

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

"Procesamiento del transcrito primario del microRNA let-7c"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A: LAURA IVÓN LÁSCAREZ LAGUNAS



Tutor: DR. LUIS ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ

MÉXICO, D. F.

MARZO 2009



Universidad Nacional Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Se reconoce el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada a Laura Ivón Láscarez Lagunas (No. de registro 99139) para realizar estudios de Maestría en Ciencias Bioquímicas. El proyecto fue apoyado por el CONACyT (D42469) y DGAPA PAPIIT (INS204406).

Al Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez por permitirme ingresar a su laboratorio, por sus enseñanzas y su apoyo.

A mi comité tutoral Dr. Félix Recillas Targa y Dr. José Luis Reyes Taboada por sus atinadas observaciones y su dedicación para con mi proyecto.

A la M. en C. Alicia Sampieri García por su ayuda técnica en la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado de examen: Dr. Félix Recillas Targa, Dr. Angel Zaraín Herzberg, Dr. José Luis Reyes Taboada, Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova y Dra. Sobeida Sánchez Nieto por todos sus comentarios que ayudaron en gran medida a mejorar este trabajo.

A la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres José y Ma. Antonieta por el incansable apoyo y la confianza plena, gracias por creer en mí sin importar las circunstancias.

A mis hermanos Iraí y José Antonio, amigos del alma que saben callar cuando disfruto del silencio y arman alboroto cuando necesito el ruido.

A Carlos que ha permanecido a mi lado toda una vida, sin importar el tiempo que eso signifique, por los ratos de ocio y las discusiones valiosas, por la sinceridad, la confianza, la fe y el cariño gracias.

A mis amigos Mariana, Estela, Far, Kady, Rox, Dany, Cris por que la maestría no hubiera sido lo mismo sin ellos.

A mis compañeros del lab. 126 N Mariana, Fabián, Julián, Agustín, Ceci, Israel, Poncho, Alicia por las enseñanzas y el trabajo compartido.

INDICE

| Lista de abreviaturas | 6 |
|---|----------------------|
| Lista de figuras y tablas | 8 |
| RESUMEN | 10 |
| I. INTRODUCCION | 12 |
| <u>1.1 Mecanismos de regulación de la expresión génica en organismos Eucariontes.</u> | 13 |
| 1.1.1 Regulación transcripcional 1.1.2 Regulación post-transcripcional 1.1.3 Regulación post-traduccional 1.2 MicroRNAs (miRNAs) | 13 15 16 17 |
| 1.2.1 Conémico do los miDNAs | 10 |
| 1.2.1 Genomica de los miRNAs 1.2.2 Biogénesis de los miRNAs | 18 |
| 1.2.2.1 Transcripción de los miRNAs | 19 |
| 1.2.2.2 Maduración de los miRNAs | 20 |
| 1.2.2.3 Procesamiento de los pri-miRNAs por el microprocesador (Drosha- DGCR8) | 23 |
| 1.2.2.4 Transporte de los pre-miRNAs al citoplasma | 26 |
| 1.2.2.5 Procesamiento de los pre-miRNAs por Dicer | 26 |
| 1.2.2.6 Función de los miRNAs maduros | 27 |
| 1.2.2.7 ¿Cómo se identifica un miRNA? | 29 |
| II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 32 |
| III. HIPOTESIS | 34 |
| IV. OBJETIVOS | 34 |
| V. MATERIAL Y METODOS | 35 |
| 5.1 Estructura del pri-let7c | 35 |
| 5.2 Cultivos Celulares | 35 |
| 5.3 Preparación de extractos nucleares y citópiasmicos | 35 |

| 5.4 Extracción de RNA 5.5 Extensión de cebador 5.6 Clonación de fragmentos obtenidos en el ensayo de extensión de cebador | 36 36 37 |
|--|----------------|
| 5.7 Northern Blot 5.8 Integridad de las muestras de RNA | 38 41 |
| VI. RESULTADOS | 42 |
| 6.1 Presencia e identificación de estructuras de tallo-asa del pri-let7c en RNA total de células HeLa y HEK 293ft. | 42 |
| 6.2 Búsqueda de estructuras de tallo-asa del pri-let7c en fracciones celulares (extractos nuclear y citoplasmático). | 50 |
| 6.3 Búsqueda de secuencias maduras (22 nt) generadas a partir de las estructuras de tallo-asa del pri-let7c. | 53 |
| 6.4 Comparación de las características intrínsecas de cada una de las estructuras de tallo-asa del pri-let7c. | 55 |
| 6.5 Predicción de secuencias maduras (22 nt) generadas a partir de las estructuras de tallo-asa del pri-let7c y búsqueda de mensajeros blanco para los mismos. | 56 |
| VII. DISCUSIÓN | 62 |
| VIII. CONCLUSIONES | 69 |
| XI. PERSPECTIVAS | 70 |
| X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 71 |

Lista de abreviaturas (Traducción y significado)

| aa | Aminoácido | | |
|-----------|--|--|--|
| ago-2 | Argonauta 2 | | |
| cDNA | Complementary DNA. DNA complementario. | | |
| cpm | Cuentas por millón. | | |
| DEPC | Diethyl pyrocarbonate. Dietil pirocarbonato. | | |
| DGCR8 | DiGeorge syndrome chromosomal region 8. | | |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide. Dimetil sulfóxido | | |
| DNA | Desoxiribonucleic acid. Acido desoxiribonucleico | | |
| DNTPs | Deoxynucleotide triphosphates. Desoxinucleótidos trifosfato. | | |
| dsRBD | <i>Double strand RNA binding domain</i> . Dominio de reconocimiento de RNA de doble hebra. | | |
| DTT | Dithiothreitol. | | |
| DUF | Domain unknown function. Dominio de función desconocida | | |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid. Acido etilendiaminotetraacético. | | |
| Exp 5 | Exportina 5. | | |
| GDP | Guanosin diphosphate. Difosfato de guanosina | | |
| GTP | Guanosin triphosphate. Trifosfato de guanosina. | | |
| HEK | Human Embrionic Kydney. Células embrionarias de riñón humano. | | |
| HeLa | Helen Lane. Células derivadas de cáncer Cervico-uterino. | | |
| Kb | Kilobase | | |
| KDa | Kilodalton | | |
| mA | Miliamperios | | |
| miRNA | Micro RNA | | |
| MREs | <i>MicroRNA recognition element</i> . Motivo de reconocimiento de miRNAs. | | |
| RNAm | Acido ribonucleico mensajero | | |
| Nt | Nucleótido | | |
| PAZ | Piwi, Argonauta, Zwille. | | |
| PBS | Phosphate-buffered saline. Buffer de fosfatos | | |
| PNK | Polynucleotide kinase. Polinucleótido cinasa | | |
| Pre-miRNA | Precursor MicroRNA. MicroRNA precursor | | |
| Pre-RNAm | Precursor de Acido ribonucleico mensajero | | |
| Pri-miRNA | Primary Micro RNA. MicroRNA primario | | |
| RISC | <i>RNA Induced Silencing Complex.</i> Complejo de silenciamiento inducido por RNA. | | |
| RNA | Ribonucleic acid. Acido ribonucleico | | |

| SDS | Sodium Dodecyl sulfate. Dodecil Sulfato de Sodio. |
|------|---|
| Sf9 | Spodophtera frugiperda |
| SSC | Sodium-Sodium citrate. Sodio-Citrato de sodio. |
| TAE | Tris-acetate-EDTA. Tris-base, Acetato, EDTA. |
| TBE | Tris-borato-EDTA. Tris-base, Acido Bórico, EDTA. |
| TRBP | The human inmunodeficiency virus trans-activating response-RNA binding protein. |
| UTR | Unstranslated región. Región no traducida. |
| U6 | snRNA U6. RNA nuclear pequeño U6. |

