

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**Participación de la vía de los miRNAs en la regulación
post transcripcional de la subunidad R1 del receptor de
glutamato tipo NMDA**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

PRESENTA:

MARIANA RAMOS BROSSIER

MÉXICO D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente	Dra. María Imelda López Villaseñor
Secretario	Dr. Luís Alfonso Vaca Domínguez
Vocal	Dr. Ángel Zaráin Herzberg
1 ^{er} suplente	Dr. Luís Padilla Noriega
2 ^o suplente	Dr. Gabriel Roldán Roldán

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio 126 norte, Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México DF, México.

Asesor de tesis:

Dr. Luís Alfonso Vaca Domínguez

Supervisor técnico:

Lic. Israel Pichardo Casas

Sustentante:

Mariana Ramos Brossier

A mis papás, por el ejemplo de vida

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a mis maestros.

A Elisa, por ser mi orgullo y mi hermana.

Al Dr. Vaca por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio. A los doctores López, Zaráin, Padilla y Roldán por las sugerencias y críticas a este trabajo.

A mi sen-seí, Israel, primero por su amistad, y después por todo lo demás, pasando por lo mucho que has hecho por esta tesis. A Laura, Ceci, Julián, Fabián, Guille, Agustín, Mariana, Alicia, Josué, Benito, Poncho, Saluz y Gloria, por enriquecer mi estancia en el laboratorio compartiendo penas, experiencias y protocolos.

A mis tutores durante la carrera, el Dr. Tapia y el Dr. López; y a mis maestros y precursores de los métodos franceses en el laboratorio, Juan Carlos, Paty, Dulce, Valentín.

A todos los que proporcionaron el chocolate, los mangos enchilados y los garbanzos necesarios para realizar este trabajo: David, Raquel, Boris, Alonso, Pablo, Amanda, Alexa, Aydé, Osvaldo, Juan Carlos y Josafat.

A los que se quejan de mis múltiples ocupaciones, pero que están siempre presentes: mi Inseparable Julio, Oscar, Grethel, Adriana, Jerry, Rodrigo, Cyn, Sandy, Quique. A todos mis amigos por aguantarme, empujarme, hacerme enseñar los dientes tan seguido, y enseñarme que hay cosas importantes y cosas poco importantes. A Sergio por la vida compartida.

A los que fueron instrumentos para que volteara a ver hacia arriba, pero sobre todo a los lados, xto joven; y por enseñarme lo mejor y lo peor de mí.

A mis compañeros de misiones, comilonas, jarochos, viajes, laboratorios, escenarios, caminatas, hamburguesas, clases, bancas en Villa Quiétud. A mis vecinos, a mi familia a lo lejos, a los Mercurios Volantes y a la gente de Jardines de San Juan.

A los que me motivaron en la recta final: Andrea, Minerva, Rodri. A Omar, por estar incondicionalmente, y por la ayuda con las figuras de este trabajo.

ÍNDICE

	Pag.
1. Abreviaturas	1
2. Resumen	2
3. Introducción	3
Traducción local en dendritas neuronales	4
mRNAs dendríticos	5
NMDAR1	6
Transporte de mRNAs a dendritas	8
Inducción de la traducción en espinas dendríticas	10
microRNAs	11
Modelos de regulación de la traducción por microRNAs en vertebrados	14
miRNAs en neuronas	16
Transporte de miRNAs a dendritas	17
Ejemplos de regulación de la traducción por miRNA en dendritas	18
3. Hipótesis	20
4. Objetivos	21
5. Metodología	22
6. Resultados	27
Predicción de MREs en la secuencia del UTR 3' de Grin1 de rata	27
Clonación del UTR 3' de Grin1 de rata y del UTR 3' de Grin1 Δ 266-552	28
Efecto del UTR 3' de Grin1 y UTR 3' Δ 266-552 en la traducción de luciferasa en diferentes fondos genéticos	29
Análisis del nivel de mRNA de luciferasa	31
Perfiles de expresión de miRNAs con MREs predichos en el UTR 3' de Grin1 en HEK293 y PC12	32
Inhibición de la expresión de las proteínas Ago2 y Dicer	33
7. Discusión y perspectivas	35
8. Conclusiones	37
9. Apéndice 1. Sistema de doble luciferasa	38
9. Bibliografía	39

ABREVIATURAS

NMDA	N-metil-D-aspartato
RNA	ribonucleic acid
UTR	(untranslated region) región no traducida
miRNAs	microRNAs
mRNA	RNA mensajero
siRNA	small interference RNA
MRE	microRNA recognition element
BDNF	brain derived growth factor
NGF	nerve growth factor
Pluc	luciferasa de <i>Photinus pyralis</i>
Rluc	luciferasa de <i>Renilla reniformis</i>
nt	nucleótidos
RISC	RNA Interference Silencing Complex
PCR	polymerase chain reaction
ORF	open reading frame
LNA	locked nucleic acid

RESUMEN

La traducción local de los RNAs mensajero (mRNAs) localizados en las dendritas neuronales es un proceso altamente regulado que tiene un papel importante en el desarrollo sináptico y en la plasticidad neuronal. Se ha identificado una gran variedad de mRNAs que son transportados a dendritas y que son regulados localmente a nivel post transcripcional, mediante la represión de la traducción.

Recientemente se ha propuesto a la vía de los microRNAs (miRNAs) como una forma de regulación fina de la traducción de estos mensajeros, y por lo tanto como participantes clave durante la función sináptica.

El mRNA que codifica para la subunidad R1 del receptor de glutamato tipo NMDA (Grin1) es un mRNA dendrítico esencial para el funcionamiento del receptor completo. Este receptor está implicado en procesos de plasticidad neuronal y en neurodegeneración, por lo que el estudio de la regulación de su expresión es importante para entender su función en el sistema nervioso central. Se ha sugerido que la expresión de la subunidad R1 se regula a nivel post transcripcional, pero aún no se entiende el mecanismo involucrado.

El objetivo de este trabajo es evaluar la participación de los miRNAs en la regulación de la expresión de Grin1.

El análisis *in silico* de la secuencia del UTR 3' del mRNA de Grin1 muestra que contiene una variedad de sitios probables de unión a diferentes miRNAs (MREs). En particular una región, que está altamente conservada en diferentes especies, localizada entre los nucleótidos 266 y 552 (287 nt), contiene la mitad de los MREs predichos en el UTR 3'.

Para evaluar el papel del UTR 3' en la expresión del Grin1, se fusionó el UTR 3' de rata al gen reportero luciferasa y la construcción se expresó en un contexto neuronal y no neuronal. Adicionalmente, se analizó el papel funcional de la secuencia de 287 nt conservada sobre la expresión del reportero. A partir de estos resultados se estimó cuáles miRNAs podrían estar involucrados en la regulación post transcripcional del mensajero de Grin1.

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso está compuesto por dos tipos celulares, las neuronas y las células gliales. Gracias a la comunicación entre estas células se llevan a cabo todos los procesos del sistema nervioso, por ejemplo la regulación del movimiento, la integración de la información sensorial y el aprendizaje entre muchas otras.

Las neuronas establecen contactos o sinapsis unas con otras, formando complejos circuitos funcionales, y en algunos casos una sola neurona puede ser contactada por otras neuronas a través de cientos o miles de sinapsis al mismo tiempo.

Las sinapsis están formadas por dos elementos: la neurona pre-sináptica y la neurona post-sináptica. Desde la pre-sinapsis se liberan los mensajes químicos que envían la información a la post sinapsis, en donde dichos mensajes son decodificados. Esto confiere direccionalidad a la transmisión de información.

Para que las sinapsis se formen, maduren y se seleccionen continuamente, es necesaria la participación de muchas moléculas localizadas en la vecindad post sináptica, incluyendo proteínas y RNA. Entre ellas se encuentran moléculas del citoesqueleto, receptores, señalizadoras, entre muchas otras.

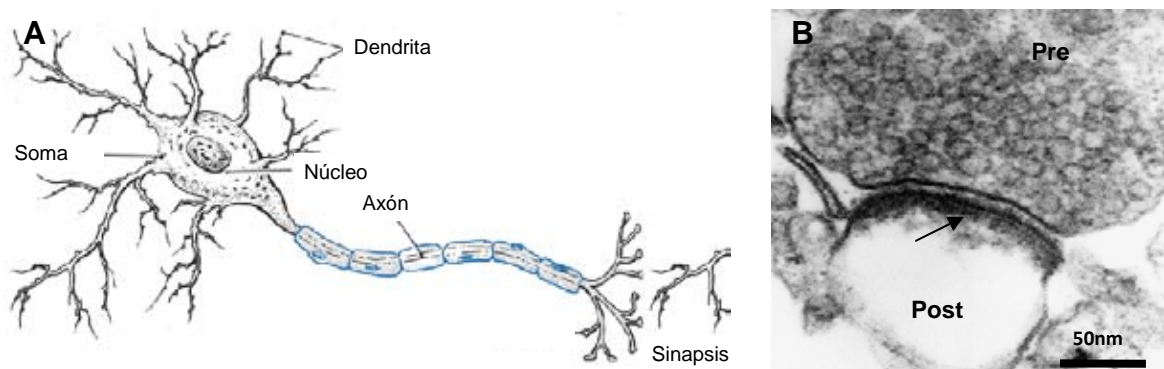


Figura 1. A, partes de una neurona. B, microscopía electrónica de una sinapsis aislada (Israel Pichardo). La flecha señala la densidad post-sináptica, conformada por receptores y por proteínas de citoesqueleto, de señalización y de andamiaje. Pre, pre sinapsis, Post, post sinapsis.

La síntesis local de proteínas en las sinapsis dendríticas es un proceso muy bien regulado, independiente del que se lleva a cabo en el soma celular. Esta adaptación sirve como una estrategia biológica para responder rápidamente a

cambios locales que ocurren sólo a nivel de las sinapsis, sin depender de lo que ocurre en el resto de la célula.

Se ha demostrado que este proceso es importante en fenómenos como el establecimiento del aprendizaje y la memoria (Sutton y Schuman, 2005).

Traducción local en dendritas neuronales

Se han encontrado ribosomas, polirribosomas, RNAs de transferencia (tRNAs), proteínas que regulan la traducción, componentes del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, entre otros, en la cercanía de las sinapsis (Bodian, 1965; Gardiol et al., 1999; Kiebler y DesGroseillers, 2000; Krijnse-Locker et al., 1995; Lowenstein et al., 1994; Steward y Schuman, 2001; Tiedge y Brosius, 1996; Torre y Steward, 1996).

La síntesis de proteínas independiente del soma se ha demostrado en sistemas libres de células como las fracciones subcelulares enriquecidas con terminaciones pre y post sinápticas aisladas (llamadas sinaptosomas, sinaptodendrosomas, o sinaptoneurosomas) (Autilio et al., 1968), y en dendritas aisladas por microdisección (Miyashiro et al., 1994). Para que este proceso ocurra se requiere que los RNAs mensajero (mRNAs) sean transportados a las sinapsis. Esto se ha observado en neuronas de diferentes estructuras cerebrales y en cultivo, tanto de mamífero como de otros organismos.

Los mRNAs son traducidos en la base de las espinas dendríticas después de la despolarización sináptica prolongada, de la acción de factores neurotróficos como BDNF ó NGF (Aakalu et al., 2001; Schratt et al., 2004; Twiss y Shooter, 1995), o después de la activación de receptores metabotrópicos de glutamato, que encienden distintas cascadas locales de señalización (Weiler y Greenough, 1993). La despolarización prolongada de las neuronas inducida por altas concentraciones de K^+ extracelular, aumenta la eficiencia de traducción y la localización de diferentes tipos de mRNAs en dendritas (Aakalu et al., 2001; Twiss y Shooter, 1995; Wanner et al., 2000).

mRNAs dendríticos

Se ha identificado una gran variedad de mRNAs localizados en dendritas (Tabla 1) y se ha demostrado que algunos, como GluR2, pueden ser traducidos en estas estructuras (Kacharina et al., 2000). Los métodos usados para identificar estos mRNAs son la hibridación *in situ* (Eberwine et al., 2002; Zhong et al., 2006), la amplificación de RNA (Eberwine et al., 2002; Eberwine et al., 2001), los macro y microarreglos a partir de RNA extraído de dendritas aisladas (Eberwine et al., 2002; Eberwine et al., 2001; Zhong et al., 2006), microscopía confocal (Aakalu et al., 2001), entre otros. Con base en la evidencia disponible

mRNA	Especie	Región	Referencia
Arc	Rata	Hipocampo	Lyford et al., 1995
BDNF	Rata	Hipocampo	Tongiorgi et al., 1997
Calmodulina	Rata	Hipocampo, cerebelo, corteza	Berry y Brown, 1996
CaMKII α	Rata	Hipocampo	Burgin et al., 1990
CREB	Rata	Hipocampo	Crino et al., 1998
ERK	Rata	Hipocampo	Eberwine et al., 2001
FMRP	Rata	Hipocampo	Miyashiro y Eberwine, ONP.
Map2	Rata	Corteza, cerebelo, hipocampo	Garner et al., 1988
NCAM	Rata	Hipocampo	Miyashiro y Eberwine, ONP.
NMDAR1 , R2a, R2b, R2c	Rata	Hipocampo	Miyashiro et al., 1994
PKC	Rata	Hipocampo	Miyashiro y Eberwine, ONP.
Canal de potasio Kv1	Rata	Hipocampo	Miyashiro y Eberwine, ONP.
Tau	Humano	Corteza, hipocampo	Kosik et al., 1989
TGF- β RII	Rata	Hipocampo	Miyashiro y Eberwine, ONP.
β -tubulina	Rata	Corteza, hipocampo	Paradies y Steward, 1997

Tabla 1. Algunos ejemplos de mRNAs encontrados en dendritas neuronales, especie y región cerebral en la que se encontró y referencia. ONP, observaciones no publicadas. Modificado de Eberwine et al., 2002.

se ha estimado que cerca del 5% de los mRNAs neuronales están localizados en dendritas (Eberwine et al., 2001). Tan sólo en el ratón se han identificado cerca de 1, 900 mRNAs distintos, asociados a densidades post sinápticas purificadas (Suzuki et al., 2007).

