 por ser aquél cuyo silenciamiento producía el cambio fenotípico más notorio. En efecto, si bien las células MDAMB231 transducidas con los shARNs#1 y #2 dirigidos contra USP19 (códigos de identificación TRC N0000051715 y N0000051716, respectivamente) presentaban un tamaño similar a las células control, se encontraban adheridas unas a las otras, formando colonias más compactas (**figura 28**).

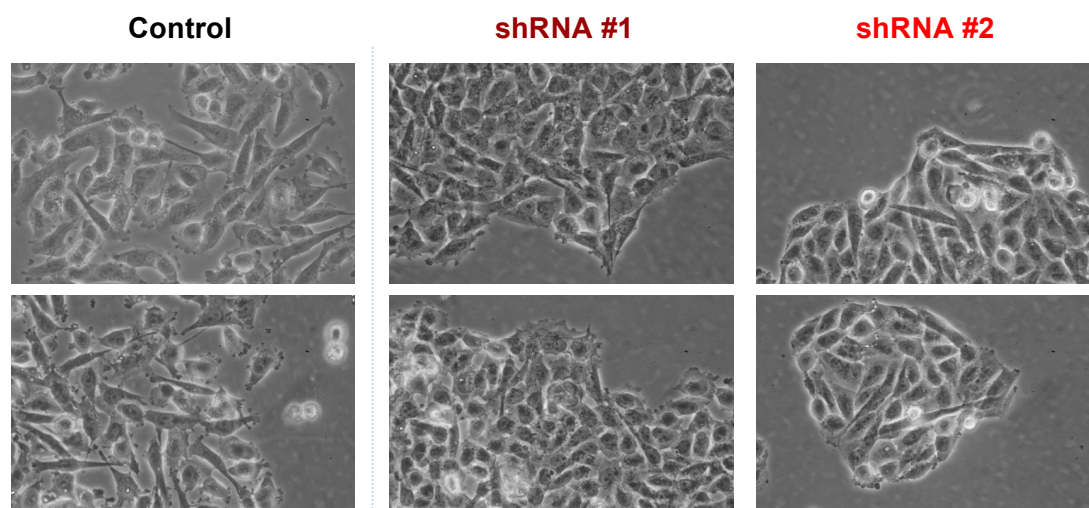


Figura 28. Fotografías de líneas celulares estables creciendo en placas de cultivo, transducidas con el vector control o con los shARNs #1 (shARN TRCN0000051715) y #2 (shARN TRCN0000051716), dirigidos al gen USP19.

Dicho gen presentó enriquecimiento en dos de los shARNs diseñados para silenciar su expresión a lo largo del proceso de selección, y en el ciclo nº4 los mismos habían aumentado su frecuencia en ~2,4 y ~4 veces (ver **Tabla 5**).

nombre shARN (TRC)	ciclo 0	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3	ciclo 4
TRCN0000051715	1,00	1,63	2,00	2,14	2,41
TRCN0000051716	1,00	1,39	1,41	3,14	4,11

Tabla 5- Frecuencia de shARN: veces de aumento de la frecuencia de los shARNs TRCN0000051715 y 16, diseñados para silenciar la expresión de USP19, en los ciclos 0 a 4, relativizado a su expresión en el ciclo 0 (línea parental, no seleccionada).

VALIDACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GEN CANDIDATO: USP19

VALIDACIÓN

Expresión de USP19

En primer lugar se evaluaron los niveles de expresión de las líneas que expresaban shARNs dirigidos contra USP19 mediante las técnicas de qRT-PCR y Western Blot. Dichos resultados se muestran en las **figuras 29 y 30**.

Las líneas transducidas con los shARN#1 y #2 dirigidos contra USP19 mostraron una disminución de los niveles de mRNA de UPS19 del 75 y 90% respecto la expresión de la línea celular control, respectivamente.

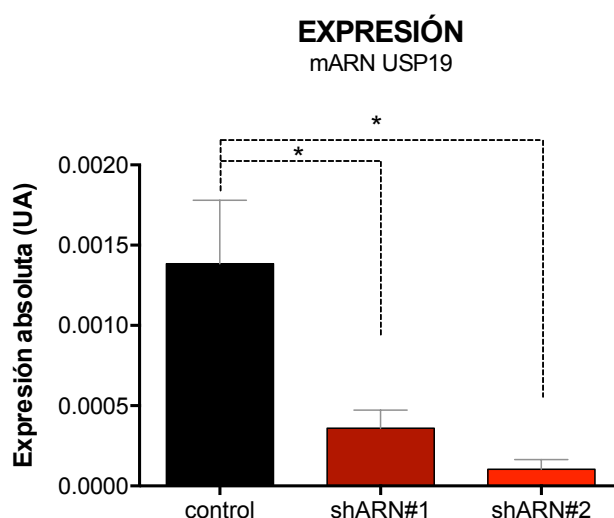


Figura 29. Determinación de los niveles de expresión de mRNA de USP19 mediante la técnica de qRT-PCR: Niveles de expresión absoluta del mRNA de USP19 (UA: unidades arbitrarias de fluorescencia) para las líneas celulares control y silenciadas con shARN#1 y shARN#2. Las barras representan la media $\pm$ SEM. Se realizó un test de ANOVA de 1 factor y prueba de Dunnett para evaluar diferencias de líneas silenciadas vs control. N=3.

En concordancia con los resultados previos, los niveles proteicos de USP19 también disminuyeron al comparar las líneas silenciadas con shARNs #1 y #2 respecto la línea celular control (**figura 30**).

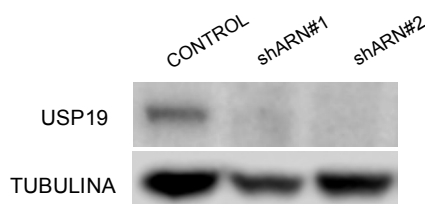


Figura 30. Determinación de los niveles de expresión poética de USP19 mediante la técnica de Western Blot: Niveles de expresión proteica de USP19 en las líneas control y silenciadas. Se utilizó tubulina como control de carga.

Curvas de proliferación

Una explicación posible para el aumento de la frecuencia de shARNs en nuestro *screen* es que los mismos tuvieran efectos *off target* y que favorecieran la proliferación celular. Este proceso no puede desligarse de nuestro ensayo funcional puesto que shARNs que aumenten la tasa de duplicación de las células (independientemente de su relevancia en el proceso de migración) irán aumentando su frecuencia a medida que avanzan los ciclos de selección. Dicho de otro modo, una célula con una ventaja adaptativa y que prolifere más rápido debido a la presencia de un shARN dado eventualmente “eliminará” de la población a otras células con otros shARNs (que pudieran tener un efecto en la migración, pero que los mismos se pierdan simplemente porque proliferan a una tasa menor).

Por tal motivo se estudiaron los efectos del silenciamiento de USP19 sobre la proliferación celular. Para ello se utilizaron dos métodos diferentes, uno que requiere el uso de microscopía y se basa en el aumento del área ocupada por las células a medida que éstas se duplican, y un segundo método que consiste en la estimación indirecta del número de células por métodos espectrofotométricos.

Determinación de las tasas de proliferación por microscopía

Se estimó la tasa de duplicación de las distintas líneas celulares midiendo el área ocupada por las células cada 6 horas a lo largo de 3 días consecutivos. Durante este tiempo, cada célula hija presentaba una morfología similar respecto a la célula que le dio origen, y no se registró apiñamiento ni encogimiento de las mismas.

Este análisis permitió determinar que las líneas celulares control y silenciadas tenían curvas de proliferación similares que mostraban una relación lineal entre el porcentaje de área ocupada de cada punto relativo al momento inicial ($t=0$) y el tiempo. La pendiente de dichas curvas permitió establecer la tasa de duplicación cada 24 horas de las líneas celulares

utilizadas. Tal como se observa en la **figura 31**, no se encontraron diferencias significativas entre las mismas.

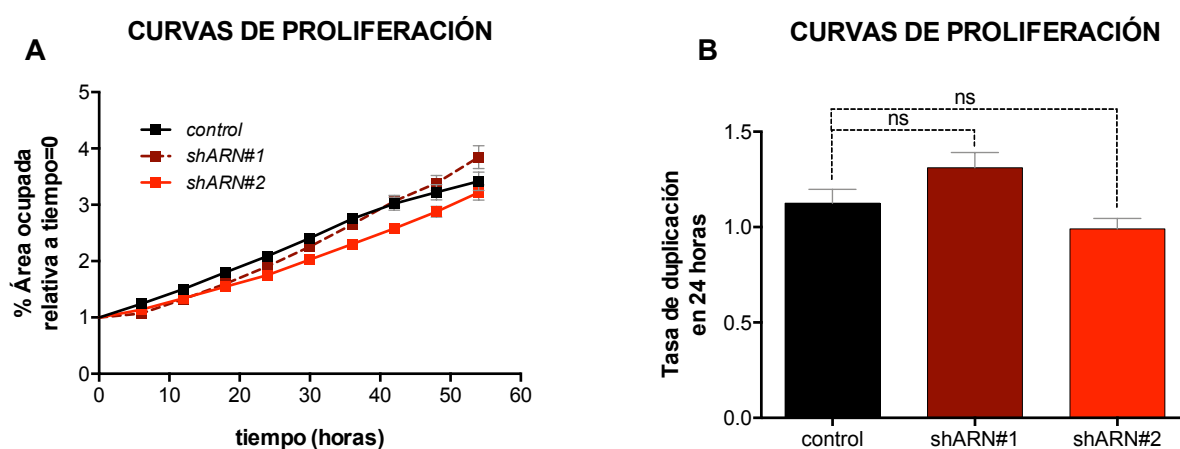


Figura 31. Determinación de las tasas de proliferación por microscopía: Se tomaron imágenes en campo claro cada 6 horas durante 3 días. **A-** Media del porcentaje de área cubierta en cada tiempo relativo al tiempo $t=0$ de las células de cada línea celular $\pm$ SEM. **B-** Tasa de duplicación de las líneas celulares cada 24 horas; las barras representan la media $\pm$ SEM. Se realizó un test de ANOVA de 1 factor y prueba de Dunnett para evaluar diferencias de líneas silenciadas vs control. $N=10$.

Determinación de las tasas de proliferación por métodos espectrofotométricos.

Se estimó la tasa de duplicación de las líneas celulares por tinción de sus componentes celulares a distintos tiempos. En este método se siembran la misma cantidad de células en sendos pocillos, y se frena el crecimiento a distintos tiempos por fijación con metanol. Luego se colorean las células con cristal violeta y se asume que existe una relación lineal entre el número de células y la cantidad de cristales en las muestras, así como también que las células hijas se colorearán del mismo modo que aquella que le dio origen. La cantidad de cristal violeta en cada muestra se calcula solubilizando los cristales con metanol, y midiendo luego la absorbancia a $\lambda=595\text{nm}$ de las soluciones resultantes.

Este método permitió determinar que las líneas celulares control y silenciadas tenían curvas de proliferación similares. Su tasa de duplicación cada 24 horas se muestra en la **figura 32**.

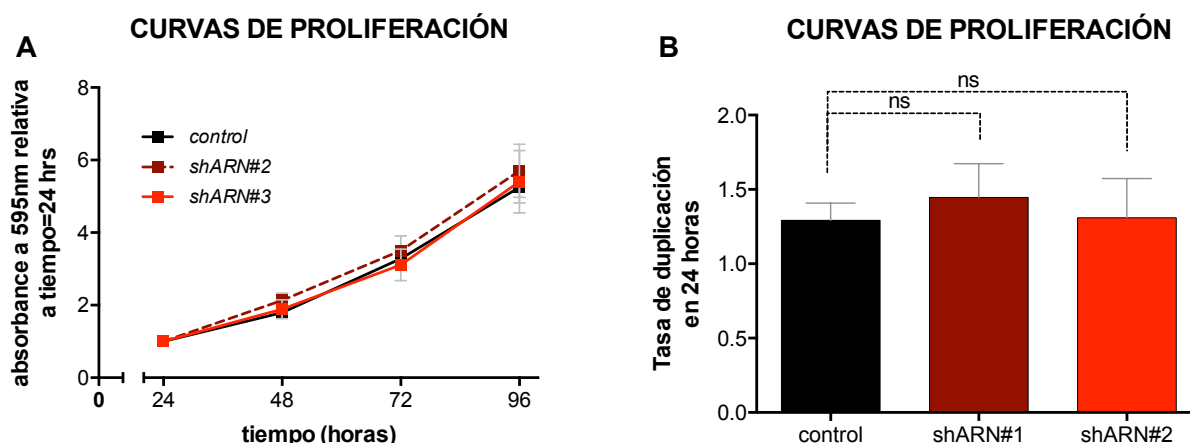


Figura 32. Determinación de las tasas de proliferación por espectrofotometría: Se estimó la tasa de duplicación de las líneas celulares por tinción con cristal violeta a distintos tiempos. **A-** Media de la absorbancia del cristal violeta a 595nm en cada punto relativo al tiempo $t=24$ hrs post siembra $\pm$ SEM para cada línea celular. **B-** Tasa de duplicación cada 24 horas; las barras representan la media $\pm$ SEM. Se realizó un test de ANOVA de 1 factor y prueba de Dunnett para evaluar diferencias de líneas silenciadas vs control. $N=3$.

Los resultados presentados hasta aquí demuestran que el silenciamiento de la expresión de USP19 no posee ningún efecto sobre la tasa de proliferación celular. Por lo tanto nuestros datos indican que el enriquecimiento de los shARNs #1 y #2 dirigidos contra USP19 no estuvo afectado por alteraciones en la proliferación celular.

Migración

Con el objeto de validar la importancia de la expresión USP19 en la determinación del potencial migratorio de células se utilizaron dos experimentos diferentes: *transwells* y el ensayo de cierre de herida.

Evaluación de potencial migratorio en cámaras *transwells*.

En una primera etapa empleamos el mismo diseño experimental que utilizamos en el *screen* para evaluar la capacidad migratoria de las líneas celulares. En concordancia con lo esperado se observó una disminución significativa en el porcentaje de células que migraron para las líneas celulares transducidas con los shARN dirigidos contra USP19 relativo al porcentaje obtenido en la línea celular control.

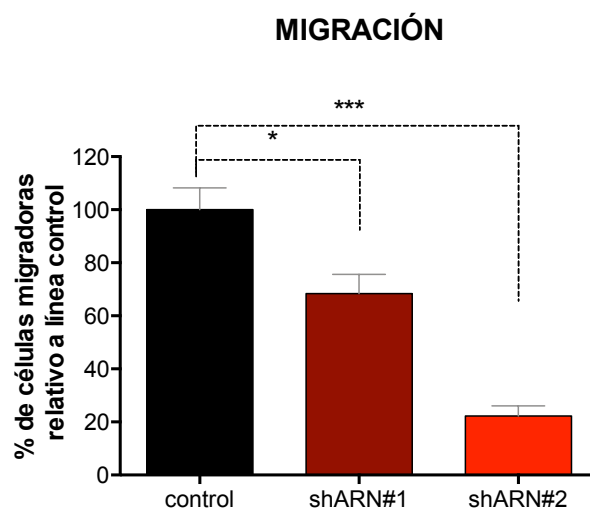


Figura 33. Ensayo de migración: Se utilizaron transwells de 8 μm de tamaño de poro con el fin de evaluar el potencial migratorio de las líneas celulares control y silenciadas para USP19. El gráfico muestra el porcentaje de células que migraron a través de la membrana porosa relativo a las que migraron en la línea celular control. Las barras representan la media $\pm$ SEM, y se realizó un test de ANOVA de 1 factor y prueba de Dunnett para evaluar diferencias de líneas silenciadas vs control. N=3, (*) $p < 0,05$ y (***) $p < 0,0005$.

Evaluación de potencial migratorio en ensayo de cierre de herida.

Otro modo de determinar el potencial migratorio de células en cultivo es mediante el ensayo de cierre de herida. El mismo consiste en generar un área libre de células sobre una monocapa celular y posterior monitoreo de la velocidad con la que las mismas avanzan sobre el nuevo espacio generado.

La **figura 34** muestra cómo luce la monocapa de células para las líneas control y silenciadas a tiempo $t=0$ y $t=8$ hrs.

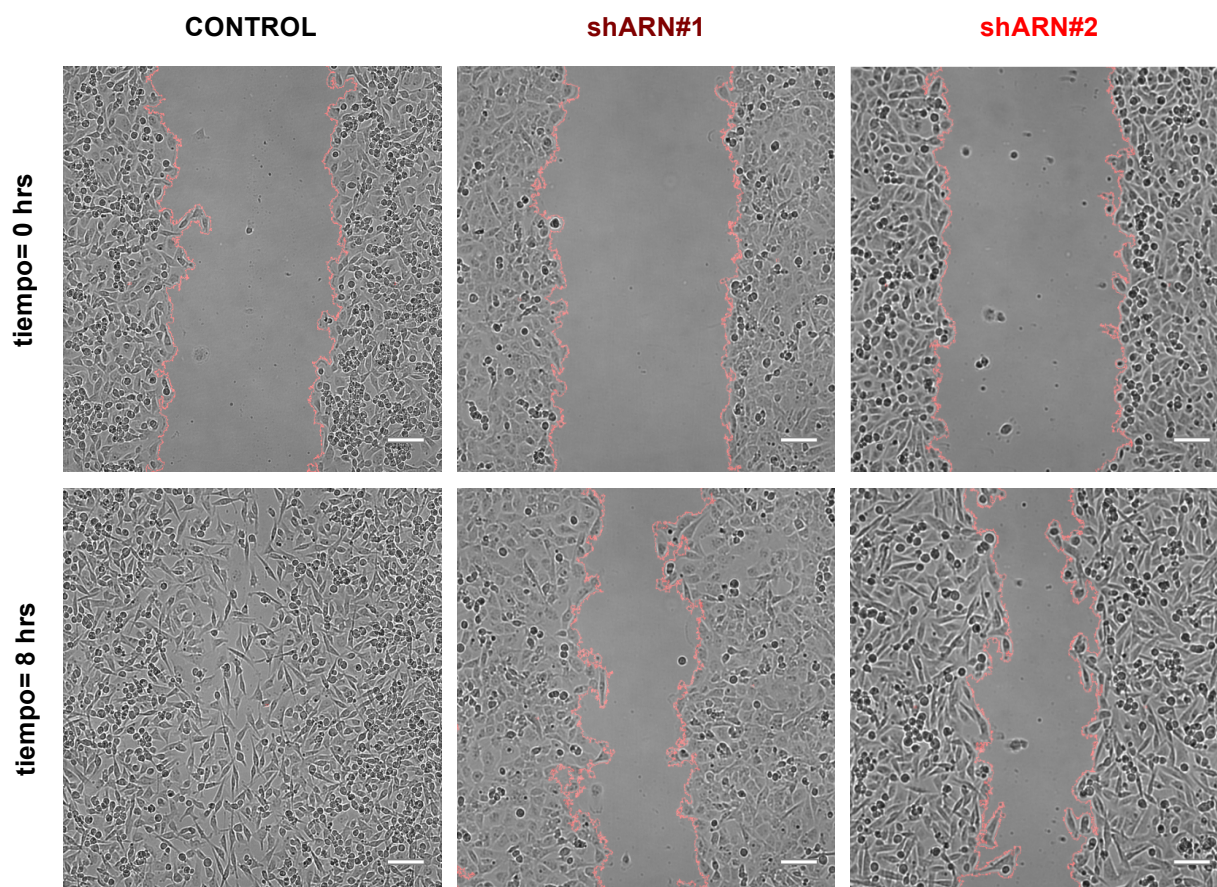


Figura 34 Ensayo de cierre de herida: Se muestran imágenes representativas del área de la herida sobre la monocapa de células control y silenciadas con los shARN#1 y #2 en los tiempos $t=0$ y 8 hrs. En rojo se indica el borde de la herida, la barra blanca representa $50\ \mu\text{m}$.

Utilizando este experimento se calculó el área recorrida por cada línea celular a diferentes tiempos relativo al área ocupada en el tiempo $t=0$ (**figura 35A**). En la **figura 35B** se muestra el área cubierta (luego de 8 horas) por las líneas que poseen USP19 silenciado, relativo a la línea control. Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de USP19 produjo una disminución significativa en la capacidad migratoria relativo a la línea control.

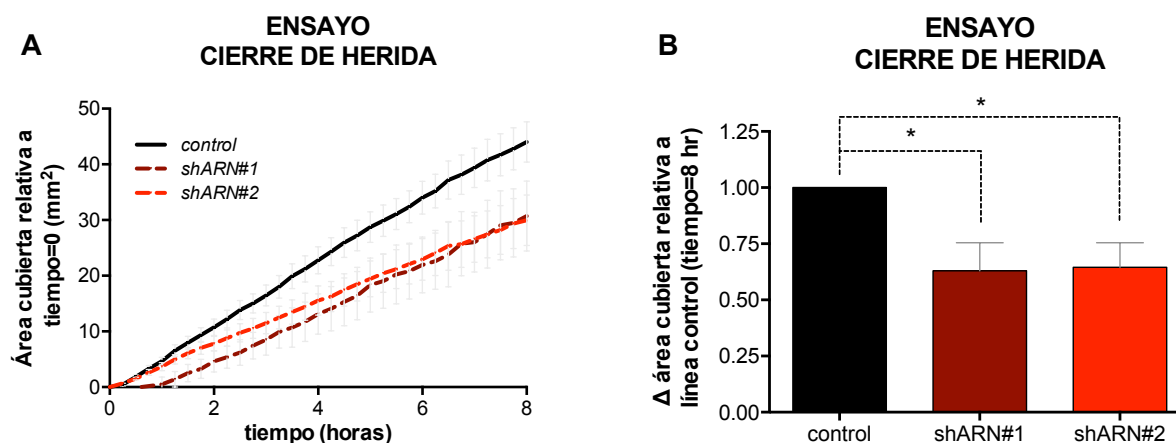


Figura 35. Ensayo de cierre de herida: Se tomaron imágenes en campo claro cada 15 minutos durante 8 horas. **A-** Se muestra la diferencia de área promedio (mm^2) cubierta en cada tiempo relativo al tiempo $t=0 \pm \text{SEM}$. **B-** Área cubierta luego de 8 horas relativa a línea control. Las barras representan la media $\pm \text{SEM}$. Se realizó un test no paramétrico Kruskal-Wallis y de Dunn para evaluar diferencias de líneas silenciadas vs control. $N=3$, (*) $p<0,05$.

El uso de los métodos antes nombrados nos permitió validar nuestros resultados, demostrando que el silenciamiento de USP19 reduce el potencial migratorio de células *in vitro*, y que el enriquecimiento de los shARN#1 y 2 en el screen funcional se debió a efectos en la migración.

CARACTERIZACIÓN

ESTUDIOS IN VITRO

Considerando que alteraciones en la capacidad migratoria pueden estar asociadas a cambios en distintos procesos celulares, típicamente alterados en células tumorales, nos propusimos estudiar cómo la depleción de USP19 afectaba las siguientes funciones celulares: invasión, clonogenicidad, resistencia a anoikis y sensibilidad a drogas.

Invasión

En este sentido, el primer paso consistió en evaluar el efecto del silenciamiento de USP19 sobre el potencial invasivo de las células en estudio.

Para ello se utilizó el ensayo de invasión en gota de agar noble. El mismo consiste en sembrar células alrededor de una gota de agar y registrar el movimiento de las mismas hacia su interior.

En la **figura 36** se muestran imágenes representativas de gotas de agar sobre las que se sembraron células control y células que expresan los shARNs #1 y #2 dirigidos contra USP19 a tiempos $t=0$ y $t=18$ hrs.

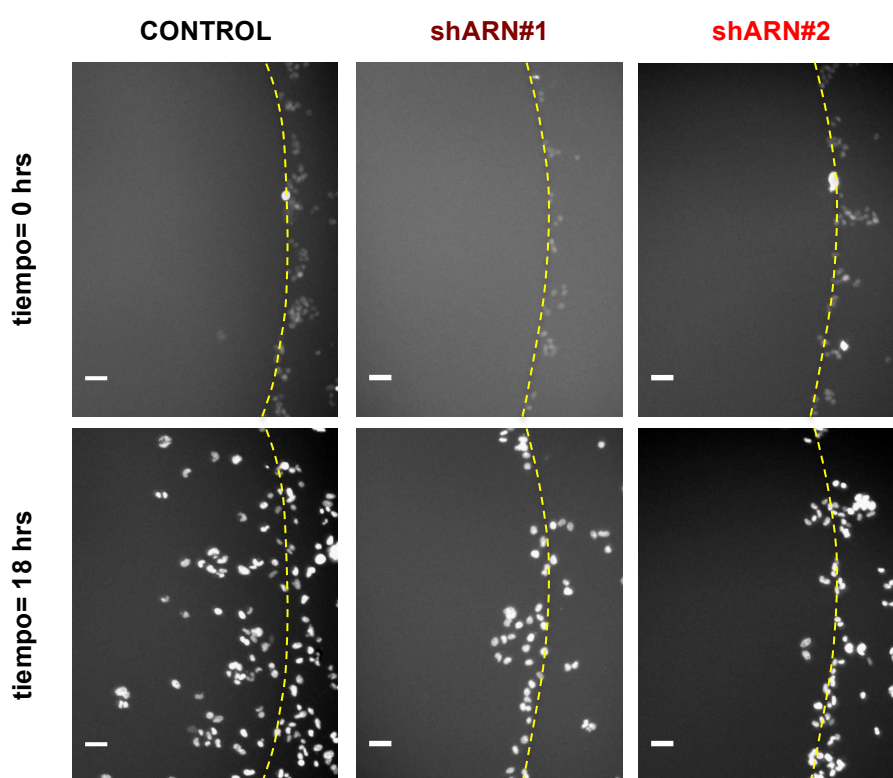


Figura 36. Ensayo invasión de gota de agarosa: Se muestran imágenes representativas de una gota de agarosa sobre las que se sembraron células control y silenciadas, en los tiempos $t=0$ y 18 hrs. La línea amarilla punteada indica el borde de la gota de agar. La barra blanca representa 50 μm .

Se observó que el número de células dentro de la gota luego de 18 horas era menor en el caso de las líneas silenciadas para USP19 respecto la línea control (**figura 37A**), así como también la distancia recorrida por las mismas (**figura 37B**).

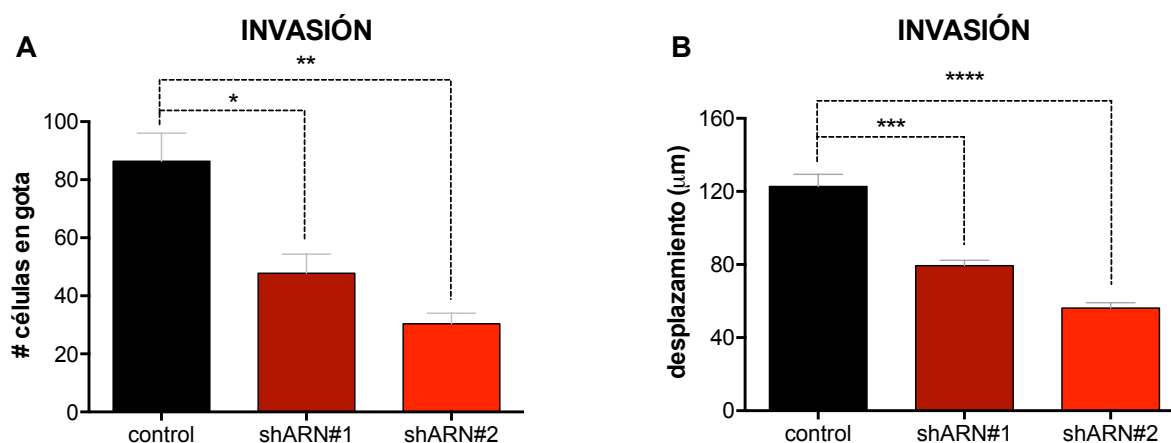


Figura 37. Ensayo de invasión en gotas de agar noble: Se tomaron imágenes en campo claro cada 20 minutos durante 18 horas. **A-** Número de células promedio luego del tiempo de experimentación $\pm$ SEM. **B-** Desplazamiento promedio (μm) de las células que invadieron la gota de agar noble $\pm$ SEM. Se realizó un test de ANOVA de 1 factor y prueba de Dunnett para evaluar diferencias de líneas silenciadas vs control. $N=3$, (*) $p<0,05$; , (***) $p<0,005$ y (****) $p<0,0005$.

A partir de estos resultados se concluyó que el silenciamiento de USP19 reduce el potencial invasivo de las células *in vitro*.

Potencial tumorigénico

A continuación quisimos determinar si el silenciamiento de USP19 tenía algún efecto sobre el potencial tumorigénico de las células. Para ello, realizamos ensayos *in vitro*, en dos y tres dimensiones.

Ensayo clonogénico en dos dimensiones

El ensayo clonogénico en dos dimensiones consiste en sembrar 1000 células en placas de 100mm y analizar las colonias formadas luego de 14 días. La **figura 38A** muestra fotografías representativas que fueron analizadas con el software ImageJ a fin de determinar el número (**figura 38B**) y tamaño (**figura 38C**) de las colonias formadas.

Como se observa en la **figura 38**, no se encontraron diferencias significativas en el número de colonias entre las líneas celulares analizadas. Por otro lado, tampoco se encontraron diferencias significativas en el tamaño de las mismas para las líneas control y transducidas con el shARN#1. Por el contrario, se observó que las colonias presentes en la línea celular que expresaban el shARN#2 tenían en promedio menor tamaño.

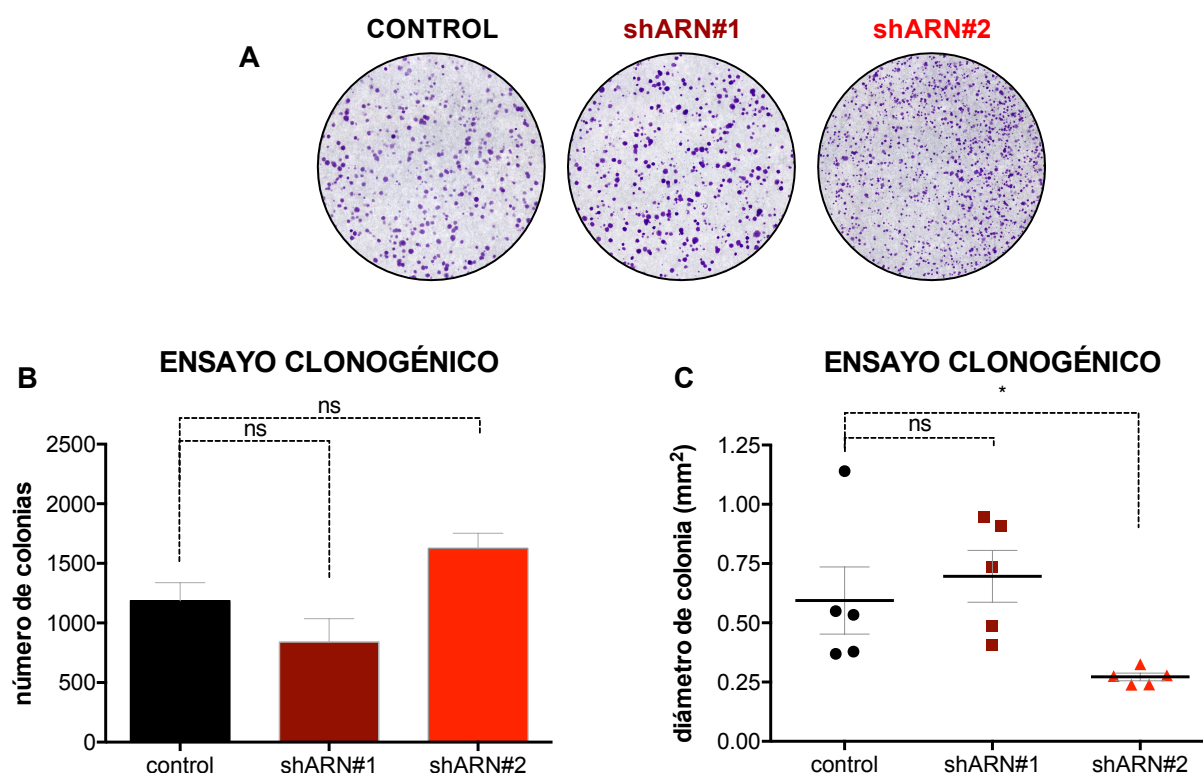


Figura 38. Ensayo clonogénico en dos dimensiones: Se utilizó este ensayo para determinar la capacidad de células aisladas para crecer formando colonias luego de 14 días. **A-** Fotografías modelo de cómo lucen las colonias de cada línea celular luego de 2 semanas de crecimiento y posterior tinción con una solución de cristal violeta; el diámetro de las placas es de 8,2 cm. **B-** Número de colonias promedio formadas luego del tiempo de ensayo para las 3 líneas celulares y su tamaño promedio (área expresada en mm²), mostrado en **C**. En **B** y **C** se expresa la media $\pm$ SEM. N=5. **B.** Se realizó un test de ANOVA de 1 factor y prueba de Dunnett para evaluar diferencias de líneas silenciadas vs. control, y **C.** test no paramétrico Kruskal-Wallis y prueba de Dunn's para evaluar diferencias en líneas silenciadas vs. línea control. (*) $p < 0,05$.

Estos resultados permitirían suponer que el silenciamiento de USP19 no altera potencial tumorigénico de las líneas celulares.

Ensayo clonogénico en tres dimensiones

Este experimento evalúa la capacidad de las células de crecer en tres dimensiones sin adhesión a un sustrato y, al igual que el ensayo clonogénico en dos dimensiones, se utiliza como un indicador fidedigno del potencial tumorigénico de las células.

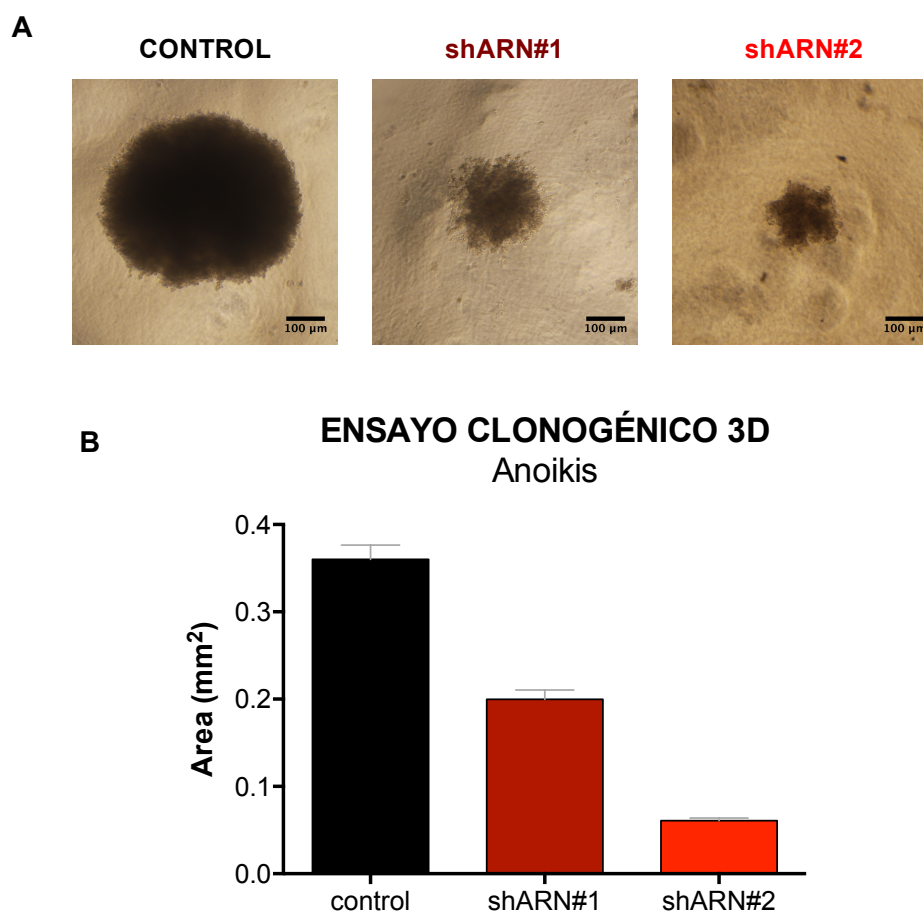


Figura 39. Ensayo clonogénico en tres dimensiones: Se utilizó este ensayo para determinar la capacidad de células aisladas de crecer embebidas en agar y formar colonias luego de 6 semanas. **A-** Fotografías de cómo lucen las colonias de cada línea celular luego de 6 semanas de crecimiento. La barra negra representa 100 µm. **B-** Área promedio de colonias formadas luego del tiempo de ensayo para las líneas celulares control y silenciadas para USP19 (mm²). Se expresa la media ± SEM. N=2.