Lista de Figuras y Tablas

| N | lo. de página |
|---|-------------------------------|
| Figura1. Múltiples niveles de regulación de la expresión génica. Figura 2. Transcripción de miRNAs. Figura 3. Biogénesis de miRNAs y represión de mensajeros blanco. Figura 4. Dominios de la familia de las RNasas III. Figura 5. Procesamiento de un pri-miRNA por Drosha y DGCR8 la componentes del microprocesador | 14 19 21 22 os 25 |
| Figura 6 . Ejemplos de pri-miRNAs predichos Figura 7. Ejemplos de miRNAs clonados en humano Figura 8. Estructura secundaria predicha para el transcrito primar | 30 31 rio 33 |
| Figura 9. Northern blot para detectar al precursor de let-7c. Figura 10. Extensión de cebador para detectar el precursor de let-7 así como los brazos 1 y 5 del transcrito primario (electroforesis en g | 42 ′c, 43 jel |
| Figura 11. Extensión de cebador para detectar el precursor de let-7 así como los brazos 1 y 5 del transcrito primario (electroforesis en g de 20 x 20 cm) | 'c, 44 Jel |
| Figura 12. Representación esquemática del tamaño de los fragmento | os 45 |
| Figura 13. Extensión de cebador para detectar el precursor de let-7 así como los brazos 3 y 4 del transcrito primario (electroforesis en g | 'c, 47 jel |
| Figura 14. Extensión de cebador para detectar el precursor de let-7 así como los brazos 3 y 4 del transcrito primario (electroforesis en g | 'c, 48 jel |
| Figura 15. Representación esquemática de las secuencias clonadas. Figura 16. Extensión de cebador para detectar el precursor de let-7 así como los brazos 1, 3, 4 y 5 del transcrito primario en RNA total o células Hel a (electroforesis en gel de 7.5 x 12.5 cm) | 49 ′c, 49 de |
| Figura 17. Extensión de cebador para detectar el precursor de let-7 así como los brazos 1, 3, 4 y 5 del transcrito primario en RNA total o células HEK (electroforesis en gel de 7.5 x 12.5 cm) | 'c, 50 de |
| Figura 18. Northern blot para validar el correcto fraccionamiento o | de 51 |
| Figura 19. Integridad del RNA utilizado. Figura 20. Extensión de cebador para detectar el pre-let7c, así con los brazos 1 y 5 en RNA total de células HeLa y HEK (electroforesis e gel de 7.5 x 12.5 cm). | 51 no 52 en |
| Figura 21. Extensión de cebador para detectar el brazo 3 del transcri primario en RNA total y extractos nucleares y citoplasmáticos o células HeLa y HEK. | to 53 de |

Figura 22. Northern blot para detectar productos de 22 nt en 20 µg de 54 RNA total de HeLa y HEK.

Figura 23. Representación esquemática de los parámetros utilizados 59 para predecir la secuencia de productos maduros generados a partir de cada uno de los brazos.

Figura 24. Representación del número de mensajeros blanco 61 predichos para distintos miRNAs.

Figura 25. Representación del modelo propuesto para el 67 procesamiento del transcrito primario que origina a let-7c.

Tabla 1. Función y genes blanco de algunos miRNAs caracterizados29en diferentes especies.

Tabla 2. Características del precursor de let-7c y de los distintos56brazos que forman el transcrito primario.

RESUMEN

Actualmente se sabe que los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNAs endógenos no codificantes de aproximadamente 17-25 nt de longitud derivados de transcritos precursores con forma de tallo-asa (Nelson *et al.*, 2003; Bartel 2004).

Los miRNAs se encuentran conservados en varios grupos eucariontes incluyendo los insectos, los nemátodos, las plantas y los mamíferos y contribuye a la regulación de una amplia variedad de funciones celulares (Hannon, 2004). Para llegar a un producto maduro de aproximadamente 22 nt a partir de un transcrito primario que potencialmente es mayor a 1 kb es necesario que el RNA sufra una serie de pasos de maduración. Dichos pasos se realizan en compartimentos celulares distintos. La maduración requiere de un procesamiento nuclear inicial, y un segundo procesamiento a nivel citoplásmico. Ambos pasos son catalizados por enzimas que pertenecen a la familia de las RNasas tipo III.

El procesamiento de los miRNAs invita a plantear preguntas interesantes, entre las cuales está la de ¿cómo puede la maquinaria celular distinguir las moléculas que generarán un miRNA para iniciar su procesamiento?

Los miRNAs primarios descritos hasta la fecha, no poseen secuencias comunes que le permitan a la maquinaria de procesamiento distinguirlos de otros transcritos. Además, las secuencias de los miRNAs maduros así como las de sus precursores son muy diversas, en humanos hay miRNAs de 17 hasta 25 nt, y cada uno tiene una secuencia y un tamaño único.

En este trabajo probamos que estructuras en forma de tallo y asa que se generan por el plegamiento del transcrito primario que origina a let7c pueden ser procesadas en el núcleo generando fragmentos de RNAs de tamaño similar al de los precursores canónicos. Dichas estructuras no difieren significativamente en sus características intrínsecas comparados con precursores de miRNAs y difieren aún menos si son comparadas con el pre-let7c. Sin embargo la ΔG° de las estructuras de tallo-asa estudiadas parece jugar un papel importante en el procesamiento de las mismas.

Además las secuencias predichas para generar un producto maduro a partir de las estructuras de tallo y asa estudiadas cumplen con los criterios establecidos para la anotación de un miRNA.

A pesar de que no pudimos demostrar que los fragmentos observados fueran exportados al citoplasma para seguir la vía de maduración, tenemos evidencia que sugiere que se comportan como el precursor de let7c canónico, es decir, que una vez procesadas en el núcleo son reconocidas por la exportina 5 y por lo tanto exportadas al citoplasma. Tampoco encontramos la presencia de los productos maduros predichos a partir de nuestras secuencias lo cual puede deberse a la falta de un RNAm blanco que los retenga en el ambiente celular.

En resumen, creemos que la maquinaria de procesamiento de miRNAs es capaz de reconocer y procesar estructuras de tallo y asa no identificadas aun como generadoras de miRNAs posiblemente por que no han podido ser detectadas debido a la ausencia de un blanco celular.

I. INTRODUCCION

La vida depende de la capacidad de las células para almacenar, recuperar y traducir las instrucciones genéticas requeridas para hacer y mantener un organismo. Esta información es transmitida de una célula a sus células hijas a través de la división celular, y de una generación de organismos a la siguiente a través de sus células germinales (Alberts *et al.*, 2002). La unidad de información fundamental de los organismos vivos es el gen. Desde el punto de vista bioquímico, un gen puede definirse como un segmento de DNA (o, en unos pocos casos, de RNA) que contiene la información requerida para sintetizar un producto biológico funcional, es decir, una proteína (Nelson y Cox, 2005).

El material genético de cualquier organismo (procarionte o eucarionte) está sometido a una serie de procesos cíclicos que aseguran la realización de sus dos funciones esenciales: (1) la transmisión de la información genética con fidelidad entre generaciones y (2) la expresión correcta en tiempo y espacio de dicha información. Por consiguiente, el ciclo del material genético comprende tres procesos: El primero es la replicación, o copia del DNA parental para formar moléculas de DNA hijas con idéntica secuencia de nucleótidos. El segundo es la transcripción, proceso mediante el cual parte del mensaje genético codificado por el DNA es copiado de forma precisa en RNA. El tercero es la traducción, en la cual el mensaje genético codificado en el RNA mensajero es traducido en los ribosomas para generar un polipéptido con una secuencia específica de aminoácidos (Alberts *et al.*, 2005).

La transmisión de la información genética entre generaciones y la traducción en forma de proteínas de dicha información no son suficientes para permitir que el desarrollo de un organismo se lleve a cabo correctamente. Es necesario, además, asegurar que los genes que constituyen la información transmitida se expresen en momentos adecuados ya sea desde el punto de vista cronológico o espacial

(procesos de desarrollo) o como respuesta a cambios en las condiciones ambientales en las que se encuentra la célula o el individuo (Lewin, 2004). De los 35,000 genes estimados en el genoma humano, solamente se expresa una fracción de ellos en una célula y en un momento dado. Algunos productos génicos están presentes en grandes cantidades, como los factores de elongación requeridos para la síntesis de proteínas; otros en cambio se encuentran en cantidades mucho menores como las enzimas que reparan lesiones poco frecuentes del DNA (Nelson y Cox, 2005). Como resultado la regulación de la expresión génica es esencial para dirigir el funcionamiento adecuado de una célula.

1.1 Mecanismos de regulación de la expresión génica en organismos Eucariontes.

La concentración celular de una proteína está determinada por un delicado equilibrio entre al menos siete procesos, cada uno de los cuales tiene varios puntos potenciales de regulación: 1) Remodelaje de la cromatina 2) síntesis del transcrito primario de RNA (transcripción) 3) Modificación post-transcripcional del RNAm, 4) Localización subcelular y degradación del RNAm, 5) Síntesis proteica (traducción), 6) Modificaciones post-traduccionales de las proteínas, 7) destino y transporte de las proteínas y 8) degradación de las proteínas (Nelson y Cox, 2005). Dichos procesos se resumen en la Figura 1.

1.1.1 Regulación transcripcional

Como en todos los procesos bioquímicos, un lugar eficaz e imprescindible para la regulación es el inicio de la ruta. El control del inicio de la transcripción permite la regulación sincronizada de múltiples genes que codifican productos con actividades interdependientes (Nelson y Cox, 2005). Por medio de esta regulación se puede elegir qué genes "encender" (activar) o "apagar" (silenciar) en un momento determinado, así como también regular la abundancia de RNAm producido. Esto se logra a través distintos mecanismos, en el presente trabajo solo mencionaremos dos de ellos. El primero implica mantener apagados ciertos

genes: en determinados tipos celulares, hay regiones de DNA que están siempre apagadas y cuyos genes no se transcriben nunca (Brown, 1999). Este nivel involucra la estructura de la cromatina, donde la regulación de la expresión de un gen no solo depende de la información codificada en la secuencia del ADN, sino también de su organización en cromatina y la regulación epigenética asociada a ésta. Considerando a la regulación epigenética como los patrones heredables de la expresión de un gen, que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia del DNA (Felsenfeld y Groudine, 2003).