Entre los mRNAs dendríticos se encuentran algunos que codifican proteínas de citoesqueleto, factores de traducción, receptores de neurotransmisores, proteínas de señalización, y de unión a calcio, etcétera (Zhong et al., 2006) (Tabla 1). Esta gran diversidad sugiere que en las sinapsis se requiere una regulación compleja de la síntesis de proteínas para orquestar la respuesta neuronal.

NMDAR1

El mRNA que codifica a la subunidad R1 del receptor de glutamato tipo NMDA (Grin1) está localizado en dendritas (Eberwine et al., 2002; Miyashiro et al., 1994, Pal et al., 2003).

Los receptores tipo NMDA son receptores de glutamato, cuyo agonista es el N-metil-D-aspartato, y que tienen un papel importante en la regulación de la función sináptica en el sistema nervioso central.

Estos receptores requieren del co-agonista glicina, están sujetos al bloqueo dependiente de voltaje por concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} , son altamente permeables a Ca^{2+} , y actúan como detectores de coincidencia permitiendo el flujo de iones sólo en presencia de Ca^{2+} y condiciones de despolarización (Mayer et al., 1984; MacDermott et al., 1986).

El flujo de calcio mediado por la activación de estos receptores activa cascadas de transducción de señales que regulan diversos fenómenos como la formación, modificación y eliminación de sinapsis (Constantine-Paton, 1990).

Fisiológicamente, los receptores NMDA tienen un papel neurotrófico importante en el sistema nervioso central, como la sobrevivencia neuronal durante el desarrollo, la plasticidad sináptica y la potenciación a largo plazo. Sin embargo la sobre activación de este receptor puede resultar en excitotoxicidad neuronal y muerte debido a la acumulación intracelular de calcio (Banko et al., 2004; Choi et al., 1988). Asimismo, se ha asociado a este receptor con fenómenos de adicciones a la cocaína y al etanol (Anji y Kumari, 2006).

Los receptores tipo NMDA son proteínas tetraméricas formadas por tres tipos de subunidades: NR1, NR2 y NR3. Existen 8 subunidades R1 generadas por splicing alternativo a partir de un solo gen (*Grin1*), cuatro diferentes subunidades NR2 (A, B, C y D) y dos subunidades NR3 (A y B). Los receptores NMDA funcionales están formados por al menos una subunidad R1 y una o más subunidades R2 (Ishii et al., 1993). Se ha demostrado que la subunidad R1 tiene un papel fundamental durante el desarrollo del cerebro en ratones (Li et al., 1994).

La combinación de las diferentes isoformas de NR1 y de las subunidades NR2 confiere diferentes propiedades biofísicas y bioquímicas al receptor NMDA, como cambios en la sensibilidad a Zn^{2+} , H^+ y poliaminas, en la probabilidad de apertura, en el tiempo de desactivación, en la conductancia, y en la interacción con moléculas intracelulares de señalización (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004; Dingledine et al., 1999; Sheng y Kim, 2002). Las subunidades que componen al receptor de NMDA varían dependiendo de la región y tipo neuronal en el sistema nervioso central.

Los receptores NMDA están localizados en las densidades post sinápticas como parte de un gran complejo de señalización que contiene proteínas de andamiaje y proteínas adaptadoras, las cuales unen a los receptores al citoesqueleto celular (Scannevin y Huganir, 2000). Se ha demostrado que los receptores NMDA no se encuentran encerrados en estos complejos, sino que sufren cambios rápidos de expresión en la sinapsis, lo cual propone un mecanismo dinámico para la regulación de la función sináptica.

Por otro lado, se ha observado que la activación de los receptores NMDA aumenta la síntesis local de proteínas específicas en sinapsis, como CaMKII (Scheetz et al., 2000) que es una cinasa involucrada en la activación de cascadas de señalización dependientes del aumento de calcio local.

La línea celular de feocromocitoma de rata, PC12, se ha usado como modelo para estudiar la diferenciación neuronal, ya que en presencia de NGF estas células presentan un fenotipo neuronal (Twiss y Shooter, 1995). Después de una semana de tratamiento con NGF (50 ng/ml), las células PC12 dejan de dividirse y comienzan a extender procesos similares a los que producen las neuronas simpáticas en cultivo primario (Schimmelpfeng et al., 2004). Después de varias semanas de tratamiento con NGF, los procesos de las células PC12

alcanzan 500-1000 micras de largo. 24 horas después de quitar el NGF del medio, se comienzan a degenerar los procesos formados y después de 72 horas las células comienzan a dividirse de nuevo. Las células PC12 tratadas con NGF sintetizan y almacenan dopamina y norepinefrina (Greene y Tischler, 1976).

Se ha reportado una discrepancia entre la expresión del mRNA y de la proteína de Grin1 en varios estados fisiológicos y patológicos del cerebro (Que et al., 1999). Pero aún no se conoce la regulación de este fenómeno.

Las células PC12 se han usado como modelo de estudio de la regulación de esta discrepancia ya que en ellas se ha observado la expresión de algunas isoformas de Grin1 generadas por splicing alternativo (NMDAR1-4a principalmente, R1-1a, R1-2a y R1-3a, Leclerc et al., 1995), pero su proteína no se expresa en cantidades detectables (Sucher et al., 1993).

Al transfectar en las células PC12 un vector que contiene al cDNA de Grin1 sin regiones UTR (regiones no traducidas) 3' y 5', se observó traducción de la proteína. Esto sugiere que la regulación de la expresión de este gen se da a nivel post transcripcional y que en esta regulación están involucradas las secuencias UTR 3' y 5' (Sucher et al., 1993). Awobuluyi y colaboradores (2003) propusieron que la regulación post transcripcional de Grin1 está mediada por la estructura secundaria de un fragmento de 420 pb en su UTR 3' altamente conservado en rata, ratón y humano.

Transporte de mRNAs a dendritas

Tanto la localización como la traducción de los mRNAs dendríticos son procesos muy bien regulados.

Los mRNAs dendríticos son transportados selectivamente desde el soma hacia las dendritas, especialmente a las estructuras post sinápticas conocidas como espinas dendríticas, como parte de complejos ribonucleoproteínicos (RNPs) llamados gránulos neuronales (Kiebler et al., 1999). Estos gránulos son transportados vía microtúbulos y proteínas de la familia de las cinecinas.

El transporte de mRNAs dendríticos involucra la unión de distintos tipos de ribonucleoproteínas a elementos en *cis* en el mRNA transportado (Mori et al., 2000). Se estima que hay alrededor de 500 proteínas de unión a RNA

codificadas en el genoma celular, y que están muy conservadas evolutivamente.

Los elementos en *cis* están formados tanto por la secuencia del RNA, como por su estructura secundaria. Muchos de estos motivos de unión a proteínas de transporte se han encontrado en los extremos no traducidos (UTR) de los mRNAs.

Un ejemplo de esto es el mRNA de Grin1, que contiene una secuencia de 24 nt en su UTR 3' (5'-GCCCAGCATCGGGACCAGTCGCGC-3') que funciona como elemento en *cis* para ser reconocido por proteínas de transporte de mRNAs a dendritas (Pal et al., 2003).

Entre las proteínas encontradas en los gránulos neuronales está la proteína del síndrome de retraso mental asociado al cromosoma X frágil o FMRP. El síndrome del X frágil es causado principalmente por el silenciamiento transcripcional del gen *fmr1* inducido por la metilación excesiva de su promotor, que resulta en una baja síntesis de ésta proteína.

Los datos de un estudio donde se analizó el cerebro de pacientes con síndrome X Frágil (Hinton et al., 1991) sugieren que la pérdida de la proteína FMRP1 en los compartimentos post sinápticos causa deformaciones dendríticas, lo cual deriva en retraso mental. En ratones knockout para *fmr1* se observó la misma morfología sináptica inmadura (Comery et al., 1997).

Estos datos, junto con la predicción de dominios de unión a RNA de FMRP, sugieren que esta proteína está involucrada en el transporte y en la regulación de la traducción en las sinapsis de un grupo de mRNAs que participan en el mantenimiento de la morfología de las espinas dendríticas (Brown et al., 2001). FMRP regula negativamente a su propio mRNA en los gránulos mediante el reconocimiento de un motivo tridimensional en su mRNA, conocido como cuarteto de Gs, que también ha sido descrito para otros mRNAs dendríticos (Ramos et al., 2003).

El transporte de gránulos que contienen FMRP y mRNAs asociados se ha observado en dendritas y se han encontrado decenas de proteínas, entre ellas a la cinesina V (De Diego Otero et al. 2002, Ohashi et al., 2002).

Inducción de la traducción en espinas dendríticas

Los mecanismos de regulación de la traducción en dendritas son poco conocidos aún.

Existen varios ejemplos de aumento de traducción local en dendritas después de estimulación sináptica. Uno de ellos es el del mRNA de FMRP, que se asocia rápidamente con polirribosomas sinápticos después de la activación sináptica, y como consecuencia, aumenta la expresión local de su proteína poco tiempo después (Antar et al., 2004; Weiler y Greenough, 1993).

Schratt y colaboradores (2004), observaron que la activación sináptica por BDNF induce la asociación a polirribosomas del mRNA de Grin1. Se sabe que el factor BDNF participa en la regulación de la traducción dendrítica de otros mRNAs, como Homer2, y dado que Grin1 es un mRNA dendrítico, se propone que la vía de señalización de este factor neurotrófico podría estar participando en la regulación de la síntesis de Grin1.

Se han estudiado varios mecanismos que regulan la traducción de proteínas en neuronas. Un ejemplo es el de CPEB (cytoplasmic polyadenylation element-binding protein), que es una enzima que regula el tamaño de la cola de poli(A) de los transcritos. Wu y colaboradores (1998) encontraron a CPEB en dendritas de neuronas de hipocampo, localizada en sinapsis y en la densidad postsináptica. Además, encontraron que CPEB unida a dos elementos de poliadenilación (CPEs) presentes en el UTR 3' del mRNA de CaMKII α aumentó el tamaño de su cola de poli(A) así como su traducción cuando fue inyectado en ovocitos de *Xenopus*.

Además del control traduccional por una gran variedad de proteínas de unión a RNA, se ha propuesto que los RNAs no codificantes tienen un papel en el control de la expresión genética en diferentes niveles.

BC1 es un RNA no codificante de aproximadamente 200 nt de longitud, que se expresa selectivamente en células nerviosas y está localizado en dendritas (Chicurel et al., 1993; Muslimov et al., 1997). Se ha propuesto que BC1 regula la síntesis de proteínas de dos formas: ya sea directamente, interactuando con la maquinaria de inicio de la traducción (Wang et al., 2002), o indirectamente, interactuando con FMRP (Zalfa et al., 2005; Zalfa et al., 2003).

BC1 es capaz de reconocer una secuencia en el mRNA de CaMKII α . Se ha propuesto que a través de esta interacción se recluta a FMRP, inhibiéndose la

traducción del mensajero. Sin embargo, este es el único ejemplo de regulación por este mecanismo.

Una de las formas de regulación fina de la síntesis de proteínas que se ha propuesto recientemente es la vía de los microRNAs.

microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs endógenos no codificantes de ~21 nucleótidos de longitud que participan negativamente en la regulación post transcripcional de mRNAs parcialmente complementarios. Por la naturaleza de la interacción con los mRNAs blanco, se ha estimado que los miRNAs podrían regular la expresión de hasta un tercio del genoma en células de humano. En animales los miRNAs están involucrados en procesos como el mantenimiento del estado pluripotencial de las células madre (Houbaviy et al., 2003), la regulación del desarrollo, la apoptosis (Brennecke et al., 2003), el metabolismo de lípidos (Xu et al., 2003), la diferenciación celular durante la hematopoyesis (Chen et al., 2004), la diferenciación de neuronas (Conaco et al., 2006), entre muchas otras.

Los genes que codifican los miRNAs se agrupan en diferentes clases dependiendo de su localización en el genoma. Muchos genes de miRNAs se encuentran en los intrones de transcritos codificantes y no codificantes. A pesar de las diferencias en su procedencia, las diferentes clases de miRNAs comparten pasos comunes en su biogénesis (Figura 2).

Los miRNAs son generados a partir de precursores primarios (pri-miRNAs) de > 120 nt de longitud, que son sintetizados por la RNA polimerasa II (Lee et al., 2004). Los pri-miRNAs son cortados en el núcleo de la célula por un complejo microprocesador que consiste en una RNAsa tipo III llamada Drosha y su co-factor DGCR8 (Han et al., 2004; Lee et al., 2003). Las estructuras de tallo y asa (hairpin) de ~70 nucleótidos así generados (pre-miRNAs) son exportados al citoplasma por la maquinaria de la exportina 5 (Lund et al., 2004; Yi et al., 2003). Una vez en el citoplasma los pre miRNAs sirven de sustrato a Dicer (Hutvagner et al., 2001), una endonucleasa de la familia de Drosha, que libera un fragmento de doble hebra de ~21 nucleótidos con dos nucleótidos sobresalientes en el extremo 3' de cada una. La doble hebra resultante es cargada en un complejo de ribonucleoproteínas llamado RISC (RNA

Interference Silencing Complex), en donde sólo una de las hebras – el miRNA maduro- se aparea con una secuencia complementaria al mRNA blanco, (MREs, microRNA recognition elements) en el extremo UTR 3' de éste.