Como se observa en la **figura 39**, los resultados de este experimento indican que las líneas celulares que expresan los shARNs dirigidos contra USP19 forman colonias de menor tamaño, al compararlas con la línea celular control y por lo tanto confirma que estas líneas poseen un menor potencial tumorigénico.

Sensibilidad a drogas

Se ha demostrado que alteraciones en la migración de células tumorales está asociado a reversión de ciertos fenotipos malignos, como ser una mayor sensibilidad a drogas quimioterapéuticas. En este sentido, evaluamos la sensibilidad de las líneas celulares utilizadas a dos tipos distintos de quimioterapéuticos: la Doxorrubicina y el Bortezomib.

La Doxorrubicina es una droga de amplio espectro normalmente utilizada en la clínica para el tratamiento de distintos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama triple negativo. El Bortezomib es un inhibidor del proteasoma que se utiliza para tratar cáncer mieloide (se ha demostrado sinergismo con inhibidores de una DUB, USP14), y cuyo uso en el tratamiento del cáncer de mama ha entrado recientemente en estudios de fase clínica.

Para ello se sembraron células y se las trató durante 5 días con distintas dosis de las drogas antes nombradas.

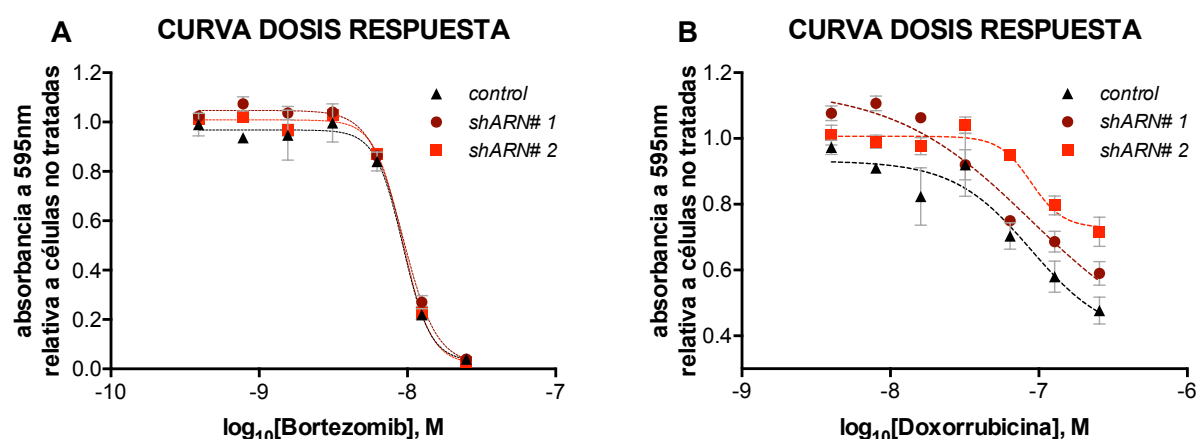


Figura 40. Sensibilidad a drogas: Se sometieron las células a tratamientos con Bortezomib o Doxorrubicina a fin de evaluar si el silenciamiento de USP19 tenía algún efecto en la sensibilidad a estas drogas. Se trató las células con distintas concentraciones de los compuestos durante 5 días, y el número de células viables luego del tratamiento fue estimado utilizando tinción con cristal violeta. **A-** Sensibilidad a Bortezomib y **B-** sensibilidad a Doxorrubicina. Las barras de error representan SEM. Las curvas se compararon utilizando el test estadístico de suma de cuadrados extra F con $p=0,05$. $N=3$.

Como se puede observar en la **figura 40**, no se registraron diferencias significativas entre las curvas de sensibilidad de las líneas celulares ensayadas y por lo tanto se puede concluir que USP19 no contribuye a la sensibilidad de los quimioterapéuticos estudiados en estas condiciones experimentales.

ESTUDIOS IN VIVO

Crecimiento tumoral

A fin de caracterizar el posible rol de USP19 en la regulación de procesos tumorigénicos, se realizaron experimentos de xenotransplantes en modelos murinos (ratones NOD/SCID de 7-8 semanas de edad).

En una primera etapa se transplantaron ortotópicamente células control o silenciadas para USP19 en las almohadillas de grasa mamaria de ratones hembra y se monitoreó el volumen de los tumores generados.

Como se puede observar en la **figura 41 A**, los tumores derivados de células silenciadas presentaron un tiempo de establecimiento del tumor significativamente mayor (40 días para la línea control y 60-76 días para los shARN#1 y #2 dirigidos contra USP19, respectivamente). Asimismo, mientras que las células control generaban tumores en el 100% de los ratones inyectados, las células silenciadas presentaban una menor capacidad para desarrollar focos de crecimiento tumoral (82% y 50% para los shARNs #1 y #2, respectivamente) (**figura 41 B**).

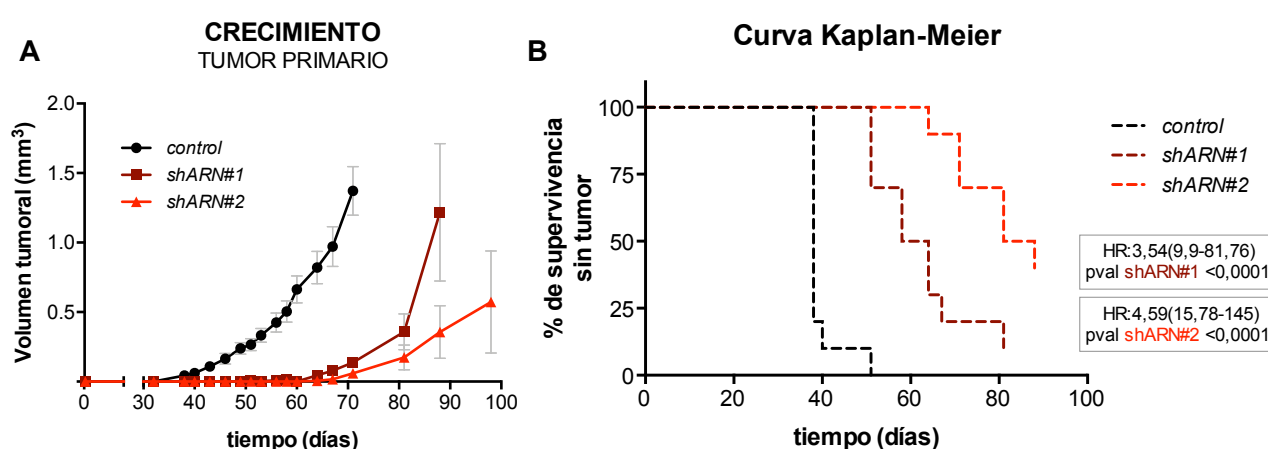


Figura 41. Crecimiento de tumor: Se transplantaron células control o silenciadas para USP19 en las almohadillas de grasa mamaria de ratones hembra. **A**- Volumen de los tumores generados a lo largo del tiempo. Las barras de error representan SEM, N=10. **B**- Curva Kaplan-Meier de supervivencia libre de tumor: se realizó un test Log-Rank (Mantel-Cox) para evaluar diferencias entre curvas y se calculó el cociente de riesgo (Hazard Ratio o HR) con el método log rank.

En principio, los fenotipos observados podrían deberse a la pérdida de expresión de los shARNs dirigidos contra USP19. Para descartar esta hipótesis, realizamos cultivos primarios de las células que componían dichos tumores y evaluamos la expresión de USP19. Como se observa en la **figura 42 A**, las líneas celulares provenientes de tumores con USP19 silenciado presentaban significativamente menor expresión de mRNA respecto de las líneas generadas a partir de tumores control. Asimismo, se evaluó la tasa de duplicación de los distintos cultivos primarios generados, y no se observaron diferencias significativas entre sí (**figura 42 B**).

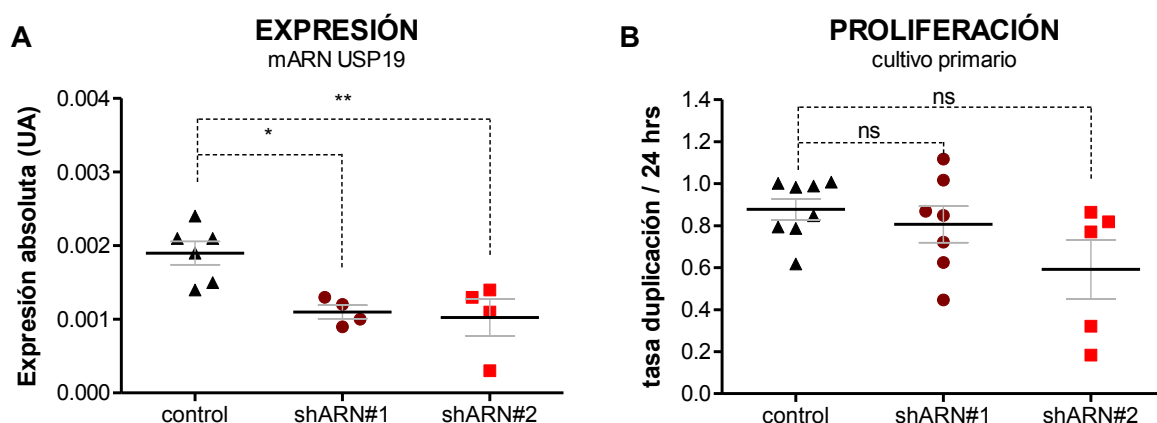


Figura 42. Tasa de duplicación de cultivos primarios y expresión mARN: Se evaluó la expresión de mARN de USP19 en cultivos primarios generados a partir de tumores provenientes de hembras inyectadas con células control y silenciadas, así como también su tasa de duplicación (mediante microscopía de campo claro). **A.** Expresión de mARN de USP19 en dichos cultivos primarios. **B.** Tasa de duplicación de los cultivos primarios cada 24 horas. Las barras representan la media $\pm$ SEM; se realizó un test de ANOVA de 1 factor y prueba de Dunnett para evaluar diferencias de líneas silenciadas vs control.

El retraso observado en el desarrollo de tumores primario en ausencia de USP19 es consistente con la mayor dificultad que las células con USP19 silenciado poseen de crecer en un contexto tridimensional observado en los experimentos *in vitro* (**figura 39**).

Metástasis experimental

En una siguiente fase decidimos estudiar el posible rol de USP19 en procesos metastogénico. Debido a que el retraso observado en el establecimiento de tumores primarios no nos permitía homologar las condiciones experimentales iniciales, decidimos utilizar el ensayo de metástasis experimental (que consiste en la inyección de células directamente al torrente sanguíneo de ratones, a través de la vena caudal). Este tipo de estudio saltea el paso inicial del proceso metastásico, que consiste en la salida de células del tumor primario, y por lo tanto sólo da información del proceso de extravasación y *homing* (formación de tumores en tejidos). En particular nos focalizamos en el proceso de *homing* en el pulmón, ya que el mismo es uno de los tejidos blanco del experimento de metástasis experimental.

La presencia de células de origen humano en el tejido pulmonar murino fue estudiado por tinción de los mismos con tinta china. Utilizando esta técnica observamos que los pulmones de ratones inyectados con células que expresaban los shARNs dirigidos contra USP19 tenían menor cantidad de focos metastásicos comparado con los pulmones de ratones inyectados con las células control (**figura 43 B**). Para realizar una estimación más precisa del grado de

infiltración de células humanas en el pulmón, se cuantificó mediante qPCR (PCR cuantitativa) la cantidad de ADN humano utilizando hGAPDH como gen control, y se lo relativizó a la cantidad de ADN murino (usando mGAPDH). Los resultados de la **figura 43 A** muestran que los pulmones de ratones inyectados con células control presentaron significativamente mayor cantidad de producto de PCR humano en comparación con los pulmones de ratones inyectados con células silenciadas.

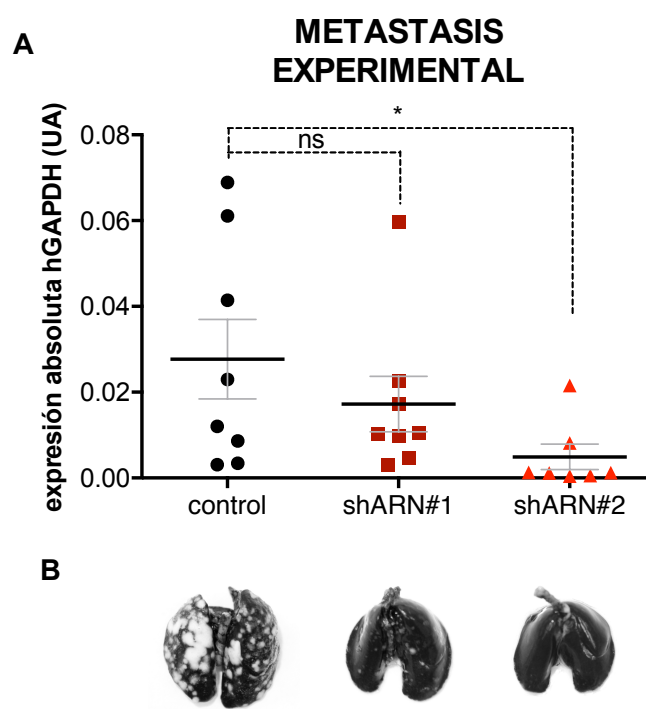


Figura 43. Metástasis experimental: **A-** Cuantificación de focos metastásicos en pulmones de ratones macho inyectados a través de vena caudal con células control o silenciadas para USP19. N= 8. Las barras de error representan SEM. Se realizó un test no paramétrico Kruskal-Wallis y prueba de Dunn's para evaluar diferencias en líneas silenciadas vs. línea control. **B-** Imágenes representativas de pulmones inyectados con células control o silenciadas para USP19, teñidas con una solución al 15% de tinta india. La barra negra representa 1 cm.

Los resultados de los experimentos *in vivo* son compatibles con nuestra hipótesis que USP19 contribuye al control del desarrollo de tumores primarios y al establecimiento de focos metastásicos.

EXPERIMENTOS UTILIZANDO OTRAS LÍNEAS CELULARES

A fin de evaluar el alcance de nuestros resultados, realizamos experimentos *in vitro* e *in vivo* en otras líneas celulares.

En primera instancia generamos líneas estables control y con shARNs dirigidos contra USP19 en la línea celular MDAMB436 (también derivada de un CMTN) y comparamos el potencial migratorio mediante el experimento de cierre de herida.

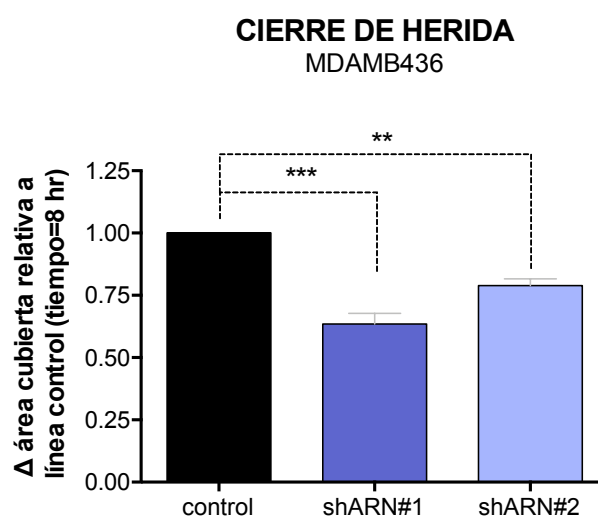


Figura 44. Ensayo de cierre de herida: Se tomaron imágenes en campo claro cada 15 minutos y se calculó el área cubierta luego del tiempo de experimentación relativa a línea control, en la línea celular MDAMB436. Las barras representan la media $\pm$ SEM. Se realizó un test de ANOVA de 1 factor y prueba de Dunnett para evaluar diferencias de líneas silenciadas vs control. $N=3$, (**) $p<0,01$ y (***) $p<0,005$.

Como se puede observar en la **figura 44**, las líneas con shARNs dirigidos contra USP19 muestran un potencial migratorio significativamente menor que la línea control y por lo tanto nuestros resultados indican que USP19 modula la migración de las células MDAMB436, al igual que en la línea celular MDAMB231.

A continuación se realizaron experimentos de xenotransplante ortotópico en la almohadilla de grasa mamaria de hembras NOD/SCID utilizando células MDAMB436 control y con shARNs dirigidos contra USP19 (**figura 45**).

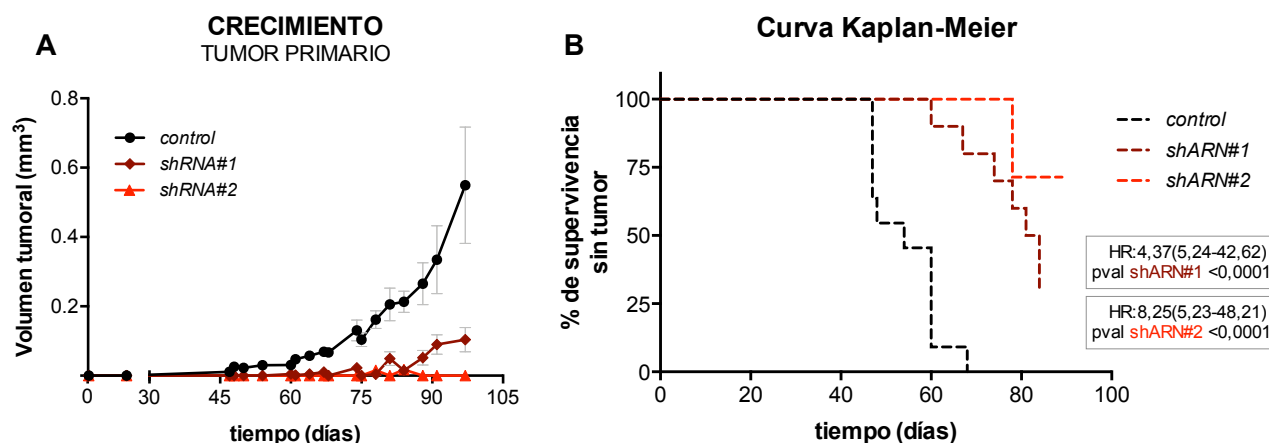


Figura 45. Crecimiento de tumor: Se transplantaron células MDAMB436 control o silenciadas para USP19 en las almohadillas de grasa mamaria de ratones hembra. **A-** Volumen de los tumores generados a lo largo del tiempo. N=7. **B-** Curva Kaplan-Meier de supervivencia libre de tumor: se realizó un test Log-Rank (Mantel-Cox) para evaluar diferencias entre curvas y se calculó el cociente de riesgo (Hazard Ratio o HR) con el método log rank.

El análisis de estos resultados mostró que, al igual que para las células MDAMB231, los tumores generados a partir de células silenciadas presentaban un tiempo de desarrollo mayor respecto al tiempo de latencia de tumores control. Asimismo, mientras que las células control generaban tumores en el 100% de los ratones inyectados, las células silenciadas presentaban una menor capacidad para desarrollar focos de crecimiento tumoral (%70 y 28% para los shARNs #1 y #2, respectivamente).

En virtud de estos resultados concluimos que el silenciamiento de USP19 afecta la capacidad migratoria de las células *in vitro* y la capacidad tumorigénica *in vivo* de las líneas celulares hasta el momento ensayadas.

En una segunda instancia generamos líneas estables control y con shARNs dirigidos contra USP19 en la línea celular MCF7. Dicha línea celular mamaria, a diferencia de las dos antes nombradas, expresa los receptores de estrógeno y progesterona, y su fenotipo migratorio e invasivo es menos agresivo.

En primer lugar realizamos experimentos de cierre de herida para evaluar el efecto del silenciamiento de USP19 sobre el potencial migratorio de estas células. Contrariamente a lo observado en las otras líneas celulares antes descritas, el silenciamiento de este gen no alteró significativamente el potencial migratorio de las células MCF7 (**figura 46**).

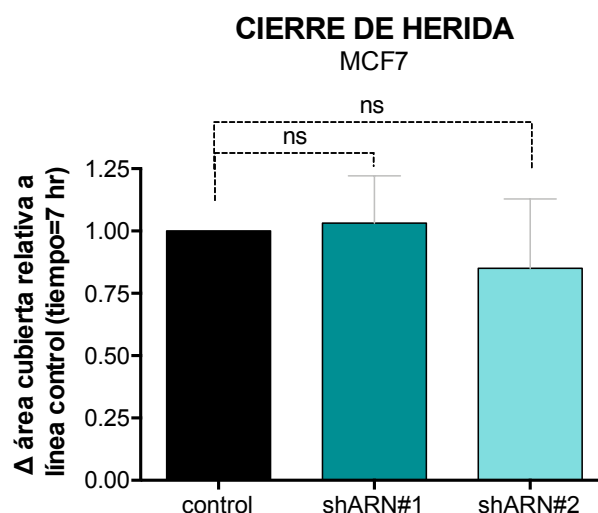


Figura 46. Ensayo de cierre de herida: Se tomaron imágenes en campo claro cada 15 minutos y se calculó el área cubierta por cada línea silenciada luego de 7 horas, relativa a línea control. Las barras representan la media $\pm$ SEM. En todos los casos se realizó un test de ANOVA de 1 factor y prueba de Dunnett para evaluar diferencias de líneas silenciadas vs control. N=3, (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,005$.

A raíz de estos resultados decidimos evaluar el efecto de un aumento en los niveles de USP19 en esta línea celular. A tal fin, se sobreexpresaron establemente construcciones que expresaban variantes *wild type* y mutante catalítica^{C506S} de la proteína USP19.

Tal como puede observarse en la **figura 47**, la expresión de la proteína *wild type* produjo un cambio morfológico respecto la línea celular control. Dicho cambio no se observó cuando se expresó la mutante catalítica^{C506S} de USP19.

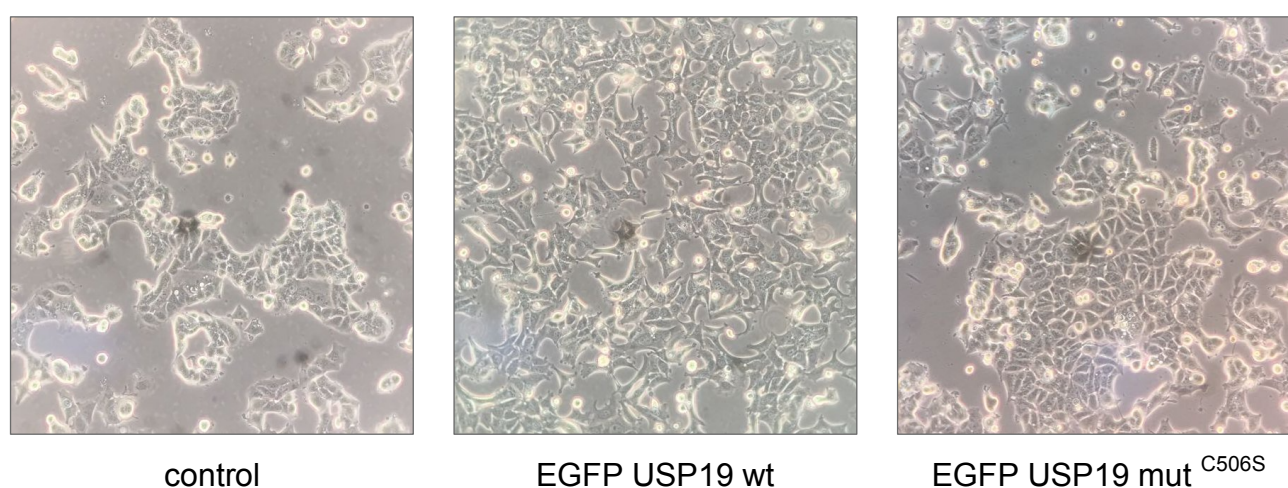


Figura 47. Sobreexpresión de USP19 wt y mutante catalítico^{C506S}: Imágenes en campo claro con contraste de fase (DIC) de las líneas celulares MCF7 control y que sobreexpresaban EGFP-USP19 wt y mutante^{C506S}.

A continuación evaluamos el potencial migratorio de las líneas MCF7 que sobreexpresaban USP19 mediante el ensayo de cierre de herida. Tal como puede observarse en la **figura 47**, la línea celular con la construcción mutante presentó un potencial migratorio significativamente menor que la línea que sobreexpresaba USP19 *wild type* (**figura 48**).

A partir de estos resultados se podría inferir que la actividad catalítica deubiquitinasa de USP19 es importante para la regulación de la migración.

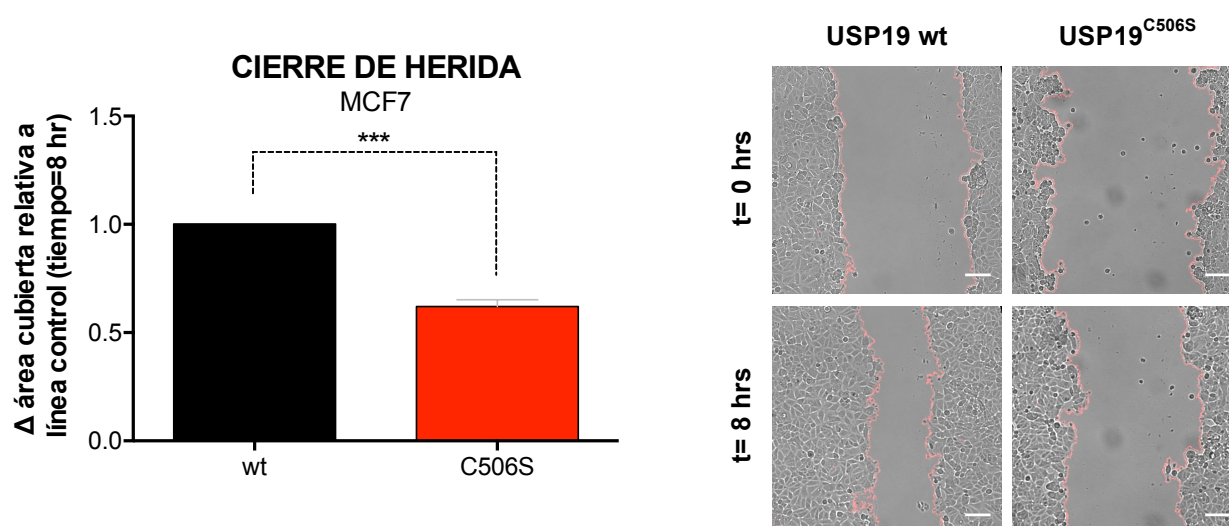


Figura 48. Potencial migratorio de MCF7 que sobreexpresan USP19 wt y mutante^{C506S}: **A.** Área cubierta luego de 8 horas por la línea que sobreexpresa USP19 mutante relativa a línea que sobreexpresa la variante wt. Las barras representan la media $\pm$ SEM. Se realizó un test de Student para analizar diferencias; (***) $p < 0,005$. **B.** Imágenes representativas del área de la herida sobre la monocapa de células que sobreexpresan la construcción wt y mutante para USP19 en los tiempos t=0 y 8 hrs. En rojo se indica el borde de la herida, la barra blanca representa 100 μ m.

Por último, se inyectaron ratones hembra NOD/SCID de 7-8 semanas de edad con las líneas celulares MCF7 que sobreexpresaban establemente USP 19 en sus variantes *wild type* y mutante catalítico^{C506S}. Tal como se muestra en la **figura 49**, se observó crecimiento de tumores primarios sólo en aquellos ratones inyectados con la línea celular MCF7 *wild type*.

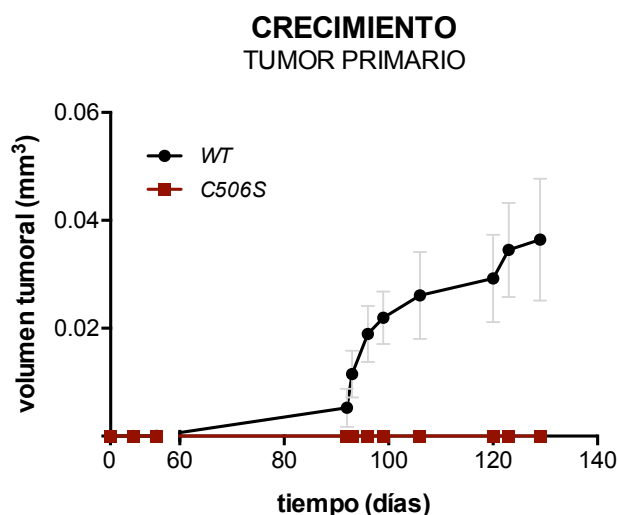


Figura 49. Crecimiento de tumor: Se transplantaron células MCF7 que sobreexpresaban USP19 wt o mut^{C506S} en las almohadillas de grasa mamaria de ratones hembra, y se registró el volumen de los tumores generados a lo largo del tiempo. $N=9$. Las barras de error representan SEM.

En virtud de estos resultados, concluimos que la función catalítica de USP19 es importante para su función como posible regulador positivo de procesos tumorigénicos y pone de manifiesto el posible alto valor terapéutico que posee el desarrollo de inhibidores farmacológicos de esta enzima en el contexto de tratamientos anti tumorales.

GENERACIÓN DE LÍNEAS KNOCK OUT

Como último paso para validar la importancia de la actividad catalítica de USP19 en el contexto de la regulación de los proceso de migración e invasión tumoral, se generaron líneas celulares MDAMB231 *knock out* para dicha proteína mediante la técnica CRISPR (**figura 49**). Estas líneas constituyen una herramienta fundamental para el desarrollo de futuros experimentos que involucren la evaluación de la sobreexpresión de construcciones que contengan a la proteína USP19 *wild type* o el mutante catalítico $C506S$.

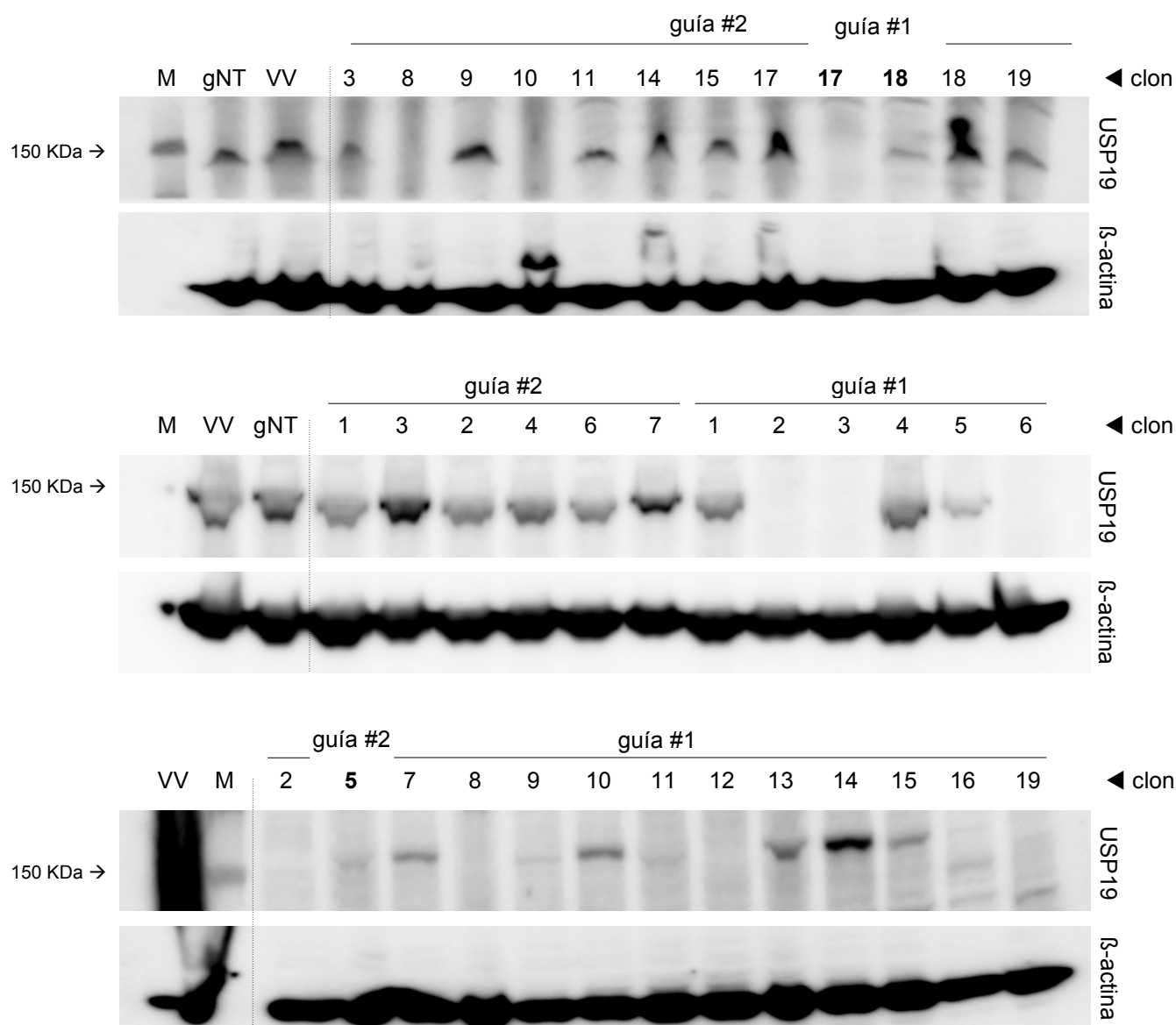


Figura 50. Obtención de líneas MDAMB231 knock out – Western Blot: Se estableció primero una línea estable que expresara la enzima Cas9-Flag mediante transducción y selección con blasticidina. Una vez obtenida la línea Cas9-Flag estable, se utilizaron vectores lentivirales para transducir los sgARN #1 y #2 dirigidos contra USP19, y los controles (vector vacío (VV) y sin blanco (gNT): non target). Se generaron poblaciones estables, se las seleccionó con puromicina, y finalmente se obtuvieron clones a partir de células únicas por la técnica de dilución limitante. Se evalúa la expresión de USP19 en cada clon por Western Blot. M= marcador de peso molecular.

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

Los principales hallazgos de este trabajo se resumen y listan a continuación:

SCREEN FUNCIONAL

- El uso de *transwells* es una buena estrategia para realizar *screens* de migración de mediana escala.
- El algoritmo utilizado para modelar el comportamiento de la población bajo selección funcional se ajustó a los resultados encontrados, y por lo tanto podría utilizarse como herramienta para predecir el comportamiento de futuros *screens* genéticos.
- Fue posible seleccionar una población con bajo potencial migratorio a partir de la línea celular MDAMB231.
- Se encontraron 26 genes candidatos como posibles reguladores de la migración celular. Para 12 de ellos ya se había descrito previamente su relación con la migración, invasión, metástasis o tumorigénesis. Estos resultados nos sirvieron como prueba de concepto de la validez del *screen* genético realizado en esta tesis como herramienta para encontrar posibles nuevos reguladores de la migración celular.

VALIDACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GEN CANDIDATO: USP19

- USP19 no afecta la tasa de proliferación de la línea celular MDAMB231 *in vitro*.
- USP19 afecta el potencial migratorio e invasivo de las células MDAMB231 *in vitro*.
- Experimentos *in vitro* en dos dimensiones demostraron que USP19 no afecta el potencial clonogénico de las células MDAMB231, pero que su silenciamiento reduce la capacidad de las mismas de formar colonias en tres dimensiones y de resistir a anoikis.
- USP19 no afecta la sensibilidad de la línea celular MDAMB231 a distintos quimioterápicos.
- Estudios *in vivo* demostraron que el silenciamiento de USP19 afecta la capacidad tumorigénica de las células MDAMB231, así como el tiempo de desarrollo de tumores primarios. USP19 también afecta la formación de focos metastásicos en el ensayo de

metástasis experimental.