El segundo involucra el uso de regiones reguladoras en *cis*, localizadas en la secuencia anterior al sitio de inicio de la transcripción. Dichas regiones permiten la unión de factores de transcripción que pueden facilitar o impedir la unión de la RNA polimerasa al promotor, regulando con ello la cantidad de mensajeros producidos (Nelson y Cox, 2005).



Figura 1. Distintos niveles de regulación de la expresión génica (Modificado de Nelson y Cox, 2005)

1.1.2 Regulación post-transcripcional.

Una vez que las secuencias de DNA han sido transcritas es necesario otro nivel de regulación en el que se incluyen varios aspectos que se describen a continuación

- Mecanismos de corte y empalme. Mediante el "splicing", los intrones (secuencias no codificantes) son eliminados del pre-RNAm y los exones (secuencias codificantes) son unidos generando un RNAm maduro. En algunos casos, pueden quedar algunos intrones entre las secuencias de exones. En un proceso denominado "splicing" alternativo dichos intrones son utilizados como molde en la traducción para originar proteínas diferentes (Lewin, 2004).
- Edición del RNA. En algunos casos, la secuencia del RNAm es modificada luego de ser transcrita. Los cambios incluyen de manera general la modificación de nucleótidos y en algunos casos muy particulares inserción de nucleótidos en regiones específicas, lo que motiva un corrimiento en el marco de lectura y genera la expresión de proteínas distintas (Lewin, 2004).
- Transporte y localización subcelular del RNAm. Para poder ser transportado al citoplasma, el RNAm debe haber sido procesado correctamente; de lo contrario es degradado en el núcleo (Lewin, 2004). La localización específica de los mensajeros también regula la traducción de los mismos, dependiendo de las condiciones celulares el RNAm puede almacenarse en partículas ribonucleoproteicas como cuerpos P, gránulos de estrés, etc. en los cuales se almacenará o degradará.
- Estabilidad del RNAm. La vida media de un RNAm está determinada principalmente por la longitud de la cola poliA. Una vez en el citoplasma, la secuencia comienza a acortarse; cuando se hace demasiado corta el mensajero es degradado (Lewin, 2004). El proceso inverso, es decir el alargamiento de la cola poliA también puede ocurrir para influir la interacción con proteínas (Lewin, 2004).
- A Iniciación de la síntesis proteica. El RNAm contiene en sus extremos secuencias que no se traducen pero que sirven para regular la traducción (5'
)

UTR y 3' UTR, del inglés *untranslated regions*). Por otro lado, las secuencias que enmarcan el codón inicial (AUG) son determinantes. Si el ribosoma se "salta" el AUG inicial, comenzará la traducción en el segundo codón produciendo una proteína con menos aminoácidos y/o secuencia diferente (Lewin, 2004).

- R Eliminación de RNAm con errores. Los ribosomas –junto con otras proteínasson capaces de identificar codones de terminación en lugares erróneos de la secuencia del mensajero (generados por algún error previo en el "splicing" o por mutaciones) (Lewin, 2004).
- RNAs pequeños. Los RNAs pequeños constituyen una familia de RNAs regulatorios no codificantes de entre 17 y 25 nt de longitud, los cuales derivan de RNA de doble hebra. Dichos RNAs pueden inducir el silenciamiento de genes a través del apareamiento de bases con mensajeros blanco. Existen dos clases bien definidas de RNAs pequeños involucrados en la regulación de genes: los microRNAs (miRNAs) y los RNAs interferentes pequeños (siRNAs) (Bartel *et al.*, 2004). Los miRNAs se describirán con detalle más adelante por ser el principal objeto de estudio de este trabajo.

1.1.3 Regulación post-traduccional.

Una vez sintetizadas, las proteínas pueden ser modificadas mediante la unión de distintas moléculas (grupos fosfato, adenilatos, azúcares, etcétera). Estas modificaciones permiten regular la acción proteica de manera rápida porque no dependen del proceso de síntesis. Existen además ciertas proteínas que contienen segmentos los cuales, bajo ciertas condiciones, se activan y se separan de la molécula, cambiando su actividad (Alberts *et al.*, 2002).

Otro mecanismo de regulación es la degradación de proteínas. La vida media de la proteína puede ser un parámetro a regular que también actúa de manera rápida. El sistema ubiquitin-proteosoma lleva a cabo la degradación (Alberts *et al.*, 2002).

1.2 Micro RNAs (miRNAs)

En 1993 Victor Ambros y sus colaboradores, descubrieron que *lin-4*, un gen que se sabía regula el desarrollo de la larva en *C. elegans* regulando a la baja la concentración de las proteínas LIN-14 y LIN-28, no codificaba para ninguna proteína y en vez de eso producía un par de RNAs pequeños. Uno de aproximadamente 22 nt y otro de 61 nt que se predijo formaba una estructura en forma de tallo-asa y se propuso como el precursor del más corto (Lee *et al.*, 1993). Estos RNAs generados por *lin-4* tenían complementariedad con múltiples sitios en el 3'UTR del gen *lin-14* (Lee *et al.*, 1993; Witman *et al.*, 1993). El RNA más corto producto de *lin-4* es reconocido como el fundador de una clase creciente de pequeños RNAs regulatorios llamados microRNAs o miRNAs (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Lee y Ambros 2001).

Let-7 el segundo miRNA identificado fue descubierto también en el nematodo *C. elegans* y posteriormente se identificó como el primer miRNA humano. *Let-7* y los miembros de su familia se encuentran altamente conservados en secuencia y función en todas las especies de metazoarios. Su desregulación genera estados celulares indiferenciados y el progreso de enfermedades como el cáncer (Roush y Slack, 2008).

Actualmente se sabe que los miRNAs son pequeños RNAs endógenos no codificantes de aproximadamente 17-25 nt de longitud derivados de transcritos precursores con forma de tallo-asa (Nelson *et al.*, 2003; Bartel 2004). Con ayuda de otros factores celulares, los miRNAs pueden regular la expresión de ciertos genes blanco ya sea por degradación del RNA mensajero o por represión traduccional (Nelson *et al.*, 2003; Bartel 2004).

El sistema de los miRNAs se encuentra conservado en varios grupos eucariontes incluyendo los insectos, los nemátodos, las plantas y los mamíferos y contribuye a la regulación de una amplia variedad de funciones celulares (Hannon, 2004). Basados en la homología de sus secuencias, los miRNAs pueden ser agrupados en sub-familias, y muchos de ellos se encuentran evolutivamente conservados.

Por ejemplo, aproximadamente un tercio de los miRNAs de *C. elegans* tienen homólogos en los vertebrados (Lim *et al.*, 2003). Muchos miRNAs, como *lin-4* tienen patrones de expresión tejido o etapa del desarrollo-específicos (Feinbaum y Ambros, 1999; Reinhart *et al.*, 2000; Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Lee y Ambros 2001).

La abundancia de un miRNA en particular puede variar dependiendo del tipo celular. El número de copias de un miRNA altamente expresado puede exceder 10⁴ por célula, un número similar al que alcanzan muchos RNAs nucleares pequeños y mucho mayor que el de un RNAm codificante (Lim *et al.*, 2003).

Por la extensión del tema de aquí en adelante solo haremos referencia a la información que se tiene sobre miRNAs animales; sin embargo existe mucha información acerca de miRNAs en plantas si se desea tener un panorama general se sugieren algunas revisiones Axtell y Bowman, 2008; Mallory y Bouché, 2008; Shukla *et al.*, 2008.

1.2.1 Genómica de los miRNAs

Gran parte de los genes para miRNAs están localizados en orientación antisentido con respecto a genes conocidos como codificadores de proteínas (Lagos-Quintana *et al*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Lee y Ambros, 2001; Mourelatos *et al.*, 2002), indicando con ello que forman sus propias unidades de transcripción (Lee *et al.*, 2002).

Otros genes para miRNAs se han encontrado en regiones intrónicas de pre-RNAms. Ubicándose preferentemente en la misma orientación que los RNAms predichos, sugiriendo que la mayoría de estos miRNAs no son transcritos por sus propios promotores sino mas bien son procesados de los intrones tal como sucede con los snoRNAs (Aravin *et al.*, 2003; Lagos-Quintana *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2003).



Figura 2. Transcripción de los miRNAs. La transcripción de los miRNAs por la RNA polimerasa II genera la producción de precursores mono, di o policistrónicos, los cuales son conocidos como transcritos primarios de miRNAs. Los Pri-miRNAs poseen un cap en el extemo 5' de 7-metil guanosina y una cola de poliA en el extemo 3' (Modificado de Sarnow *et al.*, 2006).