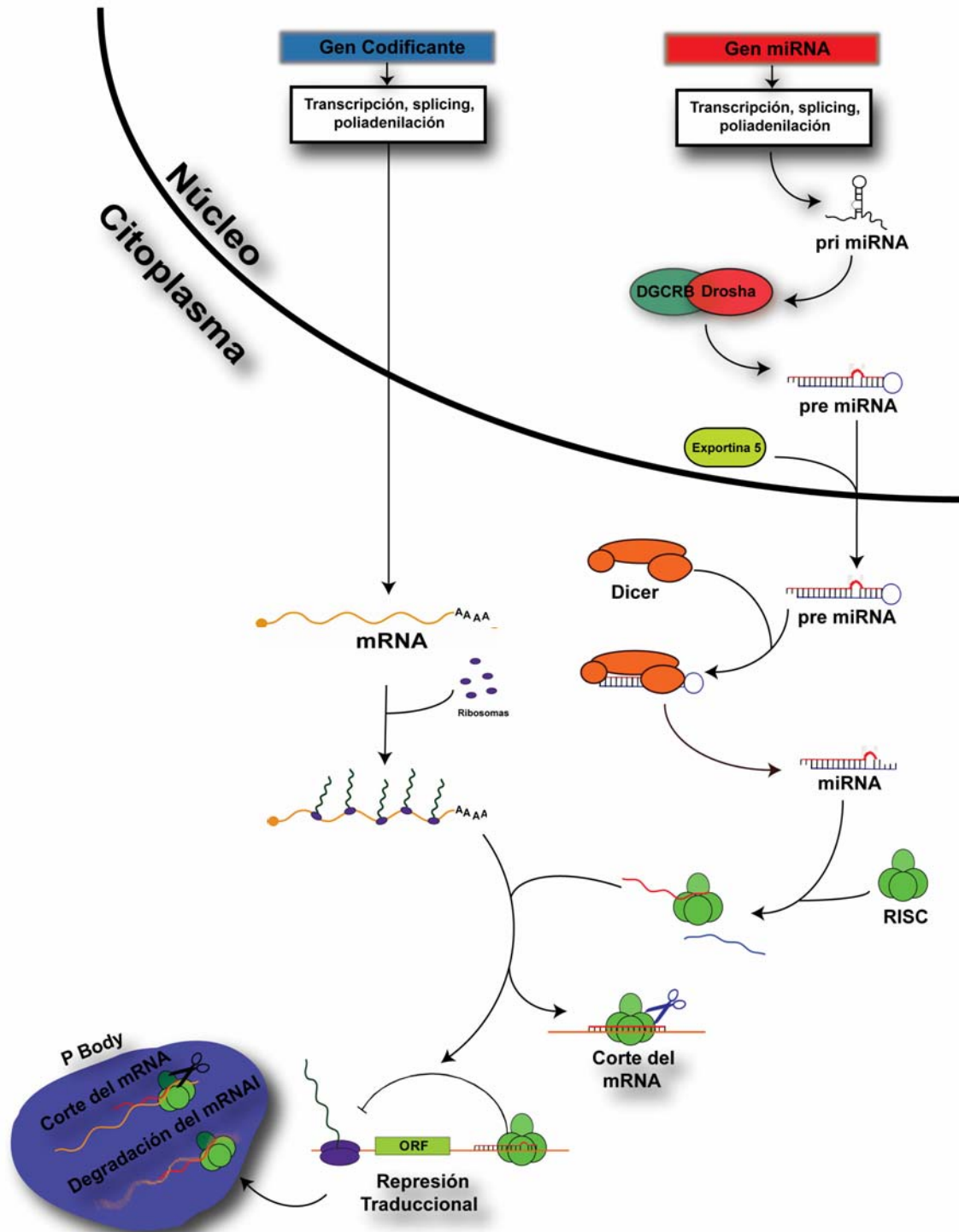


Figura 2. Esquema de la vía de los miRNAs en mamíferos.

Dependiendo del grado de complementaridad de este apareamiento, los miRNAs pueden inducir la represión de la traducción, o el corte del mRNA blanco por la acción de Ago2, que es la proteína efectora de RISC (He y Hannon, 2004; Murchison y Hannon, 2004; Valencia-Sanchez et al., 2006).

En mamíferos, la mayoría de los miRNAs no se aparean completamente con el mRNA blanco en los nucleótidos 2-7. De esta forma, los miRNAs pueden afectar tanto la traducción y/o la estabilidad de sus blancos.

Entre las proteínas que conforman a RISC asociado con miRNAs (o miRISC), se encuentran las proteínas MOV10, Gemin 3 y 4, y FMRP, entre otras. La relación entre FMRP y la vía de miRNAs ha despertado un interés en el estudio de la participación de estos RNAs no codificantes en la regulación de la traducción de los mRNAs dendríticos durante su transporte a dendritas.

Los sitios de unión a miRNA en las secuencias codificantes y en los UTR 5' también son funcionales, aunque son menos frecuentes y menos eficientes (Doench y Sharp, 2004; Grimson et al., 2007; Lewis et al., 2005; Lewis et al., 2003). Se ha propuesto que la represión traduccional es mayor cuando los MREs se localizan más próximos al codón de paro o al sitio de poliadenilación en el extremo UTR 3'(Majoros y Ohler, 2007).

La población de miRNAs expresados en una célula determina en gran parte el fenotipo celular a través de la regulación de grupos de proteínas específicas (Hobert, 2004). Se ha predicho que cada miRNA puede interactuar con más de un tipo de mRNAs, y que algunos incluso podrían tener varios cientos de blancos, afectando así redes completas de expresión.

Una combinación de aproximaciones computacionales y experimentales ha permitido elucidar cómo es que los mRNAs blanco son reconocidos por los miRNAs (Hendrickson et al., 2008). De todo este trabajo han surgido varios parámetros que algunos algoritmos toman en cuenta para hacer predicciones (Hofacker, 2007).

1. La energía libre del apareamiento entre el miRNA y su sitio blanco.
2. La región "semilla", una región de entre 2 y 8 nucleótidos en el extremo 5' del miRNA, que es particularmente importante para su función. En algunas ocasiones esta región es suficiente para el reconocimiento

mRNA-miRNA (Brennecke et al., 2005; Doench y Sharp, 2004; Lewis et al., 2003).

3. La conservación evolutiva de los MREs y las familias de miRNAs.

Así, los programas computacionales han resultado ser una herramienta útil que complementa las aproximaciones experimentales de las relaciones mRNA-miRNA. Algunos ejemplos de programas son TargetScan 4.2 (Lewis et al., 2003), MiRanda (Enright et al., 2005), MiRBase (Griffiths-Jones et al., 2006) y microRNA targets (John et al., 2004).

Modelos de regulación de la traducción por microRNAs en vertebrados

La traducción de proteínas puede dividirse en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. En cada etapa están involucrados una gran cantidad de factores.

La traducción de la mayoría de los mRNAs requiere de un Cap m7G en el 5'. La evidencia hasta ahora indica que los miRNAs pueden interferir con el inicio de la traducción, evitando la asociación del factor eIF4E al Cap e impidiendo así el reclutamiento del factor de inicio de la traducción eIF4G (Bhattacharyya et al., 2006; Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005b) o durante la elongación, promoviendo la terminación prematura de la traducción (Olsen y Ambros, 1999; Petersen et al., 2006; Seggerson et al., 2002).

La cola de poli(A) en el 3' de un mRNA tiene un papel importante en su estabilidad (Wilusz et al., 2001) así como en el inicio de la traducción (Gingras et al., 1999). Pero el papel que tiene el poli(A) en la represión de la traducción mediada por miRNA no es claro (Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005a), aunque ésta aumenta cuando la cola es mayor a 200 nt.

Se ha reportado que algunas proteínas de la biogénesis de miRNAs, miRNAs y mRNAs reprimidos por miRNAs son acumulados en cuerpos de procesamiento (Liu et al., 2005). Los cuerpos de procesamiento (cuerpos P) se han definido como sitios de represión traduccional y de degradación de mRNA en el citoplasma, debido a que contienen factores involucrados en estos procesos, como las proteínas que escinden el Cap (Dcp1 y Dcp2), exonucleasas 3'-5'(Xrn1), y deadenilasas (CCR4-Not) (Behm-Ansmant et al., 2006a). No

contienen ribosomas ni factores de inicio de la traducción. (Parker y Song, 2004).

Los cuerpos P comparten componentes con otros gránulos de RNA, pero sus funciones son diferentes a la de los gránulos neuronales (que transportan mRNAs manteniéndolos inhibidos traduccionalmente) y de la de los gránulos de estrés (que contienen mRNAs que sufren represión traduccional inducida por estrés).

Varios experimentos han relacionado a los cuerpos P con la represión de la traducción mediada por miRNAs, incluyendo la observación de que estos cuerpos contienen elementos de RISC, como Ago2 y miRNAs (Chu y Rana, 2006; Jakymiw et al., 2005; Liu et al., 2005).

Se ha observado una correlación entre la represión traduccional inducida por miRNAs y la acumulación de mRNAs en cuerpos P (Bhattacharyya et al., 2006; Liu et al., 2005; Sen y Blau, 2005), además de una relación inversa entre la localización de cuerpos P y la asociación de polirribosomas a mRNAs.

La acción de los miRNAs se asocia frecuentemente con la degradación del mRNA blanco (Lim et al., 2005). Sin embargo, existen muchos ejemplos de represión de la traducción de mRNAs endógenos o artificiales por miRNAs que no afectan el nivel de mRNA (Bhattacharyya et al., 2006; Pillai et al., 2005).

El mecanismo para que el mRNA blanco sea cortado por RISC (conocido como RNAi) requiere complementaridad perfecta entre miRNA-mRNA (Haley y Zamore, 2004). Los híbridos miRNA-mRNA en animales tienen desapareamientos en su región central, por lo que la degradación del mRNA no puede ocurrir mediante el mecanismo de RNAi. Los sitios de corte encontrados en mRNAs que son degradados por la acción de miRNAs revelan que esta degradación no es resultado del corte mediado por Ago2, sino que es una consecuencia de la localización en cuerpos P del mRNA reprimido traduccionalmente (Schmitter et al., 2006).

Algunos experimentos para estudiar la desestabilización del mRNA inducida por miRNA demuestran que los mRNAs que van a ser degradados son deadenilados primero (Wu et al., 2006). Así, se ha sugerido que el complejo miRNA-mRNA recluta a GW-182 (una proteína presente en los cuerpos P), que a su vez recluta a una deadenilasa. La deadenilación es seguida por la

eliminación del Cap, lo cual lleva a la degradación del mRNA por exonucleasas (Behm-Ansmant et al., 2006a; Liu et al., 2005; Rehwinkel et al., 2005).

Considerando que el estado traduccional de un mRNA puede afectar directamente su estabilidad, es posible que la degradación del mRNA blanco sea una consecuencia de la represión traduccional más que un efecto directo del miRNA (Behm-Ansmant et al., 2006b). En un modelo simple (Pillai, 2005a), el miRNA induciría primero la represión de la traducción, seguido por la inclusión del complejo miRNA-mRNA a cuerpos P. Esto podría explicar los efectos de degradación del miRNA ya que los cuerpos P son ricos en componentes de la vía de degradación de mRNA.

El mecanismo exacto por el que los miRNAs afectan la traducción queda sin resolver, y tampoco se ha establecido si actúan siempre de la misma forma fisiológicamente.

miRNAs en neuronas

Entre el 30 al 40% de los miRNAs de mamífero se expresan en neuronas (Babak et al., 2004; Kim et al., 2004; Lagos-Quintana et al., 2002; Nelson et al., 2004; Rogelj y Giese, 2004), aunque aún se desconoce la función de cada uno en particular.

Algunos miRNAs se expresan específicamente en el sistema nervioso central. (ej. miR-124) mientras que otros se expresan muy abundantemente en él (ej. miR-9).

Varios miRNAs neuronales muestran un patrón de expresión diferencial en distintas regiones del cerebro (Landgraf et al., 2007, Pichardo et al. en preparación), así como en soma y dendritas (Kye et al., 2007; Lugli et al., 2008, Pichardo et al., en preparación) lo cual apoya la hipótesis de que los miRNAs son una forma de regulación local y específica. Esto correlaciona con la abundancia de algunos blancos predichos *in silico*. (Krichevsky et al., 2003).

miR-124 no sólo es uno de los miRNAs más abundantes en el cerebro, sino que el motivo de unión de miR-124a es uno de los MREs más común en el UTR 3' de los transcritos en mamíferos (Xie et al., 2005). Se ha demostrado que la expresión de miR-124 es necesaria para la diferenciación neuronal *in vivo* e *in vitro* (Conaco et al., 2006, Cao et al., 2007) y se ha visto que este miRNA regula negativamente un gran número de transcritos neuronales. Por

ello se le considera como un factor importante en el establecimiento de la identidad neuronal (Lim et al., 2005).

Kim y colaboradores (2004) demostraron que muchos miRNAs específicos de neuronas están presentes en fracciones polirribosomales de tejidos neuronales, y que su asociación a polirribosomas no cambia, aún en condiciones despolarizantes.

Varios miRNAs están involucrados en la diferenciación posicional y funcional de las neuronas sensoriales en *C. elegans* (Chang et al., 2004), así como en la regulación del desarrollo del cerebro en pez cebra (Giraldez et al., 2005).

Algunas de las proteínas involucradas en la función y maduración de miRNAs, como Dicer Ago2 y FMRP, localizadas en las dendritas de neuronas de la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo de ratón (Barbato et al., 2007; Lugli et al., 2005; Lugli et al., 2008). La actividad catalítica de Dicer en sinapsis aisladas aumenta cuando se activa una proteasa dependiente de calcio, cuya concentración intracelular aumenta durante la estimulación sináptica. Estos cambios están involucrados en maduración local de algunos miRNAs (Lugli et al., 2005; Lugli et al., 2008).

Mediante el estudio de un modelo de ratones *knockout* inducible de Dicer se ha observado que la alteración en la vía de los miRNAs causa fenotipo atrófico después del nacimiento, especialmente en regiones como la corteza y el hipocampo (Davis et al., 2008). En el cerebelo, se muestra el mismo fenotipo con pérdida de conexiones sinápticas y atrofia generalizada de las neuronas de Purkinje, lo que provoca ataxia en estos animales.

Dadas las evidencias de transporte de ciertos mRNAs a las sinapsis y de la identificación de algunos miembros de la maquinaria de miRNAs en dendritas, se ha propuesto un papel para los miRNAs como una forma de regulación fina durante la función sináptica.

Transporte de miRNAs a dendritas

Fiore y Schrott (2007) proponen dos modelos para el transporte de miRNAs a las sinapsis dendríticas, basados en los datos experimentales reportados:

En el primero, los miRNAs serían procesados en el soma y se unirían al UTR 3' del mRNA destinado a ser transportado a las dendritas. Al mismo tiempo, las

proteínas de transporte se unirían a las secuencias en *cis* de los mRNAs y transportarían al miRNP a las dendritas.