- El silenciamiento de USP19 afecta el potencial migratorio *in vitro* de la línea celular MDAMB436 que, al igual que la línea celular MDAMB231, deriva de un cáncer de mama triple negativo.
- Estudios *in vivo* demostraron que el silenciamiento de USP19 afecta la capacidad tumorigénica de las células MDAMB436, así como el tiempo de desarrollo de tumores primarios.
- El silenciamiento de USP19 no afecta el potencial migratorio de la línea celular MCF7.
- La sobreexpresión de USP19 *wild type* en la línea celular MCF7 afecta su morfología, mientras que la sobreexpresión de USP19 mutante^{C506S} (mutante de actividad catalítica) no lo hace.
- La actividad catalítica de USP19 es importante para modular el potencial migratorio *in vitro* y su potencial tumorigénico *in vivo*.

DISCUSIÓN

La ubiquitinación es una modificación post-traducciona de proteínas cuyo estudio ha despertado un creciente interés en el ámbito de la oncología molecular debido a su gran potencial a nivel terapéutico en el tratamiento del cáncer. Alteraciones en distintos componentes de la cascada de ubiquitinación están asociadas a la transformación maligna de células tumorales y al desarrollo de procesos metastásicos. Por lo tanto su estudio, regulación y el desarrollo de compuestos que inhiban o activen componentes específicos poseen un gran potencial para el desarrollo de nuevas drogas farmacológicas [169].

El objetivo de esta tesis doctoral fue identificar y caracterizar genes relacionados con la cascada de ubiquitinación que representaran potenciales nuevos blancos moleculares para el desarrollo y mejora de las terapias antitumorales actuales. A tal fin se realizó un *screen* genético utilizando tecnología de ARN de interferencia (shARNs) para encontrar nuevos genes relacionados con el proceso de ubiquitinación que regularan positivamente el potencial migratorio de células tumorales. En particular se focalizó la atención en células derivadas de CMTN, una neoplasia maligna que posee un mal pronóstico y que presenta alto riesgo de recurrencia metastásica [170]. Actualmente no existen tratamientos eficaces para tratar esta afección, ni tratamientos específicos dirigidos a blancos moleculares determinados.

Mediante este procedimiento se identificó a la deubiquitinasa USP19 como un nuevo regulador de los procesos de migración e invasión celular. Asimismo se validó, tanto *in vitro*, como así también en modelos animales *in vivo*, el rol que este gen cumple en el control de procesos de tumorigénesis resaltando su alto potencial como posible futuro punto de intervención terapéutico en el tratamiento del cáncer.

Uso de *transwells* como estrategia funcional para realizar *screens* de migración

Los *transwells* han sido eficazmente utilizados en el pasado para encontrar reguladores de la migración o invasión de células, en el contexto de *screens* genéticos con siARNs/shARNs o cADNs (expresión con retrovirus) [142-145]. Los mismos confieren la posibilidad de realizar *pooled screens* (bibliotecas agrupadas) porque permiten el análisis simultáneo del efecto del silenciamiento/expresión de distintos genes en una población mixta de células. Esto permite, a su vez, que se requiera menor cantidad de tiempo/insumos para estudiar los procesos de migración e invasión, y por lo tanto pueden estudiarse mayor cantidad de genes. De todos modos, esto conlleva un gasto adicional de secuenciación e identificación de los agentes que modulan la expresión génica en la población mixta.

En base a lo expuesto anteriormente, en esta tesis doctoral se utilizaron *transwells* para realizar el ensayo funcional que evaluara el potencial migratorio de células MDAMB231. Durante aproximadamente un año se determinaron las condiciones experimentales necesarias que nos permitieron realizar un monitoreo fidedigno del proceso de selección funcional, como así también optimizar el uso de *transwells*.

En primer lugar y a fin de minimizar los efectos del proceso de proliferación en el ensayo de migración, se hambreadon las células previamente durante 24 horas. Dado que el hambreado con un medio sin suero (SFB) producía muerte de un porcentaje no despreciable de células, se utilizó un medio 0,1% SFB. En estas condiciones, prácticamente todas las células permanecían adheridas a la placa de cultivo. A continuación se estudió la proliferación de las células hambreadas luego del agregado de un medio suplementado con 10% SFB (siendo éstas las condiciones experimentales a utilizarse en el ensayo de migración), y se observó que durante las primeras 24 horas post liberación del hambreado, el número de células permanecía constante.

En virtud de estos resultados se determinó luego el porcentaje de migración de las células hambreadas a distintos tiempos, considerando como tiempo máximo 24 horas de experimentación de modo tal de asegurar que las células no se replicaran. Se observó que el porcentaje de células que migraban aumentaba en función del tiempo, y por lo tanto se decidió realizar los experimentos de migración a 24 horas para obtener el mayor rango dinámico posible.

La evaluación del potencial migratorio de las células consiste en la cuantificación del número de células que se encuentran adheridas a la cara inferior de la membrana porosa del *transwell* luego del tiempo de experimentación, comparándolo con el número de células totales (considerando también aquellas que no migraron y se encuentran adheridas a la cara superior de la membrana del *transwell*).

Esta cuantificación se realizó, en un primer momento, utilizando el procedimiento estándar. El mismo consiste en teñir distintos componentes celulares con cristal violeta, y tomar fotografías de distintos campos de la membrana. Este procedimiento era muy laborioso, insumía mucho tiempo y estaba condicionado por el operador y por la representatividad de dichas fotografías respecto la membrana completa. Por otro lado, y dado que las membranas son transparentes, era necesario utilizar dos réplicas para cada experimento: un *transwell* para contar las células en la cara superior de la membrana (que no migraron) y otro para cuantificar las células en la cara inferior (que migraron). Al realizar este procedimiento no se podía saber con exactitud el porcentaje de células migradoras y no migradoras de la población en estudio, debido a variabilidad en la adhesión de las células a cada *transwell*.

A fin de mejorar el procedimiento mencionado anteriormente, se cambió el método de tinción y el tipo de membranas utilizadas: se utilizó el colorante DAPI para teñir núcleos celulares, y *transwells* de membrana opaca (Fluoroblok®).

La tinción con DAPI facilitó la determinación de estructuras bien delimitadas (núcleos) que pueden ser cuantificadas con programas computacionales, evitando entonces el error asociado al operador. Esto significó una mejora sustancial respecto a la tinción con cristal violeta, la cual no permite reconocer los límites celulares ni diferenciarlos de los límites de los poros de la membrana, y por lo tanto no permitía realizar una cuantificación fidedigna del número de células en el *transwell*.

El uso de *transwells* Fluoroblok® nos permitió aumentar aún más la precisión de la cuantificación del potencial migratorio porque permite analizar el número de células a ambos lados de una misma membrana. De este modo fue posible independizar la cuantificación de una adhesión diferencial que pudieran tener las células en los dos *transwells* utilizados en el método antes descrito.

Finalmente, la cuantificación se mejoró con el uso de un microscopio Zeiss AxioObserver Z1 y la herramienta “*tiling*” que el mismo dispone. Esta herramienta posibilita la adquisición automática de fotografías que recorren un área determinada (de mayor tamaño a la contemplada en una única fotografía), y posterior ensamblado de las mismas en una única imagen de mayor tamaño. De este modo la cuantificación representa fielmente la cantidad de células en toda la membrana, en contraste con el método antes utilizado que consistía en tomar fotografías y estimar aproximadamente el número de células promedio por el área cubierta en cada fotografía.

Esta puesta a punto fue de suma importancia porque la selección funcional llevada a cabo en esta tesis requería de una cuantificación y monitoreo preciso del proceso de migración celular.

Uso de shARNs como herramienta para realizar screens

Los *screens* genéticos por pérdida de función con siARNs o shARNs como herramienta de bloqueo de expresión génica han sido ampliamente utilizados en los últimos años para encontrar factores de regulación de la migración, metástasis, proliferación, sensibilidad a drogas o mutaciones (*synthetic lethality*), factores de crecimiento, reguladores de estabilidad, etc. [171-176]. Existen otro tipo de *screens* genéticos que se basan en la ganancia de función génica y utilizan cADN u ORFs (marcos de lectura abiertos, de su traducción en inglés *Open*

Reading Frame), que también han sido utilizados para estudiar migración y otros procesos celulares [144, 145].

Cada tipo de tecnología tiene cualidades particulares que los hacen adecuados para una u otra aplicación. Los *screens* de ganancia de función con cADN u ORF son muy costosos ya que no es sencillo armar las bibliotecas (en particular para cADNs/ORFs grandes). Asimismo, si se genera una biblioteca de cADN a partir de una línea celular, ésta depende de la expresión génica de la línea celular utilizada, en ese momento. Por estos motivos este tipo de *screens* son menos utilizados que los que utilizan siARNs o shARNs, y fue descartado como estrategia para realizar el *screen* descrito en esta tesis.

Los siARNs son relativamente sencillos de implementar, pero tienen ciertas desventajas respecto la tecnología que emplea shARNs: en primer lugar, los *screens* con siARNs tienen que realizarse ensayando cada siARN por separado, mientras que los shARNs pueden agruparse para realizar un *pooled screen*. Asimismo la duración del silenciamiento es diferente: mientras que los shARNs pueden transducirse con vectores virales e integrarse en el genoma de la célula blanco (y por ende, perpetuar el efecto del silenciamiento mientras la célula transcriba el shARN), los siARNs irán perdiendo su concentración intracelular a medida que las células se dividan. Ambos tipos de tecnología sirven para *screens* de genes transcripcionalmente activos y disminuyen la expresión génica parcialmente, y por lo tanto presentan una alta tasa de falsos negativos. Además, estas estrategias pueden producir efectos debido al silenciamiento de otros genes diferentes al gen para el que fueron originalmente diseñados (*off target effects*). Esto último se soluciona utilizando bibliotecas que contienen un mayor número de si/shARNs (*“ultra deep library”*, que contienen hasta 25 si/shARNs), aunque son muy costosas [152].

Por lo expuesto en el párrafo anterior, la tecnología con shARN nos proporciona un excelente compromiso entre costos y beneficios. No obstante, cuando se realizan este tipo de *screens* existen diversos factores a considerar: (1) No todos los shARNs que tengan el mismo blanco tienen la misma eficiencia de silenciamiento, y por ende alguno de éstos puede desaparecer del ensayo funcional independientemente del gen contra el cual estén dirigidos. (2) Asimismo, genes importantes en la regulación de la migración pueden tener distinta dominancia respecto al fenotipo estudiado, y por ende genes relevantes pero poco dominantes pueden desaparecer de las poblaciones seleccionadas, independientemente del cambio fenotípico que generen. (3) Por otro lado y considerando que los shARNs se insertan en el genoma de las células, se pueden verificar efectos insercionales por interrupción de genes que modulan el proceso estudiado, independientemente de la relevancia real del shARN en dicho proceso. (4) Finalmente, *screens* que utilicen bibliotecas agrupadas de shARNs (*pooled*

screens) necesitan una adecuada puesta a punto de modo tal de asegurar que un único shARN se inserte en cada célula a ensayar.

En el caso particular de nuestro *screen* la proliferación fue uno de los efectos *off target* más relevantes. En este tipo de efecto secundario indeseado, células que contengan shARNs que les confieran una ventaja adaptativa sobre otras aumentarán su frecuencia, independientemente de la relevancia del gen para el cuál fueron diseñados y su relevancia en el fenotipo en estudio. Una estrategia que ayuda a identificar genes que potencialmente regulen un cierto proceso con mayor precisión, es realizar varias réplicas del *screen* o utilizar varias líneas celulares. No obstante estas estrategias, aunque atractivas, multiplican los costos de experimentación, y posibles diferencias en los niveles de expresión/variantes de *splicing* para distintos genes en las distintas líneas podrían enmascarar buenos candidatos potenciales [177].

Por ultimo es importante destacar que la tecnología CRISPR se ha utilizado también para realizar *screens* génicos por pérdida o ganancia de función, tanto *in vitro* como *in vivo* [151]. Si bien no existía cuando comenzó esta tesis doctoral, constituye una herramienta fundamental para los experimentos a desarrollarse en el futuro. Al igual que las herramientas antes nombradas, esta tecnología presenta ventajas y desventajas, y efectos *off target* en la proliferación celular (debidos al número de copia del gen blanco) son también muy relevantes y deletéreos [178].

En esta tesis doctoral se decidió realizar un *screen* genético para bloquear únicamente genes relacionados con el UPS. Esta decisión se tomó considerando que genes ya conocidos, con un fenotipo dominante en el contexto de la regulación de la migración celular, podrían enmascarar posibles genes candidatos y que esto podría disminuir la posibilidad de encontrar nuevos potenciales reguladores de la migración celular. Asimismo, el tiempo y cantidad de insumos que se requerirían para cubrir la complejidad de la biblioteca utilizada sería mucho mayor.

Selección de una población con bajo potencial migratorio a partir de la línea celular MDAMB231

La línea celular MDAMB231 es una línea ampliamente utilizada como modelo de investigación para estudiar el cáncer de mama tanto *in vitro* como *in vivo*. La misma tiene un alto potencial migratorio, es altamente invasiva y presenta un elevado potencial metastásico. En esta tesis doctoral se la utilizó como modelo experimental para realizar la selección de células que perdieran su capacidad migratoria como consecuencia de la expresión de shARNs dirigidos al bloqueo de genes relacionados con el *UPS*.

En primer lugar se caracterizó el potencial migratorio de las células antes nombradas utilizando *transwells* Fluoroblok®. Con esta información se modeló el comportamiento de la población seleccionada en distintas situaciones experimentales en el contexto del *screen* genético: si 1, 50 o 150 shARNs bloqueaban la migración de las células ensayadas. Se estimó que se necesitarían, en el peor de los casos (un único shARN disminuyera el potencial migratorio de las células), alrededor de 11 ciclos de enriquecimiento para seleccionar una población que hubiese perdido un 80% de su potencial migratorio original. Se llevó a cabo la selección funcional y se monitoreó el proceso en paralelo.

Secuenciación e interpretación de los resultados

La secuenciación de las muestras se realizó en un equipo Illumina HiSEQ 2500 HT y la lista de secuencias obtenidas se normalizó para calcular la frecuencia de cada shARN en cada ciclo de selección. Como criterio para descartar posibles falsos positivos debido a efectos *off target* de los shARNs enriquecidos, se eligieron genes para los que se encontrasen al menos dos shARNs que lo bloquearan específicamente y que aumentaran su frecuencia a medida que avanzaban los ciclos de selección. Si comparáramos los datos de los ciclos 0 (población no seleccionada) a ciclo 11, se encontraban sólo una docena de shARNs que habían aumentado su frecuencia. Ninguno de ellos estaba dirigido al mismo gen y en el ciclo 11 ocupaban el 95% del total de las lecturas. En virtud de estos resultados, se estudió con mayor detenimiento la lista de secuencias en todos los ciclos. La gran mayoría de los shARNs aumentaban paulatinamente su frecuencia hasta el ciclo 4 y luego se perdían de la población de shARNs. Contemplando la posibilidad de efectos *off target* de los shARNs mayoritarios en el ciclo 11 y que los mismos pudieran “desplazar” a shARNs de la población celular por efectos en la proliferación, se decidió analizar los datos provenientes de los ciclos 0 a 4 (los shARNs mayoritarios en el ciclo 11 ocupaban sólo un 25% de las lecturas). Utilizando este criterio se encontraron 26 genes candidatos, de los cuales 12 ya estaban descriptos en la literatura como

posibles reguladores de la migración, invasión, tumorigénesis o metástasis (BTRC [157], CBL [158], CYLD [159], DTX1 [160], FBXL19 [161], HACE1 [162], HECTD1 [163], TRIM 15 [164], TRIM 25 [165], TRIM 37 [166], TRIM 59 [167] y UCHL3 [168]). Estos resultados fueron alentadores ya que validaban nuestro *screen*.

Elección de *usp19* como gen candidato a validar y caracterizar

Se generaron líneas estables MDAMB231 que tuvieran los distintos genes candidatos silenciados mediante transducción de shARNs y posterior selección.

Dado que el potencial migratorio de las células está determinado en parte por la adhesión de las mismas a sustratos y a células vecinas, se evaluó la morfología de las líneas resultantes. Dicho parámetro fue fundamental para la elección de USP19 para su posterior validación y caracterización. Entre los 14 genes candidatos restantes, USP19 fue aquél que mostró un mayor cambio morfológico: las células que tenían menor expresión de USP19 se encontraban más adheridas entre sí respecto las células control, y formaban colonias más compactas (**figura 28**).

Estudios *in vitro*

En primer lugar se confirmó la disminución de los niveles de expresión de USP19 en las nuevas líneas celulares generadas a nivel de mRNA y proteína, y se observó que los shARNs utilizados presentaban diferente eficiencia de silenciamiento (**figuras 29 y 30**). Para todos los experimentos *in vitro* e *in vivo* que se realizaron posteriormente se verificó una correlación entre el nivel de silenciamiento y el fenotipo observado.

A continuación, y dado que alteraciones en la proliferación celular podrían interferir en la selección funcional realizada en esta tesis, estudiamos la tasa de duplicación de las líneas celulares control y silenciadas para USP19 utilizando dos métodos diferentes. En ambos casos no se observaron diferencias entre las líneas silenciadas y la línea celular control (**figuras 31 y 32**). A partir de estos resultados razonamos que el aumento de frecuencia de shARNs dirigidos contra USP19 en el *screen* podrían atribuirse a su importancia en la regulación de la migración, y no a posibles efectos en la proliferación celular.

Luego, para validar la importancia de USP19 en este proceso, realizamos experimentos de migración celular en *transwells* (**figura 33**) y el experimento de cierre de herida (**figuras 34 y 35**). En ambos casos se observó que el silenciamiento de USP19 reduce el potencial

migratorio de las células ensayadas. Por otro lado, para determinar si USP19 es importante en el proceso de invasión, realizamos un experimento de invasión en gotas de agar noble (**figuras 36 y 37**) y observamos una disminución del potencial invasivo de las células silenciadas respecto la línea celular control.

Seguidamente realizamos experimentos para evaluar el potencial clonogénico de las células en dos (**figura 38**) y tres dimensiones (**figura 39**). No observamos diferencias significativas en el número de colonias que se formaron en el ensayo en dos dimensiones para las líneas estudiadas. No obstante, el ensayo clonogénico en tres dimensiones (que permite evaluar la capacidad de formar colonias de células sin adherencia a un sustrato y la posibilidad a resistir anoikis) mostró que las células que tenían USP19 silenciado generaban colonias de menor tamaño respecto las células control.

Estos resultados nos permitieron especular que en un contexto tridimensional *in vivo* podríamos obtener diferencias entre las células control y silenciadas para USP19.

Por otro lado, y dado que en muchos casos una disminución del potencial migratorio e invasivo está asociado a fenotipos menos agresivos, quisimos caracterizar la sensibilidad de las líneas celular MDAMB231 control y silenciadas para USP19 a dos drogas quimioterapéuticas: Doxorrubicina y Bortezomib.

USP19 es una de las pocas DUBs USPs que tiene dominio transmembrana, y se localiza en el retículo endoplásmico. Wiles y colaboradores demostraron que USP19 disminuye la respuesta de UPR (con una reducción concomitante de CHOP) en el contexto de diferenciación de células mioepiteliales, y que el silenciamiento de USP19 aumenta los niveles de CHOP tanto *in vitro* como *in vivo* [52].

El efecto de las drogas antes mencionadas está en parte involucrados con la activación del UPR [179-182], y por lo tanto nos preguntamos si el silenciamiento de USP19 podría afectar la respuesta de la línea MDAMB231 a las mismas. Realizamos tratamientos de 5 días con distintas concentraciones de Doxorrubicina o Bortezomib, y no encontramos diferencias en la sensibilidad de las líneas celulares ensayadas (**figura 40**).

Considerando los efectos diferenciales que el silenciamiento de USP19 produce en la proliferación celular y en la resistencia a anoikis en tres dimensiones versus dos dimensiones, habría que re-evaluar la sensibilidad de las líneas celulares control y silenciadas mientras las mismas crecen embebidas en una matriz extracelular.

Estudios *in vivo*

Los resultados *in vitro* nos alentaron a estudiar el efecto del silenciamiento *in vivo* en experimentos de crecimiento de tumor primario y metástasis experimental.

Para ello se inyectaron ratones NOD/SCID hembra ortotópicamente en la almohadilla de grasa mamaria y se monitoreó el crecimiento del tumor primario generado. Las hembras inyectadas con células silenciadas para USP19 presentaron una demora en la aparición de los tumores respecto de las hembras inoculadas con células control, así como también una reducción en el número de hembras positivas para el desarrollo de tumores. Una vez que los tumores empezaban a crecer, aumentaban su volumen al mismo ritmo que los tumores generados a partir de células control (**figura 41**).

Con el objeto de confirmar si la causa del menor porcentaje de tumores generados y la demora en su desarrollo podía deberse a pérdida en la expresión de los shARNs dirigidos contra USP19, se realizaron cultivos primarios de los tumores y se determinó la expresión de USP19 en los mismos (**figura 42 A**). La expresión de mRNA de USP19 era menor en los cultivos primarios derivados de tumores provenientes de hembras inyectadas con células silenciadas, respecto aquellos tumores de hembras inoculadas con células control. Por otro lado, se evaluó la tasa de duplicación de dichos cultivos primarios y no se observaron diferencias significativas entre los mismos (**figura 42 B**).

Por otro lado se estudió la capacidad de las líneas celulares control y silenciadas de generar tumores en los pulmones mediante el experimento de metástasis experimental. En este experimento se inyectaron células directamente al torrente sanguíneo de ratones macho NOD/SCID, y se cuantificó la abundancia relativa de ADN humano en muestras de pulmones de ratones de cada grupo experimental. Los resultados indicaron que aquellos pulmones de ratones inyectados con las líneas silenciadas para USP19 tenían menor contenido de ADN humano respecto la línea celular control (**figura 43**).

Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que USP19 no afecta la proliferación celular, sino que podrían afectar el número de células capaces de generar tumores.

Estudios en otras líneas celulares

Se evaluó el efecto del silenciamiento de USP19 en otras líneas celulares para determinar si su función estaba conservada o dependía de distintos contextos moleculares. Para ello se utilizaron las líneas celulares derivadas de cáncer mamario MDAMB436 y MCF7. La línea celular MDAMB436 es triple negativa, mientras que la línea MCF7 es positiva para el

receptor de estrógeno y progesterona, y negativa para la amplificación de HER2.

En primer lugar, se evaluó el potencial migratorio de células MDAMB436 que expresaban shARNs dirigidos contra USP19 y control, mediante el ensayo de cierre de herida. Al igual que la línea MDAMB231, el silenciamiento de USP19 ocasionó una disminución del potencial migratorio de la línea en estudio (**figura 44**).

Luego se realizaron experimentos *in vivo*: se inyectaron estas líneas en la almohadilla mamaria de hembras NOD/SCID y se monitoreó el crecimiento del tumor primario. Todas las hembras inyectadas con células control generaron tumores, mientras que se observó una reducción del porcentaje de hembras que desarrollaron tumores cuando se las inyectó con células silenciadas. A su vez, se observó en una demora en el desarrollo de los tumores generados a partir de células silenciadas respecto la aparición de los tumores control (**figura 45**).

Por otro lado, se evaluó el efecto del silenciamiento de USP19 sobre el potencial migratorio de la línea celular MCF7. A tal fin se realizó el experimento de cierre de herida con líneas control y con aquellas transducidas con shARNs dirigidos contra USP19 (**figura 46**). Nuestros resultados indicaron que el silenciamiento de USP19 no afecta la migración de la línea celular en estudio.

A continuación se llevaron a cabo experimentos de sobreexpresión en dicha línea celular. La sobreexpresión de USP19 *wild type* [183] produjo un cambio morfológico en la línea celular MCF7, mientras que esto no se vio al sobreexpresar una versión mutante catalítica de dicha proteína (**figura 47**). Basados en estos resultados, se decidió comparar el potencial migratorio de las líneas MCF7 que sobreexpresaban USP19 *wild type* o mutante, y se observó que la actividad catalítica es importante para modular la migración de esta línea celular (**figura 48**).

Por último, se evaluó el crecimiento de tumores primarios en hembras NOD/SCID inyectadas ortotópicamente en la almohadilla de grasa mamaria con éstas líneas celulares. Sólo aquellas células que expresaban la proteína USP19 *wild type* fueron capaces de formar tumores primarios, mientras que la línea celular que expresaba la versión mutante catalítica no logró formar tumores (**figura 49**). Estos resultados nos permitirían concluir que la actividad catalítica de USP19 es importante para determinar el potencial migratorio de células MCF7 y fundamental para asegurar el desarrollo de tumores primarios en hembras inyectadas con esta línea celular.

En virtud de los resultados concluimos que el silenciamiento de USP19 afecta la

migración celular, proliferación y potencial tumorigénico de células cancerosas. Asimismo la actividad catalítica de USP19 podría ser necesaria para los fenotipos antes nombrados, y por lo tanto dicha DUB muestra un alto potencial como posible blanco de intervención terapéutica para pacientes con CMTN.

Posible mecanismo molecular de acción de USP19

Se ha descrito en la literatura un número acotado de sustratos de USP19. Para la gran mayoría de ellos, la regulación de USP19 no está directamente involucrada en procesos que se relacionan con los fenotipos analizados en el transcurso de esta tesis. No obstante, entre los distintos sustratos nos llamó la atención un trabajo que vincula a USP19 con el procesamiento de LRP6, un co-receptor involucrado en la cascada señalética de Wnt. El mismo se sintetiza en el retículo endoplásmico y es retenido allí hasta su correcto procesamiento mediante palmitoilación y ubiquitinación. Una vez plegado, USP19 deubiquitina a LRP6 y el mismo sale del retículo endoplásmico. En ausencia de USP19, LRP6 se degrada en vía mecanismo ERAD, y cuando se sobreexpresa aumenta la salida de LRP6 del retículo endoplásmico. Estos autores además demostraron que en ausencia de USP19, la cantidad de LRP6 en membrana y la cascada señalética de Wnt están disminuidos [58].

Las vías de señalización Wnt son un grupo de cascadas de transducción de señales formadas por proteínas que transfieren las señales del exterior de una célula hasta su interior. Las mismas son activadas cuando ligando Wnt se une a receptores de la familia Frizzled y correceptor LRP6 o 5, que recluta a Dishevelled (una proteína de andamiaje o *scaffold*) dentro de la célula. En la vía canónica, esto produce una activación de LRP6 por fosforilación, y el reclutamiento del complejo Axin a los receptores. Todo esto conduce a una fosforilación de β -catenina y consecuente estabilización, que permite su acumulación, ingreso al núcleo y activación de expresión de genes blanco.

Mutaciones de componentes de la cascada de Wnt se encuentran asociados a problemas congénitos, cáncer y otras enfermedades [184]. En el contexto de cáncer de mama, la activación de la cascada de Wnt y β -catenina se ha asociado a cáncer del fenotipo basales o triple negativos, y correlaciona con mal pronóstico y el desarrollo de metástasis [185, 186]. El bloqueo de dicha cascada en líneas celulares derivadas de CMTN inhibe su proliferación y migración, induce apoptosis, e inhibe el potencial tumorigénico [187, 188]. Por todos estos motivos, se ha propuesto el bloqueo de la cascada de Wnt/ β -catenina como un posible blanco de intervención terapéutica para el tratamiento de CMTN [189, 190], y en particular para el subtipo mesenquimal y tipo-mesenquimal [191].

Lindvall y colaboradores demostraron que LRP6 es necesario para el desarrollo de la glándula mamaria murina; luego del desarrollo, su expresión disminuye y se encuentra circunscripta a las células basales [53]. Estos autores y otros grupos analizaron los perfiles de expresión génica de distintas bases de datos y vieron que el mismo estaba sobreexpresada en cáncer de mama del tipo basales [192]. Por otro lado Liu y colaboradores demostraron que LRP6 está más expresado en tejido mamario tumoral respecto tejido normal (**figura 51 A**) (en particular más expresado en CMTN), y que el silenciamiento de LRP6 en distintas líneas celulares disminuye su proliferación y potencial tumorigénico. Asimismo, la inhibición de la cascada Wnt con mesd (una chaperona de LRP6) fue suficiente para disminuir el tamaño tumoral de ratones transplantados con tumores MMTV-Wnt1 (**figura 51 B**) [193].

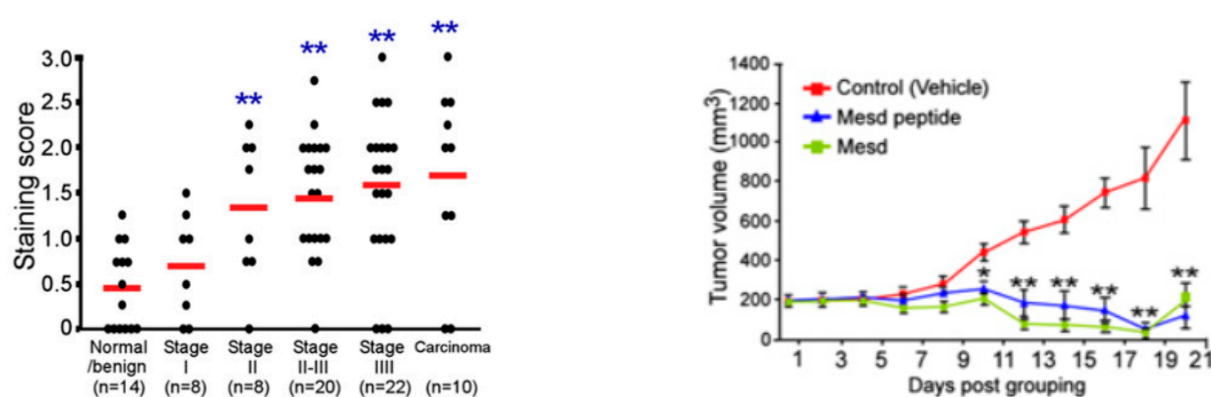


Figura 51: Relevancia de expresión de LRP6 en cáncer de mama. A. Se evaluó la expresión de LRP6 mediante inmunohistoquímica de un microarreglo de tejidos de cáncer de mama. La determinación de la tinción se realizó con tres experimentos independientes. Se le asignó un puntaje a la intensidad de la tinción: ausente (0), leve (1), moderado (2) y fuerte [29]. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$. B. Se analizó el volumen tumoral de ratones conteniendo trasplantes tumorales del modelo MMTV-Wnt1 que fueron tratados intra-peritonealmente diariamente con PBS (vehículo), proteína mesd o péptido mesd. Cada punto representa media $\pm$ SEM. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$. [193]

Asimismo, el grupo de Liu y otros grupos caracterizaron la expresión de LRP6 en líneas celulares mamarias mediante Western Blot. Los resultados se muestran en la **figura 52**.

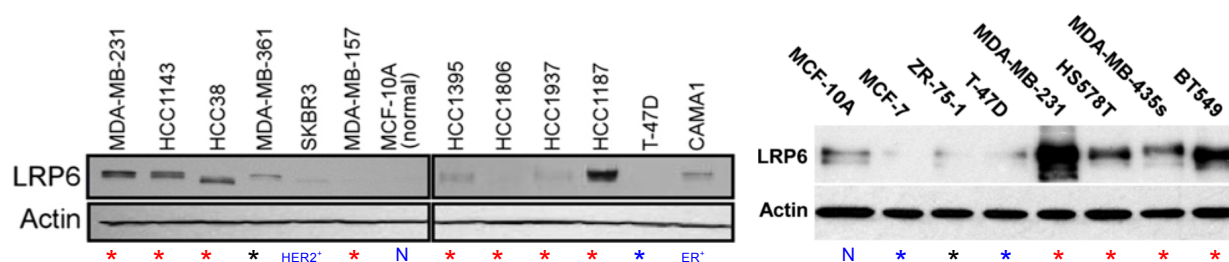


Figura 52: Expresión de LRP6 en líneas de cáncer de mama (Western Blot). Se evaluó la expresión de LRP6 en distintas líneas celulares mamarias normales y cancerosas. A. [193], B. [194]. Los asteriscos indican la expresión del receptor de estrógeno (ER), progesterona (PR) o amplificación de HER2 (HER2⁺). (*) líneas triple negativas ER⁻, PR⁻, HER2⁻; (*) líneas ER⁺, PR⁺, HER2⁻; (*) líneas ER⁺, PR⁺, HER2⁺. [193]

PR^+ , $HER2^+$; (N) línea normal; (ER^+) línea ER^+ , PR^- , HER^- ; ($HER2^+$) línea ER^- , PR^- , $HER2^+$ (según Wu y colaboradores [195]).

La importancia de LRP6 en la cascada señalética de Wnt y su relación con la proliferación, migración, invasión y tumorigénesis de distintos tipos de cáncer o líneas celulares ha sido reportada extensamente [194, 196-199].

Por todo lo expuesto en los párrafos anteriores, resulta atractivo pensar que el mecanismo molecular que podría ser responsable de los fenotipos causados por el silenciamiento de USP19 es LRP6 y la cascada señalética de Wnt.

Perspectivas y futuras direcciones

En este trabajo validamos a USP19 como un posible blanco terapéutico para el tratamiento de pacientes con CMTN. Como explicado anteriormente, este tipo de cáncer sobreexpresa marcadores de la vía de señalización de Wnt y son sensibles a su disrupción. Nos proponemos ahondar en los estudios que permitan determinar la identidad de la cascada señalética responsable de los fenotipos observados en esta tesis doctoral debidos al silenciamiento de USP19, focalizando nuestra atención en el co-receptor LRP6. Realizaremos ensayos de rescate de fenotipo en las líneas celulares CRISPR que generamos con construcciones que sobreexpresen USP19 en sus variantes *wild type* y mutante catalítica, para determinar si la misma es importante en el contexto de nuestros experimentos. En simultáneo estudiaremos los niveles de LRP6 en dichas líneas celulares. Asimismo, evaluaremos la activación de la cascada canónica de Wnt mediante el análisis de expresión de distintos genes blancos utilizando el kit “WNT Signalling Pathway Plus PCR Array” de Qiagen, y el reportero de actividad transcripcional de β -catenina “TOPflash” y “FOPflash”. Esperamos que la validación de USP19 como un nuevo blanco terapéutico y la validación de su mecanismo molecular de acción nos permitan profundizar el estudio de su relevancia en un contexto clínico, con muestras de pacientes.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Detalle de genes silenciados por la biblioteca de shARNs

En la **Tabla 6** se encuentra la lista de shARNs dirigidos contra genes relacionados con el sistema ubiquitina-proteasoma (*UPS*) y su secuencia. También se indica el código de identificación de cada uno de ellos en el consorcio de ARN de interferencia del Instituto Broad, Estados Unidos.