Algunos genes se encuentran agrupados en *loci* en el genoma cuyo arreglo y patrón de expresión indica que pueden transcribirse como transcritos primarios policistrónicos (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001). Los miRNAs dentro de un *loci* genómico no siempre se encuentran relacionados y los miRNAs relacionados no necesariamente se hallan formando *loci* (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; La

Finalmente unos pocos genes de miRNAs humanos se encuentran en la región 3'UTR de RNAms codificantes; por ejemplo miR-198 ubicado en el 3'UTR del RNAm de una proteína relacionada con la folistatina (Rodríguez *et al.*, 2004).

1.2.2 Biogénesis de los miRNAs

1.2.2.1 Transcripción de los miRNAs

La transcripción es un punto de regulación muy importante en la expresión de los miRNAs. Los miRNAs son transcritos inicialmente como parte de un transcrito primario largo (1-2 kb) (pri-miRNA) (Lee *et al.*, 2002; Cullen, 2004; Kim 2005). Algunos transcritos primarios han sido analizados en mamíferos, nemátodos e insectos (Tam, 2001; Bracht *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Sokol y Ambros 2005). La versión completa de los transcritos primarios parece ser de manera general mayor a 1kb y contiene un cap 5'7-metil guanosina y una cola de poliA en el extremo 3'. Estas son características de los transcritos procesados por la Polimerasa II como los RNAms; además existen algunos estudios que han

caracterizado al menos parcialmente los promotores que dirigen la transcripción de los miRNAs encontrando que son transcritos por la Pol II (Johnson *et al.*, 2003; Johnston y Hobert 2003; Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Fazi *et al.*, 2005; Sokol y Ambros, 2005; Zhao *et al.*, 2005; Conaco *et al.*, 2006). La información disponible, indica que la mayoría de los genes de miRNAs son transcritos por la Pol II, sin embargo la Polimerasa III también puede estar involucrada, por ejemplo, en la transcripción de varios miRNAs codificados por el gammaherpesvirus murino 68 (Pfeffer *et al.*, 2005) o por adenovirus (Anderson *et al.*, 2005) además de algunos miRNAs asociados a secuencias repetidas tipo *Alu* (Borchert *et al.*, 2006).

1.2.2.2 Maduración de los miRNAs

Para llegar a un producto maduro de aproximadamente 22 nt a partir de un transcrito primario que es potencialmente mayor a 1 kb es necesario que el RNA sufra una serie de pasos de maduración. Dichos pasos se realizan en compartimentos celulares distintos. La maduración requiere de un procesamiento nuclear inicial, y un segundo procesamiento a nivel citoplásmico. Ambos pasos son catalizados por enzimas que pertenecen a la familia de las RNasas tipo III (Figura 3).

Las RNasas tipo III forman un conjunto de endoribonucleasas que cortan RNA de doble hebra. Todos los miembros de la familia contienen un sitio característico de unión al RNA, comúnmente llamado "dominio de RNasa III" (RIIID). El corte por una RNasa III genera una estructura terminal característica en el RNA de doble hebra, dicha estructura consiste en un grupo fosfato en el extremo 5' y un extremo de dos bases de una sola hebra en el extremo 3' (Robertson *et al.*, 1968).

Las RNasas III varían en su composición de aminoácidos y dominios peptídicos. Van desde 200 hasta 2000 aminoácidos, y se subdividen en tres clases de acuerdo con los dominios que presentan (Blaszczyk *et al.*, 2001; Lamontagne *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Gan *et al.*, 2006) (Figura 4).



Inhibición Traduccional

Figura 3. Biogénesis de miRNAs y represión traduccional de mensajeros blanco. Una vez transcritos los primiRNAs son procesados en el núcleo por el microprocesador generando una estructura de tallo-asa de aproximadamente 80 nt. denominado pre-miRNA. El corte característico del microprocesador es reconocido por la exportina 5 la cual exporta el pre-miRNA del núcleo al citoplasma. Una vez en el citoplasma el premiRNA es reconocido y procesado por la enzima Dicer cuyo corte genera un dúplex de RNAs de aproximadamente 22 nt. Una de las hebras del dúplex (la que dará origen al miRNA maduro) es seleccionada en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) y posteriormente lleva a cabo su función inhibiendo la traducción mediante el apareamiento imperfecto con el 3'UTR de un RNAm blanco (Modificado de Filipowicz *et al.*, 2005).



Figura 4. Dominios de la familia de las RNasas III. Representación esquemática de los dominios presentes en las enzimas que componen la familia de las RNasas III. La barra superior indica la escala en unidades de residuos de aminoácidos (Modificado de Lamontagne *et al.*, 2001).

Clase I. Es la clase mejor caracterizada y extensamente estudiada, e incluye a las de menor número de aminoácidos y dominios peptídicos. Sus miembros han sido encontrados en bacterias, bacteriófagos y algunos hongos (Westphal y Crouch 1975; Apirion y Miczak, 1993). Estas enzimas contienen un dominio único de ribonucleasa (RIIID) y un dominio de unión al RNA de doble hebra (dsRBD).

Clase II. El miembro fundador de esta clase es la proteína denominada Drosha la cual se encuentra conservada solo en mamíferos (Filippov *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000; Fortín *et al.*, 2002). Drosha es una proteína nuclear de 130 a 160 kDa que fue originalmente descrita como un gen localizado junto al gen de la RNasa H en el genoma de *Drosophila* (Filippov *et al.*, 2000). Esta enzima cataliza el primer paso de maduración de los miRNAs. En el núcleo Drosha genera un producto en forma de tallo-asa de aproximadamente 70 nt a partir de un transcrito primario. Actualmente no existe ninguna estructura publicada de esta enzima; sin embargo evidencia bioquímica indica que Drosha funciona como un monómero, con sus dominios de ribonucleasa formando un dímero interno (Han *et al.*, 2004). Drosha está formada por 1374 aa, contiene dos dominios de RNasa (RIIIDa y RIIIDb), un dominio de unión a RNA de doble hebra y una región rica en prolina cuya función aun no ha sido bien establecida (Filippov *et al.*, 2000; Fortin *et al.*, 2002).

Clase III. Estas proteínas son las más grandes de la familia y contienen dos dominios de RNasa (a y b), un dominio de unión a RNA de doble hebra y un

dominio N-terminal de helicasa, seguido por un pequeño dominio de función desconocida (DUF 283) y un dominio PAZ. Las proteínas de la clase III también son conocidas como la familia de Dicer (Bernstein *et al.*, 2001). Dicer procesa RNAs de doble hebra en pequeños fragmentos de RNA de aproximadamente 22 nt.

1.2.2.3 Procesamiento de los pri-miRNAs por el Microprocesador (Drosha-DGCR8)

Los transcritos primarios contienen estructuras en forma de tallo-asa a partir de las cuales se generarán los miRNAs. Estas estructuras son procesadas en el núcleo por la enzima Drosha generando un producto de aproximadamente 70 nt, denominado miRNA precursor (pre-miRNA). Mutaciones que alteran la estructura del tallo de estos "hairpins" afectan la eficiencia del procesamiento (Lee et al., 2003; Zeng y Cullen, 2003). Al parecer todos los elementos requeridos para el procesamiento por Drosha se encuentran en las proximidades de la estructura de tallo-asa, ya que la enzima es capaz de procesar eficientemente un pri-miRNA mínimo que solo contiene 20 nt a cada lado del sitio de corte (Han et al., 2004). Sin embargo no está claro como Drosha reconoce su blanco y realiza el corte en un sitio específico dado que no existe un elemento de secuencia común en los primiRNAs. Drosha y/o su cofactor (DGCR8 en mamíferos) tienen que reconocer características estructurales comunes entre los diversos pri-miRNAs. Tampoco está claro cual de los dominios de Drosha está involucrado en el reconocimiento del sustrato. Parte de la interacción entre el sustrato y la enzima podría ocurrir cerca de los sitios catalíticos. Dicha interacción parece estar fortificada en el dominio dsRBD ya que la eliminación de este dominio inhibe la actividad enzimática (Han et al., 2004).

Como mencionamos anteriormente, Drosha contiene sólo un dominio dsRBD el cual podría no ser suficiente para generar una interacción fuerte con su sustrato, por lo que un módulo adicional de unión al RNA de doble hebra puede requerirse. DGCR8 una proteína de 120 kDa que posee dos dominios de unión a RNA de doble hebra en su extremo C-terminal y un sitio de unión a grupo hemo en su

región central provee dicho módulo adicional y junto a Drosha forma un complejo capaz de procesar eficientemente los pri-miRNAs, que se ha denominado "microprocesador" (Gregory *et al.*, 2004; Denli *et al.*, 2004).

El modelo para el corte de los pri-miRNAs por el microprocesador consiste en que los dos dominios de RNasa de Drosha forman un dímero intramolecular generando un centro de procesamiento que contiene dos sitios catalíticos. Debido a la estructura helicoidal del RNA de doble hebra, el dominio RNasa IIIa hace un corte en la hebra 3', mientras el RNasa IIIb lo hace en la hebra 5', resultando en el corte característico de las RNasas III. El dominio dsRBD sostiene el tallo y la región media de Drosha interactúa con DGCR8. Los dominios RNasa IIIa y b podrían contribuir también a la unión de DGCR8. DGCR8 puede interactuar con el tallo estabilizando la unión al sustrato (Han *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2006).