En el segundo modelo, el pre- o pri- miRNA tendría su propia secuencia en *cis* que sería reconocida por las proteínas de transporte. En este modelo se asume que el procesamiento del precursor ocurre en el compartimento sinaptodendrítico, lo cual añade otro nivel de regulación a la función neuronal de los miRNAs. Existen evidencias que muestran que este último modelo es posible (Lugli et al., 2008).

Ejemplos de regulación de la traducción por miRNA en dendritas

Aunque se sabe poco sobre la función específica de cada miRNA en las dendritas, estudios recientes proporcionan algunos ejemplos.

El primer miRNA cuya función dendrítica se ha demostrado es miR-134, un miRNA localizado en las dendritas que regula la expresión de la proteína sináptica Limk1 (Schratt et al., 2006). Esta proteína es una de las responsables de la despolimerización de microtúbulos en las espinas dendríticas, de tal forma que si se inhibe su traducción, cambia el tamaño y forma de las espinas dendríticas. En ausencia de actividad sináptica, miR-134 podría estar reclutando un aparato de silenciamiento para mantener al mRNA de Limk1 en un estado reprimido. Cuando se estimularon las neuronas con BDNF se observó un aumento de la concentración local de la proteína, por lo que se propuso que el complejo de silenciamiento acoplado a miR-134 podría ser regulado por un mecanismo aún no identificado dependiente de estimulación sináptica. Schratt y colaboradores (2004) observaron que la activación sináptica inducida por BDNF aumenta la asociación del mRNA de Grin1 a polirribosomas, lo cual sugiere que un mecanismo similar al propuesto para Limk1 podría participar en regulación de este mensajero.

Por su posible regulación por miRNAs, muchos mRNAs dendríticos se han analizado *in silico* en busca de MREs. Entre ellos, el mRNA que codifica a la subunidad R1 del receptor de glutamato tipo NMDA (Grin1).

Ya que la presencia de la subunidad R1 es esencial para el funcionamiento del receptor NMDA, el estudio de la regulación transcripcional y post transcripcional de esta subunidad es crucial para entender el papel que desempeña este receptor en el sistema nervioso. En este trabajo evaluamos la

participación de la vía de los miRNAs en la regulación post transcripcional del mRNA dendrítico Grin1.

HIPÓTESIS

La traducción del mRNA que codifica para la subunidad R1 del receptor de NMDA de rata está regulada por un fragmento de ~287 nucleótidos en su extremo 3' no traducible, que contiene una gran cantidad de posibles sitios de unión a microRNAs.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la participación de los miRNAs en la regulación post transcripcional del mRNA de la subunidad I del receptor de glutamato tipo NMDA (Grin1).

Objetivos específicos

1. Identificar mediante métodos *in silico* los sitios posibles de unión a microRNAs (MREs) en la secuencia del UTR 3' de Grin1 de rata.
2. Clonar el UTR 3' completo de Grin1 de rata para fusionarlo al gen reportero de luciferasa en el vector *pGL3 promoter*.
3. Observar si la expresión de luciferasa disminuye en presencia del UTR 3' de Grin1 cuando se sobre expresa en células neuronales y no neuronales.
4. Determinar la participación del fragmento altamente conservado (266-552) del UTR 3' de Grin1 en la regulación de la expresión de luciferasa mediante la clonación de la variante Grin1 3'UTR Δ 266-552.
5. Inhibir la expresión de las proteínas Ago2 y Dicer para probar si la vía de los miRNAs está involucrada en los cambios de expresión de luciferasa en un contexto neuronal y no neuronal.

METODOLOGÍA

Análisis in silico del UTR 3' de Grin1

La secuencia del UTR 3' de Grin1 de rata (1, 131 pb) se tomó de www.ensembl.org, y se analizó con 4 programas diseñados para identificar los posibles MREs (microRNA recognition elements) en su secuencia: TargetScan 4.2 (<http://www.targetscan.org/>), MiRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>), MiRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>) y microRNA targets (<http://cbio.mskcc.org/mirnaviewer/>).

Perfil de expresión de miRNAs

Los perfiles de expresión de miRNAs se obtuvieron de <http://www.microrna.org/microrna/getExprForm.do> (datos del laboratorio del Dr. Thomas Tuschl, Landgraf et al., 2007, <http://www.mirz.unibas.ch/smiRNAdb/cgi/smiRNAdb?page=home>).

Clonación del UTR 3' de Grin1 de rata y construcción de los vectores pGL3:Grin13UTR y pGL3:Grin13UTR Δ Apal

El UTR 3' de NMDAR1 (Grin1a, 1, 131 pb) se clonó a partir de RNA de cerebro completo de rata macho adulta (Wistar, ~250g) extraído mediante el método de Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para hacer el cDNA se utilizó 1 μ g de RNA total, oligo d(T)¹⁸ y el kit Superscript III (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para amplificar el extremo UTR 3' de Grin1 por PCR, se usaron los oligos NMDAR13UTRRev(ttttctagactgacattccttaggcacaccactgaataccgggattaggggtgctgtgcgccc), y NMDAR13UTRFwd (aaaatctagagacgccccgcccgcctcctct) que incluyen un sitio XbaI para flanquear el fragmento de interés y el producto de 1, 151 pb fue amplificado con la DNA polimerasa de alta procesividad Pfx (Invitrogen).

Se le añadió una adenina en cada extremo 3' del producto de PCR mediante la actividad de terminal transferasa de la Taq polimerasa, para posteriormente clonarlo en el vector pGEM-T Easy (Promega). Después de transformar el

vector resultante en *E. coli* DH5 α , las colonias transformantes fueron seleccionadas por su resistencia a ampicilina (200 ug/mL) y por su actividad de β -galactosidasa en medio LB-agar con X-gal (0.1 mM) e IPTG (20 mg/ml). Al finalizar se analizaron por PCR y ensayo de restricción las colonias blancas donde el marco de lectura de la β -galactosidasa se interrumpió con el inserto clonado.

Las clonas *pGEM:Grin13UTR* fueron digeridas con *Xba*I, para escindir el fragmento correspondiente al UTR 3' y posteriormente subclonarlo en el sitio *Xba*I entre el codón de término del gen de luciferasa (*Pluc*) y la señal de poliadenilación de SV40 del vector pGL3-promoter (Promega).

La construcción resultante de 6, 147 pb (*pGL3::Grin1 3'UTR*) fue analizada por PCR y ensayo de restricción para definir la orientación correcta y, finalmente, secuenciada por el método de Sanger en capilar, sin encontrar mutaciones no deseadas.

Para eliminar un fragmento de 287 nt entre dos sitios *Apa*I, el vector resultante se digirió con esta enzima de restricción para escindir los nucleótidos 266-552. El vector digerido (5, 860 pb), fue purificado (Qiagen), religado, transformado y analizado como se refirió anteriormente. El vector resultante se nombró *pGL3::Grin13UTR Δ Apa*I.

Cultivo celular y transfección

Las células HEK293-FT y HeLa se mantuvieron en medio D-MEM (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, y 100 μ g/mL de antibiótico/antimicótico (Gibco). Las células PC12 (donación del Dr. Ángel Zaráin, Facultad de Medicina, UNAM) se mantuvieron en medio D-MEM suplementado con 10% de suero de caballo (Gibco), 5% de suero fetal bovino, y 10 μ g/mL antibiótico/antimicótico. Todas las líneas celulares fueron incubadas a 37 °C y 5% CO₂.

Para diferenciar a las células PC12 hacia un fenotipo neuronal, se utilizó medio D-MEM suplementado con 2% de suero de caballo y 50 ng/ml de factor de crecimiento neuronal (mNGF, Alomone) durante 6 días.

24 horas antes de la transfección, las células HEK293-FT y PC12 no diferenciadas fueron sembradas al 60% de confluencia. Las células PC12 en

proceso de diferenciación se sembraron al 10% de confluencia 4 días antes de la transfección en cajas de 24 pozos.

Cada transfección se realizó por triplicado utilizando 400 ng de DNA plasmídico (320 ng de *pGL3* ó *pGL3::Grin13UTR* ó *pGL3::Grin13UTR Δ Apal*, más 80 ng de *pRL-SV40*), y cada experimento se repitió al menos 3 veces.

Las células HEK293-FT, se transfectaron con Lipofectamina+PLUS en medio OPTIMEM sin suero (Invitrogen).

Las células PC12 diferenciadas y no diferenciadas se transfectaron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y Advanced-DMEM (Gibco) sin suero.

Aproximadamente 5 horas después de la transfección, el medio se cambió por medio con suero.

Ensayo de actividad de luciferasa

48 horas después de la transfección, las células fueron lavadas con solución fisiológica de fosfatos (PBS), lisadas con 100 μ l de Solución de Lisis Pasiva 1X (Promega) e incubadas en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

La actividad de luciferasa se midió en paralelo con un luminómetro (Turner BioSystems) tanto para las enzimas de la luciferasa de *Photinus pyralis* (Pluc); como para la luciferasa de *Renilla reniformis* (Rluc). Para ello, se mezclaron 10 μ l de lisado celular con 50 μ l del reactivo que contiene el sustrato enzimático apropiado para cada enzima (Promega), y se registró la luminiscencia de las reacciones de forma independiente.

La actividad de luciferasa se normalizó al dividir la actividad de Pluc entre la actividad de Rluc (Pluc/Rluc) de todos los lisados. Para calcular las diferencias entre cada condición experimental se tomó como 100% la actividad de luciferasa normalizada de la condición control (*pGL3 promoter*). La actividad de luciferasa de los otros grupos experimentales se calculó como el porcentaje de actividad en relación a la condición control.

siRNAs y lentivirus

La secuencia para sintetizar los siRNAs específicos para Dicer de humano (transcritos 1 y 2) se tomó de Hutvagner et al., 2001. Se sintetizaron oligos de DNA con las secuencias sentido y antisentido del siRNA que incluyen en su

extremo 3' la secuencia del promotor de T7, más 2 citocinas que favorecen la transcripción de la enzima T7 (Donzé y Picard, 2002). Las secuencias de los oligos utilizados son: oligo t7, 5' taatacgactcactatag 3', oligo sentido siDicer, 5' aaaggtctcgacgaagttcgtccctatagtgagtcgtatta 3', y oligo antisentido siDicer, 5' aaacgaacttcgctcgagacctccctatagtgagtcgtatta3'.

Después de hibridar por separado los oligos sentido y antisentido con el oligo T7, la doble hebra incompleta se rellenó usando la enzima Klenow (New England Biolabs) para generar fragmentos de doble cadena de 41 pb. Estos fragmentos se usaron como sustrato para la enzima T7 RNA polimerasa (New England Biolabs) y las hebras de RNA sentido y antisentido así generadas se hibridaron para generar RNA de doble cadena de 24 pb. Estos RNAs se digirieron con DNAsa I (Roche) y RNAsa Ti (Roche) para eliminar las guaninas no apareadas en los extremos 5'. El siRNA generado (21 pb) se purificó con columnas G25 (Amersham Biosciences). Los siRNAs se transfectaron en células HEK293-FT y HeLa en una concentración 100 nM, usando lipofectamina2000 y siIMPORTER (Upstate). Como control negativo se usó un siRNA diseñado para inhibir la expresión de tirosinasa.

Los lentivirus que contienen un hairpin específico para Ago2 (dos de ellos para Ago2 de rata y ratón y uno para Ago2 de ratón y humano) bajo el promotor de U6 (MISSION® Lentiviral Transduction Particles, no. de catálogo TRCN0000009630, TRCN0000009632 y TRCN0000009633, Sigma) y el lentivirus control (MISSION® Non-Target shRNA Control Transduction Particles, no. de catálogo SHC002V, Sigma) se usaron para transducir células PC12. Estos vectores lentivirales contienen un gen de resistencia a puromicina. La transducción se llevó a cabo en medio D-MEM sin suero y en presencia de polibreno (6 µg/ml). Se usaron $\sim 0.05 \times 10^7$ unidades lentivirales en cada transducción.

Las células PC12 transducidas se mantuvieron durante 10 días en D-MEM con puromicina (0.75 mg/ml).

PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

48 horas después de transfectar las células con los siRNAs, con los vectores derivados de pGL3, o de ser transducidas con los lentivirus, se extrajo RNA de las células mediante el método de Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las

instrucciones del fabricante. Se sintetizó cDNA a partir de 1 µg de RNA total con oligos hexámeros y con la enzima Superscript II (Invitrogen). El mismo protocolo se siguió después de 10 días de haber mantenido a las células PC12 en medio de selección.

Para cada reacción de PCR cuantitativo en tiempo real se usaron 3 µl de oligos (0.5 µM) específicos para Dicer, Ago2, GAPDH, Pluc o Rluc, además de 2 µl de cDNA (dilución 1:10) y 5 µl de *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Cada reacción se hizo por triplicado, en un termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems).

El análisis de los valores de Ct se hizo por el método de cuantificación relativa.

RESULTADOS

Predicción de MREs en la secuencia del UTR 3' de Grin1 de rata

Para identificar posibles miRNAs involucrados en la regulación post transcripcional del mRNA de Grin1 de rata, se analizó su UTR 3' con cuatro programas computacionales diferentes. Los programas usados están diseñados para predecir posibles MREs de miRNAs de rata y han sido utilizados frecuentemente en la literatura. Éstos son: miRBase, MiRanda, TargetScan 4.2 y microRNA Targets (Figura 3).