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
03373	AMFR	AGGAGAGAACTTGGATGAGAA
03374	AMFR	CATGAGGTGCAACGTCGAATT
03375	AMFR	CCTCGCTTAAACCAACACAAT
38799	ANAPC11	GCTGCAACAAGGTGGAAACAA
38801	ANAPC11	CCGCCAGGAATGGAAGTTCAA
38802	ANAPC11	CAACGATGAGAACTGTGGCAT
38803	ANAPC11	GCAGGATGGCATTAAACGGAT
04357	ANAPC2	GCAGATTAAAGCAAGTCAGAT
04358	ANAPC2	GCTGCTCTTCTGGACGTACAT
04359	ANAPC2	CCCGGCACCTTCTCTGTCATT
04360	ANAPC2	CCTCTATATCTCTGCCATCAA
07238	APPBP1	CCAAGCAGTATTGAAGATATA
07239	APPBP1	CGCTGCATAAATATCACCAAA
07240	APPBP1	CCAGGAGTATCTAACTATCAA
07241	APPBP1	GCCATGGAATTCTTACAAGAA
07242	APPBP1	GCATGTCACAACTTCAGCAA
07500	ARIH1	CCATCTAGAGTGCTCATGCAA
07501	ARIH1	GCCAGATGAATACAAGGTCAT
07502	ARIH1	GCTACCTTGAACGAGATATTT
07503	ARIH1	CCATGTTGTTAAAGTCCAATA
07504	ARIH1	CCTGTAAATGTAAGTGGTTA
34269	ARIH2	CCTCCCAAATAAATTTGCTTT
34270	ARIH2	CCTGCAATACACCTACCCATA
34271	ARIH2	CGACTCTGAAACAGCCAACTA
34272	ARIH2	GCTGGATGTGTCTAGGAGATT
34273	ARIH2	GAGGACTATTACGTGGGAGTA
34669	ATE1	CGGGTGACTTTGCATTGATAA
34670	ATE1	GTCAGTATAGACCTTCTGATT
34671	ATE1	GATGACATCAAAGAGAGTTTA
34672	ATE1	CCTGAGACATATGTTTGGGTA
34673	ATE1	CACAATAAGGTGCCGACCTTT
07405	ATXN3	CGTCGGTTGTAGGACTAAATA
07406	ATXN3	CGAGTGTTAGAAGCAAATGAT
07407	ATXN3	GCAGGGCTATTAGCTAAGTA
07408	ATXN3	CGCCAAGAAATTGACATGGAA
07409	ATXN3	GTGCTCAACATTGCCTGAATA
07370	BAP1	GCCACCATGTTGACATAAGTT
07371	BAP1	CGTCCGTGATTGATGATGATA
07372	BAP1	CGTGGAAGATTTCCGGTGTCAA
07373	BAP1	CCCTGTATATGGATTTATCTT
07374	BAP1	CCACAACCTACGATGAGTTTAT
03743	BARD1	CCAGACACTAAGAGCAGGAAT
03744	BARD1	GTGGATATAGTCAAGCTGTTA
03745	BARD1	CCACCTTCATGCAAACGTAAA
03746	BARD1	AGGTAGAGTCATTATATTTG
03747	BARD1	GCTGTTTGATGGATGCTACTT
03780	BIRC2	GCCGAATTGTCTTTGGTGCTT
03781	BIRC2	ACATTCATTATCTCCACCTT
03782	BIRC2	GCTGCGGCCAACATCTTCAAA
03783	BIRC2	CCCTACAGTTATGCAATGAGT
03784	BIRC2	TGGTTAAATCTGCCTTGGAAA

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
03775	BIRC3	GCAGAGTCATCAATTATCCAT
03776	BIRC3	GCACTACAAACACAATATTCA
03777	BIRC3	CCGTCAAGTTCAAGCCAGTTA
03778	BIRC3	CAGTTCGTACATTTCTTTTAT
03779	BIRC3	GCTCTTATTCAAACCTCTCCAT
03785	BIRC4	AGCTGTAGATAGATGGCAATA
03786	BIRC4	GCACTCCAACCTTCTAATCAAA
03787	BIRC4	GACATGGATATACTCAGTTAA
03788	BIRC4	CAGAATGGTCAGTACAAAAGTT
04157	BIRC6	CCATGCTATATCCAGAAGTAA
04158	BIRC6	GCGTTCTTTCTACAGTGCATT
04159	BIRC6	GCTGTAGTGAATGGTGCAAAT
04160	BIRC6	CGGCTATGAAACCCAAACCTT
04161	BIRC6	GCTCATTTGTTGGTTTCAGAT
07629	BRAP	CGCCAGTTCAACTCAATAGAA
07630	BRAP	GCAGGAAATGAACAAGTGTTT
07631	BRAP	CCAGGAGAGAAAGTAGCGATT
07632	BRAP	CCTTACAGTTAGAGTATTCAT
07633	BRAP	CCATTTAACGACGTAATTGAA
09823	BRCA1	TATAAGACCTCTGGCATGAAT
09824	BRCA1	TATAGCTGTTGGAAGGACTAG
10305	BRCA1	AGAATCCTAGAGATACTGAA
39833	BRCA1	CCCTAAGTTTACTTCTCTAAA
39834	BRCA1	GCCCACCTAATTGTACTGAAT
39835	BRCA1	CCCACCTAATTGTACTGAATT
39836	BRCA1	CCCTTCTAAATGCCCATCATT
39837	BRCA1	GCCTACAAGAAAGTACGAGAT
06541	BTRC	CCATTAAAGTTGCGGTATTTA
06542	BTRC	GCACATAAACTCGTATCTTAA
06543	BTRC	GCGTTGTATTGCGATTTGATAA
06544	BTRC	GCGTTTCAATAATGGCATGAT
06545	BTRC	GCTGAACCTGTGTGCAAGGAA
07599	C20orf18	CCACAACACTCATCTGTCAAA
07600	C20orf18	GCAGGGTAAATGGGATTCCTT
07601	C20orf18	GCAGATGAACTGCAAGGAGTA
07602	C20orf18	CCCTGAGGATTACCAGCGATT
07603	C20orf18	GCCCTGATATGACAGTGGCGT
03459	CAND1	CTTGCCCTAATACACTTCAGAT
03460	CAND1	TCCATAATCCAGAGGTTGTAA
03461	CAND1	GTCAACAACAAGAACCTACAT
03462	CAND1	GTAATCTTTCTGCCCTTGATA
03463	CAND1	CGGTTGATGATGGTCTGGATA
10310	CBL	ACAAGAAGATGGTGGAGAAG
10311	CBL	ATATCACATCAGTGGTTCCA
39723	CBL	CCAGTGAGTTGGGAGTTATTA
39724	CBL	CCGTACTATCTTGTCAAGATA
39725	CBL	CCCTTCATAAAGACAAACCAT
39726	CBL	CCCTCACAATAAACCTCTCTT
39727	CBL	GCCGATGTGAAATTAAGGTA
03831	CCNF	CTCAACTCTCAACTCACTGTA
03832	CCNF	GCAACAGGTGAAGCGGATAAA

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
03833	CCNF	GCTCACGGACAACACTTACAA
03834	CCNF	TCAGGCCAGGAAGTCATGTTT
03835	CCNF	CGCACCTTTCATCTGGCTCTT
07375	CDC23	GCAGGAGGTAATATGCTATAA
07376	CDC23	GCTCGTATATTGTTTCCCAA
07377	CDC23	CCTGTCCATAAACAGCGATTT
07378	CDC23	CCAGGCTTATAGACATGCCAT
07379	CDC23	GCCCAGTGTTACATCAAATAT
07299	CDC34	CCAGAATAAACTTGCCGAGTT
07300	CDC34	TCGGGAGTACACAGACATCAT
07301	CDC34	GAGTGTGATCTCCCTCCTGAA
07302	CDC34	CTTTCGGTTCCTGACCAAGAT
07303	CDC34	ACGCAGAACGTCAGGACCATT
07702	CHFR	CCTGTTATCCTTGTTTGTA
07703	CHFR	CGCCATGAAATTCATCATAT
07704	CHFR	GCAGTGAAGAAGATGTGCAAA
07705	CHFR	GCATACCTCTATGAATCTTTA
07706	CHFR	GCAGCCTTTCTGCCACCTGTA
15213	CNOT4	CCCTGTAGTTTCTGGACGTTT
15214	CNOT4	CCAGTGCTTATGTAACCTATA
15215	CNOT4	GCCTCTTCACATCAGAAACAA
15216	CNOT4	GCCCTTGGAGATAGATGATAT
15217	CNOT4	CGGTGATAATTCCCAGCAGAT
19199	COPS5	CGCCTTTAGGACATACCCAAA
19200	COPS5	CCAGACTATTCCACTTAATAA
19201	COPS5	CCTGGACTAAGGATCACCATT
19202	COPS5	CCATGATCATTATGGACAGTT
19203	COPS5	GTCTCAGGTTATTAAGGATAA
72558	COPS6	CTTGAGAGAAAACCGCTGTCAT
72559	COPS6	CCGAAATATCGAGGTGATGAA
72560	COPS6	CCCTTGTCATTCTCAACATCT
72561	COPS6	CAGTTTGTGAACAAGTTCAAT
72562	COPS6	CGTGGGAAGAGAAGATTATCAT
07619	COPS8	CCACTAATGTAAGATACAGAA
07620	COPS8	CCTGGATGTTTCTTTAACAA
07621	COPS8	GCTCCATAATGACATGAATAA
07622	COPS8	CAGCCAATTATGGAAGCACTT
07623	COPS8	GCTGTGAAAGGCATATTAGAA
03391	CUL1	GCACACAAGATGAATTAGCAA
03392	CUL1	CGTGGTTATATCAGTTGTCTA
03393	CUL1	GCCAGCATGATCTCCAAGTTA
03394	CUL1	GATTTGATGGATGAGAGTGTA
06522	CUL2	CGTTTGACAGTTGATGTGTCTT
06523	CUL2	GCCCTTATTCAAGAGGTGATT
06524	CUL2	GCAGACTATATGGACTGCTTA
06525	CUL2	GCAAGCTACATCGGATGTATA
06526	CUL2	CCCTTGGAGAAAGACTTTATA
73343	CUL3	CCCTGTTGTAATTTGAGATTT
73344	CUL3	CCCAAATCAAAGGAAATAGAA
73345	CUL3	CGTAAGAATAACAGTGGTCTT
73346	CUL3	CGTGTGCCAAATGGTTTGAA

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
73347	CUL3	GCGGATAATGAAATCTAGAAA
06527	CUL4A	CCATGATATGTGGTCTAAGAA
06528	CUL4A	GCAGGTGTATAAAGATTTCATT
06529	CUL4A	GCCAAAGGTTAATGCAGGAAA
06530	CUL4A	GCAGAACTGATCGCAAAGCAT
06531	CUL4A	CCAGAATATCTTAACCATGTA
06532	CUL4B	GCCATGAAAGAAGCATTTGAA
06533	CUL4B	CCTGAATATCTACATCATGTT
06534	CUL4B	CGGGACTACATGGAAAGAGAT
06535	CUL4B	GCAGAATTTAAAGAGGGTAAA
06536	CUL4B	GCAATTCCTTCAGAAAGGTTTA
06537	CUL5	GCAGTAAACTTGCCAAATATA
06538	CUL5	GCAGACTGAATTAGTAGAAAT
06539	CUL5	GCTAGAATGTTTCAGGACATA
06540	CUL5	CGCTGTATTGTTTGCATGGAA
06480	CUL7	CGCTACTGTGAGCACTTTAAT
06481	CUL7	CCTGATCAACTGCCATGTCTA
06482	CUL7	GCACCTGAGTTCTAGACTCAA
06483	CUL7	CATGTTGAGTAGTCCTGATTA
06484	CUL7	GACATGCTCAATCAGGCGATT
39628	CYLD	CCCATTAAATTCAGTGTAGTT
39629	CYLD	GCAGCGTTACAGACAAACAAA
39630	CYLD	GCCCAATACCAATGGAAGTAT
39631	CYLD	CCCACAATTCAGCAGTTGTTA
39632	CYLD	GCGCTGTAACCTTTAGCATT
82853	DDB1	CCTTGATTGGTGTGTCAGTT
82854	DDB1	CGACTCAATAAAGTCATCAAA
82855	DDB1	CGACCGTAAGAAGGTGACTTT
82856	DDB1	CGTGTACTCTATGGTGGAATT
82857	DDB1	CCTATCACAATGGTGACAAAT
83993	DDB2	GCAGAGGTGGTGATTTGTAA
83994	DDB2	CCTCGCTACAACCTCATTGTT
83995	DDB2	GCTGAAGTTTAAACCCTCTCAA
83996	DDB2	TCTGGATTCTTACCGGATATT
83997	DDB2	GACACCATCAACATCTGGTTT
05022	DTX1	GCAGAGAGTCAATTTCCCTTT
05023	DTX1	CCACTGCTATCTACCCAACAA
05024	DTX1	CGGTGAAGAAGCTGAATGGTA
05025	DTX1	CAACAGCATGTGCGAGATGAA
05026	DTX1	GACCAAGAAGAAGCACCTTAA
04558	DTX2	CGGCAATAAGGATGGAAGTCT
04559	DTX2	CAAGACAGAGATGGACCGCAA
04560	DTX2	AGGCATGACGAGTGTTCTGAT
04561	DTX2	GCAACGGCAATAAGGATGGAA
73223	DTX3	GCTGTGTGTGTTTCATCAGATA
73224	DTX3	TGGCGAGACTTCTGACATCTA
73225	DTX3	CCGTGTGTCTATCCTCATAGA
73226	DTX3	CTATGAGAAGTACGGCACCAT
73227	DTX3	GCAGAGAAAGAGCTGAAGAAA
73208	DTX3L	GCTGATTTAATGCCAGTCTAA
73209	DTX3L	GCCAAATACATGATGAATGTA

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
73210	DTX3L	CCGATGGACATTGATAGCGAT
73211	DTX3L	CGCGTATTAGGAGTCTCAGAT
73212	DTX3L	CACTTACATCAGACCAAGTTT
38864	DUB3	GCCTGAGTTCAACGTCAGAAA
38866	DUB3	GCACCTTAGACCACTGGAAAT
38867	DUB3	CCTCTTGTCTATGTCCTCTAT
38868	DUB3	GCAGGAAGATGCCCATGAATT
38869	DUB4	CCACGGCATTTCAGACACTTT
38870	DUB4	CCACCAAATATTTGGAGGCTA
38871	DUB4	CAACGGACATTACTTCTCTTA
38873	DUB4	CGAAGAACTCAATGGAGAGAA
34244	DZIP3	CGGAAATTGAAGGATGCTTAT
34245	DZIP3	CCACCTCTCATGGAGTACAAT
34246	DZIP3	CCATACTTACTGTTCTCTCAA
34247	DZIP3	CGATTTGTAGTTACCTAGATT
34248	DZIP3	CCTCACATTAAGAAGTTCTTA
04587	E2-230K	CGATGATTCCCTATGGCTTCTA
04588	E2-230K	GACATCAAGAAGCTACAGGAA
04589	E2-230K	CGGGTCTCTTCTTCGATGATT
04590	E2-230K	TGTGTTGAGATGCTGCCGTTT
03408	EDD	GCTGTAGATTTCAACTTAGAT
03409	EDD	TGACAGCAGAACACAATAATT
03410	EDD	GCCTTACAGAAATGCCCAGAA
03411	EDD	GCTCGTCTTGATCTACTTTAT
03412	EDD	GCCATTAGAAAAGAACACAAA
09882	EP300	CAGACAAAGTCTTGGCATGGTA
09883	EP300	CAATTCCGAGACATCTTGAGA
09884	EP300	TACACTAGAGACACCTTGAT
39883	EP300	CCTCACTTTATGGAAGAGTTA
39884	EP300	CCAGCCTCAAACCTACAATAAA
39886	EP300	CCCGGTGAACCTCTCCTATAAT
39887	EP300	CGAGTCTTCTTTCTGACTCAA
03719	ERCC8	GCAGCAGTGATGAAGAAGGAT
03720	ERCC8	TGGAATTAACACCCTTGACAT
03721	ERCC8	GATGGTGTGATTGTACTTTAT
03722	ERCC8	TGATGATGAGACTACAACAAA
03723	ERCC8	GCGCTAATGCTTGAACCTTTT
83298	FANCL	GCCTGAAGATTTACAACCTGAA
83299	FANCL	GCCTTATTGAAGAGATAGGAA
83300	FANCL	CCTTTCCATCAAATATGCTTA
83301	FANCL	GCAGAATTGCATTAGGTAATA
83302	FANCL	GCTGAGCAGGAACATACATTT
21999	FBXL11	GCCGCAGAGAACTTTGTGAAT
22000	FBXL11	GCTTGAGAGATCCTCTGATTT
22002	FBXL11	CCCACAGGGATAGAAGATGAA
22003	FBXL11	GCTGATACAGAAGATCAGCTA
33854	FBXL12	CTCTACACGATGCGACCTAAA
33855	FBXL12	GTCTATGGACTGGTGGATGTA
33856	FBXL12	CCTCCGAGATGTGCGCAAGAT
33857	FBXL12	CCGGCTCCATTCCCTGCGGAT
33858	FBXL12	GCCTCACTATGCCCAAGCTCA

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
62333	FBXL19	CGCTGGATCGAGGATGTTAAA
62334	FBXL19	TGCACCTCAATCTTGCTGGTT
62335	FBXL19	GCACCTGAAGAAGAAACCAAA
62336	FBXL19	GCTGCTTCTCAAGGACAGCTA
62337	FBXL19	GCGGGAGCTGTGTATCTGCAT
04276	FBXL2	GAACCTCAATGGATGCACAAA
04277	FBXL2	GATAACCGACAGCACACTCAT
04278	FBXL2	CTCTCCATTCACTGTCTCTAAA
04279	FBXL2	TGGCCTACTTTAATTACAAAT
04280	FBXL2	GTCTATTACAAACAGCTCCTT
73318	FBXL20	CCTAAATGGTTGCCCTGAAAT
73319	FBXL20	GCCAGGAATTGCCATGAACCTT
73320	FBXL20	CTTAGCAAGTTCTGTTCCAAA
73321	FBXL20	GCCCACTAATCACAGATGCAT
73322	FBXL20	GCCGAGTAGTGGAGAATATTT
04286	FBXL21	AGACTGTGTGAGAGAAGGTTA
04287	FBXL21	CTTTGTGTAGCTGACCGTTGT
04289	FBXL21	CCCTGTTACTCACCTTTATTT
04281	FBXL3	CGGATGTGAAATAACCAGTTA
04282	FBXL3	CCAAGAACTGAGGACTACAA
04283	FBXL3	CGATTAGAACATTTGCGCATT
04284	FBXL3	GCCAGCTACATCTTATTTGAA
04285	FBXL3	GCCTGACTTGTGGAGATGTTT
04290	FBXL5	CCTGATGATGAATGGGTGAAA
04291	FBXL5	GCTGAAGATTTGGCTGATATT
04292	FBXL5	GTACAGGAACAGCTTTAAGAA
04293	FBXL5	GCACTTTACTCATAGCACATT
04294	FBXL5	GTCAGAACACTCCACAGGTAT
04295	FBXL6	TCCTCGGCTCACTTTCTCTCAA
04296	FBXL6	TGAACCTGATGTGGCTGCCCA
04297	FBXL6	CACTGCGAGAAGTGGACTTGA
04298	FBXL6	CTGCGCTTACTGGATCTTCGT
04299	FBXL6	CCCTGTGCTCTCTTAACCTCA
04300	FBXO11	CAAGGAGTAATAGAAGAGAAT
04301	FBXO11	CGCCTCAACTTCAACTACAGA
04302	FBXO11	GCAGTATGTGTTAGTGGTCAA
04303	FBXO11	GAGTGCTAGAAGACAATGATA
04304	FBXO11	GAGAGTTTCCAGCAGTTGTAT
11183	FBXO15	GCAAAGTACAATCTGAGTCAT
11184	FBXO15	CCTTTATCTTAGTATCGCAAA
11185	FBXO15	GCTGGTTATTGGAAGAAAGAA
11186	FBXO15	CCACCAAACATAGACTCCGAT
22434	FBXO17	CATTTAGTTCATTTGCCTGCA
22435	FBXO17	GCCGCAATCTCATCTTCAACT
22436	FBXO17	GCAAGGGCATCCGCTACGTAT
22437	FBXO17	GCCCAGCAACGAAGACAAGGA
22438	FBXO17	GTGGTCAAGTTCTCAGCCTCA
51663	FBXO18	CCTCGTCATTAAAGACAAATT
51664	FBXO18	CCTGACTCATACTATGGGCTT
51665	FBXO18	CGCTGAAATGAGACGGTTTAA
51666	FBXO18	CGTGCCTATTTGGTGTAAAGAA

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
51667	FBXO18	GCTGATTCTGAATCACAAGAT
04305	FBXO2	ACAAAGTGGGCTCTCAATAAA
04306	FBXO2	CACCGTTAAGCTACTGTCCGA
04307	FBXO2	TCGTGGTGAAGGACTGGTACT
34284	FBXO21	CGGGCTCATTATGAAGCATAA
34285	FBXO21	GCCTTCCCTTATGAAACACTA
34286	FBXO21	CCTGGACATCTTTGACTACAT
34287	FBXO21	GCTGGATCTCTATCTGGCAAT
34288	FBXO21	CGGCAACAGAAGATCTTAAAT
04308	FBXO22	CTTCGTGTGGTCCTTGTCTTT
04309	FBXO22	GTAGCAATCGACCTCAGGAAA
04310	FBXO22	CCCAAACAATGCCAAGTCCTT
04311	FBXO22	CGCATCTTACCACATACAGTT
04312	FBXO24	GTAGTGAATGAGACCCAGCTT
04313	FBXO24	TCATGCAAGGAAATAACAGAT
04314	FBXO24	CCTGTCGCTATGTTGTGTTGT
04315	FBXO24	CATATCATCTCATTCCCTCCCA
04316	FBXO24	GCATGACTTCCAACCAGAGCA
04317	FBXO25	TCAGAAACATTACCCAGCGAA
04318	FBXO25	CCACCACAATCCTCGCTTAAT
04319	FBXO25	GCCATTCTTGTCTTAGGGATT
04320	FBXO25	GTACGGAGACACACTGCATTT
04321	FBXO25	GAAGTCTGTATTAGTGGGAAA
07792	FBXO27	GAAGTCTGTATTAGTGGGAAA
07793	FBXO27	CCACGTGTTCTCCAACATCAA
07794	FBXO27	TGGAACAACAATGCCTGCCTT
07795	FBXO27	CCAACCAGACTGTTCTAGATA
04327	FBXO3	CCCATCATCAGAGACCAAATT
04328	FBXO3	AGGAAGATACATTGACCATTA
04329	FBXO3	CCTGGGTTCTATGTGACACTA
04330	FBXO3	CATTCTCTACAACATCAGGAT
04331	FBXO3	CACTGTCTAATCACTATCGTT
73288	FBXO34	GCTGTGAATAACTGCCTGTTT
73289	FBXO34	CCACAGCTTTAATCGGGCAAT
73290	FBXO34	CCACATAACATCAAGTGTCTT
73291	FBXO34	CCAAGAGTTTGTAGTGCCCTTA
73292	FBXO34	CGGTAAAGCATCATCTCGAAA
34319	FBXO4	CCAGGTTTGGGAAGAATTGAAT
34320	FBXO4	GCTGCATCTGAATCTTCTAAA
34321	FBXO4	CGGGAAGACCATTGTTGGTTT
34322	FBXO4	CGATTGATGTACAGCTATATA
34323	FBXO4	CCTATATCTGAGGTCACTGAT
73323	FBXO44	GCCAACAGCTTTACGGACATT
73324	FBXO44	CCCAATGACCAGGTCAAGAAA
73325	FBXO44	CTCCCACACATTCTCCAATA
73327	FBXO44	AGGTCAAGAAATACTTCGTTA
04332	FBXO5	TCGCTGTAATTCACCTGCAAA
04333	FBXO5	CGGATAGTTGTAAAGAAGAAA
04334	FBXO5	CGGTGTAGTATCCTGAGGTTT
04335	FBXO5	CGAAAGCCTCAAAGCCTGTAT
04336	FBXO5	CCAGACCAATATCCCAACAAA

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
07731	FBXO6	TGTGGTAACTTACTGTACAT
07732	FBXO6	GCATGGCAAATTGATTTCAT
07733	FBXO6	TGTGCTGAAGAGGATATGTTT
07734	FBXO6	CCTACGAAATGTGCCTCAAGT
04337	FBXO7	CGCCTAATATACCTTCATCCA
04338	FBXO7	GCCACATTCATTAGAGACCTT
04339	FBXO7	CCCTGCTCTTGGTTCTCCTCT
04340	FBXO7	GCTGACTGTTCTGATGCCAAT
04341	FBXO7	CCATCGTCAACTCACACCATT
34314	FBXO8	CCTGATTTAATGCGAGAACTT
34315	FBXO8	CTACTTTATGTCCAAGGGTAT
34316	FBXO8	GAGAGTATCTTGAAACTCTTA
34317	FBXO8	CTGGTCCATATACAATAAGAA
34318	FBXO8	TCTAACACCAATCATCGTAAA
34309	FBXO9	CCTGATATAGAGTTCAAGATT
34310	FBXO9	CCTCAGATCATTGGAGCAGTT
34311	FBXO9	CCACGTTTAAAGAACTAGGAAT
34312	FBXO9	CCAGAGGTTCAACAAACTCAT
34313	FBXO9	CCAGGTGTAAGCTCTAGCAAT
04342	FBXW11	TCGTACTCTCAATGGGCACAA
04343	FBXW11	GAACGAATGGTACGCACTGAT
04344	FBXW11	GTCCAGTAAATTGCTAAGTAA
04345	FBXW11	CCATCAGAAGGAAACTATCAA
04346	FBXW11	GTGTCATTGTAAGTGGCTCTT
06546	FBXW2	GAACCAAAGTTCTCACCTAAT
06547	FBXW2	GCAAATACATTGTCTGTAGTT
06548	FBXW2	GCCTTTGAAACCTCGTCATTA
06549	FBXW2	GCAGACTTCACTGTGAAAGTA
06550	FBXW2	GCAGCGGTGAAGTTTGATGAA
04585	FBXW4	CTCACCACCAAGCATCTCTAT
04586	FBXW4	GAAGTGGAGATGCAGTCAGAT
04495	FBXW5	CGTGCGGAACAAGCCCTATGA
04496	FBXW5	CATAGACATACACGGACACAT
04497	FBXW5	CGACGAGTGCTTCTTCATCTT
06555	FBXW7	CCTAAAGAGTTGGCACTCTAT
06556	FBXW7	CCAGAGAAATTGCTTGCTTTA
06557	FBXW7	CCAGTCGTTAACAAGTGGAAT
06558	FBXW7	CCAGAGACTGAAACCTGTCTA
04322	FBXW8	GCAGCTTATGAGGATGGGTTT
04323	FBXW8	GTGTGGTCATTGCGGGATATA
04324	FBXW8	CCTTCCCTATAACCATGTTT
04325	FBXW8	GCCACAAAGAACAGCTCAGAT
04326	FBXW8	CCGGAGAATGAAATGAATGAT
07712	FLJ11011	GCATGAATTAACATGCGTCTT
07713	FLJ11011	CGCTCTCAGTCCAATCAGTTT
07714	FLJ11011	CCTCCTGGAATGACCTTAAAT
07715	FLJ11011	CAGGTCATGTTTACTGGTGAA
07716	FLJ11011	CATCCTCATGTTTATAGCAAT
52738	FLJ30092	CCCACCATTGAAGACATTAAA
52739	FLJ30092	GCCTCTTCATAAACTGTCCAT
52741	FLJ30092	CCTCACCTACAATTACGTCAA

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
52742	FLJ30092	GCTCTCGATATTTATCCACAA
34119	FLJ31951	AGGTGATTATTGAGTCTTGTA
34120	FLJ31951	CCTCTCTCTATGAATCGGTTT
34121	FLJ31951	GCAGGGTTATCGAGCTTTTCAT
34122	FLJ31951	CTTTGGAGAATGGACAGTGAT
04992	FLJ34154	GCTAGGTTTATCTCTAGTATT
04993	FLJ34154	CGCTGCATTCTCGTTGTCTTT
04994	FLJ34154	CGCTGCCTGTACCTTAGATTT
04995	FLJ34154	CCTCAATTTAGACCAAGTATA
04996	FLJ34154	GCCCTCATAAATAGTGACATA
34169	FLJ36180	GCCAGGAAGAAACAAAGACTT
34170	FLJ36180	CCCAGCAAATCAGAAGCCTAA
34171	FLJ36180	CTCACCTGTTTCATCTGCTTA
34172	FLJ36180	TGGACTATGAATCTGGACATA
34173	FLJ36180	GAGGAACATAACACACCTTTA
83858	GAN	CCACATAATATGGGATGCAAT
83859	GAN	CCCGTACATCAGGACAAAGTT
83860	GAN	GCAAGACATAACTTCGGAATT
83861	GAN	CCTGGACAAAGCAACCTGATT
83862	GAN	CCGTGACTTTGCACTACATTA
36864	GPS1	CCGAGACATCATCTTCAAATT
36865	GPS1	GAGAACCTTTAACGTGGACAT
36866	GPS1	CCGCAACCAGATCCATGTCAA
36867	GPS1	CGCTGCCGGTTCAGGTGTTTA
36868	GPS1	CCGTGCCCTCATCCAGTATTT
03413	HACE1	GCTGTGCCATATACTCCAAAT
03414	HACE1	CGGAAGGATTTGTTATGTTTA
03415	HACE1	GCAGATTGTCAGGATGTTATT
03416	HACE1	CCAGAAATTGATGTGAGTGAT
03417	HACE1	GCCAGTACCTAAAGATTCTAA
04083	HECTD1	GCACTTTCTTACCAGCCCTTT
04084	HECTD1	GCCACGAACAACATGAATCTA
04085	HECTD1	GCCCTGATAGTTCTGTTTCGTA
04086	HECTD1	CGAGATTTATACGATGACCAT
04087	HECTD1	TCTCTCTTTGTTTGGCATATA
07758	HECTD2	CCTTAGAACTCTGATACAAT
07759	HECTD2	GCTGTGTATGATACCTTACTT
07760	HECTD2	CCCAGAATTAAATGCTGCATT
07761	HECTD2	CGAAGAAAGAAGCTGCTGAAA
07762	HECTD2	GCCTCATTTAACACCATTGAA
01523	HECW1	GACCTCACTTTCACTGTTAAT
01524	HECW1	CACCCAGATGATGAGGAGATT
04789	HECW2	GCCCAAACATTTCTTTGAGAT
04790	HECW2	CCAGGGAAGTTAAAGTTAATT
04791	HECW2	GCACAATACTTGGAGTCAATT
04792	HECW2	GCTTACAATGACAAGATTGTT
04793	HECW2	CCCTTATCTTAAGATGTCAAT
07243	HERC1	GCCACATTTAGTTACTCTAAA
07244	HERC1	GCTGATAAACTGAGTCCCAAA
07245	HERC1	GCCCAGAATATCACTGTCCTT
07246	HERC1	GCATTCATTTACTCGAACTAT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
07247	HERC1	GCCATTGAATATCGACTTCAT
07380	HERC2	CCAGAGGATATTTAAACCAAA
07381	HERC2	CCTGGCATAATGGAGTCATTT
07382	HERC2	CGGACTCTACACAAGATTATT
07383	HERC2	CCTATGAAGATTGATTCTCTT
07384	HERC2	GCAAGTAATTCTAAGCCAAAT
00291	HERC3	GATGTGTTTCTGGGATTGTAT
00292	HERC3	AGGGTGTTATTTGAGAAGTTA
00293	HERC3	CCAAGCACATTATACCAGTTT
00294	HERC3	CAAGGATAACAGGCAGGAATT
00295	HERC3	CGAGAAAGCTATGGAGTGATT
34299	HERC4	CGCAACAAGTTTGGTCAGCTA
34300	HERC4	GCCTATGGAATGTTGGCAGAT
34301	HERC4	CGGTTCAACAAGCAACAGGAA
34302	HERC4	CCATCCTTGGATGATTTGAAA
34303	HERC4	GCTTAATTCTAGTGGTGCCTA
04168	HERC5	GAAGGACTAGACAATCAGAAA
04169	HERC5	GCTGAGGAGAATGGTAATGTT
04170	HERC5	GATGCCTGTTTATTTGGACTT
04171	HERC5	GCGACGAAGACATTATCAAAT
04409	HERPUD1	CACCGTTGTTATGTACCTGCA
04410	HERPUD1	CCTCCTCCTGACGTTGTAAAT
04411	HERPUD1	TGTGCAATGTGAAGAGTCCTT
04412	HERPUD1	GTGTGGATGATGATATGCTTT
07455	HIP2	GCCATTCAAATTGTTGGTGTT
07456	HIP2	CCAGAAACATACCCATTTAAT
07457	HIP2	CCGCACGGTATTATTGTCATT
07458	HIP2	GCTATGGGCTTTGATAGGAAT
07459	HIP2	GTAGCAAATCAGTACAAACAA
34149	IBRDC2	CGGGTTTATATCGAACGCAAT
34150	IBRDC2	CCCATGTATAATCTGTTGTGT
34151	IBRDC2	GTGGACCAGTTTCAACTTTAT
34152	IBRDC2	CCACTCAAGAGCATCAGTGAT
34153	IBRDC2	GCTGAGATTGCCTGTTTGGTA
02087	ITCH	CCAGAAGTCAAGGTCAATTAA
02088	ITCH	GCCTATGTTTCGGGACTTCAAA
02089	ITCH	GCCGACAAATACAAATACAAA
02090	ITCH	CCCAAGAATCAGAGGTTATAT
04423	KIAA0317	CGCTCCCTGCATAAGAACATA
04424	KIAA0317	CGCAGTCATCATTTGTCCTTT
04425	KIAA0317	CCCAAATCATAGGACTGCGTA
04426	KIAA0317	GCCCAATTCCAACGTAGTAAA
06489	LMO7	GCCTCTTTAGATTACATAGAA
06490	LMO7	CCTGGGTCTTTGTTATCATTT
06491	LMO7	GCGTCATTAAGAAGATCAATA
06492	LMO7	GCTATTAACAACACCAAGTTT
06493	LMO7	CCGGTTTATACAGAAGCAGAT
73123	LNK	GCCTCCTAGAACTACACTAT
73124	LNK	CGGTGCTTGTATAACTGTAAA
73125	LNK	CCACTATTAGAAGCAGATCAT
73126	LNK	CCTTTGAGAGATCCACTATTA

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
73127	LNK	GCCAGGAGACATCATTCTAAA
73238	LOC283514	GCGAGACTTCATTTCTACAAA
73239	LOC283514	GCCGGCTGATTGGATCATCAT
73240	LOC283514	AGGAAACAGGAGAGGCATGAA
73241	LOC283514	CCTGGAGGATATAGTTCTGGT
73242	LOC283514	CTGCGGCAGATCCATAGGGTT
34163	LOC286480	GACCAAGAGATACGCAACGTA
07753	LOC92912	GCACAAAGACTCCTTGAGCAA
07754	LOC92912	GCCACCTTAGTCAAAGGCAAA
07755	LOC92912	GAGCCCAACAATCCTATAATT
07756	LOC92912	CTGGATGTTGAGATGCTAGAT
07757	LOC92912	CCATTTGTTTCGAGTGGTGTTA
22382	LRR29	CAGAACTCACAGACAACGGCT
22383	LRR29	CTGACCTGACCCTAACACTCT
73153	LRSAM1	GCAGATCAGGAGCCAGATTAA
73154	LRSAM1	GCAACCATCAAGGTTCTAGAT
73155	LRSAM1	GATGAACGATTCCAGCAGATT
73156	LRSAM1	CGTGGAAGGAATCAACTGAT
73157	LRSAM1	TGATTCAGTATCAACGGCTTT
03376	MDM2	CTTTGGTAGTGGAATAGTGAA
03377	MDM2	GATTCCAGAGAGTCATGTGTT
03378	MDM2	CGATTATATGATGAGAAGCAA
03379	MDM2	CTGTGTGTAATAAGGGAGATA
03380	MDM2	CTCAGCCATCAACTTCTAGTA
52948	MED8	CCCTGGATTTCATGTTTCTTAT
52949	MED8	CCTGGGTTTCATTCTGGCTAT
52951	MED8	CACTCTGAACAAGGTCTTGAA
52952	MED8	GAGAAGCAACTGACGACAGAT
33789	MGRN1	CCCTTGACGTTCTCTCTGATT
33790	MGRN1	CCTGAGAGTTTCATAACAGAA
33791	MGRN1	TGGAGCATGATGAGCACTCTT
33792	MGRN1	CGGAACTACTTTGCTTCGCA
33793	MGRN1	GATTGACTTCTCGGAATGGAA
04553	MIB1	CAGAGGATAAAGATGGTGATA
04554	MIB1	CCTCTGGGATAATGGTGCTAA
04555	MIB1	GCAATAAGTAAGAAACGTGAT
04556	MIB1	CAAGGATAATACCAATGTCAA
04557	MIB1	GCCGAGTACAACAGATTTATT
34114	MIB2	GCAGTGCTACATGCACAACAA
34115	MIB2	AGTCCCAAAGTTTCCAGGCAT
34116	MIB2	GCGCTAGCTGTGAGAAAGATT
34117	MIB2	GAAAGTGTTTGGAGACGGGAA
34118	MIB2	GAGGTGCCAAACATCGATGTT
19809	MID1	GCTGGAAATGTGTTTATTGAT
19810	MID1	CGGCACCAAGTACATCTTCAT
19811	MID1	CCATCGTCTGATTGAGCCAAT
19812	MID1	GCTATGACAAATTGAAGCAAA
19813	MID1	CGTCACCCTACAGAACATCAT
33764	MID2	CCCTTATGTTTCTGGGATGAA
33765	MID2	CCACCATCTATCCGAGAAGAA
33767	MID2	CCTCCTGGATTATGACAACAA