El grupo de Han en el 2006 reportó algunas características estructurales presentes en el pri-miRNA que incrementan la posibilidad de que el complejo enzimático Drosha-DGCR8 libere la secuencia precursora correcta posicionándose de manera adecuada sobre el transcrito primario. El modelo generado de dicho trabajo se muestra en la Figura 5.



Figura 5. Procesamiento de un pri-miRNA por Drosha y DGCR8 los componentes del microprocesador. DGCR8 se une de manera más favorable a la unión entre el tallo de doble hebra y los segmentos 3' y 5' de hebra sencilla del pri-miRNA que al extremo donde se ubica el asa del precursor. El posicionamiento correcto de DGCR8 permite generar un producto que corresponda al pre-miRNA completo reduciendo el número de cortes abortivos (modificado de Zamore y Zeitz, *Cell* 2007).

Existe evidencia que sugiere que Drosha y DGCR8 son los componentes esenciales del microprocesador. Sin embargo el complejo activo es de 650 kDa dentro del cual podrían estar presentes diferentes subunidades como es el caso de las helicasas DEAD box p68 y p72 cuya participación en el procesamiento de los miRNAs no ha quedado bien establecida (Fukuda *et al.*, 2007). Otra posibilidad es que múltiples copias de Drosha y DGCR8 puedan estar incluidas en el microprocesador. El complejo podría estar compuesto de dos moléculas de Drosha (160 kDa) y dos o más copias de DGCR8 (120 kDa) (Han *et al.*, 2004).

Recientemente los grupos de Bartel y Lai encontraron que pequeños intrones en forma de tallo-asa en *Drosophila* y *C.elegans* pueden ser fuentes alternativas de miRNAs (Okamura *et al.*, 2007; Ruby *et al.*, 2007). Debido a sus características compartidas con intrones y miRNAs estas estructuras se han denominado "mirtrons".

Ambos grupos demostraron que los "mirtrons" son procesados inicialmente por la maquinaria de "splicing", es decir, entran a la vía de maduración de los miRNAs sin ser procesados por el microprocesador y generan pequeños RNAs reguladores (Okamura *et al.*, 2007; Ruby *et al.*, 2007).

Aunque inicialmente se predijo que los "mirtrons" debían ser más comunes en las especies que poseen una proporción alta de intrones pequeños (insectos y nemátodos) actualmente se han identificado también en mamíferos (Beresikov *et al.*, 2007).

1.2.2.4 Transporte de los pre-miRNAs al citoplasma

Una vez que los pre-miRNAs han sido generados, son exportados del núcleo al citoplasma por la Exportina 5 (Exp5) y su cofactor Ran-GTP. (Yi *et al.*, 2003; Bohnsack *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004)

La Exp5 es un miembro de la familia de las carioporinas las cuales regulan el tráfico macromolecular del núcleo al citoplasma. La Exp5 está especializada en unir RNAs con un "overhang" en el extremo 3' (Gwizdek *et al.*, 2003) como los tRNAs y los pre-miRNAs. El complejo Exp5/Ran-GTP tiene una gran afinidad por los pre-miRNAs, tal como lo muestra la interacción proteína-RNA que puede ser demostrada *in vitro* (Bonhsack *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004). Además del transporte se cree que el complejo tiene la función de proteger a los pre-miRNAs desde el momento en que son generados hasta que se encuentran listos para el siguiente paso de corte en el citoplasma. Una vez ahí, el GTP es hidrolizado a GDP, y el complejo formado Exp5/Ran-GDP libera al precursor (Yi *et al.*, 2003; Lund *et al.*, 2004).

1.2.2.5 Procesamiento de los pre-miRNAs por Dicer

Dicer es otra enzima de la familia de las RNasas III que procesa a los pre-miRNAs una vez que estos han llegado al citoplasma (Billy *et al.*, 2001; Grishok *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002). Dicer posee un dominio PAZ de aproximadamente 130 aa el cual se une preferentemente a los extremos 3' no apareados de un RNA de

doble hebra (Lingel et. al., 2003; Song *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003). Debido a que los pre-miRNAs generados por Drosha contienen un extremo 3' no apareado, Dicer los reconoce y corta una región de doble hebra de aproximadamente 22 nt, mediante un centro catalítico formado intramolecularmente por sus dominios RIIID (Zhang *et al.*, 2004).

Tal como sucede en el caso de Drosha, Dicer también tiene un cofactor que incrementa su actividad. En el caso de humanos esta proteina es denominada TRBP y parece actuar incrementando la afinidad de Dicer por sus sustratos (Chendrimada *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006).

Recientemente, se ha identificado un paso adicional en el procesamiento de los pre-miRNAs dependiente de una enzima que forma parte del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) cuyo nombre es Ago2. La estructura generada por el "slicer" del RISC se denominó precursor de miRNA cortado por Ago2 o ac-pre-miRNA. Este intermediario de la ruta endógena de procesamiento es generado por el corte del pre-miRNA a 12 nt de su extremo 3'. La marca que genera el corte de Ago2 podría tener dos funciones: primero el corte en el extremo 3' puede contribuir a la selección de las hebras del dúplex que se carga en RISC ya que solo el brazo 5' del ac-pre-miRNA puede generar un miRNA maduro. Segundo, el corte en el brazo 3' puede facilitar la remoción de la hebra pasajera del dúplex (Diederichs y Haber, 2007).

1.2.2.6 Función de los miRNAs maduros

El producto generado por Dicer es un dúplex de miRNA intermediario ya que usualmente solo una de las dos hebras contiene al miRNA maduro que es funcional. Se sugiere que la complementariedad menos estable en su extremo 5' es la seleccionada para dar lugar al miRNA maduro mientras que su hebra complementaria se degrada (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003).

El miRNA maduro ejerce su efecto a través de su asociación con un complejo formado por varias proteínas denominado complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Cuando un miRNA se asocia a RISC se aparea con un RNAm blanco inhibiendo su traducción (Hammond *et al.*, 2000; Hammond *et al.*, 2001). El componente principal de cada RISC es un miembro de la familia de proteínas Argonautas el cual mediante estudios estructurales y bioquímicos se ha demostrado que actúa como la endonucleasa del RISC (Liu *et al.*, 2004; Rand *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2005). Existen otras proteínas asociadas a RISC entre las que se encuentran varias helicasas putativas; sin embargo la función molecular de estas proteínas en el silenciamiento no se conoce (Caudy *et al.*, 2002; Mourelatos *et al.*, 2002; Caudy *et al.*, 2003).

En los miRNAs animales la complementariedad con sus blancos está usualmente restringida a la región 5' (nucleótidos 2-8) del miRNA y la región 3' del blanco (Lewis *et al.*, 2003; Lai, 2004; Brennecke *et al.*, 2005). La región 5' del miRNA ha sido denominada "región semilla" para describir su relevante contribución para la unión. Debido a que la región semilla es muy corta los miRNAs pueden regular un número considerable de transcritos (Lewis *et al.*, 2003; Lai, 2004; Brennecke *et al.*, 2003; Lai, 2004; Brennecke *et al.*, 2005). En ausencia de complementariedad perfecta entre el miRNA y su blanco, la asociación en RISC bloquea la traducción del RNAm en vez de promover su corte (Lewis *et al.*, 2003; Lai, 2004).

En la actualidad el mecanismo por el cual los blancos imperfectamente apareados son reprimidos por miRNAs sigue siendo controversial. Existe evidencia experimental que apoya distintos modelos publicados. Estos incluyen el secuestro de ribosomas (por relocalización en cuerpos de procesamiento), bloqueo del inicio de la traducción, represión traduccional después del inicio de la misma, degradación cotraduccional y deadenilación del blanco acoplado a degradación del transcrito (Liu J, 2008).

Evidencias cada vez mayores indican la participación de los miRNAs en diversas funciones celulares como el control del desarrollo, la diferenciación y la proliferación celular, la apoptosis, la organogénesis, el desarrollo de tumores, el progreso de enfermedades como el cáncer, etc. Tabla 1 (Bartel, 2004).

| MicroRNA | Función | Genes blanco | Especie | Referencias |
|----------|--------------------------------------|---------------------------|-----------------|---|
| lin-4 | Desarrollo | lin-14 | C. elegans | Lee R. et. al., <i>Cell</i> , 1993 |
| let-7 | Desarrollo | lin-41 | C. elegans | Reinhart B., <i>et. al</i> ., <i>Nature,</i> 2000 |
| bantam | Apoptosis y proliferación celular | hid | D. melanogaster | Brennecke J., et. al., <i>Cell</i> , 2003 |
| mir-196 | ¿Desarrollo? | HoxB8, HoxC8, HoxD8 | M. musculus | Yekta S. et. al., <i>Science</i> , 2004 |
| mir-143 | Diferenciación de adipocitos | ć? | H. sapiens | Esau C. et. al., <i>J.</i> <i>Biol. Chem</i> ., 2004 |

 Tabla 1. Función y genes blanco de algunos miRNAs caracterizados en diferentes especies.