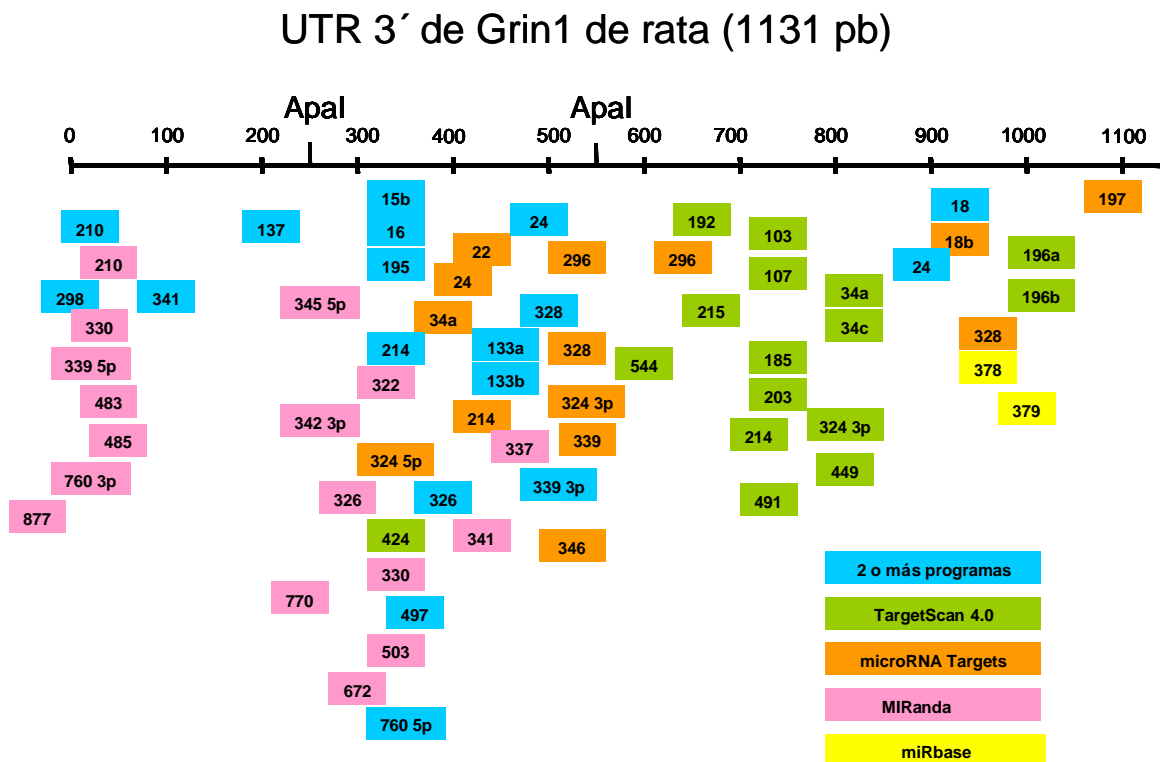


Figura 3. MREs predichos en el UTR 3' de Grin1 de rata. Los números representan los miRNAs. Los MREs predichos únicamente por TargetScan 4.0 se muestran en verde, por microRNA Targets en naranja, por MiRanda en rosa, y por miRbase en amarillo. Los MREs predichos por más de un programa están marcados en azul. Arriba se muestra el fragmento 266-552 flanqueado por los sitios de restricción de Apal que se escindió en el vector *pGL3:Grin13UTRΔApal*.

En total se predijeron 66 sitios posibles de unión a miRNAs (MREs) en este UTR 3'. De ellos, 18 MREs fueron predichos por más de un programa (en azul), 2 sólo por miRBase (en amarillo), 15 sólo por TargetScan (en verde), 14 sólo por microRNA targets (en naranja), y 17 sólo por MiRanda (en rosa).

Aproximadamente la mitad de los MREs predichos se localizan entre dos sitios de restricción de la enzima Apal del UTR 3' de rata, tal y como se muestra en la Figura 3. Esta región, que comprende los nucleótidos 266-552, está altamente conservada entre especies (Figura 4).

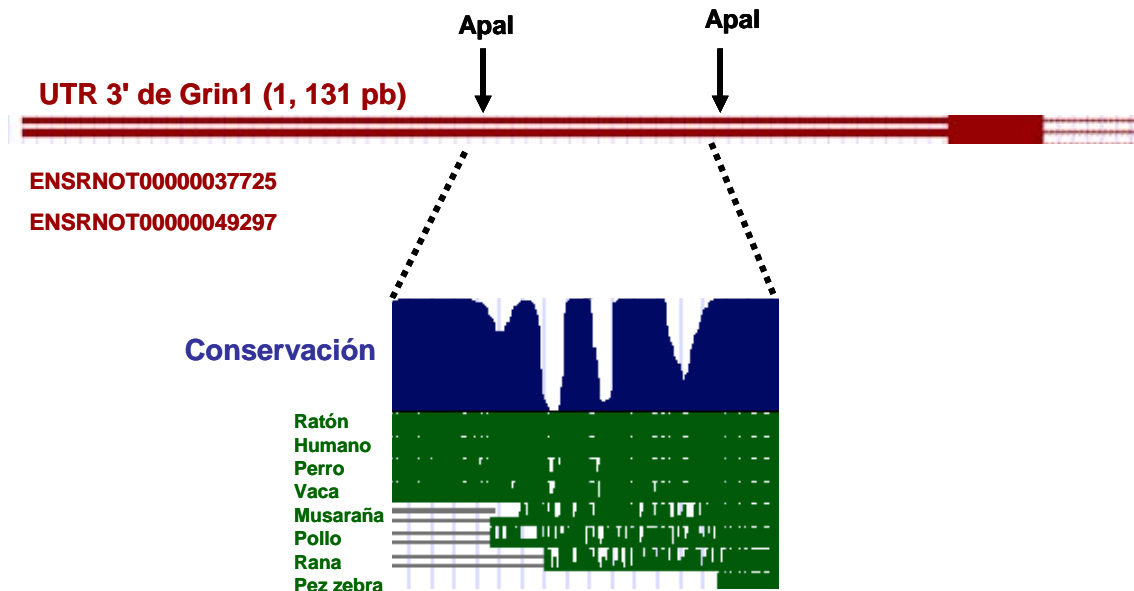


Figura 4. Alineamiento de la secuencia del UTR 3' de Grin1 de rata con el de otras especies. En rojo se muestran dos isoformas de Grin1 de rata. La región comprendida entre los sitios de restricción Apal (flechas) está altamente conservada en diferentes especies. UCSC Genome Browser.

Clonación y transfección del UTR 3' de Grin1 de rata y del UTR 3' de Grin1 Δ 266-552

Para evaluar funcionalmente el papel del UTR 3' de Grin1 en la regulación post transcripcional de su mensajero, el UTR 3' completo de 1, 131 pb se clonó en el sitio XbaI después del codón de término del gen de luciferasa del vector *pGL3 promoter*, como se muestra en la figura 5A.

La región comprendida entre los dos sitios Apal de este UTR 3' resulta interesante para estudiar la regulación del mensajero de Grin1, tanto por su alto contenido en MREs predichos como por su conservación entre especies. Por ello, decidimos escindir esta región del UTR 3' de Grin1 y clonar el UTR 3' sin ese fragmento en el vector *pGL3 promoter* (Figura 5A).

El vector *pGL3 promoter* contiene la secuencia de la luciferasa de *Photinus pyralis* (Pluc) bajo la regulación del promotor SV40. El plásmido *pRL-SV40*, que contiene la secuencia de la luciferasa de *Renilla reniformis* (Rluc) bajo la regulación del mismo promotor que *pGL3 promoter*, se usó como control de transfección para normalizar la expresión de Pluc (Apéndice 1).

En la figura 5B se muestra el patrón de restricción de la mezcla de vectores usados para transfectar distintas líneas celulares. En cada caso, se digirieron 400 ng de DNA: 320 ng de vector derivado de pGL3 (*pGL3 promoter*, *pGL3:Grin13'UTR* ó *pGL3:Grin13'UTRΔApal*) más 80 ng de *pRL-SV40*.

Después de la digestión con HindIII, todos los vectores se linearizaron: *pGL3 promoter*, 5010 pb; *pRL-SV40*, 3705 pb; *pGL3:Grin13'UTR*, 6147; y *pGL3:Grin13'UTRΔApal*, 5860 pb.

pGL3 promoter y *pRL-SV40* no tienen sitios de restricción Apal. Al digerir *pGL3:Grin13'UTR* con Apal se libera un fragmento de 278 pb, mientras que *pGL3:Grin13'UTRΔApal* se lineariza al ser digerido con esta enzima. La digestión y eliminación del fragmento comprendido entre los sitios Apal se realizó correctamente.

Efecto del UTR 3' de Grin1 y UTR 3'Δ266-552 en la traducción de luciferasa en diferentes fondos genéticos

Los vectores *pGL3 promoter*, *pGL3:Grin1 3'UTR* y *pGL3:Grin13'UTRΔApal*, se transfectaron en dos líneas celulares: HEK293-FT, PC12 y PC12 diferenciadas con NGF. Se eligieron estas células por los diferentes fondos genéticos que

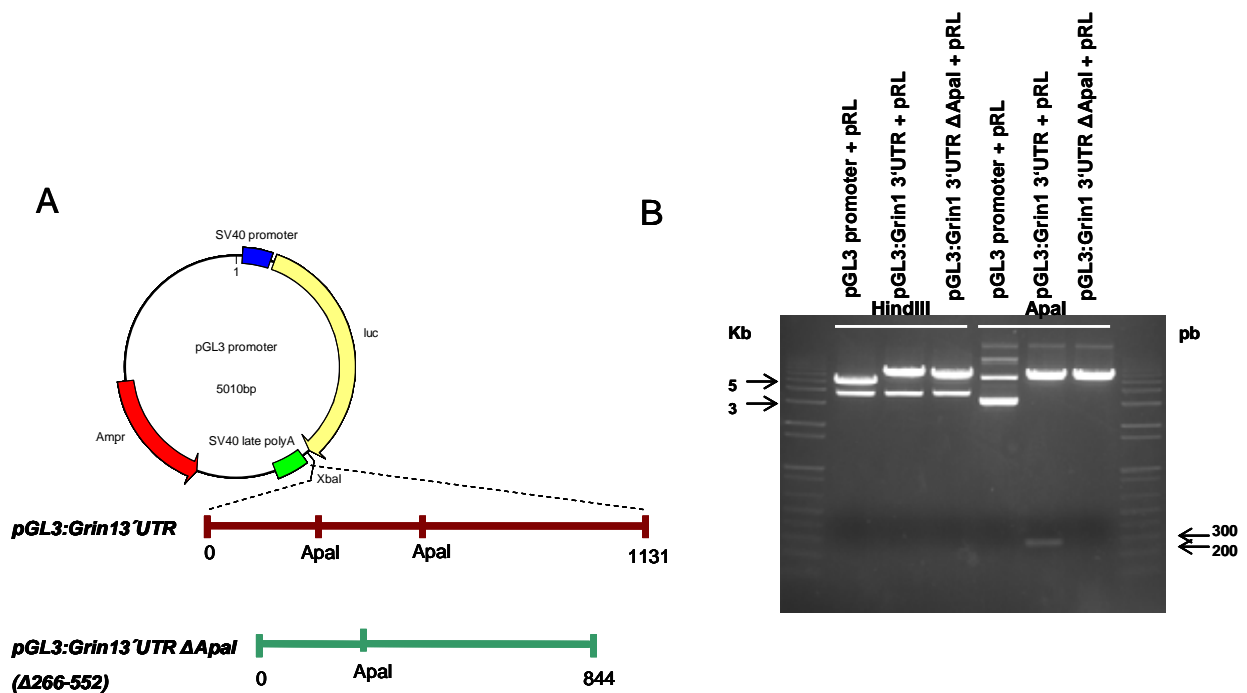


Figura 5. Vectores utilizados en este trabajo. A, construcción de los vectores *pGL3:Grin13'UTR* y *pGL3:Grin13UTRΔApal*. B, Patrón de restricción de la mezcla de vectores usados para transfectar diferentes líneas celulares: 320 ng de los vectores *pGL3 promoter*, *pGL3:Grin13UTR* ó *pGL3:Grin13UTRΔApal*, más 80 ng del vector *pRL-SV40*.

poseen. HEK293-FT es una línea de riñón de embrión humano, mientras que PC12 es un feocromocitoma de glándula adrenal de rata que en presencia de NGF presenta fenotipo neuronal (Greene y Tischler, 1976; Schimmelpfeng et al., 2004). Esto nos permitió comparar la expresión de luciferasa con y sin el UTR 3' de Grin1 en un fondo neuronal antes y después de su diferenciación. En la figura 6 se muestran las células PC12 no diferenciadas y diferenciadas. Después de 6 días de tratamiento con NGF (50 ng/ml), se observa la formación de neuritas en las células PC12.

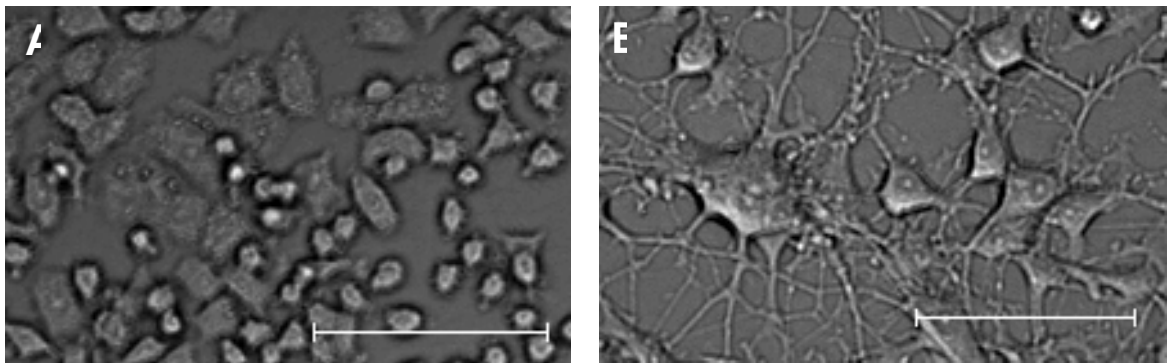


Figura 6. A, células PC12 sin diferenciar. B, células PC12 después de 6 días de diferenciación con NGF 50 ng/ml. Las barras blancas representan 50 μ m.

En la figura 7 se muestra la actividad de luciferasa medida 48 horas después de la transfección en las diferentes líneas celulares.

La actividad de Rluc del vector *pRL-SV40* se usó para normalizar la actividad de luciferasa de Pluc de los vectores derivados de *pGL3 promoter*, y se graficó la actividad como porcentaje, tomando como 100% la expresión de *pGL3* sin la región UTR 3' (*pGL3 promoter*, barras negras).