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
33768	MID2	GCAGAACATTATTGATCGCTT
33794	MKRN1	GCAGCATATCAAATCGTGCAT
33795	MKRN1	CGTATAGTGTAGTGTGCAAGT
33798	MKRN1	ACCTCTCTGACAGTCCGTATA
34289	MYCBP2	GCGTGTCTATACCTGTGAAAT
34291	MYCBP2	CGTCTCTAACACCTGTGGATT
34292	MYCBP2	CCAAAGAACATGCTCCTATAA
34293	MYCBP2	GCTATCAAGATGACAATCTAT
33819	MYLIP	GCTTAACTTAGAGTCAAGTT
33820	MYLIP	CGACTGGGAATCATAGAAGTT
33821	MYLIP	CCTTGGCAAGAAATATGTCTT
33822	MYLIP	CCAGACCAAGTTTGGAGACTA
33823	MYLIP	CCCAATTAATAGGATAGCTTA
60703	NCOR2	GCCTGTCTAAAGCCTTAATA
60704	NCOR2	CCTCTATTACTACCTGACTAA
60705	NCOR2	GCTTCACAACACAGGCATGAA
60706	NCOR2	GCAGCGCATCAAGTTCATCAA
60707	NCOR2	GCAGTGTAAGAACTTCTACTT
07550	NEDD4	GCCTTTCTCTTGCTGCTATAT
07551	NEDD4	CCGGAGAATTATGGGTGTCAA
07552	NEDD4	CCGTCAAGTAAGTTGGATGTT
07553	NEDD4	GCTGAAGTATACGGTTCAAAT
07554	NEDD4	CGGTTGGAGAATGTAGCAATA
00904	NEDD4L	CCTGTTTGTATGCGTTTGCTA
00905	NEDD4L	CGCCTTGACTTACCTCCATAT
00906	NEDD4L	GCGGATGAGAATAGAGAACTT
00907	NEDD4L	GCGAGTACCTATGAATGGATT
00908	NEDD4L	GTCAGAAATAATGGTCACAAA
06497	NEDD8	GCTCATAATGAGGCATCATAT
06498	NEDD8	GAAAGGAGATTGAGATTGACA
06499	NEDD8	GCAAGCAGATGAATGATGAGA
06500	NEDD8	CAGCAGCTGATTACAAGATT
06501	NEDD8	CCTACAGACAAGGTGGAGCGA
34224	NEURL	CTCGGCTGTTATGCTGTTCTT
34225	NEURL	CCAGAACCTCAAAGACTCTAT
34226	NEURL	CGATGAGTGCACCATTTGCTA
34227	NEURL	CCGGTCCTCATCTACGAGCAA
34228	NEURL	GTTTGCCATGAGGGCAACAT
14903	NFX1	GCCTCAGTTGTCCCAGTTATT
14904	NFX1	GCAGAAATGAAATCCACATA
14905	NFX1	CCAGTATATCATTCTTGTCAT
14906	NFX1	GCAGAGAAGATACCCACAGAA
14907	NFX1	GCCGTGAATAAGGGAAAGAAT
34184	NHLRC1	GCTCCATCAAAGTGTTTGATT
34185	NHLRC1	CCTTCGGAGAAGTGAAGGTT
34186	NHLRC1	CCATGGTCACTCATGGTCTTT
34187	NHLRC1	AGCCTCTACTTTCCCTCCAAA
34188	NHLRC1	CGCGCATCAGTTTGGAGAGAA
04211	OTUB1	AGGAGTATGCTGAAGATGACA
04212	OTUB1	CCGGCCTGGACACTACGATAT
04213	OTUB1	TGTGGTTGTAAATGGTCCTAT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
04214	OTUB1	CACCACCAATCCGCACATCTT
04215	OTUB1	TGTTTCTATCGGGCTTTCGGA
22409	OTUB2	TGGGCTGCTATGTCTCTGTAT
22410	OTUB2	CCTTCCGTTTACCTGCTCTAT
22411	OTUB2	CGAGATGGATACCGCCCTGAA
22412	OTUB2	CATCCCACTACAACATCCTTT
22413	OTUB2	TGTGGTGGAAGTGGTAGAGAA
04447	PARC	CCTTGACCGTTTCTCCAGTTT
04448	PARC	TCTGTAGTGCTTCTGTTTGC
04449	PARC	CCATCTTTCAGCCCTACATTT
04450	PARC	GCAGGTTCTCAGTAGTCGATT
04451	PARC	GCTGGAATGAGTACCTGACAA
00281	PARK2	CGTGAACATAACTGAGGGCAT
00282	PARK2	CGCAACAAATAGTCGGAACAT
00283	PARK2	CGTGATTGCTTAGACTGTTT
00284	PARK2	CTCCAAAGAAACCATCAAGAA
00285	PARK2	CTTAGACTGTTTCCACTTATA
36999	PHF21A	GCCCAGAATAACATTCTTATT
37000	PHF21A	CCCATCAAAGTACCACAGTTT
37001	PHF21A	CCAGAGACCTACCATTGCTAT
37002	PHF21A	CCTGGAAGTTTAGCAATTGTT
37003	PHF21A	GCTCAGCAATTCCATAAGTAA
22039	PHF21B	GCACTCTTATGTCACCCACAA
22040	PHF21B	CCTGGTTACCACGGAACATTT
22041	PHF21B	GTTAGGCCAAAGACTCTGATT
22042	PHF21B	GTCATCATCATTACAGCCTCAA
22043	PHF21B	AGTGCAGAAATGCCTGGAGTT
04591	PJA1	GAAGTCCCAATGCACAGATCA
04592	PJA1	GCGAGGAGTGACCAAGTGAAA
04593	PJA1	GCCAAAGTACCCTGAAGACAA
04594	PJA1	CCAATCAGTCAGTTAGCCTAA
03865	PML	CAATACAACGACAGCCCAGAA
03866	PML	CACCCGCAAGACCAACAACAT
03867	PML	GCCAGTGTACGCCTTCTCCAT
03868	PML	GTGTACCGGCAGATTGTGGAT
03869	PML	GTGTACGCCTTCTCCATCAAA
06592	PRPF19	GAACGGATGTGGAAGGAAGAA
06593	PRPF19	CCTGTCTCTAATCATGTTTAT
06594	PRPF19	CCTCAAGTTCTACAGCCTGTA
06595	PRPF19	CGGCTCATCGAGAAGTACATT
06596	PRPF19	CCGATGCCACTATCAGGATTT
03870	PSMA1	GCAATGGAAGCTGTAAACAA
03871	PSMA1	GAAAGGGTCTGTATAATCATT
03872	PSMA1	CTGCTGATGCTAGACTGTTAT
03873	PSMA1	GTTCCCAATCAGCTCGTACTT
03874	PSMA1	CCAGATACCAACACAACGATA
03875	PSMA2	AGGGCAAATGACAGAGGATAA
03876	PSMA2	CCATTCATACAGCCATCTTAA
03877	PSMA2	ACTATGTGAATGGGAAGACTT
03878	PSMA2	CTGTATGATGAGCGAAGTGTA
03879	PSMA2	AGAACCAATTACCAAGCATAT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
03880	PSMA3	CAAGCTGCAAAGACGGAAATA
03881	PSMA3	GCAGTTTCATGTTAGGGTCTT
03882	PSMA3	AGAAATGACCTGCCGTGATAT
03883	PSMA3	GTACATGACGAAGTTAAGGAT
03884	PSMA4	GATGCTAATGTTCTGACTAAT
03885	PSMA4	GTACTAAATAAGACCATGGAT
03886	PSMA4	GCAACACTAACAAGAGAGAAT
03887	PSMA4	CATACTGAATTGGGTCCTTGT
03888	PSMA4	CTTTGGTGTTTCATTGCTGTA
03889	PSMA5	TGGGCTAATTGCTGATGCTAA
03890	PSMA5	GCATTATTATTTGGAGGAGTT
03891	PSMA5	CCTTTGGAGTAGCATTATTAT
03892	PSMA5	TCACTCATCATCCTCAAACAA
03893	PSMA5	AGAGGTTATCAAGGACATTTA
22369	PSMA6	GTAACAACAAACCAACATCAT
22371	PSMA6	GTTGTGTGATGACCGGAATGA
22372	PSMA6	TGACCGGAATGACAGCTGACA
22373	PSMA6	GATGACCGGAATGACAGCTGA
03894	PSMA7	TCGACTTTGATGGCACTCCTA
03895	PSMA7	TGAAAGAACAGTGCGGAAGAT
03896	PSMA7	GAGAAGTATGTTGCTGAAATT
03897	PSMA7	TCCATTCCATTTATTCACACT
46844	PSMA8	CAGAAATATACCCAAAGCAAT
46845	PSMA8	CTTCTGGTACTTATCATGCTT
46846	PSMA8	GTAGTAATAAACAGAGCCCGT
46847	PSMA8	TGGTGGAAGAAACATTGAACT
03898	PSMB1	GAAGCAAGACTAAAGATGTAT
03899	PSMB1	CGGATCTGCATAGTGACCAAA
03900	PSMB1	TGCTCTTATCACCAATCAGTT
03901	PSMB1	GCGGCTGGTGAAAGATGTCTT
03902	PSMB1	GCTTTGATCCAGTAGGGTCTT
03935	PSMB10	GATCACAAGACTGGCGCCAA
03936	PSMB10	CGGACAAGAGCTGCGAGAAGA
03937	PSMB10	ATACGCGAGCCACTAACGATT
03903	PSMB2	TATTACATGGACTACCTGGCA
03904	PSMB2	AGATGCGAAATGGATATGAAT
03905	PSMB2	GCAGCTAAGTTACACGCCGA
03906	PSMB2	ACCGATACTACACCCGACTA
03907	PSMB2	CGCACTCTTGATAAATGGTTA
03908	PSMB3	GATCAAACCTTATACCCTCAT
03909	PSMB3	CTGTATGAGTTGAAGGAAGGT
03910	PSMB3	GTGCGCAGATCAAACCTTATA
03911	PSMB3	CACCTGCGCCGAACAAATGTA
03912	PSMB4	ATGGTGATTGATGAGGAGCTT
03913	PSMB4	GTGTTGAAATAGAGGGACCAT
03914	PSMB4	TGCGAGTCAACAACAGTACCA
03915	PSMB4	CCGCAACATCTCTCGCATTAT
03916	PSMB5	TCTGGCTCTGTGTATGCATAT
03917	PSMB5	CGAAATAAGGAACGCATCTCT
03918	PSMB5	CCAGACGGTGAAGAAGGTGAT
03919	PSMB5	CAATGTCGAATCTATGAGCTT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
03920	PSMB5	CCCATCCTCCATCCTATTTAT
03921	PSMB6	CGGGAAGGCATGACCAAGGAA
03922	PSMB6	CAGATACCCAAATTCGCCGTT
03923	PSMB6	CAATAAGAGATGCCCTGTACT
03924	PSMB6	ACACCTATTCACGACCGCATT
03925	PSMB6	ACTGACAAGCTGACACCTATT
03926	PSMB7	CACCTCTACAGCATCTATCCT
03927	PSMB7	ACATTGGTGCAGCCCTAGTTT
03928	PSMB7	GAGCATTGAGGCCAGTAAGA
03929	PSMB7	AGACACAGACATGACAACCCA
07268	PSMB8	CCACGTAAAGTCCAAGGAGAA
07269	PSMB8	CCACTCACAGAGACAGCTATT
07270	PSMB8	CCTTTAGATGACACGACCCTA
07271	PSMB8	CCTCTCTATGGGCAGTATGAT
07272	PSMB8	GTTGGGTGAAAGTAGAAAGTA
03930	PSMB9	CATCGAGTCATCTTGGGCAAT
03931	PSMB9	CGCTTCACCACAGACGCTATT
03932	PSMB9	GTAATAAACTCTCTAGGGCCA
03933	PSMB9	CTTTATCTATGGTTATGTGGA
03934	PSMB9	GCTGCAAATGTGGTGAGAAAT
50503	PSMC1	CCAAAGCAGTAGCAAACCAAA
50504	PSMC1	GCACCGTCCATCGTGTATT
50505	PSMC1	GAACCTATTGAGAAGTACCTA
50506	PSMC1	GTCACAGTGATGAAGGTAGAA
50507	PSMC1	GAACACTACGTCAGCATTCTT
07181	PSMC2	CCTGAAGGCTTTCAAGTGAAA
07182	PSMC2	GCGTGCTTCATTGAGTTATT
07183	PSMC2	GCCAGGGAGATTGGATAGAAA
07184	PSMC2	GCCTGCCTTATCTTCTTTGAT
07185	PSMC2	CCTAAGATTGACCCAACAGTT
20229	PSMC3	CCAAGCCATGAAGGACAAGAT
20230	PSMC3	GTGCAGATGTTTATTGGAGAT
20231	PSMC3	CCAGCCCAACACCCAAGTTAA
20232	PSMC3	CACGGAGCAATACAGTGACAT
20233	PSMC3	GCTCCTGGATGTTGATCCTAA
52038	PSMC4	GCCGCCAGAAGAGATTGATTT
52039	PSMC4	CCGCTGGTCATCGGACAATTT
52040	PSMC4	GAAAGCATAACAAGACTGTCAT
52041	PSMC4	CATCATCTTCATAGACGAGAT
52042	PSMC4	CTCCACTATCACTAGCAAGAT
20259	PSMC5	GCACAGAGGAACGAACATAAT
20260	PSMC5	CAAGGTTATCATGGCTACTAA
20261	PSMC5	GAAGATTATTCTCGGAAGAT
20262	PSMC5	CAAACAGATCAAGGAGATCAA
20263	PSMC5	TGCTCCATCTATCATCTTCAT
50598	PSMC6	CCTCTTACAAACCCAGAGTTA
50599	PSMC6	CCCATTACAAAGCATGGTGAA
50600	PSMC6	CCAGAGTTATTTAGCGTGTA
50601	PSMC6	GCTGGAGTCTAAATTGGACTA
50602	PSMC6	CATTGGTGAAAGTGCTCGTTT
58103	PSMD1	GCAGCCTTAGTGGCATCTAAA

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
58104	PSMD1	CCCAGAACCATTGAGTATAT
58105	PSMD1	GCACGTCAAGATGTTTATGAT
58106	PSMD1	GCTGTAAGTGATGTTAATGAT
58107	PSMD1	GCATCATCATTCTGAAGGATA
58074	PSMD10	GCTCAAGTGAATGCTGTCAAT
58075	PSMD10	CAAGGGTAACTTGAAGATGAT
58076	PSMD10	CCAGTGAATGATAAAGACGAT
58077	PSMD10	GAAGAGTTGAAGGAGAGTATT
03946	PSMD11	GAGTACAGATTGAACACATAT
03947	PSMD11	CCTCATTTGGTGCATCTGTAT
03948	PSMD11	CTGGTGTCTTTGTACTTTGAT
03949	PSMD11	GCAAGTCAAAGAGCAGAGCAT
03950	PSMD11	CCGACGTGGAAGGAAATTAT
58058	PSMD12	GCCAAGTATTATACTCGGATA
58059	PSMD12	CCTTCCTATCAAACCTTCGATT
58060	PSMD12	CCGAATAAGTGGTGACAAGAA
58061	PSMD12	CCTAGCTGTGAAGGATTACAT
58062	PSMD12	GTAGACAGATTAGCAGGAATT
58108	PSMD13	GCAGCCTGATTTAGCAGCTAA
58109	PSMD13	CCCAAGGAGATGGTCTCATT
58110	PSMD13	CAGGTTACAAAGGAAACAATT
58111	PSMD13	GAAATCATTCTTCACGTAGTT
58112	PSMD13	TGGCTGATTGACACCCTCTAT
06455	PSMD14	GTTGGCTTTCTGGTGTGGATA
06456	PSMD14	CAAGCCATCTATCCAGGCATT
06457	PSMD14	CATGGACTAAACAGACATTAT
58088	PSMD2	CCACATTTGTAGCGAACACTT
58089	PSMD2	GCTGGCTCAAATCGTGAAGAT
58090	PSMD2	CCCTATAACATGGCCCACAAT
58091	PSMD2	CGAAACATTATTCTAGGCCAA
58092	PSMD2	GAGGATAAACAGCTTCAAGAT
58118	PSMD3	GCAGGGCTTCTTCACTTCAA
58119	PSMD3	GCTGCGGAATTACCTACACTA
58120	PSMD3	CCCTATTTCTTCTGACTCAA
58121	PSMD3	GCCGCAAAGTGTTACTATTAT
58122	PSMD3	CCATGAGGTTTCTCCCAAAT
03938	PSMD4	CCGACAAGGCAAGAATCACAA
03939	PSMD4	CCTGAGAACAACGTGGGCCTT
03940	PSMD4	GCACGGAATATAGGGTTAGAT
58113	PSMD5	CCCTGTCAAGAATATCACTAA
58114	PSMD5	CCCTGCTTAACGAGAACCATA
58115	PSMD5	CCATACTATGTGAAACCTGTT
58116	PSMD5	GCTGTCATGGATAGTCCTCAA
58117	PSMD5	CCTGTATAGAAATGGTGACAT
58063	PSMD7	GCTGAGGAAGTTGGAGTTGAA
58064	PSMD7	GCCATCAACGAACTCATGAAA
58065	PSMD7	CCTGCACAACCTCATCAACAA
58066	PSMD7	GATGACAAAGACGATTCTGTA
58098	PSMD8	CGACACTATCAGGGATGAGAT
58099	PSMD8	GCTGACCAAACAGCAGCTAAT
58100	PSMD8	GCCAAACAGGTCATCGAGTAT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
58101	PSMD8	CCCAGCTCAAATGCTACTACT
58102	PSMD8	GATGACAGACTACGCCAAGAA
03941	PSMD9	ACCAGCTTAGACTTGTTCCAA
03942	PSMD9	GCGCAGATCAAGGCCAACTAT
03943	PSMD9	GCATGTTCTAATTCCACGTAT
03944	PSMD9	CGGCGCAAGGAGGAGATAGAA
03945	PSMD9	GCGGGTCTGCAAGTGGATGAT
58078	PSME1	CGCAATGCTTATGCTGTGTTA
58079	PSME1	GCCCAGTGAAGTGAATGAAA
58080	PSME1	CGGATTGAGGATGGTAACAAT
58081	PSME1	CCTGATCCAGTCAAGGAGAAA
58082	PSME1	GCTTCCACACTCAAATCTCTA
58093	PSME2	CCCAAGATTGAAGATGGAAAT
58094	PSME2	CCAAGGATGATGAGATGGAAA
58095	PSME2	CCAGACAACCATTTCCTCAAGTA
58096	PSME2	CTACAGATTCTTGCCACAGAA
58097	PSME2	CCAGAAGTCTGGACTCTCAAA
58068	PSME3	GCATCTTATCTGGACCAGATT
58069	PSME3	CGTGACAGAGATTGATGAGAA
58070	PSME3	CGAAGGTTGGATGAGTGTGAA
58072	PSME3	GAACCAATCTTAAACATCCAT
34229	PSMF1	GCTGGGTGGAACAACAATAAA
34230	PSMF1	GTCTGGAATCATCACACCTAT
34232	PSMF1	GCACTTATTGACCCCTTCTCA
34233	PSMF1	CCCTGAACCTTGATGATTATA
03467	RAD18	CCCTCGACATCCACTTTGAAA
03468	RAD18	TGCTTCGAGTATTTCAACATT
03469	RAD18	GAACCAAGAAACAAGCGTAAT
03470	RAD18	GCCCAAGGAAAGATGCTAAAT
05972	RAD23A	CCCTACCCTTATTCCATGAAA
05973	RAD23A	GATGTCCCTATCAGGGACTAT
05974	RAD23A	GCAGACCTTCAAGATCCGCAT
05975	RAD23A	AGGCCTATTTGCGGTGTGAAA
05976	RAD23A	GAAGAACTTTGTGGTCGTCAT
03951	RAD23B	CCAGCGTTACTACAGCAGATA
03952	RAD23B	GTGTACTAGATCCAGAACTT
03953	RAD23B	AGAAGCTGGAAGTGGTCATAT
03954	RAD23B	CTCCAGCATCAGCGACAGCAT
03955	RAD23B	CAGCAGATAGGTCGAGAGAAT
22384	RBX1	CTTCCCTGCTGTTACCTAAT
22385	RBX1	CTGCATCTCTCGCTGGCTCAA
22387	RBX1	ACTGCATCTCTCGCTGGCTCA
22388	RBX1	ATGTCAAGCTAACCAGGCGTC
04088	RCHY1	TGCTTTAGATATGACCAGGTA
04089	RCHY1	GCTCAATTAGGGCAGTATCAT
04090	RCHY1	CCCGTGTTGTTGCTCATGTCT
04091	RCHY1	GCAATGACTGTAATGGACGAT
34074	RFFL	CCGGCTATACAAGGATCAGAA
34076	RFFL	CCATGACATCTCTACCGAAAT
34077	RFFL	ACCTGCTTGGACTGTAAGAAA
34078	RFFL	GCAGTATGTAATCCGAGCTGT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
06436	RFP	CCACATAATGATTATGGCTAT
06437	RFP	CAGGGCTGAAAGAATCAGGAT
06438	RFP	GAATTAAGAGAGGCTCAGTTA
06439	RFP	GAGAAGATTGTTTGGGAGTTT
34254	RFP2	CCCTATTTGTTGTAGTCTGTT
34255	RFP2	GCTGTCTTTCAAACCTTCACTT
34256	RFP2	GCCAGTATGCAAAGGACACTT
34257	RFP2	GCCGTAAGGAAACTTCAGCTA
34258	RFP2	CTTGCTGTTATGCAAGCATAT
33690	RFPL1	CCACCTAATGGTGATAAGAGT
33691	RFPL1	TGATAAGAGTGTCTTGAGTAT
33692	RFPL1	GTCTGCTTCAAGTGCATCAAT
33693	RFPL1	CGAGAGATTTGACGTGTCCAT
33759	RFPL2	CGTCTGCCTCAAGTGCATTAA
33760	RFPL2	GCTTTGCTGTTACTCTTCCAT
33761	RFPL2	CTCTTCGTAGACCGCAAGTTA
33762	RFPL2	GTCTATACATTACAGGAGCGTA
33763	RFPL2	GCTGAAGAAGATTCTGCAGAT
33754	RFPL3	GCTCCTTCAATTCCACCTAAT
33755	RFPL3	CCGCTGACTTTCCTCTTAGTA
33756	RFPL3	CCCAAGCTGAAGAAGATTCTA
33757	RFPL3	GCTTTGCTGTTGCTGTTCCAT
29719	RFWD2	CCACCATCAATGTAACCTCCAT
29720	RFWD2	CCTTGGTATAATAGCACGTTA
29721	RFWD2	GCTAACAGTCAGGGTACAATT
29722	RFWD2	GCAGCCCAACTACAGATTCTT
29723	RFWD2	GCTGGAGTTACAAAGAAGATT
04139	RNF12	GTAATAACCTGAGTGAAGAA
04140	RNF12	GAATATACAGAAGGCAACAAA
04141	RNF12	GAGATAGCATAGCCAGCAGAA
04142	RNF12	GCTGATATAGTGATGGGCAAA
04143	RNF12	GCTCAGTCTCAAATCGAAATA
33894	RNF123	GCGCTACTATTGGGATGAATA
33895	RNF123	GCGGATTATATCAGTGCCGAT
33896	RNF123	CCCTCAAAGATGACCTTGCTT
33898	RNF123	GCCAGAACATTTGGACCAGTT
04794	RNF128	GTGCTTATATTGATCTGGAAT
04795	RNF128	CCGCATCATCTGGATATGCTT
04796	RNF128	CGCTGATAGAAAGAGGTAATT
04797	RNF128	GCAGTGGATGTTATTCCTCAT
04798	RNF128	GCTGTGTGCATTGAATTGTAT
07726	RNF130	GAACCTATTTTTGTGCATCAT
07727	RNF130	CCTGGCTTAGTGAACATTGTA
07728	RNF130	GCTGTAGTCATCTACAATAAT
07729	RNF130	CCTGGGAATTGTGCCGAATTT
07730	RNF130	CGGTTCTTTGTCCCTCCTAAT
11147	RNF133	CCCATGTTTCATCAGGCATTT
11148	RNF133	GCCTAATGACATAGTTCGTAT
11149	RNF133	CGTTGTGGTTATGATTGGTAA
11150	RNF133	CCCATTTGCAAATGTGATATT
11151	RNF133	GCATGTAATCCCAATACCATT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
33999	RNF135	CTTACCTTATGTGCCTTTCTT
34000	RNF135	CATCCATCCAACCTTTAACTT
34001	RNF135	GCAGTAGAGAAGAGCATCACA
34002	RNF135	GTGGACAATCAGGAGAAGCTT
34003	RNF135	CTCTTGTTGTGTGGAATGGAA
33774	RNF139	CCAGACATACTACGAGTCTTT
33776	RNF139	CCTTTCTGTTAGCTGCAACTT
33777	RNF139	GCTCGTATTACACCGTGTAA
33778	RNF139	CCACACGATATGTTTATCTTT
03442	RNF14	AGGTATGGTAAGAGAGTGATT
03443	RNF14	CCACCTTCATTACACTTAGT
03444	RNF14	CCCAAAGCTCTGAATAGTTAA
04413	RNF144	GAACGAGATTGAGTGCATGGT
04414	RNF144	CGATGATTTCTTCTGATACA
04415	RNF144	CCTTCTGATACACTACGATAA
04416	RNF144	GCTGTGATGGTGTCTACTGTT
04417	RNF144	CCACTCCCTTTGTACTTTGCT
04799	RNF148	CTGAAGATGTAACCAGATCTT
04800	RNF148	CCCAAGATGTAGTACGCATTT
04801	RNF148	GCCATTACATCATGTATCTAT
04802	RNF148	GTGATGATAAGCAACCTGAAA
04803	RNF148	GTTTGCTTTGACACATACAAA
07763	RNF152	CCCTGTAGTATAGTACGTGAT
07764	RNF152	CTTCACAACATGTCTTGCATT
07765	RNF152	TCATCGCCATTCCACACACTT
07766	RNF152	GCCCAAGTTGCTGGACTGCAA
07767	RNF152	CGGTCTTCATCAAACCTCCCA
16739	RNF157	GCAGAGGGAAATGATGTTATA
16741	RNF157	CATCCCGTCTAATCCGTGTA
16742	RNF157	GCCACGGAAGAGTTCCAGAAT
04804	RNF19	GCCGGGTTTCATTATCATAAT
04805	RNF19	CCCATGATATTCGCTTGATAT
04806	RNF19	CGCAAGATTCACAATCGCTAT
04807	RNF19	GCCATCCAAATTCAGGCACAA
04808	RNF19	CCTGATATAATGACTTGTCAT
33694	RNF2	GCACCTACAAAGGAGCACAAA
33695	RNF2	CCTAGTAACAAACGGACCAAA
33696	RNF2	CGAAGTCTACACAGTGAATTA
33697	RNF2	GCCAGGATCAACAAGCACAAT
33698	RNF2	GCTGTGAGGTTAGCTTTAGAA
33874	RNF20	CCTGAGATATAAGCGGAAATT
33875	RNF20	CCGTGCTGTAACATGCGTAAA
33876	RNF20	CCACTGATGATGCCTCACTAT
33877	RNF20	GCCAATGAAATCAAGTCTAAA
33878	RNF20	CGGAGGAAGTAGACATTAGAA
04600	RNF25	GAGGACCAGGATTCACAGTAT
04601	RNF25	GATGAACTACAGGTGATTAAA
04602	RNF25	TGGGAGGGAGGCAATAAAGAT
04603	RNF25	GAAACCCAGAAAGCTATGCTA
04604	RNF25	CAGGTCAAATCAGCAAAGGTT
33924	RNF26	CCTTGTGTAATCTGCTGTATA

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
33926	RNF26	CCCTTGGAAATTGCTGAAGGA
33927	RNF26	CTTGCTTTTCATTGCTGGCCTT
33928	RNF26	CCTGGTGGCTTATGTGATCAA
33949	RNF34	CCCTCAGTTAATGCGACTGAA
33950	RNF34	GCCTTGATGATGTGGAAGGAA
33951	RNF34	CGGCACAGGTACAAAGTGAAA
33952	RNF34	GCAGTATCTCATTCTGAGAAA
33953	RNF34	GCATGTTTGCTGTGACTGCAA
73083	RNF39	CGCCCATTCAGGAGTATTAA
73084	RNF39	CCAACATCCAAGTCATCTAAT
73085	RNF39	GACGATTTGAAGTCCCAACAT
73086	RNF39	GAGGATGATCTCCCTGAAGAT
73087	RNF39	GAGAGGATATGAGGAAGACAT
17053	RNF4	CGGGCTTCTGACTGCTCCATA
17054	RNF4	CCCATACTCCCAGAAACGCCA
17055	RNF4	CTACCCATACTCCCAGAAACG
17056	RNF4	CATACTCCCAGAAACGCCAGG
17057	RNF4	CCATACTCCCAGAAACGCCAG
04780	RNF40	GCTGTGATCTACCCTAGAGAA
04781	RNF40	CGCATCGAGTTTGAGCAGAAT
04782	RNF40	GCAGCTTAACCTCTGGCTACTA
04783	RNF40	CGCCACCTGATTAGTAGTCTT
04784	RNF40	GCAGAAGTTTGAGATGCTGAA
34249	RNF41	CCGACGCTACTATGAGAACTA
34250	RNF41	CCCTATTTGCAGTGGAGTCTT
34251	RNF41	CCTGGAGGAGACAATTGAATA
34252	RNF41	CGAAGATCTTATCTGCCCTAT
34253	RNF41	GCCAGGCCTTGTCTATGATATT
04785	RNF5	GAGTGTCCAGTATGTAAAGCT
04786	RNF5	ATCAGCAGAGAGAAGGTTGTC
04787	RNF5	AGTATGTAAAGCTGGGATCAG
04788	RNF5	CGGCAAGAGTGTCCAGTATGT
38804	RNF7	CCCAACTCTTACTCTTAATTT
38805	RNF7	CGACAAGATGTTCTCCCTCAA
38806	RNF7	CCTGTGGGTGAAACAGAACAA
38808	RNF7	CCTCAAGAAGTGGAACGCGGT
04102	SEN6	CCGTGTTACCTTTCTCTATTA
04103	SEN6	GACAGAACTAACAGAAGAGAA
04104	SEN6	CACAGGATTAACAACCAAGAA
04105	SEN6	CTACAGGAAGATCAGAGCAAA
04543	SEN7	AGTGCAGCTTATTATTCTCAA
04544	SEN7	GCAGTGATTGTGGAGTATATT
04545	SEN7	GTCGAATATGTCAGTACCAAA
04546	SEN7	CGGTTGCTACTCCCTTTCTAT
04547	SEN7	CCCAGAGTTATATTGACGAAT
73338	SEN8	CCTAACTTCATTCAAGACCTA
73339	SEN8	GCTGGCTCAATGACCATATTA
73340	SEN8	CCCTGCATACATCACAAAGAA
73341	SEN8	CCCAACAAGAGAGTTGTATTT
73342	SEN8	GACTGTGGGATGTACGTGATA
83693	SHFM1	CCAGAAGAAGTGTGAAGTAA

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
83694	SHFM1	GAAGTAGAGAAACATGGTTAT
83695	SHFM1	GCTGAAGTAGAGAAACATGGT
83696	SHFM1	GTAGAGGATGACTTCTCTAAT
83697	SHFM1	GCTGGCTTAGATGAAGATGAA
03961	SIAH1	GTCGCCCAAAGCTCACATGTT
03962	SIAH1	TCACCAGCAGTTCTTCGCAAT
03963	SIAH1	CACACCTTTGAGCTTAATCTT
03964	SIAH1	CCCTGTAAATATGCGTCTTCT
03965	SIAH1	CTGATAGGAACACGCAAGCAA
07415	SIAH2	GCTGGCTAATAGACACTGAAT
07416	SIAH2	GCCTACAGACTGGAGTTGAAT
07417	SIAH2	CATACGGAGAAACCAGAACAT
07418	SIAH2	ACACAGCCATAGCACATCTTT
07419	SIAH2	CGCTAATAAACCTGCAGCAA
06494	SKP1A	GCAAACACTTAGACATCAAA
06495	SKP1A	CCAAACAATCTGTGACTATTA
06496	SKP1A	CCTGAAGATGATGAGAACAAA
07530	SKP2	GCCTAAGCTAAATCGAGAGAA
07531	SKP2	CCACGATCATTTATGGACCAA
07532	SKP2	CCATTGTCAATACTCTCGCAA
07533	SKP2	AGGCCAACTATTGGCAACAAA
07534	SKP2	GATAGTGTCTATGCTAAAGAAT
03471	SMURF1	GCCCAGAGATACGAAAGAGAT
03472	SMURF1	CCACTTGTCTTATTTCCACTT
03473	SMURF1	CTGGAGGTTTATGAGAGGAAT
03474	SMURF1	CCGAAGGCTACGAACAAAGAA
03475	SMURF2	CGGTACAAGTCACATTTTATT
03476	SMURF2	GTGTGGATACTTGAGAATGAT
03477	SMURF2	CGCCTCAAAGACACTGGTTAT
03478	SMURF2	CCACCCTATGAAAGCTATGAA
57063	SOCS1	CCTACCTCTTCATGTTTACAT
57064	SOCS1	CGACACGCACTTCCGCACATT
57065	SOCS1	CTTCCGCACATTCCGTTTCGA
57066	SOCS1	GACACGCACTTCCGCACATTC
57067	SOCS1	GCACTTCCGCACATTCCGTTTC
57073	SOCS3	CCACCTGGACTCCTATGAGAA
57074	SOCS3	CCGCTTCGACTGCGTGCTCAA
57075	SOCS3	GAAGAGCCTATTACATCTACT
57076	SOCS3	CGGCTTCTACTGGAGCGCAGT
57077	SOCS3	CTCCTATGAGAAAGTCACCCA
07233	SQSTM1	GCCCTCCATTTGTAAGAACAA
07234	SQSTM1	CGAGGAATTGACAATGGCCAT
07235	SQSTM1	GCAGATGAGAAAGATCGCCTT
07236	SQSTM1	CCGAATCTACATTAAAGAGAA
07237	SQSTM1	CCTCTGGGCATTGAAGTTGAT
73973	STAMPB	GCAATATGAATGGAGCTTATT
73974	STAMPB	GCATCCATTTACTCTGAGGAA
73975	STAMPB	CCAGAGTCAGTAGCCATTGTT
73976	STAMPB	TCCAGGAAACTGGATTCTTTA
73977	STAMPB	CACAAGTGAAGGCCAGCTAA
73963	STAMBPL1	GCTGCTACTCTAAGTGCTGTT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
73964	STAMBPL1	GCTTCCTAACCATCGAGATT/
73965	STAMBPL1	GCTTGAGGTTTCTGCTTGTA/
73966	STAMBPL1	GCTATGCCTGACCATACAGA/
73967	STAMBPL1	CCAGAACAAATTCCTTGCTGA/
07525	STUB1	CCCAAGTTCTGCTGTTGGAC/
07526	STUB1	GAAGAGGAAGAAGCGAGACA/
07527	STUB1	GACGCATTCATCTCTGAGAA/
07528	STUB1	GCAGTCTGTGAAGGCGCACT/
07529	STUB1	CGCGAAGAAGAAGCGCTGGA/
34004	SYVN1	TGAATGCTTAATCCCGGGAA/
34006	SYVN1	GCTCACGCCTACTACCTCAA/
34007	SYVN1	GACCGTGTGGACTTTATGGA/
22124	TCEB1	CTGTAGTTCAGTTAGTAACT/
22125	TCEB1	GCCATGTATGTCAAATTGAT/
22126	TCEB1	GCACCTGAAATTGCACTGGA/
22127	TCEB1	CGAAACCAATGAGGTCAATT/
22128	TCEB1	CGTACAAGGTTTCGCTACACT/
07661	TCEB2	CTCTTGATGATGGCAAGAC/
07662	TCEB2	GCAGCGGCTGTACAAGGATG/
14998	TCEB3	CTGAGGACTTGCCTTGGAAA/
14999	TCEB3	CCTGCCTATTACAGTAGACA/
15000	TCEB3	GCAGGTGTATTCTGGTTCCA/
15001	TCEB3	GCTTCAGACAACCACCTGAA/
15002	TCEB3	CGCCAGTAGCATCAGCTTTA/
07515	TOPORS	CCCTTTGGACAGTCTTTATT/
07516	TOPORS	CCACTATGTAAACAGCCCTT/
07517	TOPORS	GCAGAAATAGAGATCGTTAT/
07518	TOPORS	GCGATGTTAGTAGATGCTCA/
07519	TOPORS	CCTGATTCTAAGTGTCCTAT/
04571	TRAF2	CCCTTGACAGATTCCACGCCA/
04572	TRAF2	CTCGGGCATGACAGGCAGAA/
04573	TRAF2	CGAGACGGTAGAGGGTGAGA/
04574	TRAF2	CCCTGAAAGAATACGAGAGC/
07348	TRAF6	GCCACGGGAAATATGTAATA/
07349	TRAF6	CGGAATTTCCAGGAAACTAT/
07350	TRAF6	CGAAGAGATAATGGATGCCA/
07351	TRAF6	CCCATCTGCTTGATGGCATT/
07352	TRAF6	CCTGGATTCTACACTGGCAA/
56948	TRAF7	CGGGACGCATCCATGTTAAA/
56949	TRAF7	CTACTCCATTGCTGTGACAA/
56950	TRAF7	GCACTGTGAAGGTTTGGACT/
56951	TRAF7	GACCAGAATGGAAACGACCT/
56952	TRAF7	GCTGGGAAAGCTCTCGGAGA/
03464	TRIAD3	CAACAACCTCCCACTCAACA/
03465	TRIAD3	TCAGATGTATTTCAAGGACT/
03466	TRIAD3	GACACTATGCAATCACCCGA/
07634	TRIM10	CGGGATAGAAATGACTGCTT/
07635	TRIM10	GCACTCTAATAAGATGTGAA/
07636	TRIM10	GCTAACGTGGTGGAGAACAT/
07638	TRIM10	CTATGCTTTGAGTTGGACTA/
33959	TRIM11	GCTATTATCTTTCCCGAGA/