1.2.2.7 ¿Cómo se identifica un miRNA?

Se han utilizado dos formas para identificar genes de miRNAs a gran escala: la clonación bioquímica y las predicciones computacionales. Un problema del primer acercamiento es que al tratar de clonar a los miRNAs muchos fragmentos de (como rRNAs, tRNAs y snRNAs) también son otros RNAs no codificantes clonados de las muestras de RNA del tamaño seleccionado (22 nt). En el segundo caso se han diseñado una serie de algoritmos en base a los cuales se predicen posibles miRNAs, sin embargo la mayoría de estos no se han corroborado experimentalmente. Para tratar de unificar criterios se han determinado dos tipos de parámetros para identificar a un miRNA y diferenciarlo de otros RNAs pequeños no codificantes (Ambros et al., 2003). Estos parámetros incluyen: 1) Criterios de expresión donde se toma en cuenta la identificación de un transcrito de RNA de aproximadamente 22 nt en la fracción de RNAs pequeños (generalmente por Northern Blot) y 2) Criterios que hacen referencia a la biogénesis de estos transcritos pequeños de RNA, entre ellos se encuentra la conservación evolutiva, le existencia de un precursor en forma de tallo-asa y la

acumulación de este precursor en organismos que tienen reducida la actividad de Dicer.

A pesar de que existen algunos trabajos (Zhang *et al.*, 2004; Bonnet *et al.*, 2004) cuyo objetivo ha sido diferenciar a los miRNAs de otros RNAs, no aportan información suficiente para descartar que otros RNAs puedan ser procesados por la maquinaria de maduración de los miRNAs.

El procesamiento de los miRNAs propone preguntas interesantes, entre las cuales una de ellas es ¿cómo puede la maquinaria celular distinguir los transcritos que generarán un miRNA para iniciar su procesamiento?

Los miRNAs primarios descritos hasta la fecha, no poseen secuencias comunes que le permitan a la maquinaria de procesamiento distinguirlos de otros transcritos. Además, las secuencias de los miRNAs maduros así como las de sus precursores son muy diversas, en humanos hay miRNAs de 17 hasta 25 nt, y cada microRNA tiene una secuencia y un tamaño único por lo que deben existir otros determinantes que los distingan (Figura 6 y 7) (Lee *et al.*, 2002).



Figura 6. Ejemplos pri-miRNAs predichos. La región marcada en verde corresponde a la estructura de talloasa conocida como pre-miRNA de la cual se originará el miRNA maduro. La estructura secundaria corresponde a la más estable predicha por el programa MFOLD (Zucker *et al.*, 1999).

| miRNA | Secuencias (5' a 3') |
|-------------------------|-------------------------|
| let-7a | UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU |
| let-7b | UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU |
| let-7c | UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU |
| let-7d | AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU |
| let-7e | UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGU |
| let-7f | UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU |
| let-7g | UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUA |
| let-/h | UGAGGUAGUAGUGUGUACAGUU |
| let-/i | UGAGGUAGUAGUUUGUGCU |
| miR-1b | UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAA |
| miR-1c | UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAC |
| miR-1d | UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAUU |
| miR-9 | UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA |
| miR-15a | UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG |
| miR-15b | UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA |
| miR-16 | UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG |
| miR-18 | UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUA |
| miR-19b | UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA |
| miR-20 | UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG |
| miR-21 | UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA |
| miR-22 | AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU |
| miR-23a | AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC |
| miR-23b | AUCACAUUGCCAGGGAUUACCAC |
| miR-24 | UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG |
| miR-26a | UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU |
| miR-26b | UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGUU |
| miR-27a | UUCACAGUGGCUAAGUUCCGCU |
| miR-27b | UUCACAGUGGCUAAGUUCUG |
| miR-29a | CUAGCACCAUCUGAAAUCGGUU |
| miR-29b/miR-102 | UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU |
| miR-29c/ | UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA |
| miR-30a-s/miR-97 | UGUAAACAUCCUCGACUGGAAGC |
| miR-30a-as ^b | CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC |
| miR-30b | UGUAAACAUCCUACACUCAGC |
| miR-30c | UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC |
| miR-30d | UGUAAACAUCCCCGACUGGAAG |
| miR-99a/miR-99 | ACCCGUAGAUCCGAUCUUGU |
| miR-99b | CACCCGUAGAACCGACCUUGCG |
| miR-101 | UACAGUACUGUGAUAACUGA |
| miR-122a | UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGU |
| miR-122b | UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGA |
| miR-122a,b | UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG |
| miR-123 | CAUUAUUACUUUUGGUACGCG |
| miR-124a° | UUAAGGCACGCGG-UGAAUGCCA |
| miR-124b | UUAAGGCACGCGGGUGAAUGC |

Figura 7. Ejemplos de miRNAs clonados en humano (*Homo sapiens*). Como se puede apreciar aun dentro de la misma especie e inclusive dentro de una misma familia de miRNAs las secuencias de estos son distintas.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta la fecha la única característica constante en todos los transcritos primarios procesados para generar un pre-miRNA es la estructura en forma de tallo y asa. Sin embargo gran parte del genoma de los vertebrados es transcrito a RNA (Alberts *et al.*, 2002) y las regiones transcritas contienen cientos de miles de secuencias que potencialmente pueden formar estructuras de tallo-asa ubicándose así como un sustrato potencial para la enzima que participa en la generación de un pre-miRNA. Incluso dentro de algunos trascritos primarios que generan miRNAs se forman otras estructuras de tallo y asa que en teoría pueden ser procesadas tal es el caso de let-7c cuya estructura se muestra en la figura 8. Dadas las características de abundancia y expresión de este miRNA se utilizará como modelo en este trabajo.

En nuestro laboratorio se analiza la posibilidad de que Dicer no recibe una señal específica para procesar del mismo modo todos los pre-miRNAs (Flores-Jaso datos sin publicar), además trabajos recientes proponen que la precisión de los extremos 5' tanto del miRNA como del miRNA* incrementa cuando el microRNA es cargado en el complejo de Argonauta (RISC) (Steitz *et al.*, 2008) en este trabajo se observó mediante pirosecuenciación una gran cantidad de microRNAs con extremos aberrantes que reflejaban la imprecisión en el corte de las enzimas Drosha y Dicer (Steitz *et al.*, 2008). Si esto es cierto la selección de lo que será un miRNA podría estar río abajo en la vía de maduración, por lo que el procesamiento inicial puede no ser específico para transcritos que generan un miRNA funcional.

El paso inicial para la maduración de los miRNAs es la generación de un precursor a partir de un transcrito primario mediada por el microprocesador. El reconocimiento de dicho transcrito es crucial para la especificidad del procesamiento por lo que hemos centrado la atención de este trabajo en ese punto.



Figura 8. Estructura secundaria predicha para el transcrito primario que da origen a let-7c. La estructura corresponde a la más estable predicha por el programa MFOLD (Zucker *et al.*, 1999). La longitud del transcrito primario es arbitraria se tomaron 198 y 207 nt a cada lado del producto maduro.

III. HIPOTESIS

Estructuras de tallo-asa diferentes a las conocidas como generadoras de miRNAs pueden ser reconocidas por el microprocesador y generar un "pre-miRNA".

IV. OBJETIVOS

- R Buscar los posibles brazos de tallo y asa (tipo pre-miRNAs) en RNA citoplásmico.
- R Buscar los productos finales del procesamiento de los brazos de tallo y asa (tipo pre-miRNAs) en RNA total.
- Analizar las características propias de cada uno de los brazos comparándolos con el precursor de let7c canónico. Incluyendo en dicho análisis su secuencia determinando con ello la región que podría generar un miRNA maduro.

V. MATERIAL Y METODOS

5.1 Estructura del pri-miRNA de let-7c

Debido a que el transcrito primario que da origen al microRNA let-7c no está clonado se tomó un fragmento de 198 nt hacia el extremo 3' y 207 nt hacia el extremo 5' del miRNA maduro (longitud sugerida por Diederichs y Haber, 2006). Esta secuencia se modeló en el programa MFOLD versión 3.0 y se tomó la estructura secundaria más estable que predijo dicho programa (figura 8).

5.2 Cultivos celulares

Para la realización de los experimentos se utilizaron dos líneas celulares humanas: 1.- Células provenientes de cáncer cervicouterino (HeLa) y 2.-Células embrionarias de riñón (HEK 293ft). Las células se cultivaron en monocapa en cajas de 100 mm de diámetro con medio líquido DMEM (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen) y 1 mM de Piruvato de Sodio. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C, en una atmósfera con 5% de CO₂.