Cuando se transfectó el UTR 3' de Grin1 completo (barras punteadas, UTR 3') se observó disminución de la actividad de luciferasa en un ~40 y ~50% en HEK293-FT y PC12 (no diferenciadas y diferenciadas), respectivamente. No hay diferencias en la actividad de luciferasa entre células PC12 diferenciadas y sin diferenciar transfectadas con el UTR 3' completo. Sin embargo, la actividad de luciferasa en esta condición es significativamente menor en PC12 que en HEK293-FT ($p < 0.01$).

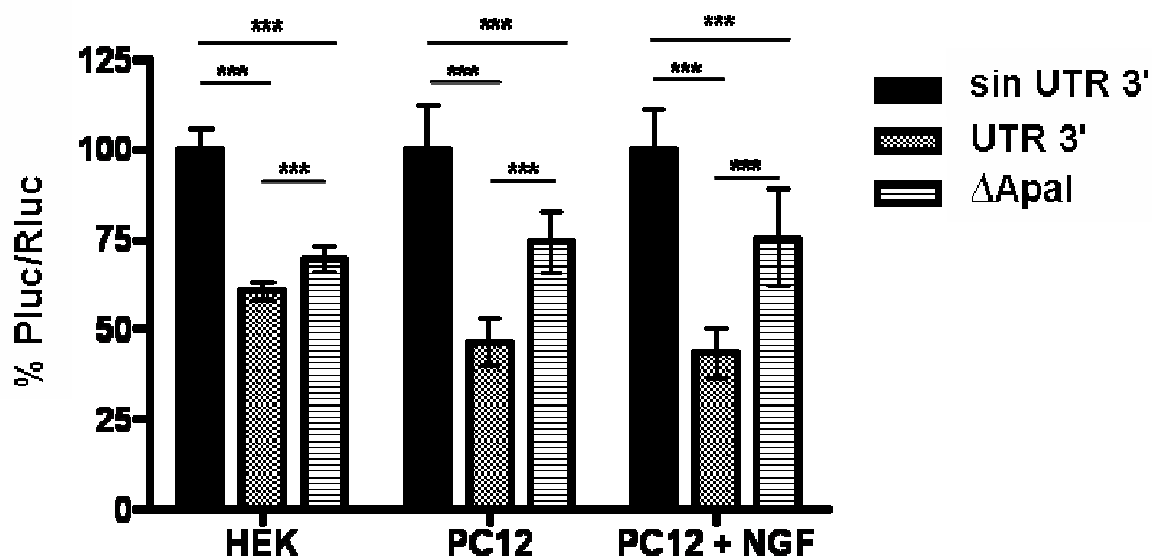


Figura 7. Porcentaje de actividad de luciferasa de Pluc y Rluc de los vectores *pGL3 promoter* (sin UTR 3'), *pGL3:Grin13UTR* (UTR 3') y *pGL3:Grin13UTRΔApal* (dApal) en las líneas celulares HEK293-FT, PC12 y PC12 diferenciadas. En cada experimento se usó *pRL-SV40* en una relación 1:5 para normalizar la transfección. Se tomó como 100% la actividad de *pGL3 promoter*. Se muestra la desviación estándar. *** $p < 0.001$ ANOVA de una vía, prueba *post hoc* deTukey.

Cuando se transfectó el vector *pGL3:Grin13UTRΔApal* (barras rayadas, ΔApal), la actividad de luciferasa se recuperó parcialmente en todas las líneas celulares con respecto a la condición de UTR 3' completo: ~10% en el caso de HEK293-FT y ~20% en PC12 diferenciadas y no diferenciadas. Una vez más, no hay diferencia en la actividad de luciferasa en esta condición entre células PC12 no diferenciadas y diferenciadas.

Análisis del nivel de mRNA de luciferasa

Para saber si el efecto observado en la actividad de luciferasa de Pluc en presencia del UTR 3' se debe a cambios en la abundancia de su mRNA, se midió la cantidad de éste por PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR).

En la figura 8 se muestra la cuantificación relativa de los niveles de mRNA de Pluc 48 horas después de transfectar *pGL3 promoter*, *pGL3:Grin13UTR* y *pGL3:Grin13UTRΔApal* en células PC12 no diferenciadas.

No hay diferencias en la abundancia del mRNA de luciferasa de Pluc al transfectar el UTR 3' completo o el UTRΔApal, comparados con la abundancia del mRNA de luciferasa de Pluc sin UTR 3'.

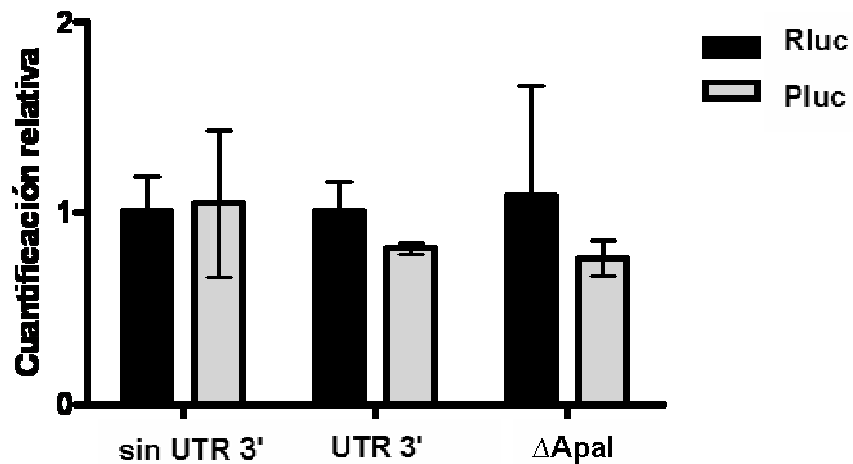


Figura 8. Cuantificación relativa de la abundancia del mRNA de luciferasa Pluc medida por qPCR, normalizado con la expresión de RLuc, 48 horas después de transfectar con *pGL3 promoter* (sin UTR 3'), *pGL3:Grin13UTR* (UTR 3') y *pGL3:Grin13UTRΔApal* (ΔApal) en células PC12 sin diferenciar. Las barras negras muestran la expresión del mRNA de RLuc, que se usó para normalizar la expresión de Pluc (barras grises). En todos los casos se muestra la desviación estándar.

Perfil de expresión de miRNAs con MREs predichos en el UTR 3' de Grin1 en HEK293 y PC12

Para correlacionar la actividad de luciferasa observada con la acción de miRNAs con MREs predichos en el UTR 3' de Grin1, se obtuvieron los perfiles de expresión de miRNAs de las líneas celulares HEK293, PC12 y PC12 diferenciadas. Estos datos se obtuvieron en el laboratorio del Dr. Tuschl (Landgraf et al., 2007) por clonación de los miRNAs en las diferentes líneas celulares.

En la figura 9, se compara la expresión de miRNAs con MREs predichos en el UTR 3' de Grin1 en HEK293 y en PC12.

Dado que la actividad de luciferasa en todas las condiciones probadas (UTR 3' y ΔApal) es muy similar en células PC12 diferenciadas y no diferenciadas, en este estudio sólo se tomaron en cuenta los miRNAs que se expresan en ambas células. Los miRNAs que se expresan únicamente en PC12 diferenciadas o en PC12 no diferenciadas no se muestran en la figura.

Siete de los miRNAs con MREs predichos en este UTR 3' (miR-137, miR-322, miR-503, miR-195, 760 5p, miR-22 y miR-210) se expresan sólo en PC12. miR-339 5p,

miR-15b, miR-16, miR-324 3p, miR-196a y miR-196b se expresan sólo en HEK293. miR-24 y miR-185 se expresan en ambas líneas celulares.

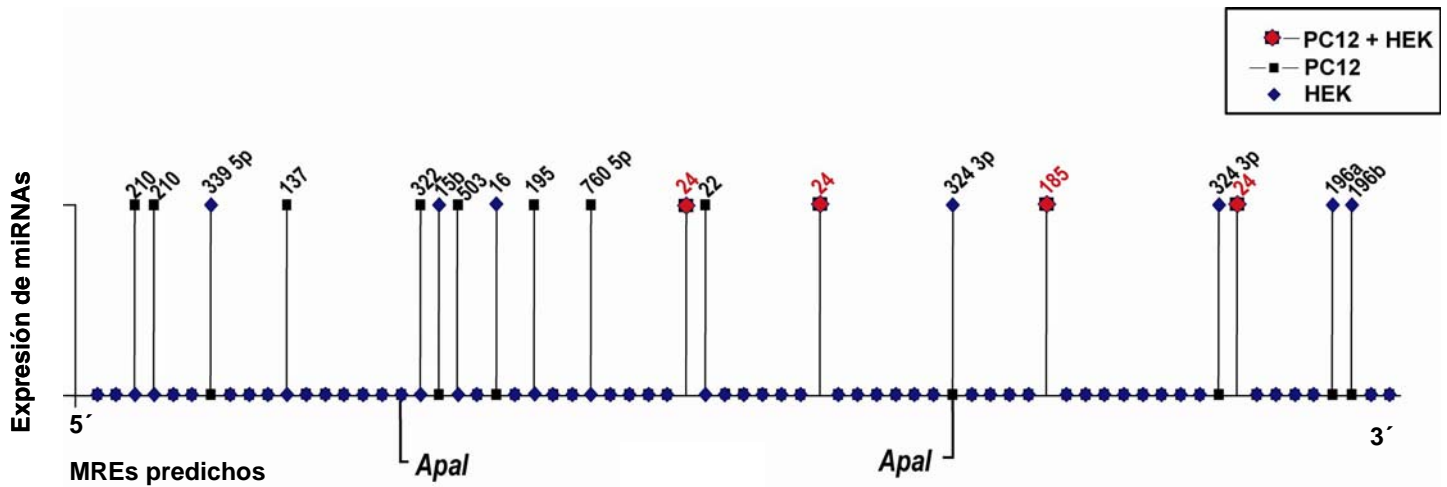


Figura 9. Perfil de expresión de miRNAs con MREs predichos en el UTR 3' de Grin1 de rata en células HEK y PC12. En el eje x se muestran todos los MREs predichos (Figura 3) en este UTR 3' ordenados conforme aparecen en la secuencia (5'-3'). Solo se muestran los nombres de los miRNAs expresados, representados arriba. Los miRNAs que no se expresan o que no fueron detectados experimentalmente se representan abajo. En cuadrados negros se muestran los miRNAs que se expresan únicamente en PC12 (miRNAs comunes entre PC12 diferenciadas y no diferenciadas), en rombos azules los que se expresan únicamente en HEK293 y en rojo los miRNAs expresados en ambas líneas celulares.

Inhibición de la expresión de las proteínas Ago2 y Dicer

Para probar si la vía de los microRNAs está involucrada en los cambios de expresión de luciferasa inducidos por el UTR 3' de Grin1, se trató de inhibir la expresión de dos proteínas de la vía de los miRNAs, Ago2 y Dicer.

Para ello se usaron dos estrategias experimentales: por medio de siRNAs específicos para Dicer de humano y por medio de lentivirus con hairpins específicos para Ago2 de rata y ratón.

Los siRNAs específicos para Dicer se transfectaron en las líneas celulares de humano HEK293-FT y HeLa (cáncer cervicouterino de humano), usando dos tipos de lípidos (Lipofectamina 2000 y siIMPORTER). Con los lentivirus se transdujeron células PC12.

48 horas después de la transfección con siRNAs o de la transducción con lentivirus se extrajo el RNA de las células para analizar la expresión de Ago2 y Dicer por PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR).

Diez días después de la transducción con lentivirus de células PC12 no diferenciadas seleccionadas con puromicina se analizó la expresión de Ago2 por qPCR (Figura 10).

El lentivirus control está diseñado para no inhibir la expresión de alguna proteína celular. Los lentivirus 32 y 33 contienen hairpins con secuencias para inhibir la traducción de Ago2 de rata específicamente. El hairpin del lentivirus 34 está diseñado para inhibir la expresión de Ago2 de ratón, pero no de rata. El análisis de los valores de Ct de estos experimentos se realizó mediante el

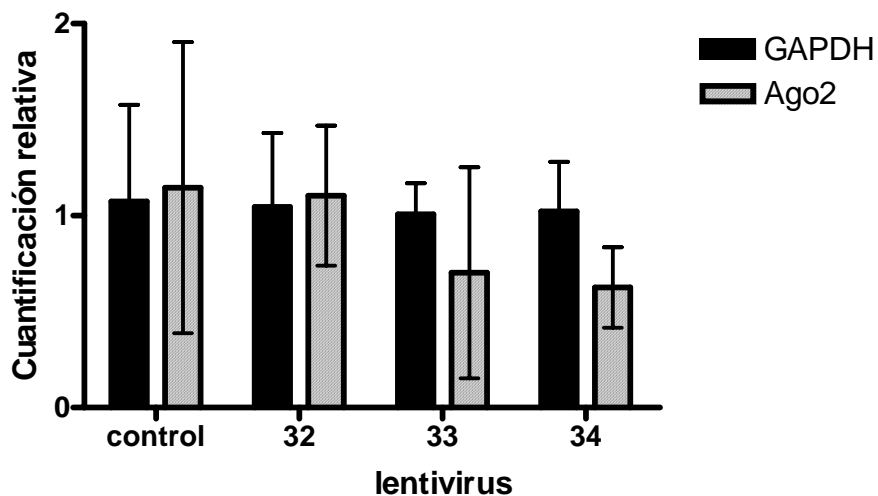


Figura 10. Expresión de Ago2 en células PC12 transducidas con lentivirus control, y con 3 lentivirus que contienen hairpins diseñados para inhibir la expresión de Ago2: 32 (rata), 33 (rata), y 34 (ratón). Las barras negras muestran la expresión del mRNA de GAPDH, que se usó para normalizar la expresión de Ago2, barras rayadas. En todos los casos se muestra la desviación estándar.

método de cuantificación relativa usando la expresión de GAPDH como condición de normalización.

Después del análisis no se encontró una reducción significativa en la expresión de Dicer ni de Ago2 en ninguna condición.