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
33960	TRIM11	GCTTGCTAAGATGGCCGAGAT
33961	TRIM11	CCTGAGCTGATCCTGTCTGAA
33962	TRIM11	AGCTATTACAATTCCTCGAA
33963	TRIM11	CGATGGGTCACTGCTATTCAT
34035	TRIM15	GAGGATGTAAAGTGCAAGAA
34036	TRIM15	CAGGTGTGAGATGAAGACTTT
34037	TRIM15	CTTGCGCATCATCTGGAAAT
34038	TRIM15	CGAAAGCAAGAAGCATCAGGT
62848	TRIM16	CCTGCCTGTTTGTAGTAATTT
62849	TRIM16	CCGCATCAGGTGAACATCAAA
62850	TRIM16	GCCGTTGTTTCAGCGCAAAATAT
62851	TRIM16	CTGTGTGACTTCTGCCTTGAT
62852	TRIM16	GCCAATGTGATGCTCTTCTTA
33825	TRIM17	GAACGCATTGTGCTGGAGTTT
33826	TRIM17	GTTTGAGAAGATGAACCTCTA
33827	TRIM17	GACCAAGTACTTATCCACCTT
33828	TRIM17	ACAGTGACCATGTGGGTGAAA
73033	TRIM2	GCACCTTAGAACTGTACTATA
73034	TRIM2	GCACATTATTGTTGTGGACAA
73035	TRIM2	GCATCGTGGATGACATTCTT
73036	TRIM2	CGCGCTCCAGAACAATTTCTT
73037	TRIM2	GTCAAGCAGAAAGCTGTGAAA
03983	TRIM21	TGAGAAGTTGGAAGTGAAAT
03984	TRIM21	AGTTATCCTATGTCCTGGGT
03985	TRIM21	CTGCCTTCTTTATGGGACTTA
03986	TRIM21	TGGCATGGTCTCCTTCTACAA
05899	TRIM22	CGGAGCACTCATCTACAAGTT
05900	TRIM22	GTCACCAAACATTCCGCATAA
05901	TRIM22	CAATGAAATGAGAGTCATCTT
34204	TRIM23	GCTTGGAAGAAGGTTGTCAAA
34205	TRIM23	CGAAGTGGTATGGGACTGTAT
34206	TRIM23	GCCCATTGATCGACAAGTAA
34208	TRIM23	GCAGTCATAGAGACAGAATTA
03445	TRIM25	GAGTGAGATCCAGACCTTGAA
03446	TRIM25	CCAGCTCACATCCGAAGTCAA
03447	TRIM25	ACAACAAGAATACACGGAAAT
03448	TRIM25	GAAGTGAACCACAAGCTGATA
03449	TRIM25	GTGCCCGATTCTCTTAGAGA
04047	TRIM26	ACACCGAGAGAAGCTGCACTA
04048	TRIM26	CTGGAGCTATCTGTGGTCTTA
04049	TRIM26	GCTGAGAGACTTGGAATATAA
04050	TRIM26	GCTGCTGAGAGACTTGGAATA
04051	TRIM26	GATGGATATGACGACTGGGAA
16348	TRIM29	CGGCCATTCTACGTCAACAAA
16349	TRIM29	CGACAAGAAGTCCAAGTACTT
16350	TRIM29	GCAGGAATTTGGTGCATTGAT
16351	TRIM29	CCACGTTGAGAAGATGTGCAA
16352	TRIM29	CCATCGCTATGTGAACAATA
33744	TRIM3	CCACGGTTGCACTTTATTTAT
33745	TRIM3	GCTGTGAACAACAAGAATGAA
33746	TRIM3	GACATAATTGTGGCAGACTAT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
33747	TRIM3	GACCACAAGAATGGCACATAT
33748	TRIM3	GCCAAACAGAAGGTGTTGCAA
33769	TRIM31	GCCACAGTTGAACGATCTCAA
33770	TRIM31	CCTGGCCTCTTATGATGAGAT
33771	TRIM31	CGTGAATCCAAGGACCACAAA
33772	TRIM31	GCTCTCAGGATACGAAGACAT
33773	TRIM31	CCTCAAATGCATCACTCAGAT
03455	TRIM32	CAGGCAAGGTATAAAGCAGTT
03456	TRIM32	CCATTTCTCTATCAAGCATT
03457	TRIM32	CAGTGCTAAAGATCATTGATA
03458	TRIM32	TCTTGGACTGTTGGGATCATT
05892	TRIM34	CGGAGGAAGTATTCAAGGAAT
05893	TRIM34	CGCCATATGAAGTATGTTGTT
05894	TRIM34	GCAGGACATGAGTGGAATCAT
05895	TRIM34	GTGTGGTATCAGTTACTCATT
33779	TRIM35	CATGAAACACAAGAGCCGAAA
33780	TRIM35	CTTGCACTGTGGAATCTGTA
33781	TRIM35	AGTGTCAGGAAGAACTGGAT
33782	TRIM35	CGCGTCTGGAAGAAGATGCTT
40288	TRIM36	CGAGGAATCAATGGTCTGTTT
40289	TRIM36	GCTGGATTTAATCTTCTGCTT
40290	TRIM36	CCATTGATTCTCCCTTGCCAA
40291	TRIM36	CTAGCGATAAACTACAAGAAT
40292	TRIM36	GCCTTGATAAATTGGCACCAT
34210	TRIM37	CCAGTGTAGCAGGTAGTCTAT
34211	TRIM37	GCTAATGCTAAAGGAGGTCAT
34212	TRIM37	CCGTTTGGACTTACTCGCAAA
34213	TRIM37	CCACAGCATCATATTCTCGAA
07570	TRIM38	CCTGAGAAACAGCCAAGCAAA
07571	TRIM38	CCACATCTTTACTTTCCCGAA
07572	TRIM38	CCGGATGGGATTAGGAGTTT
07573	TRIM38	GCTGAAGAGCAATGAAGTCAA
07574	TRIM38	GCCCTCAAAGAGACGGATCAA
33879	TRIM39	GTAGGCATATTCCTAGACTAT
33880	TRIM39	CCGCTCTCATATCTACACCTT
33881	TRIM39	CGAGATGCTTAAGGATGTCAA
33882	TRIM39	CGATGCTACACAGGAGTACAA
33883	TRIM39	GTCCTGTCTGTGAAAGACAT
34029	TRIM4	CGCTTCATTGAAGAAGCTCAT
34030	TRIM4	GCTGCTCTGTACCATTCTAA
34031	TRIM4	GCTGAATGAGAACACGTTAAA
34032	TRIM4	GCGATTCCAAGTGGCTGTAAA
34033	TRIM4	CACCAGTGACTGATAGGAAAT
11142	TRIM40	CCACTACAAGGAACGACTCAA
11143	TRIM40	GACACCAACACACTGAAGAAT
11144	TRIM40	AGCGGCCAGAATCCTTGACAT
11146	TRIM40	CAGAAAGGACATTGCAGAACT
34044	TRIM41	CCCGTGAATCAACCCATCATA
34045	TRIM41	CGAGCGTGTCTTTCCTTTCTT
34046	TRIM41	GCCAATATGGTCCAGGTGATT
34047	TRIM41	GAGACTTTCAATAGGTGTGAA

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
34048	TRIM41	CGTCTCAGAGAGATGCATGAA
73248	TRIM42	CCTCAGACTCATCACAAAGTA
73249	TRIM42	GCAGAGATGTTGTCCTCAGTT
73250	TRIM42	CCCAACACAGAATACGTGTTT
73251	TRIM42	CCGCAATACCATCATCACTTT
73252	TRIM42	CAGTCCGATATGAAATTGATA
34094	TRIM43	CGGTTCTCCATAAGGAAGAAA
34095	TRIM43	CAATCACAATATCAGGCTCTT
34096	TRIM43	GAAGGTGGATAATCATTTCAA
34097	TRIM43	TGGGACCCATAGGCAAAACAAA
34098	TRIM43	CTTCTCCTTTGGGAAACACTA
73078	TRIM45	CCCGTCCTGGAGTAAATGATA
73079	TRIM45	GCTTTGTAAGCAAACCTCACTA
73080	TRIM45	CCAGCCAAATGTGTCTCTACAA
73081	TRIM45	CCTGGCTCAGATCCACATAAT
73082	TRIM45	CCACTGGTCATGCTGTGGAAA
33944	TRIM46	CCCTTCGCTTTCCTAACCAT
33945	TRIM46	CCTGACATACATCCTGGGAAA
33946	TRIM46	GCTGCTGACAGAGCTTAACCT
33948	TRIM46	CTGGCACTATACCGTTGAGTT
34049	TRIM47	CCACACACCCAGCCTTCTCAT
34050	TRIM47	GTTTGCCTATATTGTGGATTT
34051	TRIM47	GCAGTGGAATGGACGCAGCTT
34052	TRIM47	CACCAAATCATCCCAAGCTGT
34053	TRIM47	CAAGAAGTCCTGCATATCCGT
33919	TRIM48	CCCAATTCTTACTCAGTGCTT
33920	TRIM48	GAGGAGCAAATGTGTGGCATT
33921	TRIM48	GAATGTGGAAACCACCAGAAT
33884	TRIM49	CCTGTGCATGAACCTACTTCAT
33885	TRIM49	CGGAAAGAGAAGAATCAGAAT
33886	TRIM49	CCTAATATACACCATCCCTAA
33887	TRIM49	GCTGAACGAAATGTGCCATAA
33888	TRIM49	GCTGGAAGGATTATGTGAATT
05896	TRIM5	CCTGAGAACATACGGCCTAAT
05897	TRIM5	GCACTGTCTCATTCTTCAATA
05898	TRIM5	CCTGATGCAATGTGTAATATT
07783	TRIM50A	CGTCACTGTTTAGGAAGGTCT
07784	TRIM50A	CCACAAGTTCATCCGGAAGTT
07785	TRIM50A	CGAATCGTCAATGAGTCGGAT
07786	TRIM50A	GCAGGGCGAACTCACCTTCTT
07787	TRIM50A	GCTTCAGTGTCCCATCTGCCT
34179	TRIM50C	CCATGAGTTCATCTGGAAGTT
34180	TRIM50C	CGTCAATGAGTCGGATGTCTT
34181	TRIM50C	GTGCTGGAACAGTTCGGAAT
34182	TRIM50C	AGGTCTTCAAGGAGTCCCTAA
34183	TRIM50C	CTCATCGCCAACTGGTGAAA
34014	TRIM51	CCTGCATTTCTCCATGAAGAA
34015	TRIM51	CCCTCAAGATGATCCCGATAT
34016	TRIM51	GCTTTGTTGATGTTGATCAAA
34017	TRIM51	CAGTGGATTTCAGAGTTGATTT
34018	TRIM51	GCAAAGCCAGAATGGAACATT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
34019	TRIM52	GCAAGCTAGAATCAAAGAATT
34020	TRIM52	GCCAACATGGTCCAGATAATT
34021	TRIM52	GCATACGATGAGGACGAAGAT
34022	TRIM52	CGAGAAGAAGAAATACTGGAA
34023	TRIM52	CAAGACCAAGATGACGATGAA
33889	TRIM54	GCCAGACTATCGAGGACAATA
33890	TRIM54	GCATGGAGCAATTCACCGTAA
33891	TRIM54	CCTCGCAGAACACTAAGATTA
33892	TRIM54	CACCATTTACAAACGCCAGAA
33893	TRIM54	GTTCTCCAAACCAGTGGTGAT
34009	TRIM55	GCTACTTCTCAGGAGTTAGTA
34010	TRIM55	GCTTTGTGAGAAGTTTGATTA
34011	TRIM55	CAGCACAACCTGTGTAGGAAA
34012	TRIM55	CCAGGTTCTGAGGATTCGAAT
34013	TRIM55	CTATGAGAACATGAACCACTT
73093	TRIM56	CGTCTTCTAGTGTGTGAGAA
73094	TRIM56	GCAGCAGAATAGTGTGGTAAT
73095	TRIM56	TGTGGATAAGAAGGGCTACAT
73096	TRIM56	CCTGGACTGTGCCGATGACTT
73097	TRIM56	CGCACGGCTCTATCTCATCAA
33800	TRIM58	GCTGCTGAAAGGGAATGAGTA
33802	TRIM58	GCAGAAGTAAGGCTGTCACAA
34164	TRIM59	GCATTGAATCTTTACCTGTTA
34165	TRIM59	GCTCTCTGTGATGTTGGCAAT
34166	TRIM59	CCTCTCTATCTGTTTACCAAA
34167	TRIM59	GTGCCCTAATTGCAGAAGTAT
34079	TRIM6	CCACTACTCTTTGTCCATATT
34080	TRIM6	GTGAGGTTTGTGGGAGCTAAA
34081	TRIM6	GTCTCTAAAGAAGCTGAAGAA
34082	TRIM6	CCCATCTACACTTTCTCTAAA
34083	TRIM6	CAAGCCTGCATCACACCAAAT
34139	TRIM60	GCTCCGTAATTTGACTGAAAT
34140	TRIM60	GCGATACATGAAGAGTGGTTA
34141	TRIM60	CCCTTGAGGAATAATATAGAA
34142	TRIM60	GAGATGATTCTTAGGCAGATA
34143	TRIM60	GATTTAGTTCTGGCCGACATT
33869	TRIM62	GCGGATCAACACCGTCCTCAT
33870	TRIM62	CATGAGACCAACCTCACATAT
33871	TRIM62	CGGCTTCTACTGCATCGTGAT
33872	TRIM62	CTCATCTTCTACAATGCTGAT
33873	TRIM62	CATTGTGGCTTACGGCAACTT
73118	TRIM63	GTATAATAATGCCTGGTCATT
73119	TRIM63	CAGAAGTTTGACACGTTGTAT
73120	TRIM63	GAAGAGGAAGAGTCCACAGAA
73121	TRIM63	GAACATGGACTTCTTTACTTT
73122	TRIM63	GACATCTTCCAGGCTGCAAAT
33859	TRIM68	GCCTGGGAGTATGTAAGCAAA
33861	TRIM68	CAGAGTATTGTATGGGAGTTT
33862	TRIM68	GCTATAATATCGTCCTGGGAA
33863	TRIM68	CAGGATATTTCAGGAAGTGTTA
33969	TRIM7	CAGAAAGATAATAGAGTCCAT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
33970	TRIM7	CGTGGGACATTACAGAGGCCT
33971	TRIM7	GTGGGACATTACAGAGGCCTG
33972	TRIM7	ACTGTGAGGTGTTCCGGTCCA
33973	TRIM7	CTGGAGGACTGTGAGGTGTTT
33964	TRIM8	GCCGCAAGATTCTCGTCTGTT
33965	TRIM8	GCTGCCGTGCAAACACAACCTT
33966	TRIM8	CCGAAGGAATGAAATCCGGAA
33967	TRIM8	GCAGCCGTCCACCAAACACTA
33968	TRIM8	CTCTTTGATAAGACGGAGGAT
34069	TRIM9	CCTGGACAAGATGAGCCTATA
34070	TRIM9	CGATGCCCTCAACAGAAGAAA
34071	TRIM9	CGATGAACAACAAGGTCCCAT
34072	TRIM9	CGACAAAGCTTGGGCAATGTA
22374	TRIP12	CCTGAGTCAAGGAAACATGTT
22375	TRIP12	CCGGAGTTTGAATCCACCTTT
22376	TRIP12	CCCTAAAGTTAGCCTTCCTAA
22377	TRIP12	CCGTATAACATGACTGTGTAT
22378	TRIP12	CGGATCATTGAGCAAATCAAT
07560	TSG101	CCCAGAATAAGTTATTGCAGT
07561	TSG101	CGTCCTATTTCCGGCATCCTAT
07562	TSG101	CCTTATCTACATGAATGGAAA
07563	TSG101	GCCTTATAGAGGTAATACATA
07564	TSG101	GCAGAGCTCAATGCCTTGAAA
04486	UBASH3A	GAGAGCCCTATTCCAGTACAA
04487	UBASH3A	TCCATCACTCTTTAGCCATAT
04488	UBASH3A	CAATTTAACTAGAGCCTCCTT
04489	UBASH3A	CGAGTGGAACCTGGAATCTTT
07735	UBB	CCGTACTCTTTCTGACTACAA
07736	UBB	CCGCACTCTTTCTGACTACAA
07737	UBB	GCCAAGATCCAGGATAAAGAA
11107	UBC	CGAGAATGTCAAGGCAAAGAT
11108	UBC	GCAAAGATCCAAGACAAGGAA
11109	UBC	CGAGAACGTCAAAGCAAAGAT
11110	UBC	AGGTTGATCTTTGCTGGGAAA
11111	UBC	GAGGTTGATCTTTGCCGAAAA
07589	UBD	CGAACACATCTTCTGATGATT
07590	UBD	CGAGACTAAGACGGGTATAAT
07591	UBD	CCTTACCCTGAAAGTGGTGAA
07592	UBD	TGGGATTTAATGACCTTTGAT
07593	UBD	GCTGGGCTCCAAGATCTTAAA
04000	UBE1	CCACTGCCTTCTACCTTGTTT
04001	UBE1	CTCCAACCTTCTCCGACTACAT
04002	UBE1	GCACAAATTAGAGATCACCAT
04003	UBE1	CCTGGGATGTCACGAAGTTAA
04004	UBE1	GTGCTATGGTTTCTATGGTTA
07253	UBE1C	GAGCAAATGTATTGCTTCTTT
07254	UBE1C	CGACACTTTCTATCGACAATT
07255	UBE1C	CCTCTATTGAAGAACGAACAA
07256	UBE1C	GCCTGGAATGACTGCTTGTAT
07257	UBE1C	CCACAGACTGTACTATTCAAA
07196	UBE1L	GCTACCTACATCTGGCTGAAA

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
07197	UBE1L	CCTAATAAAGTGCTTGAGGA
07198	UBE1L	GCATGAGTTTGAAGAACTCT
07199	UBE1L	AGCCGCTATGATGGGCAAAT
04005	UBE2A	CCAATCCCAATAGTCCAGCA
04006	UBE2A	TCTTCCATTCTAACATCCATA
04007	UBE2A	CCATTCTAACATCCATACAGT
04008	UBE2A	CCAGGAGAACAAACGGGAAT
04009	UBE2B	GCTTTAATTGTGTGGTGCTTT
04010	UBE2B	GCAGTTATATTTGGACCAGA
04011	UBE2B	GAATCCTAACAGTCCAGCCA
04012	UBE2B	CGGGATTTCAAGCGGTTACA
04013	UBE2B	CATGCGGGATTTCAGCGGT
04240	UBE2C	TGTCTGGCGATAAAGGGATT
04241	UBE2C	CCCTTACAATGCGCCACAG
04242	UBE2C	TGGAACAGTATATGAAGACC
04243	UBE2C	CCTGCAAGAAACCTACTCAA
03381	UBE2D1	CTTCTTTCTCACTGTACATTT
03382	UBE2D1	GTTCTCTACTTTGTGATCCTA
03383	UBE2D1	GCCATTAGTCACCATTAGTTA
03384	UBE2D1	GCGATCCACCTGCTCACTGT
03385	UBE2D1	ACAACAGACATGCAAGAGAA
03386	UBE2D2	GTTCTCTGTTGTGTGATCCC
03387	UBE2D2	CTCCAGCACTAACTATTTCAA
03388	UBE2D2	GCTGAGATTAGTGGTGGATT
03389	UBE2D2	CCTGTTGGAGATGATATGTT
03390	UBE2D2	TGTCCATCTGTTCTCTGTTG
38789	UBE2D3	CCTGCATTATAGCTGGAATA
38790	UBE2D3	GCCTGCTTTAACAATTTCTAA
38791	UBE2D3	GCCACAATTATGGGACCTAA
38793	UBE2D3	CCCATATCAAGGCGGTGTAT
04120	UBE2D4	GCCGACAGAGAGAAGTACAA
04121	UBE2D4	CTAGAGATTTGGGTCATGTT
04122	UBE2D4	CAAGGCCGACAGAGAGAAGT
04123	UBE2D4	ATCACCTAATATCAACAGCA
04124	UBE2D4	CACCCTAATATCAACAGCAA
04014	UBE2E1	GTTGGTAAAGAGTAGGGTAT
04015	UBE2E1	CCGTGTATGAGGGTGGTGTA
04016	UBE2E1	CCTCCTTTCTATCTGCTCAC
04017	UBE2E1	GCAAACCGAGAAAAGAAACA
04018	UBE2E1	GTCCAGCACTAACCATTCTA
11177	UBE2E2	GCTTTCTTACAAAGCTTTGTA
11178	UBE2E2	CCGATGGAGATCAACGTGAA
11180	UBE2E2	CGTGAAAGTGTTTACGCAAGA
07575	UBE2E3	CGGACTTCTGTGTATATGTT
07576	UBE2E3	GCTTTGACTATTTCAAAGGTT
07577	UBE2E3	CCACTGCTAAGTTATCCACT
07578	UBE2E3	CCACCGGGTTCTGTATATGA
07579	UBE2E3	AGAGCAGAACACGACAGGAT
07200	UBE2G1	GCCTGGTATTAAGGTTGGAT
07201	UBE2G1	GCTAATGTTGATGCTGCGAA
07202	UBE2G1	CGATGGGAAGTCCTTATTAT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
07203	UBE2G1	GCAGGTTTAAATAGATGACAAT
07204	UBE2G1	CCTCCAGATACACTTTATGAA
04019	UBE2G2	GTTTCCCACTTGATTACCCGT
04020	UBE2G2	CGACCATACTCATCAAAGATT
04021	UBE2G2	CAATGACGAAAGTGGAGCTAA
04022	UBE2G2	GATGAGATTTACCTGTGAGAT
04023	UBE2G2	GAGATTTACCTGTGAGATGTT
04024	UBE2H	ACCTACCTGATAAATACCCTT
04025	UBE2H	CTTCATGTTCTGGTTTGGTTT
04026	UBE2H	CGGAGTATGGAAGTTAGAGT
04027	UBE2H	GAGTGGACCTACCTGATAAAT
04028	UBE2H	CCACAAGGAACACCATATGAA
07205	UBE2I	GCCTACACGATTTACTGCCAA
07206	UBE2I	TGGAGGAAAGACCACCCATTT
07207	UBE2I	ACCACCATTATTTACCCGAA
04130	UBE2J1	CCACCAAGCATTATTCTCCTA
04131	UBE2J1	GCTGAGATTGTGTGCTAGGAA
04132	UBE2J1	CGTGGAGTATAAGGACAGCAT
04133	UBE2J1	CCAAGAGACAACCACACTGAT
04134	UBE2J1	CAGCTCTTATATTCCGACGAA
34084	UBE2J2	CGCGCTCATCTTTCTTCGTTT
34085	UBE2J2	GAAGTCGTGGAGGAGATTAAA
34086	UBE2J2	CAAACCTCCCAGTATCTATAT
34087	UBE2J2	GAAGGTGGCTATTATCATGGA
34088	UBE2J2	CGCATTAAGAAAGACCCGGTG
07208	UBE2L3	CCTTAGAATTTATCGTCAGAT
07209	UBE2L3	CCAGCAGAGTACCCATTCAA
07210	UBE2L3	GCTAATTTATTGACTTGGCAA
07211	UBE2L3	CCACCGAAGATCACATTTAAA
07212	UBE2L3	GAATACTCTAAGGACCGTAAA
07281	UBE2L6	GAATCAAACCTTCATCCTGAA
07282	UBE2L6	GCTGGTGAATAGACCGAATAT
07283	UBE2L6	GATCAAATTCACAACCAAGAT
07284	UBE2L6	CTGTTCAGAAAAGATGCCGAA
07258	UBE2M	CGATGGGAAATGAATTGGCTT
07259	UBE2M	GCGGATCCAGAAGGACATAAA
07260	UBE2M	CAAGGTGAAGTGTGAGACAAT
07261	UBE2M	CTTCTACAAGAGTGGGAAGTT
07262	UBE2M	CCTGCCCAAGACGTGTGATAT
07213	UBE2N	GCTGAGGCATTTGTGAGTCTT
07214	UBE2N	GCCTTGTTAAGTGCTCCCAAT
07215	UBE2N	CCATAGAAAACAGCTAGAGCAT
07216	UBE2N	CCTTCCAGAAGAATACCCAAT
07217	UBE2N	CTAGGCTATATGCCATGAATA
04201	UBE2Q	CACTATGAAATGAAAGAGGAA
04202	UBE2Q	CCGACTTCATTCTACTTAAC
04203	UBE2Q	CCGACCTGTGTAACTCTATA
04204	UBE2Q	GTTGAGATAAAGACGGGACAT
04205	UBE2Q	GCCAACAAATCTCAATACAGT
04225	UBE2R2	CTGGCGGAATACTGCATCAA
04226	UBE2R2	GCCGACTGTTATGATGATGAT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
04227	UBE2R2	CCAATGTGCGATGCTTCAGTTA
04228	UBE2R2	GCCTGATGAAATGTGCTCCTT
04229	UBE2R2	CGACGACTTGTATGATGACGA
07672	UBE2S	GGGCTCTCTTCTCCTTCCAC
07673	UBE2S	CCCGATGGCATCAAGGTCTTT
07674	UBE2S	GCACATCATCCGCTGGTGTA
07675	UBE2S	TGGGCTCTCTTCTCCTTCCA
07676	UBE2S	CCCATATGCTGGAGGTCTGTT
04386	UBE2T	GAACCTCCTCAGATCCGATTT
04387	UBE2T	GTACACAACCTCAACACAGAAA
04388	UBE2T	GCCAACACACCTTATGAGAAA
04389	UBE2T	GTCCTGGTTCATCTTAGTTAA
04390	UBE2T	GCAAGATAAAGACCAAATGGA
11172	UBE2U	GAAATTCCTAACCACTCTGAA
11173	UBE2U	CCTACAGGTTATGCTTTCTAA
11174	UBE2U	GCATCAGAAAAGAAATGGAATTT
11175	UBE2U	CCTCCAGTTGTGAAATTTATA
11176	UBE2U	GCCAGAATACTGGTTAAAGAT
33704	UBE2V1	CCCTGGTTTCTTTAAGTCTTA
33705	UBE2V1	GCAAAGTGAAGTGAAGGAA
33706	UBE2V1	CCAAGAGCCATATCAGTGCTA
33707	UBE2V1	AGGACAGTGTTACAGCAATTA
33708	UBE2V1	CGCCTAATGATGTCTAAAGAA
04034	UBE2V2	CAAGGTGGACAGGCATGATTA
04035	UBE2V2	CAGAAGGACAAACATACAACA
04036	UBE2V2	GTCTTAAATCAACAACCTTCT
04037	UBE2V2	GCTCCTCCGTCAGTTAGATTT
03368	UBE3A	CCTACATCTCATACTTGCTTT
03369	UBE3A	CGGAATACTCAAGCAAAGAAA
03370	UBE3A	CCACCATTTGTAGACCACGTA
03371	UBE3A	GAGACATTTTACGCAACTTATT
03372	UBE3A	CCTGATGATGTGTCTGTGGAT
04775	UBE3B	GCTCGGTTCTTTGAAGATTT
04776	UBE3B	CCGTGATGATGTGAAAGTTT
04777	UBE3B	CCCAGTGAAGAGTCTCCTAAA
04778	UBE3B	CGTGCCATTTGCATCCTTCTT
04779	UBE3B	GCTGGTCACTATCTCCTCTTT
03399	UBE3C	GCCAGACATTACTACTTCCTA
03400	UBE3C	GTCCTATTTCTATCTCCACTT
03401	UBE3C	CCAGTCATTTATTTCGAGGCTA
03402	UBE3C	GCAGATAAGCAAGAAGTTCAA
07395	UBE4A	CCCTGCTATTTCTCTTCCAAT
07396	UBE4A	CCGGCCAAACACAGAATAAAA
07397	UBE4A	GCTGGGAGTAATTCTGAGTAT
07398	UBE4A	GCTCGCTTATTACTTCAAGAT
07399	UBE4A	GCGCATCATCTCCATGTTGAA
07545	UBE4B	CCCTACTTAACATACTTGAAT
07546	UBE4B	CCGATATAACACTGCCTTTAA
07547	UBE4B	CGCCCTCTAATAGCCTTGAAA
07548	UBE4B	GCAGGGATCAAATCCACAATA
07549	UBE4B	CGCTATCATATTAGCACCATT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
11112	UBL5	CGCGTTAAATGCAACACGGAT
11113	UBL5	CCGTTGGAACAAGATTGTCCT
11114	UBL5	CTATGAAATCCACGATGGGAT
11115	UBL5	GATTGTCCTGAAGAAGTGGTA
11116	UBL5	TGGGATGAACCTGGAGCTTTA
04437	UBOX5	GAGAAAGTGAACCGCAGTGAA
04438	UBOX5	CCGGCACATTCTTTCTTTA
04439	UBOX5	CGGCGGTATCCCTTGTATCAA
04440	UBOX5	TCATGGTTTCAGGACAGAGTA
04441	UBOX5	CATTGGCAGTGATCCCTTCTT
20560	UBP1	GCCAGTTAAATGCGTTGAAT
20562	UBP1	CCACCAAATTAATCAGGTTTA
20563	UBP1	CGGCTACAATACACAGAGCAT
04371	UBQLN1	CCTCAGCTACAGAATCCAGAA
04372	UBQLN1	GTTACAGATTACAGCAGGGTTT
04373	UBQLN1	GCTTCTCCCATAGGTAGTTTA
04374	UBQLN1	AGGTCTGAGTAGCTTGGGTTT
04375	UBQLN1	CTCCCAACTTTCTCCAACAA
04376	UBQLN2	AGCAGTTTAAGGAAGCGATTT
04377	UBQLN2	ATGCAAGAGATGATGAGAAAT
04378	UBQLN2	ACCTGGCCTGATTCCGAGCTT
04379	UBQLN2	ACGCTTCAAATCCCAAACCGA
04380	UBQLN2	GTAACCTCCACACCTATTTCCA
04196	UBQLN3	CTCTATGACTATCTCCAGCAA
04197	UBQLN3	CCACAGTTACAGGATGAGATA
04198	UBQLN3	AGTCAGTAGCAATCAAGGGAA
04199	UBQLN3	AGCCTTATTCAATCAAACCAT
04200	UBQLN3	TGTTCTAATCTTTGCTGGCAA
07738	UBQLN4	CCAGAGGAAATTCGTGTGAAA
07739	UBQLN4	GCGTCCATACTCTCTGGCTTT
07740	UBQLN4	CCCAAGGACAAGGAGGAAATT
07741	UBQLN4	GCTGCTCAGATGATGGTGAAT
03423	UBR1	GCGTTGAGTCTTCGATTAAAT
03424	UBR1	GCTTTCATATCCAGGCAATT
03425	UBR1	GCTGGTCTTCATGTACGTTTA
03426	UBR1	CCAAGAGACTAATCAGATGTT
03427	UBR1	GCAGAGAAGAAATGTATGATA
03403	UBR2	CCTCCTTACCTTGATGACTAT
03404	UBR2	GCCGGAATGTGGAGAAGAAAT
03405	UBR2	CCTTTGTGAATGCTTGAGTAA
03406	UBR2	GCATGGCACTACAAGAAGAAA
03407	UBR2	GCGTACACCATCCAAAGCATA
07273	UCHL1	GTGTGAGCTTCAGATGGTGAA
07274	UCHL1	CGGGTAGATGACAAGGTGAAT
07275	UCHL1	CTGTGGCACAATCGGACTTAT
07276	UCHL1	CCAGCATGAGAACTTCAGGAA
07535	UCHL3	GTCAATAATGGAAACACCAAA
07536	UCHL3	GCACCAAGTATAGATGAGAAA
07537	UCHL3	CCTGGAGGAATCTGTGTCAAT
07538	UCHL3	CCCTGATGAATAAGATTTAA
07539	UCHL3	GTCTTACTTCTCTTCTCTATT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
04125	UCHL5	TCCCGACTTGACACGATATTT
04126	UCHL5	ACGCAAAGAAAGCTCAGGAAA
04127	UCHL5	CCTGTTAATGGGAGACTGTAT
04128	UCHL5	TCTTGTCTTTAATGCATGGAT
04129	UCHL5	AGCTCATTAAAGGATTCGGTT
07485	UFD1L	GCTGTTCAAACCTGACCAATAA
07486	UFD1L	CTGGCAATAGACTGGATGGAA
07487	UFD1L	TGGGCTACAAAGAACCCGAAA
07488	UFD1L	CAGCCGACTTAACATTACCTA
07489	UFD1L	CCCAATCAAGCCTGGAGATAT
04352	UHRF1	CCGCACCAAGGAATGTACCAT
04353	UHRF1	GCCTTTGATTGTTCTCTTCTT
04354	UHRF1	CATGCAGTATCCAGAAGGCTA
04355	UHRF1	TGTGAAATACTGGCCCCGAGAA
04356	UHRF1	GCGCTGGCTCTCAACTGCTTT
03479	UHRF2	CGTCTCTTCTTCCATTACAAT
03480	UHRF2	GAAGTTGTAAAGGCTGGTGAA
03481	UHRF2	ACTGGTATTGTCCTTCTTGTA
03482	UHRF2	CTGCTGATGAAGACGTTATTT
73303	UREB1	GCGTCTGTGTTGTGGAGGTTT
73304	UREB1	CCACACTTTCACAGATACTAT
73305	UREB1	GCTCCCACTATAACCTCACTT
73306	UREB1	CGACGAGAACTAGCACAGAAT
73307	UREB1	GCTACACAAGATGGAGTCAAA
04043	USP1	GACTGAATAATCTCGGCAATA
04044	USP1	CCAGAGACAAACTAGATCAAA
04045	USP1	CCAGTGACCAACAGGCATTA
04046	USP1	GCTCGTATTTGTATTCTCCAT
07430	USP10	GCCTCTCTTTAGTGGCTCTTT
07431	USP10	CCTATGTGGAAACTAAGTATT
07432	USP10	CCCATGATAGACAGCTTTGTT
07433	USP10	GCTGTGGATAAACTACCTGAT
07434	USP10	CGACAAGCTCTTGAGATAAA
07358	USP11	CCCTCCCTTCTAGTCTTTATT
07359	USP11	CCGTGATGATATCTTCGTCTA
07360	USP11	CCGATTCTATTGGCCTAGTAT
07815	USP12	GCACCAATAATGCTTTGAATT
07816	USP12	CCAGATGTCTTACTTGTGAAA
07817	USP12	CCAGACAGAATGTACGACCTT
07818	USP12	CCAGAACAGTTTCCGGTCAAT
07819	USP12	CCTTTAGAACTTCGTCTGTTT
07248	USP13	GCAGATAAAGAAGTTCACCTT
07249	USP13	GCCAGTATCTAAATATGCCAA
07250	USP13	CGCCTGATGAACCAATTGATA
07251	USP13	CGATTTAAATAGCGACGATTA
07252	USP13	CCGGTGAAATCTGAACTCATT
07425	USP14	CCCAAGATTACAGCAGTCAGAT
07426	USP14	GCAGCCAAATACAAGTGACAA
07427	USP14	CCTTGGTAACACTTGTTACAT
07428	USP14	CGCAGAGTTGAAATAATGGAA
07429	USP14	GCAGCCCTTAGAGATTTGTTT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
07565	USP15	CCGTAATCAATGTGGGCCTAT
07566	USP15	CCTTGGAAGTTTACTTAGTTA
07567	USP15	CCCATTGATAACTCTGGACTT
07568	USP15	GCTCTTGAGAAATGTGCCGATA
07569	USP15	GCTCACCAAGTGAAATGGAAA
07594	USP16	GCCAGAAGAAATCATGTTTAT
07595	USP16	GCGAATAAACTGCTTTGTGAA
07596	USP16	CGGTGATATTCCACAAGATTT
07597	USP16	GCCAAGAACCAACGAAGACAA
07598	USP16	GCCTACAATAAAGTACTAAA
04192	USP18	ACTGCATATCTTCTGGTTTAC
04193	USP18	CCTCATGGCCTGGTTGGTTTA
04194	USP18	CAGCAACATGAAGAGAGAGCA
04195	USP18	GAAGACAGCAACATGAAGAGA
51713	USP19	GCGTGATTTGATTCTGTTGTA
51714	USP19	CCTTCCAAGTTGAAGGCCATT
51715	USP19	GCTGATGAACAGCTTTGCATA
51716	USP19	GCGTGACAAGATCAATGACTT
51717	USP19	CGGAGGTAATTAAGAATCGTT
07277	USP2	CCGCGCTTTGTTGGCTATAAT
07278	USP2	GCTCACAACATTTGTGAAGTT
07279	USP2	CCCATTGCTAAGCGAGGTTAT
07280	USP2	CCATGCTGTTTACAACCTGTA
07609	USP20	GCGACCATCATCAGGATCAAA
07610	USP20	CCCATTGACAACAGCAGGATT
07611	USP20	CGACACCTTCATCAAGTTGAA
07612	USP20	GACATCTTTGACGGCTCCATT
07613	USP20	CGCCTGTGAGAAGGAGGTATT
04347	USP21	GCTCCACCGATACTTGCCAAT
04348	USP21	GCCTTTCTACTCTGATGACAA
04349	USP21	CCACTTTGAGACGTAGCACTT
04350	USP21	GACCCTCTGCAATATCACTTT
04351	USP21	CCTGCGAAGCTGTGAATCCTA
46923	USP22	CGGACTATACTGAGAGCCTAT
46924	USP22	GCTGTTTCACAAAGAAGCATA
46925	USP22	CGAAGGGTACTTGCTGTTCTA
46926	USP22	CGGCGGAAGATCACCACGTAT
46927	USP22	GACAACAAGTATTCCTGTTT
04366	USP25	GCACTTCTCCTGTTGACGATA
04367	USP25	GCTGTAGAAGATATGAGAAAT
04368	USP25	GCTGTTCTCATCTGTGCTTA
04369	USP25	GCGTGAGCTGAGGTATCTATT
04370	USP25	TGGAGGAGTAAGATGAAATAT
11117	USP26	GCTATAATCGAGAGAAACAAT
11118	USP26	GAATCCAAGAAACAAAGACAT
11119	USP26	CTACTTTCAATCCCATCGTTT
11120	USP26	CAACTGAAAGATAACATGGAA
11121	USP26	GCAGATTGTTGAGGTGTGTA
07742	USP28	GCACAGAAGTTTCGTTGTCATA
07743	USP28	GCTCTAATGATGGGATCAAAT
07744	USP28	CCCAACTGAATCAGATCAAAT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
04562	USP29	CTGGTGAAGAATAACGAGCAA
04563	USP29	CCCTCAATCAGTCTACAGAAT
04564	USP29	TGTGTGGAGTATCTTGGTGTA
04565	USP29	GCAGTGATTGAGGAGAGCAT
04566	USP29	CCACTTTAGAGATAGGGCAAT
07604	USP3	GCTGCCTTTCCACAGCTATAA
07605	USP3	GCCTCATATGTGGGACAGAAT
07606	USP3	CCAACCATAAGAAATCAGAAA
07608	USP3	GCCCATGAATTCAATGCGCTA
38819	USP30	CTGTTGTGTAAAGAAAGCATT
38821	USP30	CCTGTTTCGATTTGATACCTTT
38822	USP30	CCATGTCATTACCTCGTCATT
38823	USP30	CACACCAGTATTTATCCTTAA
04548	USP31	GACAGCATACATCCTCTTCTA
04549	USP31	GCTCCAATTCTCCATCCCGAT
04550	USP31	CTGTAGTGTATCAAGGCAAAT
04551	USP31	CTCTGCCTGATGTGCTTATTA
04552	USP31	GCTCTGTAAAGTCTGTCTGTA
11127	USP32	GCACTGATGATATTCCTGAAT
11128	USP32	CGTGAATACTACAGAAGAGAA
11129	USP32	GACGACAGTATGGGCTATCAA
11130	USP32	GTGGCTATACAACAGTGAGAA
11131	USP32	CCACCTATTTCGTCCTCTCTA
04442	USP33	GTGGAATTTGTCAGCAGATAT
04443	USP33	CCTCCGGTTGTTTCATGTTGAT
04444	USP33	CTGGATATAGAAGCGGATGAA
04445	USP33	GCAACAGTGATAGAGCAGAAA
04446	USP33	GCCTCAGAACATTTGGGATAA
38844	USP34	CCAGAGAATATCCGCCTTATT
38846	USP34	GCGAATTGAATTTGCCCATAA
38847	USP34	GCTCGTAACATGGCTGACTTA
38848	USP34	GCAGATATTGAAGCCCTCAAA
22444	USP36	GCGACTGAATATACACCTGTA
22445	USP36	CGTCCGTATATGTCCCAGAAT
22446	USP36	GCAACTCGAATAGCAGCAGAT
22447	USP36	GCGGTCAGTCAGGATGCTATT
22448	USP36	TCCAAGAAGAACATCGGCAAT
04567	USP37	GAGAATAAAGTCAGCCTAGTA
04568	USP37	CCGGATTTGCAGAAGATGATA
04569	USP37	CCCTAACTTCTCTGGCCTATT
04570	USP37	GCTACCGAGTTAAGTCTTCAA
38834	USP38	CGTCTAATACTATGACTGTTA
38836	USP38	CCAGAGATTCTTACTGGTGAT
38837	USP38	GCATCATTTGAACCTTCTGTA
38838	USP38	CCCTATCTATTAAGTTCCGTT
01150	USP39	GATTTGGAAGAGGCGAGATAA
01151	USP39	CCTTCCAGACAACATGAGAT
01152	USP39	CTGAATAACATAAAGGCCAAT
01153	USP39	GTTGCCTCCATATCTAATCTT
01154	USP39	GCCGGGTATTGTGGGACTGAA
04038	USP4	CATGTCCGAGTTTGCTGTAA