5.3 Preparación de extractos nucleares y citoplásmicos

Los extractos se prepararon a partir de 2 cajas de 100 mm con una confluencia del 100% (aproximadamente 8.8 x 10⁶ células por caja) de cada una de las líneas celulares antes descritas. Las células se colectaron y fueron lavadas dos veces con PBS frío y una vez con 20 ml de un buffer que contiene HEPES-KOH pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, y 0.5 mM de DTT. Después del lavado las células se incubaron con 10 ml del mismo buffer durante 10 min en hielo. Luego de la incubación fueron homogenizadas con ayuda de una varilla de plástico en hielo. Los núcleos fueron colectados mediante centrifugación por 15 min a 3300 g a 4°C. El sobrenadante contenía la fracción citoplásmica. Una vez fraccionadas las células se realizó la extracción de RNA por el método de Trizol (Invitrogen).
5.4 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó a partir de una caja de 100 mm de cada una de las líneas celulares en el caso de extracción de RNA total, y de dos cajas en el caso de RNA proveniente de los extractos (nucleares y citoplásmicos). La extracción se realizó con el método de Trizol (Invitrogen) siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor. La cuantificación se hizo mediante una dilución 1:100 en un espectofotómetro (GENEQUANT, Amersham Biosciences)

5.5 Extensión de cebador

Los oligonucleótidos utilizados para los experimentos fueron los siguientes: pre-let7c: 5'- cagttaactcccagggtgaactctaaacca- 3' pre-let7c brazo 1: 5'- ataccttcttgcacacaaattggctcaatca- 3' pre-let7c brazo 3: 5'- attttgacattgttcataagcagataca- 3' pre-let7c brazo 4: 5'- acaaagagtatcctgattggatttgtgaac- 3' pre-let7c brazo 5: 5'-agctcctccaaatatggcagccatacaccta- 3'

Las estructuras correspondientes a lo que se denomina brazo 1, 3, 4 y 5 se encuentran marcadas en la figura 4. El experimento se realizó a partir de 1µg de RNA total de HeLa, HEK y Sf9 (*Spodopthera frugiperda*) como control. Se agregó 1 µl de una dilución 1:10 de oligonucleótido marcado con [γ -P³²] ATP (Amersham Biosciences; el marcaje se realizó de acuerdo con la hoja técnica de la enzima Polinucleótido cinasa T4, T4-PNK), 1 µl de dNTPs 10 mM y DMSO a una concentración final de 3%, la reacción se llevó a un volumen de 13 µl con agua estéril. Se calentó a 95°C por cinco minutos y se dejó enfriar en hielo por un minuto. Se centrifugaron los tubos y se agregó 4 µl de "Buffer First Strand 5X" (Invitrogen), 1 µl de DTT 0.1 M y 1 µl de la enzima SuperScript III (Invitrogen). La reacción se incubó durante 60 min a 55°C, y luego 15 min a 72°C para inactivar la enzima. Se cargó toda la reacción en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% y 8 M de urea, posteriormente se transfirió a una membrana de nylon (Hybond N+, Amersham) 1 hr a 35 mA y se dejó exponer en un cassette de

exposición (BIO-RAD) toda la noche. El resultado se visualizó en un "phophor imagen" (Typhoon 8600, Molecular Dynamics).

NOTA. Se utilizaron dos tamaños de gel dependiendo de la definición deseada de los productos obtenidos. Los tamaños utilizados fueron de 7.5 x 12.5 cm y de 20 x 20 cm.

5.6 Clonación de fragmentos obtenidos en el ensayo de extensión de cebador

Oligonucleótidos adaptadores utilizados

Adaptador 1 (3'): 5'-acgtacgtacgaattcaatacgactcactata-3'

Adaptador 2 (5'): 5'-agctagctagctagctgaattc-3'

Se realizó una reacción de extensión de cebador para cada uno de los brazos del prilet7c incluyendo el pre-let7c canónico. Al término de la misma se incubó durante 1 hora con 2 µl de RNasa A (Qiagen) asegurando con ello que el producto fuera solo cDNA. Se realizó una electroforesis a partir de toda la reacción en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% y 8 M de Urea, con la finalidad de separar el exceso de oligonucleótido presente en la reacción. Se cortó el fragmento de gel que contenía las moléculas de más de 30 nt (longitud del oligonucleótido). Se eluyó la banda toda la noche en 300 µl de buffer de elución (SDS 1 %, Acetato de Sodio 0.3 M y EDTA pH 8.1 mM) y se extrajo el DNA por el método de fenol/cloroformo, se precipitó con etanol al 100% y se resuspendió en 10 µl de agua estéril. El producto resuspendido se defosforiló durante 30 minutos a 50°C con 3 µl de fosfatasa alcalina (Roche) luego de lo cual se extrajo el DNA por fenol/cloroformo y se resuspendió en 10 µl. Se le ligó un adaptador en el extremo 3' mediante la T4-RNA ligasa en una reacción que incluía 10 µl de DNA, 10 µl de oligonucleótido adaptador (100 mM), 2 µl de buffer y 1 µl de T4-RNA ligasa (NEB). El adaptador 1 fue preparado a partir de un oligonucleótido antisentido a la secuencia del promotor de T7 más el sitio de restricción EcoR1 el cual se le agregó ATP en el extremo 5' (este procedimiento se realizó de acuerdo con la hoja técnica de la enzima T4-PNK). Para purificar el producto de la ligación se corrió un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% y 8M de urea. Con base

en el gel y con ayuda de un marcador de peso molecular se cortó la banda que contenía el producto de la ligación. Se eluyó la banda toda la noche y se extrajo el DNA mediante el método de fenol/cloroformo, se precipitó con etanol al 100% y el producto se resuspendió en 10 µl. Se repitió el procedimiento de ligación y purificación ahora de un oligonucleótido adaptador en el extremo 5' el cual contenía el sitio de corte para EcoR1 (adaptador 2). Se realizó un primer PCR a partir de 5 µl del producto purificado. La reacción se incubó durante 20 ciclos a las siguientes temperaturas 1 minuto 94°C, 1 minuto 50°C, 1 minuto a 72°C. A partir de 1 µl del primer PCR se realizó un segundo PCR de 12 ciclos a las mismas temperaturas. El producto se corrió en un gel de agarosa al 2%. Se purificó y se digirió con la enzima EcoR1, luego se incubó toda la noche con T4-DNA ligasa para la concatenación de fragmentos*. Después de una purificación el producto de la ligación se subclonó en el plásmido pDRIVE. Se transformó en la cepa TOP10 de *E. coli*, se purificó el plásmido en las colonias positivas y se analizó su inserto por restricción con BamH1 y Xba1. Posteriormente se enviaron las muestras para su secuenciación a la Unidad de Secuenciación del IBT, UNAM. * La concatenación no se logró por lo que solo se pudo secuenciar plásmidos con un solo fragmento.

5.7 Northern Blot

 Para detectar productos generados por el procesamiento de los brazos del pri-let7c.

Soluciones utilizadas

| Ficoll 400 | 10 g |
|----------------------|------|
| Albúmina bovina | 10 g |
| Polivinilpirrolidona | 10 g |

Solución Denhardts 50X

| Agua libre de nucleasas | Ajustar a 1 I |
|-------------------------|---------------|
| (DEPC 0.1%) | |

Solución SSC 20X

| | | Concentración |
|---------------------------|---------------|---------------|
| | | final |
| NaCl | 175.3 g | 3 M |
| Citrato de Sodio | 88.2 g | 0.3 M |
| Agua libre de nucleasas | 800 ml | |
| (DEPC 0.1%) | | |
| Ajustar el pH a 7 con HCl | | |
| Agua libre de nucleasas | Ajustar a 1 I | |
| (DEPC 0.1%) | | |

TBE 10X 1L

| | | Concentración |
|--------------|-------|---------------|
| | | final |
| Tris Base | 109 g | 0.9 M |
| Acido Bórico | 55 g | 0.9M |
| 0.5M EDTA | 40 ml | 20 mM |

Sondas utilizadas y marcaje en el extremo 5'.

Detección de prilet7c brazo 1 5' (obtenido de la clonación de fragmentos)

5'-aggaattcttcatcactttaacctgattgagccaatttgtgtgcaagaaggtaat-3'

Detección de prilet7c brazo 1 3' (oligonucleótido diseñado y sintetizado)

5' -atgatccaagatactcatgacac- 3'

Detección de prilet7c brazo 3 5' (obtenido de la clonación de fragmentos)

5' -ccctattagattattccatttgtatctgcttatgaacaatgtcaaaat- 3'

Detección de prilet7c brazo 3 3' (oligonucleótido diseñado y sintetizado)

5' -gacaacccattagaaatacc- 3'

Detección de prilet7c brazo 5 5' (obtenido de la clonación de fragmentos)

5' –atctatatccttgccaagcccttaggtgtatggctgccatatttggaggagct- 3' Detección de prilet7c brazo 5 3' (oligonucleótido diseñado y sintetizado) 5' –actccttatcatatcttcagtc- 3' Detección de let7c

5' -aaccatacaacctactacctca- 3'

Las sondas fueron marcadas en el extremo 5' utilizando Polinucleótido cinasa T4 (PNK T4, Invitrogen). Se marcaron 5 pmol de cada una de las sondas con 2 μ l de [γ -P³²] ATP 10 mCi/ml (AMERSHAM). Las cuentas por millón (cpm) fueron determinadas con un contador de centelleo en una dilución 1:1000.