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS


Como se ha propuesto anteriormente (Awobuluyi et al., 2003), es posible que la disminución en la actividad de luciferasa en presencia de la región conservada del UTR 3 de Grin1 se deba a su estructura secundaria. Si esta explicación fuera suficiente, se esperaría que la diferencia en la actividad de luciferasa observada en presencia del UTR Δ Apal, comparada con la del UTR completo, fuera similar en los dos contextos celulares. Sin embargo nuestros resultados muestran que el mecanismo es distinto en cada línea celular, lo cual concuerda con la observación de que el patrón de expresión de miRNAs en células HEK y PC12 es diferente (excepto miR-24 y miR-185, que se expresan en ambas líneas celulares).

miR-24 tiene 3 MREs predichos en el UTR 3 de Grin1, dos de ellos en la región de 287 nt altamente conservada entre especies. La disminución en la actividad de luciferasa en presencia del UTR 3' completo puede deberse a la represión mediada por miR-24 en ambas líneas celulares. Sin embargo, esta disminución es menor en células HEK que en PC12, lo cual puede atribuirse a la acción de un miRNA presente exclusivamente en células PC12, además de miR-24 (miR-137, miR-322, miR-503, miR-195, 760 5p, miR-22, miR-210).

Al comparar la actividad de luciferasa en presencia del UTR Δ Apal con la actividad en presencia del UTR 3' completo, observamos que la actividad se recupera parcialmente en ambas líneas celulares. Sin embargo la recuperación es mayor en células PC12. Esto puede deberse a que los miRNAs que actúan en células PC12 tienen MREs en el sitio Apal-Apal (miR-15, miR-16, miR-324 3p), y a que en células HEK los miRNAs que podrían estar actuando tienen MREs predichos fuera de esta región (miR-339 5p, miR-324 3p, miR-196a, miR-196b).

miR-339 5p, miR-137, miR-15b, miR-16m miR-22, miR-324 3p, miR-24 y miR-185 se han encontrado en neuronas, ya sea por clonación o por Northern Blot (Miska et al., 2004, Kim et al., 2004, He et al., 2007, Sempere et al., 2004), lo que sugiere que estos miRNAs podrían coexistir con el mRNA de Grin1 en el cerebro.


Por otra parte, la acción de los miRNAs se asocia frecuentemente con la degradación del mRNA blanco. Sin embargo, existen muchos ejemplos de represión de la traducción de mRNAs endógenos o artificiales por miRNAs que no afectan el nivel de mRNA. Este puede ser el caso del mensajero de luciferasa fusionado al UTR 3' de Grin1.


Finalmente, para poder concluir si los efectos observados en la actividad de luciferasa en presencia del UTR 3' son mediados por miRNAs, proponemos  siguientes perspectivas de este trabajo:

- Interferir con la vía de los miRNAs, usando el mecanismo de RNAi para inhibir la expresión de Dicer y/o Ago2.
- Mutar los MREs presentes en el UTR 3' de Grin1.
- Usar oligonucleótidos de RNA modificados (LNAs) para inhibir selectivamente la acción ciertos miRNAs (miR-24 y/o miR-185, por ejemplo) y observar su participación en la regulación de la actividad de luciferasa en presencia del UTR 3' de Grin1. Gracias a las modificaciones en sus nucleótidos, estos oligos de RNA de cadena sencilla inhiben la función del miRNA elegido. Este mecanismo es específico, ya que actúan apareándose con la secuencia del miRNA maduro y “bloquean” así al complejo RISC que contiene al miRNA-oligo modificado.

Para inhibir la expresión de Ago2 y Dicer usamos dos estrategias experimentales: siRNAs específicos para Dicer de humano y lentivirus con hairpins específicos para Ago2 de rata y ratón.

La abundancia del mRNA de estas proteínas en diferentes condiciones experimentales, medida por qPCR, no cambió significativamente con respecto a la condición control.

La secuencia usada en este trabajo para sintetizar el siRNA contra Dicer ha sido usada en varios trabajos (Hutvagner et al., 2001, Lee et al., 2003, Lee et al., 2006). La falta de inhibición de la expresión de Dicer se debe probablemente a fallas experimentales y será necesario optimizar las condiciones de síntesis y de transfección de estos siRNAs. .

Una de las posibles razones por las que no observamos cambios en la abundancia del mRNA de Ago2 en nuestras condiciones es que las secuencias de los hairpins en los lentivirus usados no están validadas  experimentalmente.

CONCLUSIONES

La secuencia del UTR 3' de la subunidad R1 del receptor de NMDA de rata (Grin1) tiene varios sitios predichos de unión a microRNAs.

La traducción del mRNA de Grin1 está regulada por su UTR 3', en particular por una región de ~287 nucleótidos, que contiene una gran cantidad de posibles sitios de unión a microRNAs.

Esta regulación depende del fondo genético celular, siendo más fuerte en PC12 que en HEK293-FT.

Los efectos observados en la actividad de luciferasa no se relacionan con la degradación del mRNA de este gen.

APÉNDICE 1

Sistema de doble luciferasa

El sistema de doble luciferasa se ha usado para estudiar la expresión genética en células eucariontes. Este método consiste en la expresión y medición simultánea de dos enzimas reporteras individuales (las luciferasas obtenidas de *Photinus pyralis* y de *Renilla reniformis*), que tienen estructuras y sustratos diferentes, lo que permite discriminar su actividad.

El reportero experimental (en este caso el vector *pGL3 promoter* y derivados, que contiene la secuencia de la luciferasa de *Photinus pyralis*, Pluc) está relacionado con el efecto de condiciones experimentales específicas, mientras que la actividad del reportero control co-transfectado (en este caso el vector *pRL-SV40*, que contiene la secuencia de la luciferasa de *Renilla reniformis*, Rluc) sirve un control interno. Al normalizar la actividad del reportero experimental con respecto al control interno se minimiza la variabilidad experimental causada por errores de pipeteo, diferencias en la viabilidad celular, en la eficiencia de transfección, y en la eficiencia de lisis celular.

En la figura 11 se muestran las reacciones catalizadas por las luciferasas usadas en este trabajo.

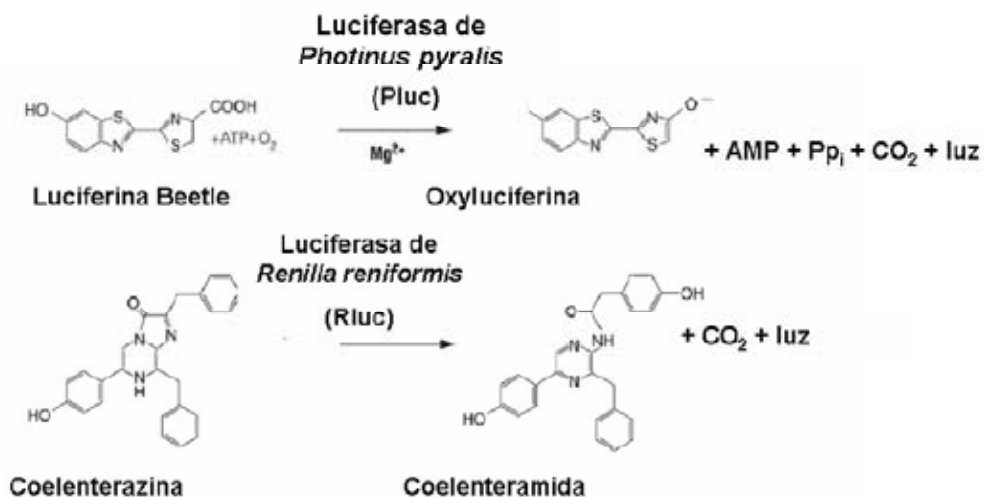


Figura 11. Reacciones enzimáticas catalizadas por Pluc y Rluc. Modificado de Promega.

BIBLIOGRAFÍA

Aakalu, G., Smith, W. B., Nguyen, N., Jiang, C., and Schuman, E. M. (2001). Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron* **30**, 489-502.

Anji, A., and Kumari, M. (2006). A novel RNA binding protein that interacts with NMDA R1 mRNA: regulation by ethanol. *Eur J Neurosci* **23**, 2339-50.

Antar, L. N., Afroz, R., Dichtenberg, J. B., Carroll, R. C., and Bassell, G. J. (2004). Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J Neurosci* **24**, 2648-55.

Autilio, L. A., Appel, S. H., Pettis, P., and Gambetti, P. L. (1968). Biochemical studies of synapses in vitro. I. Protein synthesis. *Biochemistry* **7**, 2615-22.

[Awobuluyi M, Vazhappilly R, Sucher NJ](#). (2003) Translational activity of N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 mRNA in PC12 cells. *Neurosignals*. **12**:283-91.

Babak, T., Zhang, W., Morris, Q., Blencowe, B. J., and Hughes, T. R. (2004). Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference. *Rna* **10**, 1813-9.

Banko, J. L., Hou, L., and Klann, E. (2004). NMDA receptor activation results in PKA- and ERK-dependent Mnk1 activation and increased eIF4E phosphorylation in hippocampal area CA1. *J Neurochem* **91**, 462-70.

Barbato, C., Ciotti, M. T., Serafino, A., Calissano, P., and Cogoni, C. (2007). Dicer expression and localization in post-mitotic neurons. *Brain Res* **1175**, 17-27.

Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006a). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* **20**, 1885-98.

Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., and Izaurralde, E. (2006b). MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**, 523-30.

[Berry FB, Brown IR](#). (1996) CaM I mRNA is localized to apical dendrites during postnatal development of neurons in the rat brain. *J Neurosci Res*. **43**, 565-75.

Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I., and Filipowicz, W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125**, 1111-24.

Bodian, D. (1965). A Suggestive Relationship of Nerve Cell Rna with Specific Synaptic Sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **53**, 418-25.

Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B., and Cohen, S. M. (2003). bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell* **113**, 25-36.

Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., and Cohen, S. M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* **3**, e85.

Brown, V., Jin, P., Ceman, S., Darnell, J. C., O'Donnell, W. T., Tenenbaum, S. A., Jin, X., Feng, Y., Wilkinson, K. D., Keene, J. D., Darnell, R. B., and Warren, S. T. (2001). Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell*. **107**, 477-87.

[Burgin KE, Waxham MN, Rickling S, Westgate SA, Mobley WC, Kelly PT.](#) (1990) In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J Neurosci.* **10**, 1788-98.

[Cao X, Pfaff SL, Gage FH.](#) (2007) A functional study of miR-124 in the developing neural tube. *Genes Dev.* **21**:531-6.

Chang, S., Johnston, R. J., Jr., Frokjaer-Jensen, C., Lockery, S., and Hobert, O. (2004). MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode. *Nature* **430**, 785-9.

Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F., and Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* **303**, 83-6.

Chicurel, M. E., Terrian, D. M., and Potter, H. (1993). mRNA at the synapse: analysis of a synaptosomal preparation enriched in hippocampal dendritic spines. *J Neurosci* **13**, 4054-63.

Choi, D. W., Koh, J. Y., and Peters, S. (1988). Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci* **8**, 185-96.

Chu, C. Y., and Rana, T. M. (2006). Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol* **4**, e210.

Comery, T. A., Harris, J. B., Willems, P. J., Oostra, B. A., Irwin, S. A., Weiler, I. J., and Greenough, W. T. (1997). Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5401-4.

Conaco, C., Otto, S., Han, J. J., and Mandel, G. (2006). Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2422-7.

Constantine-Paton, M. (1990). NMDA receptor as a mediator of activity-dependent synaptogenesis in the developing brain. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **55**, 431-43.

[Crino P, Khodakhah K, Becker K, Ginsberg S, Hemby S, Eberwine J.](#) (1998) Presence and phosphorylation of transcription factors in developing dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, :2313-8.

Cull-Candy, S. G., and Leszkiewicz, D. N. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* **2004**, re16.

Davis, T. H., Cuellar, T. L., Koch, S. M., Barker, A. J., Harfe, B. D., McManus, M. T., and Ullian, E. M. (2008). Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *J Neurosci* **28**, 4322-30.

[De Diego Otero Y, Severijnen LA, van Cappellen G, Schrier M, Oostra B, Willemsen R.](#) (2002) Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells. *Mol Cell Biol.* **22**, 8332-41.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* **51**, 7-61.

Doench, J. G., and Sharp, P. A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* **18**, 504-11.

[Donzé O, Picard D.](#) (2002) RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **30**:e46.

Eberwine, J., Belt, B., Kacharina, J. E., and Miyashiro, K. (2002). Analysis of subcellularly localized mRNAs using in situ hybridization, mRNA amplification, and expression profiling. *Neurochem Res* **27**, 1065-77.

Eberwine, J., Miyashiro, K., Kacharina, J. E., and Job, C. (2001). Local translation of classes of mRNAs that are targeted to neuronal dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7080-5.

[Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS.](#) (2003) MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.* **5**:R1.

Fiore, R., and Schratt, G. (2007). MicroRNAs in vertebrate synapse development. *ScientificWorldJournal* **7**, 167-77.

Gardiol, A., Racca, C., and Triller, A. (1999). Dendritic and postsynaptic protein synthetic machinery. *J Neurosci* **19**, 168-79.

[Garner CC, Tucker RP, Matus A.](#) (1988) Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature.* **336**, 674-7.

Gingras, A. C. Raught, B. Sonenberg, N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem.* **68**: 913-63.

Giraldez, A. J., Cinalli, R. M., Glasner, M. E., Enright, A. J., Thomson, J. M., Baskerville, S., Hammond, S. M., Bartel, D. P., and Schier, A. F. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* **308**, 833-8.

Greene LA, and Tischler AS. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**:2424-2428,

[Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ.](#) (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* **34**:D140-4.

Grimson, A., Farh, K. K., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., and Bartel, D. P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* **27**, 91-105.

Haley, B., and Zamore, P. D. (2004). Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 599-606.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., and Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* **18**, 3016-27.

He, L., and Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* **5**, 522-31.

He X., Zhang Q., Liu Y. (2007) Cloning and identification of novel microRNAs from rat hippocampus. *Pan X Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* **39**:708-714.