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
04039	USP4	GCACCACTGACTGACTACTTT
04040	USP4	CCCAACTGTAAGAAGCATCAA
04041	USP4	GCCCAGAATGTGCTAAGGTTT
04042	USP4	GAGGCGTGGAATAAACTACTA
38824	USP40	CCCGTGGAGAAGATTGAAATT
38825	USP40	CGGAGGCCATTACCATGTATA
38826	USP40	CGGAGATACTATTGGTGTTAA
38827	USP40	CCTCAGTATCATTTCTTCAAT
38828	USP40	CGGATTAATCTCAAGCCCTTT
38814	USP44	CGGATGATGAAGTTGTGCAAT
38815	USP44	CGGCAGGAATTGGAGTATCAA
38816	USP44	CCTCGTCTAATGAAATCCTTA
38818	USP44	GCACAGGAGAAGGATACTAAT
22399	USP46	GACAGAAGAATTGGGTAGATA
22400	USP46	CCAGAGCAGTTTCCAATCAAT
22401	USP46	CGCTTACCAATGAACTCGAT
22402	USP46	GCTAAACACTATTGCGGACAT
07692	USP47	CGGAATCATGTTGTGCACTAT
07693	USP47	GCGCAATACATGCAAGATAAA
07694	USP47	CCAGTGATTATGTCAGCCAAA
07695	USP47	GCAGCTTTCAAACAACATTTA
07696	USP47	CCGAGGAAGTAGATATGAGTA
38829	USP48	GCATTAAAGCAAAGGTGGATT
38830	USP48	GCCACCATCTATGTCCATAAA
38831	USP48	GCGTAAGCAAAGTGTGGATAA
38832	USP48	CCACTTGTTATGTCAACACAT
38833	USP48	GCGTCTGAAGAACCAACTAAA
04476	USP49	CTAGAGGGAAATTACATACAT
04477	USP49	CGGGATCTCTACGTGTTCTGT
04478	USP49	CATGCTCTCCTCTCTTGACAA
04479	USP49	CTCAGTCAGGTCACATGTATA
04480	USP49	GCCGTAATCATCGAGAGAAGA
04066	USP5	CTTTGCCTTCATTAGTCACAT
04067	USP5	CGGCTGGCTATTGGTGTTGAA
04068	USP5	GATAGACATGAACCAGCGGAT
04069	USP5	GACCACACGATTTGCCTCATT
04070	USP5	AGCGAGGAGAAGTTTGAATTA
38859	USP50	CCGGAGAAGATCATATGAGAA
38860	USP50	CGTATGTTTAAAGTGTGAGAA
38861	USP50	CCAAGCGATTGCAGTGAAGTT
38862	USP50	GCAACCTCTACCCAGCATTTA
38849	USP51	GCCTGCAATCAGATGTCACAT
38850	USP51	CCCAGAGACTAGGAAACGTAA
38851	USP51	CCAACAGATTGTGTGCCCAAT
38852	USP51	CGTGCTACATAGACACAGCAA
04427	USP52	CCTCTCCCTTTACTGTTCTAT
04428	USP52	GCTTCCTTTCTCCATTGCGAT
04429	USP52	CCTGCCTTCTTGCGCTTCATT
04430	USP52	CAGTGATGATATTCGGCAGAT
38839	USP53	GCCACCAAAGAAATATGCTAT
38840	USP53	GCAGCCAAGATTCTAGGGATA

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
38841	USP53	CCTGGAAGTATGCTATCACTA
38842	USP53	CCTGTAATTCATAAGTCAGAT
38843	USP53	CCTGTCCAAATGAGACAGTTT
38854	USP54	GTTCTGTGATTCTCAGCTTAA
38855	USP54	CCAGCATATTGGGACCAGATT
38856	USP54	GCTGTAGTCCTTCAAATTCAT
38857	USP54	CCACAGGCAAGGTTTACCTAA
38858	USP54	CATGAGGGATAGTACAGGTTT
07335	USP6	CCCTGCAAGTTGATTCTCATT
07336	USP6	CGTTGGAATCAACAGCAGCAT
07337	USP6	GCGGAAGGACATACTTATGAA
04057	USP7	CCAGCTAAGTATCAAAGGAAA
04058	USP7	CCTGGATTTGTGGTTACGTTA
04059	USP7	TGTATCTATTGACTGCCCTTT
04060	USP7	GTGTCCTATATCCAGTGTA
07435	USP8	GCTGTGTTACTAGCACTATAT
07436	USP8	CCCAGATATAACCCAGGCTAT
07437	USP8	GCCAGAATGAAGAGGTGTCTA
07438	USP8	GCCTTCATGTATTTGTCTCTA
07439	USP8	CCACAGATTGATCGTACTAAA
07361	USP9X	GAGAGTTTATTCACTGTCTTA
07362	USP9X	CGATTCTTCAAAGCTGTGAAT
07363	USP9X	CGACCCTAAACGTAGACATTA
07364	USP9X	CGCCTGATTCTTCCAATGAAA
07365	USP9Y	GCAGTGTAACATTTCTAGATA
07366	USP9Y	CCTCCCAAGTTCTATACCTAA
07367	USP9Y	GCGATGTATTGTTAATCGTAT
07368	USP9Y	GCTCTTACATTACAGGACCTT
07369	USP9Y	GCTATCCAACCTCAAACGATT
04249	VCP	CCTATCAACAGCCATTCTCAA
04250	VCP	CCTAGCCCTTATTGCATTGTT
04251	VCP	CCTGATGTGAAGTACGGCAAA
04252	VCP	GATGGATGAATTGCAGTTGTT
04253	VCP	AGGGAGGTAGATATTGGAATT
10459	VHL	CAATGTTGACGGACAGCCTAT
10460	VHL	TATCACACTGCCAGTGTATAC
10461	VHL	TAGGATTGACATTCTACAGTT
39624	VHL	GCCTAGTCAAGCCTGAGAATT
39625	VHL	GATCTGGAAGACCACCCAAAT
39626	VHL	CCATCTCTCAATGTTGACGGA
73053	VPS11	GCTGTTTAAAGAAGAACCTATT
73054	VPS11	CCTCAAGCATATCGAGAACAA
73055	VPS11	GCCAACTGTTGTATCTTGTTT
73056	VPS11	GCTTTGAGAGTTACTCGGAAA
73057	VPS11	GCTCCGACAAGCAGATTCTAA
72338	WSB2	CCAGACACTATTACTGGCTTT
72339	WSB2	CGGTAAACAGATTCAAGTGTT
72340	WSB2	CCCTTCGAAGTTTCCTAACAA
72341	WSB2	CACGGCTTCTTACGATACCAA
72342	WSB2	CCCACCAGTTTGATTGGAAGT
03395	WWP1	ATTGCTTATGAACGCGGCTTT

ID TRCN00000	Gen	Secuencia shARN (5'-3')
03396	WWP1	ACAACACACCTTCATCTCCGT
03397	WWP1	TCTGTAATAAAGGTGGTCCA
03398	WWP1	CCTCTCAAATTCATAACAGTT
01512	WWP2	GTTTGTAGGTTTGCCAGGTT
01513	WWP2	CGGCACAGAGTCATTTAGATT
01514	WWP2	CCTCACCTACTTTCGCTTTAT
01515	WWP2	CCCAAGGTGCATAATCGTCAA
01516	WWP2	CCAAAGATTCCTATACCAATT
04530	ZA20D1	CGGGACTTGATGCTGCGGAAA
04531	ZA20D1	CGGTCCCATGTCTCCTCCAAT
04532	ZA20D1	CCCAACTCAGACCAAAATGCAA
04533	ZA20D1	GCAAGGAGGCTAAACAAAGTT
04534	ZA20D1	CCTGTATATGAGAGCCTTGAA
12938	ZBTB16	CCACCGCAATAGTCAACACTA
12939	ZBTB16	GAATGCACTTACTGGCTCATT
12940	ZBTB16	GTGGACAGTTTGATGACCATA
12941	ZBTB16	CCGGGATGAGAGCACACTCAA
12942	ZBTB16	GCAATAGTCAACACTATACTT
37539	ZC3HC1	CGGAACAACCTTCATTGGAAT
37540	ZC3HC1	CCAGCAGATTGAATCGTCCAT
37541	ZC3HC1	CTCTCTGAGAAATCAAGGAAA
37542	ZC3HC1	CTGCTATTCTTGTTAGTGAAT
37543	ZC3HC1	CCTTGGGTGAATATCACACTT
73143	ZFYVE19	GTCCCTGGAATGAGGAAAGAT
73144	ZFYVE19	GCTATCGATGAAAGCTGGAAA
73145	ZFYVE19	CTGCCAGATTCTCTGGTAAA
73146	ZFYVE19	GACACGACAAGACCAGATGAT
73147	ZFYVE19	ACACGACAAGACCAGATGATT
33724	ZNF179	CCAGAGATTGTCTGGCAGATA
33725	ZNF179	TCCACCCAGAAAGATGCCATT
33726	ZNF179	ACCTCTTAGTTTCGTGACTCAT
33727	ZNF179	CCGGAAGATATGCAAGCAGAA
34099	ZNF650	GCAGTATATGACTGTGTTATT
34100	ZNF650	GCTTTGTGATAAGTGAACAT
34101	ZNF650	CCGTTTCATGATGTGAGGCTTT
34102	ZNF650	CGAGGCAAACCTCTCTACATT
34103	ZNF650	CCTTACGCAAAGACCACTTTA
73043	ZNRF1	CCCTAATATCTTGACTTCATT
73044	ZNRF1	ACAACGATGATGTGCTGACTA
73045	ZNRF1	CGAGATGGAAATGCACTTTAT
73046	ZNRF1	ACGAGATGGAAATGCACTTTA
73047	ZNRF1	CAGCTCGCATAGTGGTTTCAA
11162	ZNRF2	CCCTTAATAGTCATCTACATA
11163	ZNRF2	CCGCACATGTTTGGAGGATTT
11164	ZNRF2	GCCACGAATAACCTATAATGA
11165	ZNRF2	GAGGATGTACTGAGTAAAGAT
11166	ZNRF2	GCTCGGATCTACCTCCAGTA

Tabla 6- Lista de shARNs en biblioteca de ARNs de interferencia dirigido a genes del UPS.

guide ID	Gen	Secuencia gARN (5'-3')
53633742	USP19	CTAAATTCTCCTCTGAGCCCAGG
53633644	USP19	CCGGGTGCAGCCTCAGGAAGTTT

Tabla 7- Lista de gARNs dirigidos al gen *usp19*. En esta tabla se indica el número de identificación de cada ARN guía, el nombre del gen blanco y la secuencia del mismo.

Detalle de oligonucleótidos utilizados en la preparación de las muestras para secuenciación por NGS *Illumina*.

Nombre	Reacción	Secuencia (5' - 3')
pLKO.1 Fw	PCR #1	GGGCCTATTTCCCATGATTCCTTC
PLKO.1 Rv	PCR #1	CCAAAGTGGATCTCTGCTGTCCC
S muestra 1	Linker	Fos-TCGA ACTGCTGATGACGACT AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA
AS muestra 1	Linker	TACACGACGCTCTTCCGATCT AGTCGTCATCAGCAG*T
S muestra 2	Linker	Fos-TCGA CTGATGACGACTACTG AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA
AS muestra 2	Linker	TACACGACGCTCTTCCGATCT CAGTAGTCGTCATCA*G
S muestra 3	Linker	Fos-TCGA TGACGACTACTGCTGA AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA
AS muestra 3	Linker	TACACGACGCTCTTCCGATCT TCAGCAGTAGTCGTC*A
S muestra 4	Linker	Fos-TCGA GACTACTGCTGATGAC AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA
AS muestra 4	Linker	TACACGACGCTCTTCCGATCT GTTCATCAGCAGTAGT*C
S muestra 5	Linker	Fos-TCGA AGTCGTCATCAGCAGT AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA
AS muestra 5	Linker	TACACGACGCTCTTCCGATCT ACTGCTGATGACGAC*T
S muestra 6	Linker	Fos-TCGA CAGTAGTCGTCATCAG AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA
AS muestra 6	Linker	TACACGACGCTCTTCCGATCT CTGATGACGACTACT*G
S muestra 7	Linker	Fos-TCGA TCAGCAGTAGTCGTCA AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA
AS muestra 7	Linker	TACACGACGCTCTTCCGATCT TGACGACTACTGCTG*A
S muestra 8	Linker	Fos-TCGA GTCATCAGCAGTAGTC AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA
AS muestra 8	Linker	TACACGACGCTCTTCCGATCT GACTACTGCTGATGA*C
S muestra 9	Linker	Fos-TCGA TAGCAGCTGCTACTAG AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA
AS muestra 9	Linker	TACACGAC GCTCTTCCGATCTCTAGTAGCAGCTGCT*A
S muestra 10	Linker	Fos-TCGA CTAGTAGCAGCTGCTA AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA
AS muestra 10	Linker	TACACGACGCTCTTCCGATCT TAGCAGCTGCTACTA*G
S muestra 11	Linker	Fos-TCGA GCTACTAGTAGCAGCT AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA
AS muestra 11	Linker	TACACGACGCTCTTCCGATCT AGCTGCTACTAGTAG*C
S muestra 12	Linker	Fos-TCGA AGCTGCTACTAGTAGC AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA
AS muestra 12	Linker	TACACGACGCTCTTCCGATCT GCTACTAGTAGCAGC*T
PCR #2 fwd	PCR #2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGATGGAAAGGACGAAACACCGG
PCR #2 rev	PCR #2	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTCCGATCT

Tabla 8. Lista de oligonucleótidos utilizados en la preparación de las muestras para secuenciación por NGS. sense, AS= antisense; *= enlace fosforotioato; Fos= fosforilación 5'.

Detalle de oligonucleótidos utilizados en qPCR

Nombre	Muestra	Secuencia (5' - 3')
qPCR USP19 Fw	cADN	TGGTGCGGTTTGCAGGTGGTCAG
qPCR USP19 Rv	cADN	GGGCAGTGTTCAGGTGCAGGAGAC
qPCR GAPDH Fw	cADN	TGCACCACCAACTGCTTAGC
qPCR GAPDH Rv	cADN	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
Human GAPDH Fw	gADN (met)	TACTAGCGGTTTTACGGGCG
Human GAPDH Rv	gADN (met)	TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA
Mouse GAPDH Fw	gADN (met)	ATGCCACCGACCCCGAGGAA
Mouse GAPDH Rv	gADN (met)	CCTGGCGATGGCTCGCACTT

Tabla 9. Lista de oligonucleótidos utilizados en PCR cuantitativa.**Macros de Image J-FIJI**

En esta tesis se utilizaron distintas secuencias de instrucciones (macro) para analizar imágenes tomadas con el microscopio de campo claro/fluorescencia. Todas ellas se basan en la creación de una imagen binaria y posterior segmentación.

Se describe a continuación las macros diseñadas para cada experimento.

MIGRACIÓN

```

dir1 = getDirectory("Elegir carpeta fuente");
list = getFileList(dir1);

for (i=0; i<list.length; i++){
    showProgress(i+1, list.length);
    open(dir1+list[i]);

    run("32-bit");

selectWindow(list[i]);

run("Threshold...");
waitForUser("elegir el threshold y clickear OK, or cancelar para salir
de la macro "); // acá es muy importante elegir bien el umbral de
color

selectWindow(list[i]);

run("Convert to Mask");
run("Set Scale...", "distance=0 known=1 pixel=1 unit=pixel"); // está
expresado en valores de pixel
run("Watershed", "stack");
run("Fill Holes", "stack");

```



```
run("Analyze Particles...", "size=50-Infinity circularity=0.00-1.00
show=Nothing summarize stack"); // determinado empíricamente, de modo
tal de que 50 píxeles sea menor que el tamaño de un núcleo (las
partículas a contar en este caso).
```

```
close();
```

```
}
```

ENSAYO CIERRE DE HERIDA

```
dir1 = getDirectory("Elegir carpeta fuente");
dir2 = getDirectory("Elegir carpeta final");
list = getFileList(dir1);
```

```
x = getNumber("Input lower threshold", 50);
y = getNumber("Input upper threshold", 255);
```

```
//Se generará una ventana en la que hay que elegir manualmente los
valores de threshold. Comienza con los valores 50 y 255, pero luego se
ajustan en cada caso (video).
```

```
setBatchMode(true);
```

```
for (i=0; i<list.length; i++){
    showProgress(i+1, list.length);
    open(dir1+list[i]);

    run("8-bit");
    run("Duplicate...", "title=copy duplicate");
selectWindow(list[i]);
run("Sharpen", "stack");
run("Find Edges", "stack");
```

```
setThreshold(x,y); // muy importante elegir bien el umbral, generando
mucho contraste.
```

```
run("Convert to Mask", " ");
run("Fill Holes", "stack");
```

```
run("Analyze Particles...", "size=12000-Infinity circularity=0.00-1.00
show=Outlines summarize stack"); // el tamaño está determinado por la
resolución de la imagen.
```

```
selectWindow("Drawing of "+list[i]);
run("Red");
run("Invert LUT");
run("RGB Color");
selectWindow("copy");
run("RGB Color");
imageCalculator("Add stack", "copy", "Drawing of "+list[i]);
run("Size...", "width=600 constrain interpolate");
saveAs("Tiff", dir2+"Drawing "+list[i]);
```

```
close();
```

```
close();
close();
}
```

ENSAYO CLONOGÉNICO EN 2/3 DIMENSIONES

```
dir1 = getDirectory("Elegir carpeta fuente");
list = getFileList(dir1);

for (i=0; i<list.length; i++){
    showProgress(i+1, list.length);
    open(dir1+list[i]);

    run("32-bit");

selectWindow(list[i]);
run("Threshold...");
waitForUser("elegir el threshold y clickear OK, or cancelar para salir
de la macro"); // acá es muy importante elegir bien el umbral de color

selectWindow(list[i]);

run("Convert to Mask");
run("Set Scale..."); // si las fotografías no tienen la misma
resolución, hay que setear la escala en cada caso.
run("Watershed", "stack");
run("Fill Holes", "stack");
run("Analyze Particles...", "size=0.00008-Infinity circularity=0.00-
1.00 show=Nothing summarize stack"); // el tamaño de las partículas
que uno mire tiene que ver con la escala y la resolución de las
fotografías

close();

}
```

PROLIFERACIÓN POR MEDICIÓN DE ÁREA

```
dir1 = getDirectory("Elegir carpeta fuente ");
dir2 = getDirectory("Elegir carpeta final");
list = getFileList(dir1);

x = getNumber("Input lower threshold", 60);
y = getNumber("Input upper threshold", 255);
//Se generará una ventana en la que hay que elegir manualmente los
valores de threshold. Comienza con los valores 60 y 255, pero luego se
ajustan en cada caso (video).

setBatchMode(true);
for (i=0; i<list.length; i++){
    showProgress(i+1, list.length);
```

```

    open(dir1+list[i]);

    run("8-bit
    run("Duplicate...", "title=copy duplicate");
selectWindow(list[i]);
run("Sharpen", "stack");
run("Find Edges", "stack");

setThreshold(x,y); // elegir el umbral

run("Convert to Mask", " ");

run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity circularity=0.00-1.00
show=Outlines summarize stack"); // el tamaño está determinado por la
resolución de la imagen y por el tamaño mínimo de partícula que se
quiere detectar.

selectWindow("Drawing of "+list[i]);
run("Red");
run("Invert LUT");
run("RGB Color");
selectWindow("copy");
run("RGB Color");
imageCalculator("Add stack", "copy", "Drawing of "+list[i]);
run("Size...", "width=600 constrain interpolate");
saveAs("Tiff", dir2+"Drawing "+list[i]);

close();
close();
close();
}

```

INVASIÓN DE GOTA DE AGAR NOBLE

Se utilizó el macro TrackMate versión v3.5.1 del ImageJ FIJI para analizar el desplazamiento de las células que invadieron la gota de agar noble. Se utilizó el *LogG detector* y *simple LAP tracker*. Para calcular el número de células que invadieron la gota se utilizó el área ocupada por la gota como el área de interés, y se utilizó la macro de migración para cuantificar número de núcleos en dicha áreas.

Determinación de número de shARNs por célula

Fue importante determinar las condiciones óptimas de trabajo en las que hubiese un único shARN por célula para poder asociar un fenotipo determinado con el silenciamiento de un único gen. A tal fin se realizaron diluciones de la suspensión de partículas virales que contenía la biblioteca de shARNs para infectar las células MDAMB231, y se evaluó el

porcentaje de supervivencia de las mismas luego de la selección con puromicina (mediante tinción con cristal violeta, analizando porcentaje de supervivencia respecto la infección con la suspensión viral no diluida, que infecta el 100% de las células –esto último se determino al comparar el porcentaje de supervivencia *versus* células no infectadas y no seleccionadas).

Se utilizaron diluciones 1/3, 1/9, 1/27, 1/50, 1/100 y 1/150 de la suspensión de partículas virales preparada.

Los resultados se muestran a continuación:

Dilución	Supervivencia respecto a SD
Sin diluir (SD)	-
Dil 1/3	99%
Dil 1/9	98%
Dil 1/27	96%
Dil 1/50	32%
Dil 1/100	20%
Dil 1/150	11,5%

Tabla 10. Porcentaje de supervivencia. Se evaluó el porcentaje de supervivencia de las células blanco infectadas con distintas diluciones de la suspensión de partículas virales, comparándolo con las células infectadas con la suspensión SD. La estimación del número de células que sobrevivieron luego de la selección con puromicina se realizó mediante coloración con cristal violeta y medición de absorbancia a 570nm.

Las distintas poblaciones generadas (transducidas con distintas diluciones de partículas virales) fueron amplificadas y se obtuvieron clones individuales mediante dilución limitante. Se extrajo ADN de cada uno de ellos y se realizó la PCR #1, que sirve para aislar y amplificar el casete de shARN. Los oligonucleótidos utilizados para esta PCR se alinean con regiones dentro de los LTRs, por lo que entonces son comunes a todos los clones de la biblioteca. Se corrieron 5 µl de cada producto de la PCR #1 en un gel de agarosa TAE 2% a fin de visualizar la banda esperada de 497 pares de bases y luego se purificó cada producto haciendo uso del kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen-28104). Se analizaron los mismos mediante secuenciación Sanger, y se evaluó el cromatograma resultante.

En aquellos casos donde había más de un shARN por célula, la secuenciación era eficiente para las zonas comunes de todos los plásmidos e ineficiente en la zona diferencial (secuencia de shARN). Por el contrario, si un único shARN había infectado la población clonal en estudio entonces la secuenciación resultaba efectiva para la zona común y la zona diferencial. Se eligió trabajar con la dilución 1/150 de la suspensión de partículas virales puesto que en esa condición 10/10 clones tuvieron una secuenciación eficiente para la zona plasmídica y la zona del shARN específica, indicando entonces que en esos clones había entrado un único shARN por célula.

El procedimiento se ilustra en la **figura 53**.

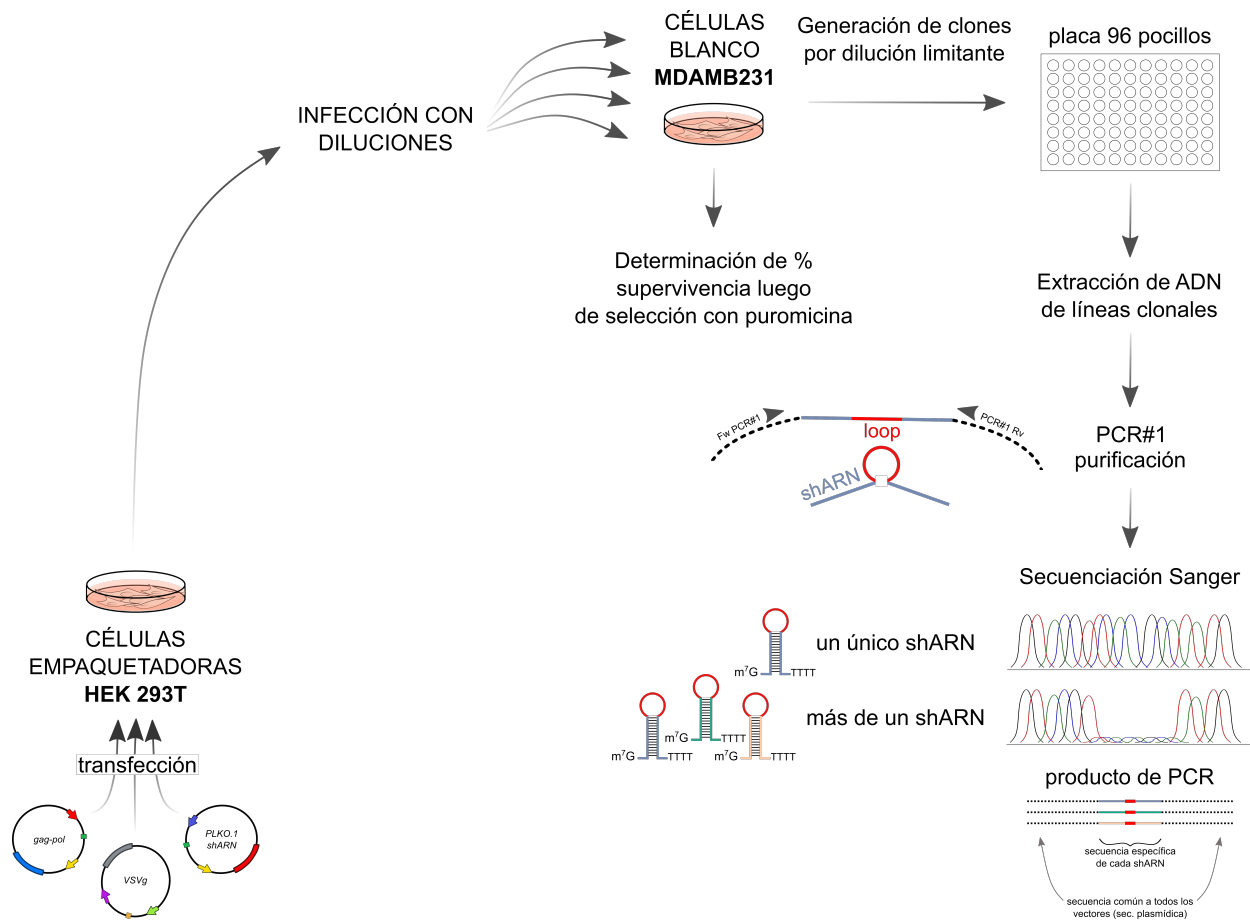


Figura 53. Determinación del número de shARN por célula. Se esquematiza el procedimiento utilizado para determinar la dilución de la suspensión viral con la que debía realizarse la infección, de modo tal de encontrar un único shARN por célula. En primer lugar se generaron las partículas virales en la línea celular Hek293T, y se transdujeron células MDAMB231 con distintas diluciones de las suspensión de virus. Se determinó, luego de seleccionar con puromicina, el porcentaje de las células que sobrevivían en los distintos tratamientos (distintas diluciones de la suspensión viral) mediante tinción con cristal violeta y estimación del número de células mediante técnicas espectrofotométricas. En simultáneo se generaron líneas clonales a partir de las células infectadas con las diluciones, se extrajo su ADN, se realizó la PCR #1 para amplificar el casete del shARN, se purificó dicho producto y se analizó mediante secuenciación Sanger. En aquellos casos en los que se había incorporado un único shARN por célula, la PCR #1 era homogénea, y la secuenciación era eficiente para las zonas plasmídicas y codificantes del shARN. En aquellos casos donde había más de un shARN por célula el producto de PCR #1 era mixto, y la secuenciación era efectiva únicamente para las zonas comunes del producto de PCR (zonas plasmídicas) y se informaban secuencias indeterminadas para las zonas codificantes.

BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] International Human Genome Sequencing C. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431:931-45.
- [2] Jensen ON. Modification-specific proteomics: Characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology* 2004;8:33-41.
- [3] Glickman MH, Ciechanover A. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological Reviews* 2002;82:373-428.
- [4] Hochstrasser M. Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nature cell biology* 2000;2:E153-E7.
- [5] Hochstrasser M. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 2009;458.
- [6] Watson IR, Irwin MS, Ohh M. NEDD8 pathways in cancer, Sine Quibus Non. *Cancer Cell* 2011;19:168-76.
- [7] Vierstra RD. The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Plant physiology* 2012;160:2-14.
- [8] Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. Modification of Proteins by Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2006;22:159-80.
- [9] Jentsch S, Pyrowolakis G. Ubiquitin and its kin: How close are the family ties? *Trends in Cell Biology* 2000;10:335-42.
- [10] Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry* 2001;70:503-33.
- [11] Schulman Ba, Harper JW. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:319-31.
- [12] Stewart MD, Ritterhoff T, Klevit RE, Brzovic PS. E2 enzymes: more than just middle men. *Cell Res* 2016;26:423-40.
- [13] Valimberti I, Tiberti M, Lambrugh M, Sarcevic B, Papaleo E. E2 superfamily of ubiquitin-conjugating enzymes: constitutively active or activated through phosphorylation in the catalytic cleft. *Sci Rep* 2015;5:14849.
- [14] Kim HT, Kim KP, Lledias F, Kisselev AF, Scaglione KM, Skowrya D, et al. Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *The Journal of biological chemistry* 2007;282:17375-86.
- [15] Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *Journal of Cell Science* 2012;125:531-7.
- [16] LORICK KL, JENSEN JP, FANG S, ONG AM, HATAKEYAMA S, WEISSMAN AM. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5.
- [17] Metzger MB, Pruneda JN, Klevit RE, Weissman AM. RING-type E3 ligases: Master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 2013;1843:47-60.
- [18] Deshaies RJ, Joazeiro CAP. RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. *Annual Review of Biochemistry* 2009;78:399-434.
- [19] Bernassola F, Karin M, Ciechanover A, Melino G. The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer Cell* 2008;14:10-21.
- [20] Chen C, Seth AK, Aplin AE. Genetic and expression aberrations of E3 ubiquitin ligases in human breast cancer. *Molecular cancer research : MCR* 2006;4:695-707.
- [21] Eisenhaber B, Chumak N, Eisenhaber F, Hauser MT. The ring between ring fingers (RBR) protein family. *Genome biology* 2007;8:209.

- [22] Rieser E, Cordier SM, Walczak H. Linear ubiquitination: A newly discovered regulator of cell signalling. *Trends in Biochemical Sciences* 2013;38:94-102.
- [23] Komander D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society transactions* 2009;37:937-53.
- [24] Ikeda F, Dikic I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO reports* 2008;9:536-42.
- [25] Husnjak K, Dikic I. Ubiquitin-Binding Proteins: Decoders of Ubiquitin-Mediated Cellular Functions. *Annual Review of Biochemistry* 2012;81:291-322.
- [26] Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK, et al. A Multiubiquitin Chain Is Confined to Specific Lysin in a Targeted Short-Lived Protein. *Science* 1989;243:8.
- [27] Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 1996;65:801-47.
- [28] Gallastegui N, Groll M. The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends Biochem Sci* 2010;35:634-42.
- [29] Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR, 3rd, Koonin EV, et al. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 2002;298:611-5.
- [30] Stone M, Hartmann-Petersen R, Seeger M, Bech-Otschir D, Wallace M, Gordon C. Uch2/Uch37 is the major deubiquitinating enzyme associated with the 26S proteasome in fission yeast. *Journal of molecular biology* 2004;344:697-706.
- [31] Hu M, Li P, Song L, Jeffrey PD, Chernova TA, Wilkinson KD, et al. Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *The EMBO journal* 2005;24:3747-56.
- [32] Borodovsky AK, Benedikt M., Casagrande RO, Herman S., Wilkinson KD, Ploegh HL. A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14. *The EMBO journal* 2001;20:5187-96.
- [33] Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:599-609.
- [34] Hunter T. The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell* 2007;28:730-8.
- [35] Fraile JM, Quesada V, Rodriguez D, Freije JM, Lopez-Otin C. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene* 2012;31:2373-88.
- [36] Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 2009;78:363-97.
- [37] Song L, Rape M. Reverse the curse - the role of deubiquitination in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:156-63.
- [38] Komada M. Controlling Receptor Downregulation by Ubiquitination and Deubiquitination. *Current Drug Discovery Technologies* 2008;5:78-84.
- [39] Schmidt M, Hanna J, Elsasser S, Finley D. Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine. *Biological chemistry* 2005;386:725-37.
- [40] Daniel JA, Grant PA. Multi-Tasking on Chromatin with the Saga Coactivator Complexes. *Mutat Res* 2007;618:135-48.
- [41] Kennedy JE, Marchese A. Regulation of GPCR trafficking by ubiquitin. 1 ed: Elsevier Inc.; 2015.
- [42] Adhikari A, Xu M, Chen ZJ. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene* 2007;26:3214-26.

- [43] Lindner HA. Deubiquitination in virus infection. *Virology* 2007;362:245-56.
- [44] Rytönen A, Holden DW. Bacterial interference of ubiquitination and deubiquitination. *Cell host & microbe* 2007;1:13-22.
- [45] Fischer JA. Deubiquitinating Enzymes: Their Roles in Development, Differentiation, and Disease. *International Review of Cytology* 2003;229:43-72.
- [46] Jiang Y-h, Beaudet AL. Human disorders of ubiquitination and proteasomal degradation. *Current Opinion in Pediatrics* 2004;16:419-26.
- [47] Nijman SMB, Luna-Vargas MPA, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AMG, Sixma TK, et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 2005;123:773-86.
- [48] Sahtoe DD, Sixma TK. Layers of DUB regulation. *Trends in Biochemical Sciences* 2015;40:456-67.
- [49] Lee JG, Kim W, Gygi S, Ye Y. Characterization of the deubiquitinating activity of USP19 and its role in endoplasmic reticulum-associated degradation. *The Journal of biological chemistry* 2014;289:3510-7.
- [50] He WT, Zheng XM, Zhang YH, Gao YG, Song AX, van der Goot FG, et al. Cytoplasmic Ubiquitin-Specific Protease 19 (USP19) Modulates Aggregation of Polyglutamine-Expanded Ataxin-3 and Huntingtin through the HSP90 Chaperone. *PLoS One* 2016;11:e0147515.
- [51] Combaret L, Adegoke OA, Bedard N, Baracos V, Attaix D, Wing SS. USP19 is a ubiquitin-specific protease regulated in rat skeletal muscle during catabolic states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E693-700.
- [52] Wiles B, Miao M, Coyne E, Larose L, Cybulsky AV, Wing SS. USP19 deubiquitinating enzyme inhibits muscle cell differentiation by suppressing unfolded-protein response signaling. *Molecular biology of the cell* 2015;26:913-23.
- [53] Ogawa M, Yamaji R, Higashimura Y, Harada N, Ashida H, Nakano Y, et al. 17 β -estradiol represses myogenic differentiation by increasing ubiquitin-specific peptidase 19 through estrogen receptor α . *The Journal of biological chemistry* 2011;286:41455-65.
- [54] Ogawa M, Kitakaze T, Harada N, Yamaji R. Female-specific regulation of skeletal muscle mass by USP19 in young mice. *The Journal of endocrinology* 2015;225:135-45.
- [55] Hassink GC, Zhao B, Sompallae R, Altun M, Gastaldello S, Zinin NV, et al. The ER-resident ubiquitin-specific protease 19 participates in the UPR and rescues ERAD substrates. *EMBO Rep* 2009;10:755-61.
- [56] Harada K, Kato M, Nakamura N. USP19-Mediated Deubiquitination Facilitates the Stabilization of HRD1 Ubiquitin Ligase. *International journal of molecular sciences* 2016;17.
- [57] Nakamura N, Harada K, Kato M, Hirose S. Ubiquitin-specific protease 19 regulates the stability of the E3 ubiquitin ligase MARCH6. *Experimental cell research* 2014;328:207-16.
- [58] Perrody E, Abrami L, Feldman M, Kunz B, Urbe S, van der Goot FG. Ubiquitin-dependent folding of the Wnt signaling coreceptor LRP6. *eLife* 2016;5.
- [59] Lee JG, Takahama S, Zhang G, Tomarev SI, Ye Y. Unconventional secretion of misfolded proteins promotes adaptation to proteasome dysfunction in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 2016;18:765-76.
- [60] Lu Y, Adegoke OA, Nepveu A, Nakayama KI, Bedard N, Cheng D, et al. USP19 deubiquitinating enzyme supports cell proliferation by stabilizing KPC1, a ubiquitin ligase for p27Kip1. *Mol Cell Biol* 2009;29:547-58.
- [61] Lu Y, Bedard N, Chevalier S, Wing SS. Identification of distinctive patterns of USP19-mediated growth regulation in normal and malignant cells. *PLoS One* 2011;6:e15936.

- [62] Mei Y, Hahn AA, Hu S, Yang X. The USP19 deubiquitinase regulates the stability of c-IAP1 and c-IAP2. *The Journal of biological chemistry* 2011;286:35380-7.
- [63] Altun M, Zhao B, Velasco K, Liu H, Hassink G, Paschke J, et al. Ubiquitin-specific protease 19 (USP19) regulates hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) during hypoxia. *The Journal of biological chemistry* 2012;287:1962-9.
- [64] Orlowski RZ, Dees EC. The role of the ubiquitination-proteasome pathway in breast cancer: applying drugs that affect the ubiquitin-proteasome pathway to the therapy of breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 2003;5:1-7.
- [65] Weathington NM, Mallampalli RK. Emerging therapies targeting the ubiquitin proteasome system in cancer. *The Journal of clinical investigation* 2014;124:6-12.
- [66] Dees EC, Orlowski RZ. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway in breast cancer therapy. *Future oncology (London, England)* 2006;2:121-35.
- [67] Field-Smith A, Morgan G, Davies F. Bortezomib (VelcadeTM) in the treatment of multiple myeloma. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2006;2:271-9.
- [68] Yang CH, Gonzalez-Angulo AM, Reuben JM, Booser DJ, Pusztai L, Krishnamurthy S, et al. Bortezomib (VELCADE) in metastatic breast cancer: pharmacodynamics, biological effects, and prediction of clinical benefits. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2006;17:813-7.
- [69] Huang X, Dixit VM. Drugging the undruggables: exploring the ubiquitin system for drug development. *Cell Research* 2016;26:484-98.
- [70] Landré V, Rotblat B, Melino S, Bernassola F, Melino G. Screening for E3-ubiquitin ligase inhibitors: challenges and opportunities. *Oncotarget* 2014;5:7988-8013.
- [71] Ndubaku C, Tsui V. Inhibiting the deubiquitinating enzymes (DUBs). *Journal of medicinal chemistry* 2015;58:1581-95.
- [72] Abramson VG, Lehmann BD, Ballinger TJ, Pietersen JA. Subtyping of triple-negative breast cancer: Implications for therapy. *Cancer* 2015;121:8-16.
- [73] Lehmann BDB, Bauer JaJ, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy aB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation* 2011;121:2750-67.
- [74] Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *Journal of Clinical Oncology* 2010;28:3271-7.
- [75] Criscitiello C, Azim HA, Schouten PC, Linn SC, Sotiriou C. Understanding the biology of triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology* 2012;23.
- [76] Aysola K, Desai A. Triple Negative Breast Cancer – An Overview. *Hereditary Genetics* 2012;10-2.
- [77] Dent R, Hanna WM, Trudeau M, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2009;115:423-8.
- [78] Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology* 2011;24:157-67.
- [79] Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SAW, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research* 2015;21:1688-98.
- [80] Brouckaert O, Wildiers H, Floris G, Neven P. Update on triple-negative breast cancer: Prognosis and management strategies. *International Journal of Women's Health* 2012;4:511-20.

- [81] Kalimutho M, Parsons K, Mittal D, López JA, Srihari S, Khanna KK. Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer: Combating a Stubborn Disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 2015;36:822-46.
- [82] Anders C, Carey LaL. Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology* (Williston Park, NY) 2008;22:1233-43.
- [83] André F, Zielinski CC. Optimal strategies for the treatment of metastatic triple-negative breast cancer with currently approved agents. *Annals of Oncology* 2012;23.
- [84] Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature reviews Cancer* 2003;3:362-74.
- [85] Friedl P, Brocker EB. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix
. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 2000;57:41-64.
- [86] Adams JC. Cell-matrix contact structures. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 2000;58:371-92.
- [87] Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 2002;110:673-87.
- [88] Burridge K C-WM. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:463-518.
- [89] Zamir E KM, Posen Y, Erez N, Yamada KM, Katz BZ, Lin S, Lin DC, Bershadsky A, Kam Z, Geiger B. Dynamics and segregation of cell–
matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2000;2:191-6.
- [90] Zamir E, Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of cell Science* 2001;114:3583-90.
- [91] Regen CM HA. Dynamics of beta 1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts. *J Cell Biol* 1992;119:1347-59.
- [92] Smilenov LB MA, Pelham RJ, Marcantonio EE, Gundersen GG. Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science* 1999;286:1172-4.
- [93] Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 2001;294:1708-12.
- [94] Rabinovitz IM, Arthur M. . The Integrin $\alpha 6 \beta 4$ Functions in Carcinoma Cell
Migration on Laminin-1 by Mediating the Formation and
Stabilization of Actin-containing Motility Structures. *The Journal of cell biology* 1997;7:1873-84.
- [95] Leavesley DI FG, Wayner EA, Cheresh DA. Requirement of the integrin beta 3 subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen. *Journal of Cell Biology* 1992;117(5):1101-7.
- [96] Maaser K, Wolf K, Klein AE, Niggemann B, Zanker KS, Brocker EB, et al. Functional Hierarchy of Simultaneously Expressed Adhesion Receptors: Integrin $\alpha 2 \beta 1$ but Not CD44 Mediates MV3 Melanoma Cell Migration and Matrix Reorganization within Three-dimensional Hyaluronan-containing Collagen Matrices. *Molecular biology of the cell* 1998;10:3067-79.
- [97] Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschla M. Mutation Research / Reviews in Mutation Research In vitro cell migration and invasion assays. 2013;752:10-24.
- [98] Byers HR FK. Stress fibers in cells in situ: immunofluorescence visualization with antiactin, antimyosin, and anti-alpha-actinin. *J Cell Biology* 1982;93:804-11.
- [99] Katoh K KY, Amano M, Onishi H, Kaibuchi K, Fujiwara K. Rho-Kinase–mediated Contraction of Isolated Stress Fibers. *J Cell Biol* 2001;153:569-84.

- [100] Chew TL, Wolf WA, Gallagher PJ, Matsumura F, Chisholm RL. A fluorescent resonant energy transfer-based biosensor reveals transient and regional myosin light chain kinase activation in lamella and cleavage furrows. *J Cell Biol* 2002;156:543-53.
- [101] Kaibuchi K, Kurosa S, Amano M. REGULATION OF THE CYTOSKELETON AND CELL ADHESION BY THE RHO FAMILY GTPASES IN MAMMALIAN CELLS. *Annu Rev Biochem* 1999;68:459-86.
- [102] D.A. L, F. HA. Cell Migration:
A Physically Integrated Molecular Process. *Cell* 1996;84:359-69.
- [103] Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* 1997;385:537-40.
- [104] Potter DA TJ, Janssen R, Croall DE, Hughes CN, Fiacco KA, Mier JW, Maki M, Herman IM. Calpain Regulates Actin Remodeling during Cell Spreading. *J Cell Biol* 1998;141:647-62.
- [105] Tsutsumi SG, Suresh K. Hogan, Victor , Collard JG, Raz A. Activation of Small GTPase Rho Is Required for Autocrine Motility Factor Signaling. *Cancer Research* 2002;62:4484-90.
- [106] Scotton CJ WJ, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, Bridger G, Balkwill FR. Multiple Actions of the Chemokine CXCL12 on Epithelial Tumor Cells in Human Ovarian Cancer. *Cancer Research* 2002;69.
- [107] Alper O B-LE, Bennett TA, Hacker NF, Stromberg K, Stetler-Stevenson WG. Epidermal Growth Factor Receptor Signaling and the Invasive Phenotype of Ovarian Carcinoma Cells. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1375-84.
- [108] Price JT, Tiganis T, Agarwal A, Djakiew D, Thompson EW. Epidermal Growth Factor Promotes MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Migration through a Phosphatidylinositol 3' - Kinase and Phospholipase C-dependent Mechanism. *Cancer Research* 1999;59:5475-8.
- [109] Sawada K MK, Tahara M, Kawagishi R, Ikebuchi Y, Tasaka K, Murata Y. Alendronate inhibits lysophosphatidic acid-induced migration of human ovarian cancer cells by attenuating the activation of rho. *Cancer Research* 2002;62:6015-20.
- [110] Doerr ME, JI. J. The roles of integrins and extracellular matrix proteins in the insulin-like growth factor I-stimulated chemotaxis of human breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 1996;271:2443-7.
- [111] Guvakova MA SE. The activated insulin-like growth factor I receptor induces depolarization in breast epithelial cells characterized by actin filament disassembly and tyrosine dephosphorylation of FAK, Cas, and paxillin. *Experimental cell research* 1999;251:244-55.
- [112] P C Brooks RLK, S Schon, J M Lewis, M A Schwartz, D A Cheresh. Insulin-like growth factor receptor cooperates with integrin alpha v beta 5 to promote tumor cell dissemination in vivo. *The Journal of clinical investigation* 1997;99:1390-8.
- [113] Itoh K YK, Akedo H, Uehata M, Ishizaki T, Narumiya S. An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med* 1999;5:221-5.
- [114] Friedl P BS, Bröcker EB. Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *J Leukoc Biol* 2001;70:491-509.
- [115] F Entschladen BN, K S Zänker and P Friedl. Differential requirement of protein tyrosine kinases and protein kinase C in the regulation of T cell locomotion in three-dimensional collagen matrices. *J Immunol* 1997;159:3203-10.
- [116] Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 2003;160:267-77.

- [117] Polette M GC, de Bentzmann S, Gruenert D, Tournier JM, Birembaut P. Association of fibroblastoid features with the invasive phenotype in human bronchial cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:105-12.
- [118] Tester AM RN, Anderson RL, Thompson EW. MMP-9 secretion and MMP-2 activation distinguish invasive and metastatic sublines of a mouse mammary carcinoma system showing epithelial-mesenchymal transition traits. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:553-60.
- [119] Friedl P, Zanker KS, Brocker EB. Cell Migration Strategies in 3-D Extracellular Matrix: Differences in Morphology, Cell Matrix Interactions, and Integrin Function. *Microscopy Research and Technique* 1998;43:369-78.
- [120] Yoshioka KN, Shoji , Itoh K. Overexpression of Small GTP-binding Protein RhoA Promotes Invasion of Tumor Cells. *Cancer Research* 1999;59:2004-10.
- [121] Somlyo AV PC, Dipierro C, Eto M, Read P, Barrett M, Gibson JJ, Burnitz MC, Myers C, Somlyo AP. Rho kinase and matrix metalloproteinase inhibitors cooperate to inhibit angiogenesis and growth of human prostate cancer xenotransplants. *Faseb J* 2003;17:223-34.
- [122] Kaneko K SK, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Myosin light chain kinase inhibitors can block invasion and adhesion of human pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 2002;24:34-41.
- [123] Seftor EA MP, Kirschmann DA, Pe'er J, Maniotis AJ, Trent JM, Folberg R, Hendrix MJ. Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:233-46.
- [124] Pitts WC RV, Gaffey MJ, Rouse RV, Esteban J, Frierson HF, Kempson RL, Weiss LM. Carcinomas with metaplasia and sarcomas of the breast. *Am J Clin Pathol* 1991;95:623-32.
- [125] Hegerfeldt Y, Tusch M, Bröcker EB, P. F. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Research* 2002;62:2125-30.
- [126] Vaidya KS, Welch DR. Metastasis Suppressors and Their Roles in Breast Carcinoma. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2007;12:175-90.
- [127] Bockhorn M, Jain RK, Munn LL. Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *The Lancet Oncology* 2007;8:444-8.
- [128] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer* 2003;3:1-6.
- [129] Moriarity BS, Otto GM, Rahrman EP, Rathe SK, Wolf NK, Weg MT, et al. A Sleeping Beauty forward genetic screen identifies new genes and pathways driving osteosarcoma development and metastasis. *Nature genetics* 2015;47:615-24.
- [130] Palmer T, Ashby W, Lewis J, Zijlstra A. Targeting tumor cell motility to prevent metastasis. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;63:568-81.
- [131] Eccles SA, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet (London, England)* 2007;369:1742-57.
- [132] Steeg PS. Targeting metastasis. *Nature reviews Cancer* 2016;16:201-18.
- [133] Iiizymi M, Liu W, Pai SK, Furuta E, Watabe K. Drug development against metastasis-related genes and their pathways: A rationale for cancer therapy. 2009;1786:87-104.
- [134] Schaefer A, Nethe M, Hordijk PL. Ubiquitin links to cytoskeletal dynamics, cell adhesion and migration. *The Biochemical journal* 2012;442:13-25.
- [135] Voutsadakis IA. The ubiquitin-proteasome system and signal transduction pathways regulating Epithelial Mesenchymal transition of cancer. *Journal of biomedical science* 2012;19:67-.

- [136] Fonslow BR, Stein BD, Webb KJ, Xu T, Choi J, Kyu S, et al. A genome-wide siRNA screen identifies proteasome addiction as a vulnerability of basal-like triple-negative breast cancer cells. *Cell* 2013;153:1054-6.
- [137] Hart T, Chandrashekhar M, Aregger M, Steinhart Z, Brown KR, MacLeod G, et al. High-Resolution CRISPR Screens Reveal Fitness Genes and Genotype-Specific Cancer Liabilities. *Cell* 2015;163:1515-26.
- [138] Workenhe ST, Ketela T, Moffat J, Cuddington BP, Mossman KL. Genome-wide lentiviral shRNA screen identifies serine/arginine-rich splicing factor 2 as a determinant of oncolytic virus activity in breast cancer cells. *Oncogene* 2015:1-10.
- [139] Williams SP, Gould CM, Nowell CJ, Karnezis T, Achen MG, Simpson KJ, et al. Systematic high-content genome-wide RNAi screens of endothelial cell migration and morphology. *Scientific data* 2017;4:170009.
- [140] Gobeil S, Zhu X, Doillon CJ, Green MR. A genome-wide shRNA screen identifies GAS1 as a novel melanoma metastasis suppressor gene. *Genes and Development* 2008;22:2932-40.
- [141] Chaudhry SI, Hooper S, Nye E, Williamson P, Harrington K, Sahai E. Autocrine IL-1 β - TRAF6 signalling promotes squamous cell carcinoma invasion through paracrine TNF α signalling to carcinoma-associated fibroblasts. *Oncogene* 2012;32:747-58.
- [142] Yang J, Fan J, Li Y, Li F, Chen P, Fan Y, et al. Genome-Wide RNAi Screening Identifies Genes Inhibiting the Migration of Glioblastoma Cells. *PLoS ONE* 2013;8.
- [143] Zhang W, Wu KP, Sartori MA, Kamadurai HB, Ordureau A, Jiang C, et al. System-Wide Modulation of HECT E3 Ligases with Selective Ubiquitin Variant Probes. *Molecular Cell* 2016;62:121-36.
- [144] Finlayson AE, Freeman KW. A cell motility screen reveals role for MARCKS-related protein in adherens junction formation and tumorigenesis. *PLoS One* 2009;4:e7833.
- [145] Gunawardane RN, Sgroi DC, Wrobel CN, Koh E, Daley GQ, Brugge JS. Novel role for PDEF in epithelial cell migration and invasion. *Cancer Res* 2005;65:11572-80.
- [146] Simpson KJ, Selfors LM, Bui J, Reynolds A, Leake D, Khvorova A, et al. Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an siRNA screening approach. *Nature cell biology* 2008;10:1027-38.
- [147] Fadoukhair Z, Zardavas D, Chad M, Goulioti T, Aftimos P, Piccart M. Evaluation of targeted therapies in advanced breast cancer: the need for large-scale molecular screening and transformative clinical trial designs. *Oncogene* 2015;35:1743-9.
- [148] Yin KB. The Mesenchymal-Like Phenotype of the MDA-MB-231 Cell Line. *Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis* 2011:385-402.
- [149] Kharitidi D, Apaja PM, Manteghi S, Suzuki K, Malitskaya E, Roldan A, et al. Interplay of Endosomal pH and Ligand Occupancy in Integrin $\alpha 5 \beta 1$ Ubiquitination, Endocytic Sorting, and Cell Migration. *Cell Reports* 2015;13:1-11.
- [150] Hanahan D. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Journal of molecular biology* 1983;166:557-80.
- [151] Lu XJ, Qi X, Zheng DH, Ji LJ. Modeling cancer processes with CRISPR-Cas9. *Trends in Biotechnology* 2015;33:317-9.
- [152] Luo J. CRISPR/Cas9: From Genome Engineering to Cancer Drug Discovery. *Trends in Cancer* 2016;2:313-24.
- [153] Shin KD, Lee MY, Shin DS, Lee S, Son KH, Koh S, et al. Blocking tumor cell migration and invasion with biphenyl isoxazole derivative KRIBB3, a synthetic molecule that inhibits Hsp27 phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:41439-48.

- [154] Jin W, Chen BB, Li JY, Zhu H, Huang M, Gu SM, et al. TIEG1 inhibits breast cancer invasion and metastasis by inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) transcription and the EGFR signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2012;32:50-63.
- [155] Munoz-Najar UM, Neurath KM, Vumbaca F, Claffey KP. Hypoxia stimulates breast carcinoma cell invasion through MT1-MMP and MMP-2 activation. *Oncogene* 2006;25:2379-92.
- [156] Li TT, Alemayehu M, Aziziyeh AI, Pape C, Pampillo M, Postovit LM, et al. Beta-arrestin/Ral signaling regulates lysophosphatidic acid-mediated migration and invasion of human breast tumor cells. *Molecular cancer research : MCR* 2009;7:1064-77.
- [157] Zhong J, Shaik S, Wan L, Tron A, Wang Z, Sun L, et al. SCF β -TRCP targets MTSS1 for ubiquitination-mediated destruction to regulate cancer cell proliferation and migration. *Oncotarget* 2013;4:2339-53.
- [158] Zhang L, Teng Y, Fan Y, Wang Y, Li W, Shi J, et al. The E3 ubiquitin ligase Cbl-b improves the prognosis of RANK positive breast cancer patients by inhibiting RANKL-induced cell migration and metastasis. *Oncotarget* 2015;6:22918-33.
- [159] Miliani de Marval P, Lutfeali S, Jin JY, Leshin B, Selim MA, Zhang JY. CYLD inhibits tumorigenesis and metastasis by blocking JNK/AP1 signaling at multiple levels. *Cancer prevention research* 2011;4:851-9.
- [160] Huber RM, Rajski M, Sivasankaran B, Moncayo G, Hemmings BA, Merlo A. Deltex-1 Activates Mitotic Signaling and Proliferation and Increases the Clonogenic and Invasive Potential of U373 and LN18 Glioblastoma Cells and Correlates with Patient Survival. *PLoS ONE* 2013;8:1-13.
- [161] Dong S, Zahao J, Bowser RK, Liu Z, Luketich JD, Pennathur A, et al. F-box protein complex FBXL19 regulates TGF β 1-induced E-cadherin down-regulation by mediating Rac3 ubiquitination and degradation. *Mol Cancer* 2014;13:1-12.
- [162] Goka ET, Lippman ME. Loss of the E3 ubiquitin ligase HACE1 results in enhanced Rac1 signaling contributing to breast cancer progression. *Oncogene* 2015;34:5395-405.
- [163] Li X, Zhou Q, Sunkara M, Kutys ML, Wu Z, Rychahou P, et al. Ubiquitylation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type I gamma by HECTD1 regulates focal adhesion dynamics and cell migration. *J Cell Sci* 2013;126:2617-28.
- [164] Lee OH, Lee J, Lee KH, Woo YM, Kang JH, Yoon HG, et al. Role of the focal adhesion protein TRIM15 in colon cancer development. *Biochimica et biophysica acta* 2015;1853:409-21.
- [165] Zhu Z, Wang Y, Zhang C, Yu S, Zhu Q, Hou K, et al. TRIM25 blockade by RNA interference inhibited migration and invasion of gastric cancer cells through TGF-beta signaling. *Sci Rep* 2016;6:19070.
- [166] Tang SL, Gao YL, Wen-Zhong H. Knockdown of TRIM37 suppresses the proliferation, migration and invasion of glioma cells through the inactivation of PI3K/Akt signaling pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2018;99:59-64.
- [167] Sun Y, Ji B, Feng Y, Zhang Y, Ji D, Zhu C, et al. TRIM59 facilitates the proliferation of colorectal cancer and promotes metastasis via the PI3K/AKT pathway. *Oncol Rep* 2017;38:43-52.
- [168] Song HM, Lee JE, Kim JH. Ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 regulates EMT process and cancer metastasis in prostate cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;452:722-7.
- [169] Diehl JA, Fuchs SY, Haines DS. Ubiquitin and cancer: new discussions for a new journal. *Genes & cancer* 2010;1:679-80.

- [170] Perez-Garcia J, Cortes J. Breast cancer in 2017: Spurring science, marking progress, and influencing history. *Nature reviews Clinical oncology* 2018;15:79-80.
- [171] Zhao Y, Ding S. A high-throughput siRNA library screen identifies osteogenic suppressors in human mesenchymal stem cells. *PNAS* 2007;104:9673-8.
- [172] Zhang L, Erfle H, Harder N, Beneke J, Beil N, Bulkescher R, et al. High-Throughput RNAi Screening Identifies a Role for the Osteopontin Pathway in Proliferation and Migration of Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Cardiovascular drugs and therapy* 2016;30:281-95.
- [173] Zhang H, Wu PY, Ma M, Ye Y, Hao Y, Yang J, et al. An integrative approach for the large-scale identification of human genome kinases regulating cancer metastasis. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2013;9:732-6.
- [174] Vitorino P, Meyer T. Modular control of endothelial sheet migration. *Genes & development* 2008;22:3268-81.
- [175] Qin J, Zhou Z, Chen W, Wang C, Zhang H, Ge G, et al. BAP1 promotes breast cancer cell proliferation and metastasis by deubiquitinating KLF5. *Nature communications* 2015;6:8471.
- [176] de Lange J, Faramarz A, Oostra AB, de Menezes RX, van der Meulen IH, Rooimans MA, et al. Defective sister chromatid cohesion is synthetically lethal with impaired APC/C function. *Nature communications* 2015;6:8399.
- [177] Campeau E, Gobeil S. RNA interference in mammals: behind the screen. *Briefings in functional genomics* 2011;10:215-26.
- [178] Aguirre AJ, Meyers RM, Weir BA, Vazquez F, Zhang CZ, Ben-David U, et al. Genomic copy number dictates a gene-independent cell response to CRISPR-Cas9 targeting. *Cancer Discovery* 2016.
- [179] Zhao X, Yang Y, Yao F, Xiao B, Cheng Y, Feng C, et al. Unfolded Protein Response Promotes Doxorubicin-Induced Non-small Cell Lung Cancer Cells Apoptosis via the mTOR Pathway Inhibition. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 2016;31:347-51.
- [180] Fan L, Song B, Sun G, Ma T, Zhong F, Wei W. Endoplasmic reticulum stress-induced resistance to doxorubicin is reversed by paeonol treatment in human hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One* 2013;8:e62627.
- [181] Obeng E, Carlson L, Gutman D, Harrington W, Lee K, Boise L. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood Journal* 2006;107:4907-16.
- [182] Dong H, Chen L, Chen X, Gu H, Gao G, Gao Y, et al. Dysregulation of unfolded protein response partially underlies proapoptotic activity of bortezomib in multiple myeloma cells. *Leukemia & lymphoma* 2009;50:974-84.
- [183] Chan P, Möller A, Liu MCP, Sceneay JE, Wong CSF, Waddell N, et al. The expression of the ubiquitin ligase SIAH2 (seven in absentia homolog 2) is mediated through gene copy number in breast cancer and is associated with a basal-like phenotype and p53 expression. *Breast Cancer Research* 2011;13:R19-R.
- [184] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009;17:9-26.
- [185] Geyer FC, Lacroix-Triki M, Savage K, Arnedos M, Lambros MB, MacKay A, et al. beta-Catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2011;24:209-31.

- [186] Khramtsov AI, Khramtsova GF, Tretiakova M, Huo D, Olopade OI, Goss KH. Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. *The American journal of pathology* 2010;176:2911-20.
- [187] Bilir B, Kucuk O, Moreno CS. Wnt signaling blockage inhibits cell proliferation and migration, and induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Journal of translational medicine* 2013;11:12.
- [188] Matsuda Y, Schlange T, Oakeley EJ, Boulay A, Hynes NE. WNT signaling enhances breast cancer cell motility and blockade of the WNT pathway by sFRP1 suppresses MDA-MB-231 xenograft growth. *Breast Cancer Res* 2009;11:R32.
- [189] King TD, Suto MJ, Li Y. The Wnt/beta-catenin signaling pathway: a potential therapeutic target in the treatment of triple negative breast cancer. *Journal of cellular biochemistry* 2012;113:13-8.
- [190] Nusse R, Clevers H. Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* 2017;169:985-99.
- [191] Shao F, Sun H, Deng C. Potential therapeutic targets of triple-negative breast cancer based on its intrinsic subtype. *Oncotarget* 2017;8:73329-44.
- [192] Lindvall C, Zylstra CR, Evans N, West RA, Dykema K, Furge KA, et al. The Wnt co-receptor Lrp6 is required for normal mouse mammary gland development. *PLoS One* 2009;4:e5813.
- [193] Liu CC, Prior J, Piwnica-Worms D, Bu G. LRP6 overexpression defines a class of breast cancer subtype and is a target for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:5136-41.
- [194] Ma J, Lu W, Chen D, Xu B, Li Y. Role of Wnt Co-Receptor LRP6 in Triple Negative Breast Cancer Cell Migration and Invasion. *Journal of cellular biochemistry* 2017;118:2968-76.
- [195] Wu X, Zahari MS, Renuse S, Jacob HK, Sakamuri S, Singal M, et al. A breast cancer cell microarray (CMA) as a rapid method to characterize candidate biomarkers. *Cancer biology & therapy* 2014;15:1593-9.
- [196] Lu W, Li Y. Salinomycin suppresses LRP6 expression and inhibits both Wnt/beta-catenin and mTORC1 signaling in breast and prostate cancer cells. *Journal of cellular biochemistry* 2014;115:1799-807.
- [197] Lu W, Liu CC, Thottassery JV, Bu G, Li Y. Mesd is a universal inhibitor of Wnt coreceptors LRP5 and LRP6 and blocks Wnt/beta-catenin signaling in cancer cells. *Biochemistry* 2010;49:4635-43.
- [198] Tung EK, Wong BY, Yau TO, Ng IO. Upregulation of the Wnt co-receptor LRP6 promotes hepatocarcinogenesis and enhances cell invasion. *PLoS One* 2012;7:e36565.
- [199] Zhang D, Yang G, Li X, Xu C, Ge H. Inhibition of Liver Carcinoma Cell Invasion and Metastasis by Knockdown of Cullin7 In Vitro and In Vivo. *Oncology Research* 2016;23:171-81.