Hendrickson, D. G., Hogan, D. J., Herschlag, D., Ferrell, J. E., and Brown, P. O. (2008). Systematic identification of mRNAs recruited to argonaute 2 by specific microRNAs and corresponding changes in transcript abundance. *PLoS ONE* **3**, e2126.

Hinton, V. J., Brown, W. T., Wisniewski, K., and Rudelli, R. D. (1991). Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* **41**, 289-94.

Hobert, O. (2004). Common logic of transcription factor and microRNA action. *Trends Biochem Sci* **29**, 462-8.

Hofacker, I. L. (2007). How microRNAs choose their targets. *Nat Genet* **39**, 1191-2.

Houbaviy, H. B., Murray, M. F., and Sharp, P. A. (2003). Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* **5**, 351-8.

Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16961-6.

Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* **293**, 834-8.

Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akazawa, C., Shigemoto, R., Mizuno, N., Masu, M., and et al. (1993). Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* **268**, 2836-43.

Jakymiw, A., Lian, S., Eystathioy, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J. C., Fritzler, M. J., and Chan, E. K. (2005). Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol* **7**, 1267-74.

[John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS.](#) (2004) Human MicroRNA targets. *PLoS Biol.* **2**:e363.

Kacharmina, J. E., Job, C., Crino, P., and Eberwine, J. (2000). Stimulation of glutamate receptor protein synthesis and membrane insertion within isolated neuronal dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11545-50.

Kiebler, M. A., and DesGroseillers, L. (2000). Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* **25**, 19-28.

Kiebler, M. A., Hemraj, I., Verkade, P., Kohrmann, M., Fortes, P., Marion, R. M., Ortin, J., and Dotti, C. G. (1999). The mammalian stau protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* **19**, 288-97.

Kim, J., Krichevsky, A., Grad, Y., Hayes, G. D., Kosik, K. S., Church, G. M., and Ruvkun, G. (2004). Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 360-5.

[Kosik KS, Crandall JE, Mufson EJ, Neve RL.](#) (1989) Tau in situ hybridization in normal and Alzheimer brain: localization in the somatodendritic compartment. *Ann Neurol.* **26**, 352-61.

Krichevsky, A. M., King, K. S., Donahue, C. P., Khrapko, K., and Kosik, K. S. (2003). A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *Rna* **9**, 1274-81.

Krijnse-Locker, J., Parton, R. G., Fuller, S. D., Griffiths, G., and Dotti, C. G. (1995). The organization of the endoplasmic reticulum and the intermediate compartment in cultured rat hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* **6**, 1315-32.

[Krol J, Fiszer A, Mykowska A, Sobczak K, de Mezer M, Krzyzosiak WJ.](#) (2007) Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets. *Mol Cell.* **25**:575-86.

Kye, M. J., Liu, T., Levy, S. F., Xu, N. L., Groves, B. B., Bonneau, R., Lao, K., and Kosik, K. S. (2007). Somatodendritic microRNAs identified by laser capture and multiplex RT-PCR. *Rna* **13**, 1224-34.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* **12**, 735-9.

Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N. D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foa, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., Muller, R. U., Schermer, B., Bissels, U., Inman, J., Phan, Q., Chien, M., Weir, D. B., Choksi, R., De Vita, G., Frezzetti, D., Trompeter, H. I., Hornung, V., Teng, G., Hartmann, G., Palkovits, M., Di Lauro, R., Wernet, P., Macino, G., Rogler, C. E., Nagle, J. W., Ju, J., Papavasiliou, F. N., Benzing, T., Lichter, P., Tam, W., Brownstein, M. J., Bosio, A., Borkhardt, A., Russo, J. J., Sander, C., Zavolan, M., and Tuschl, T. (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* **129**, 1401-14.

Leclerc, C. L., Chi, C. L., Awobuluyi, M., and Sucher, N. J. (1995). Expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the rat pheochromocytoma cell line PC12. *Neurosci Lett* **201**, 103-6.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415-9.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., and Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* **23**, 4051-60.

[Lee Y](#), [Hur J](#), [Park SY](#), [Kim YK](#), [Suh MR](#), [Kim VN](#). (2006) The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J*. **25**:522-32.

Lewis, B. P., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**, 15-20.

Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., and Burge, C. B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**, 787-98.

Li, Y., Erzurumlu, R. S., Chen, C., Jhaveri, S., and Tonegawa, S. (1994). Whisker-related neuronal patterns fail to develop in the trigeminal brainstem nuclei of NMDAR1 knockout mice. *Cell* **76**, 427-37.

Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S., and Johnson, J. M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**, 769-73.

Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J., and Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* **7**, 719-23.

Lowenstein, P. R., Morrison, E. E., Bain, D., Shering, A. F., Banting, G., Douglas, P., and Castro, M. G. (1994). Polarized distribution of the trans-Golgi network marker TGN38 during the in vitro development of neocortical neurons: effects of nocodazole and brefeldin A. *Eur J Neurosci* **6**, 1453-65.

Lugli, G., Larson, J., Martone, M. E., Jones, Y., and Smalheiser, N. R. (2005). Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *J Neurochem* **94**, 896-905.

Lugli, G., Torvik, V. I., Larson, J., and Smalheiser, N. R. (2008). Expression of microRNAs and their precursors in synaptic fractions of adult mouse forebrain. *J Neurochem*.

Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**, 95-8.

[Lyford GL](#), [Yamagata K](#), [Kaufmann WE](#), [Barnes CA](#), [Sanders LK](#), [Copeland NG](#), [Gilbert DJ](#), [Jenkins NA](#), [Lanahan AA](#), [Worley PF](#). (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* **14**, 433-45.

[MacDermott AB](#), [Mayer ML](#), [Westbrook GL](#), [Smith SJ](#), [Barker JL](#). (1986) NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature*. **321**:519-22.

Majoros, W. H., and Ohler, U. (2007). Spatial preferences of microRNA targets in 3' untranslated regions. *BMC Genomics* **8**, 152.

[Mayer ML](#), [Westbrook GL](#), [Guthrie PB](#). (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*. **309**:261-3.

Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, Yoshii A, Sestan N, Rakic P, Constantine-Paton M, Horvitz HR (2004) [Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain](#). *Genome Biol*. **5**:R68.

Miyashiro, K., Dichter, M., and Eberwine, J. (1994). On the nature and differential distribution of mRNAs in hippocampal neurites: implications for neuronal functioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10800-4.

Mori, Y., Imaizumi, K., Katayama, T., Yoneda, T., and Tohyama, M. (2000). Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of alpha-CaMKII regulate its dendritic targeting. *Nat Neurosci* **3**, 1079-84.

[Morita S](#), [Horii T](#), [Kimura M](#), [Goto Y](#), [Ochiya T](#), [Hatada I](#). (2007) One Argonaute family member, Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics*. **89**:687-96.

Murchison, E. P., and Hannon, G. J. (2004). miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 223-9.

Muslimov, I. A., Santi, E., Homel, P., Perini, S., Higgins, D., and Tiedge, H. (1997). RNA transport in dendrites: a cis-acting targeting element is contained within neuronal BC1 RNA. *J Neurosci* **17**, 4722-33.

Nelson, P. T., Hatzigeorgiou, A. G., and Mourelatos, Z. (2004). miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. *Rna* **10**, 387-94.

Ohashi, S., Koike, K., Omori, A., Ichinose, S., Ohara, S., Kobayashi, S., Sato, T. A., and Anzai, K. (2002). Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J Biol Chem* **277**, 37804-10.

Olsen, P. H., and Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* **216**, 671-80.

Pal, R., Agbas, A., Bao, X., Hui, D., Leary, C., Hunt, J., Naniwadekar, A., Michaelis, M. L., Kumar, K. N., and Michaelis, E. K. (2003). Selective dendrite-targeting of mRNAs of NR1 splice variants without exon 5: identification of a cis-acting sequence and isolation of sequence-binding proteins. *Brain Res* **994**, 1-18.

[Paradies MA](#), [Steward O](#). (1997) Multiple subcellular mRNA distribution patterns in neurons: a nonisotopic in situ hybridization analysis. *J Neurobiol*. **33**, 473-93.

Parker, R., and Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 121-7.

Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J., and Sharp, P. A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* **21**, 533-42.

- Pillai, R. S. (2005a). MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *Rna* **11**, 1753-61.
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005b). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* **309**, 1573-6.
- Ramos, A., Hollingworth, D., and Pastore, A. (2003). G-quartet-dependent recognition between the FMRP RGG box and RNA. *Rna* **9**, 1198-207.
- [Que M, Schiene K, Witte OW, Zilles K.](#) (1999) Widespread up-regulation of N-methyl-D-aspartate receptors after focal photothrombotic lesion in rat brain. *Neurosci Lett.* 273:77-80.
- Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., and Izaurralde, E. (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *Rna* **11**, 1640-7.
- Rogelj, B., and Giese, K. P. (2004). Expression and function of brain specific small RNAs. *Rev Neurosci* **15**, 185-98.
- Scannevin, R. H., and Huganir, R. L. (2000). Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci* **1**, 133-41.
- Scheetz, A. J., Nairn, A. C., and Constantine-Paton, M. (2000). NMDA receptor-mediated control of protein synthesis at developing synapses. *Nat Neurosci* **3**, 211-6.
- [Schimmelpfeng J, Weibezahn KF, Dertinger H.](#) (2004) Quantification of NGF-dependent neuronal differentiation of PC-12 cells by means of neurofilament-L mRNA expression and neuronal outgrowth. *J Neurosci Methods.* **139**:299-306.
- Schmitter, D., Filkowski, J., Sewer, A., Pillai, R. S., Oakeley, E. J., Zavolan, M., Svoboda, P., and Filipowicz, W. (2006). Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells. *Nucleic Acids Res* **34**, 4801-15.
- Schratt, G. M., Nigh, E. A., Chen, W. G., Hu, L., and Greenberg, M. E. (2004). BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *J Neurosci* **24**, 7366-77.
- [Schratt GM, Tuebting F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME.](#) (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature.* **439**:283-9. Erratum in: *Nature.* (2006) **441**:902.
- Seggerson, K., Tang, L., and Moss, E. G. (2002). Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol* **243**, 215-25.
- Sempere, L. F. [Freemantle S](#), [Pitha-Rowe I](#), [Moss E](#), [Dmitrovsky E](#), [Ambros V](#). (2004) Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.* **5**, R13.
- Sen, G. L., and Blau, H. M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* **7**, 633-6.
- Sheng, M., and Kim, M. J. (2002). Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* **298**, 776-80.

[Suzuki T](#), [Tian QB](#), [Kuromitsu J](#), [Kawai T](#), [Endo S](#). (2007). Characterization of mRNA species that are associated with postsynaptic density fraction by gene chip microarray analysis. *Neurosci Res*. **57**, 61–85.

Steward, O., and Schuman, E. M. (2001). Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* **24**, 299-325.

Sucher, N. J., Brose, N., Deitcher, D. L., Awobuluyi, M., Gasic, G. P., Bading, H., Cepko, C. L., Greenberg, M. E., Jahn, R., Heinemann, S. F., and et al. (1993). Expression of endogenous NMDAR1 transcripts without receptor protein suggests post-transcriptional control in PC12 cells. *J Biol Chem* **268**, 22299-304.

Sutton, M. A., and Schuman, E. M. (2005). Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity. *J Neurobiol* **64**, 116-31.

Tiedge, H., and Brosius, J. (1996). Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* **16**, 7171-81.

[Tongiorgi E](#), [Righi M](#), [Cattaneo A](#). (1997) Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. *J Neurosci*. **17**, 9492-505.

Torre, E. R., and Steward, O. (1996). Protein synthesis within dendrites: glycosylation of newly synthesized proteins in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* **16**, 5967-78.

Twiss, J. L., and Shooter, E. M. (1995). Nerve growth factor promotes neurite regeneration in PC12 cells by translational control. *J Neurochem* **64**, 550-7.

Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J., Hannon, G. J., and Parker, R. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* **20**, 515-24.

Wang, H., Iacoangeli, A., Popp, S., Muslimov, I. A., Imataka, H., Sonenberg, N., Lomakin, I. B., and Tiedge, H. (2002). Dendritic BC1 RNA: functional role in regulation of translation initiation. *J Neurosci* **22**, 10232-41.

Wanner, I., Baader, S. L., Oberdick, J., and Schilling, K. (2000). Changing subcellular distribution and activity-dependent utilization of a dendritically localized mRNA in developing Purkinje cells. *Mol Cell Neurosci* **15**, 275-87.

Weiler, I. J., and Greenough, W. T. (1993). Metabotropic glutamate receptors trigger postsynaptic protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7168-71.

Wilusz, C. J., Gao, M., Jones, C. L., Wilusz, J., and Peltz, S. W. (2001). Poly(A)-binding proteins regulate both mRNA deadenylation and decapping in yeast cytoplasmic extracts. *Rna* **7**, 1416-24.

Wu, L., Fan, J., and Belasco, J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4034-9.

Wu, L., Wells, D., Tay, J., Mendis, D., Abbott, M. A., Barnitt, A., Quinlan, E., Heynen, A., Fallon, J. R., and Richter, J. D. (1998). CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses. *Neuron* **21**, 1129-39.

Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E. J., Golub, T. R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K., Lander, E. S., and Kellis, M. (2005). Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* **434**, 338-45.

Xu, P., Vernooy, S. Y., Guo, M., and Hay, B. A. (2003). The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol* **13**, 790-5.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* **17**, 3011-6.

Zalfa, F., Adinolfi, S., Napoli, I., Kuhn-Holsken, E., Urlaub, H., Achsel, T., Pastore, A., and Bagni, C. (2005). Fragile X mental retardation protein (FMRP) binds specifically to the brain cytoplasmic RNAs BC1/BC200 via a novel RNA-binding motif. *J Biol Chem* **280**, 33403-10.

Zalfa, F., Giorgi, M., Primerano, B., Moro, A., Di Penta, A., Reis, S., Oostra, B., and Bagni, C. (2003). The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* **112**, 317-27.

Zhong, J., Zhang, T., and Bloch, L. M. (2006). Dendritic mRNAs encode diversified functionalities in hippocampal pyramidal neurons. *BMC Neurosci* **7**, 17.