Protocolo Northern Blot

30 µg de RNA total de las líneas celulares utilizadas (HeLa y HEK) se cargaron en un gel de poliacrilamida al 15% y 8 M de urea. Previa desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, el RNA fue cargado en proporción 1:1 con buffer de carga para RNA, además se cargó también 5 µl de marcador de peso molecular DECADE (Ambion). La electroforesis del gel duró aproximadamente 1 hr a 100 V en buffer TBE 1X (90 mM Tris Base, 90 mM ácido bórico y 2 mM EDTA). Posteriormente se transfirió a una membrana de nylon (Hybond N+, Amersham) mediante electrotransferencia en cámara seca durante 30 min a 0.35 Amp. Una vez transferidas las muestras a la membrana está se sometió durante 60 s a luz ultravioleta (120 mJ) en un entrecruzador comercial, con la finalidad de fijar los ácidos nucleicos (RNA) a la membrana. Una vez fijada la membrana se prehibridizó en 10 ml de solución de prehibridación (6X SSC, 10X solución Denhardt's, 0.2 % SDS) a 65°C durante 1 hr en botellas medianas (NALGENE). Se retiró la solución de prehibridación y se sustituyó por 10 ml de solución de hibridación (6X SSC, 5X solución Denhardt's, 0.2% SDS, sonda antisentido marcada en el extremo 5' 5x10⁶ cpm, se utilizó igual cantidad de sonda específica y de sonda contra U6 como control de degradación). Con esta solución se incubó la membrana toda la noche a 37°C. Al término de la hibridación se retiró la solución y la membrana fue sometida a tres lavados de 5 minutos cada uno. utilizando para ello 10 ml de solución de lavado (6X SSC, 0.2% SDS). La membrana fue envuelta en plástico transparente y colocada en una pantalla para phosphorimager durante 4 hrs. Finalmente el resultado se analizó en un "phosphor imagen" (Typhoon 8600, Molecular Dynamics).

Para detectar el pre-let7c canónico

Sondas utilizadas

Pre let7c 5' -cagttaactcccagggtgaactctaaacca-3'

El marcaje y el protocolo de Northern Blot fueron los mismos que en el apartado anterior.

Para validar fraccionamiento nuclear y citoplásmico

El marcaje y el protocolo de Northern Blot fueron los mismos que en el apartado anterior, la única diferencia radica en la cantidad de RNA utilizado. Se utilizaron 2 y 5 µg de RNA nuclear y citoplásmico

5.8 Integridad de las muestras de RNA

Para verificar la integridad del RNA utilizado en los ensayos de Northern Blott, se cargó 1 µg de RNA en un gel de agarosa al 1% preparado con TAE 1X disuelto en agua libre de nucleasas (DEPC 0.1%).

VI. RESULTADOS

6.1 Presencia e identificación de estructuras de tallo-asa del pri-let7c en RNA total de células HeLa y HEK.

Para identificar los brazos del transcrito primario que origina a let7c se utilizó un ensayo de Northern Blot en extractos nucleares de células HeLa y HEK. En un primer experimento se trató de identificar el pre-let7c canónico para poder así validar el método de detección. Se utilizó como sonda el oligonucleótido descrito en Materiales y Métodos como pre-let7c (Figura 9A); sin embargo mediante este método no se pudo identificar el pre-let7c canónico aun cuando se cargaron grandes cantidades de RNA. Cuando se utilizó una sonda en contra del miRNA maduro se pudo observar un producto de 22 nt de longitud en los carriles donde se cargó RNA total, en aquellos cargados con RNA nuclear no se detectó nada esto debido a que para generar el producto final de la vía de biogénesis son necesarias etapas de maduración que se llevan a cabo en el citoplasma. El hecho de poder encontrar solo el producto maduro sugiere que el precursor se esta procesando de manera muy eficiente (Figura 9B).



Figura 9. Northern blot para detectar el precursor de let-7c. A) Se utilizó una sonda en contra de la región del asa. Como control de cargado se utilizó una sonda en contra de U6. B) Se utilizó una sonda en contra de let 7c maduro. Como control de cargado se utilizó una sonda en contra de U6.

Debido a que el Northern Blot resultó una técnica inadecuada para la detección del pre-let7c canónico se pensó en utilizar un método más sensible. La técnica de extensión de cebador utilizando los oligonucleótidos específicos en contra de la región del asa de cada brazo nos permitió visualizar la presencia del precursor de let-7c, además de abrirnos la posibilidad de caracterizar las otras estructuras de tallo-asa del transcrito primario. Los resultados del primer experimento de este tipo se muestran en la figura 10.



Figura 10. Extensión de cebador para detectar el precursor de let-7c, así como los brazos 1 y 5 del transcrito primario (electroforesis en gel de 7.5 x 12.5 cm). Los oligonucleótidos utilizados para la reacción son complementarios a la región del asa y la bandas observadas corresponden al producto amplificado a partir del oligonucleótido en dirección 5'. Se utilizó como control el precursor de miR-17. Se muestra la zona donde se detectaron productos de amplificación entre 50 y 70 nt para los brazos probados. En el caso de miR-17 se detecta un producto de amplificación de aproximadamente 30 nt.

De acuerdo con lo observado en la Figura 10 ambos brazos probados (1 y 5) generan productos de un tamaño similar al del precursor canónico; sin embargo no se puede determinar con exactitud el tamaño de las bandas por lo que se decidió repetir la reacción en una electroforesis utilizando un gel de 20 x 20 cm. Las dimensiones de este gel permiten una mayor migración y por lo tanto una mejor definición del peso de las bandas (Figura 11).



Figura 11. Extensión de cebador para detectar el precursor de let-7c, así como los brazos 1 y 5 del transcrito primario (electroforesis en gel de 20 x 20cm). Los oligonucleótidos utilizados para la reacción son en contra de la región del asa y la bandas observadas corresponden al producto amplificado a partir del oligonucleótido en dirección 5'. Se utilizó como control RNA de Sf9. Las flechas indican los tamaños de las bandas obtenidas para cada uno de los casos.

En la Figura 11 el número de bandas aumentó posiblemente porque el tamaño del gel permitió una mejor separación de las mismas, el tamaño del producto mayor generado con los oligonucleótidos para el pre-let7c y el brazo 1 permaneció constante, sin embargo en el caso del brazo 5 se observó una banda de mayor tamaño (100 nt) a las detectadas anteriormente, 72 nt como máximo (Figura 10). El mapeo de todas las bandas obtenidas se muestra en la figura 12.



Figura 12. Representación esquemática del tamaño de los fragmentos obtenidos por extensión de cebador. Las flechas curvas indican la región contra la cual está diseñado el oligonucleótido. Las flechas con doble punta indican la longitud de los fragmentos clonados y secuenciados. A dicha longitud hay que agregarle los nucleótidos del oligonucleótido utilizado para la prueba. La longitud total del fragmento (nt) se indica a la derecha. Rojo Brazo 1, Verde pre-let7c canónico, Negro Brazo 5, Azul Brazo 3.Se indican los tamaños de todas los productos obtenidos en la figura 11.

Para descartar la posibilidad de que los productos observados no correspondieran

al procesamiento del pri-let7c sino mas bien fueran algún tipo de procesamiento

inespecífico, se clonó individualmente cada una de las bandas generadas.

De la clonación de fragmentos se obtuvieron las siguientes secuencias:

Extensión de Cebador con los oligonucleótidos complementarios a la región del asa del precursor canónico de let7c.

5'CGGGTTGAGGTAGTAGGTTGTATGGTTTAGAGTTACACCCTGGGAGTTAACTG3' Extensión de cebador con los oligonucleótidos complementarios a la región del asa del brazo 1 del pri-let7c.

5' -CGTCGAGGAATTCTTCATCACTTTAACCTGATTGAGCCAATTTGTGTGCAAGA- 3'

Extensión de Cebador con los oligonucleótidos complementarios a la región del asa del brazo 5 del pri-let7c.

5' -AGAATATTATATCTATATCCTTGCCAAGCCCTTAGGTGTATGGCTGCCATATT- 3' Los resultados de la secuenciación muestran que los productos generados corresponden a parte de los brazos del pri-miRNA que da origen a let7c como se muestra en la figura 12. Cabe mencionar que a pesar de los esfuerzos por clonar todas las bandas obtenidas mediante concatenación, sólo se pudo identificar el producto de amplificación más abundante en todos los casos.

Una vez corroborada la identidad de los fragmentos de DNA generados en el ensayo de extensión de cebador decidimos probar los brazos restantes del transcrito primario. El brazo 3 y el 4 indicados en la figura 8 fueron probados en RNA total utilizando los oligonucleótidos específicos descritos en la metodología como pre-let7c brazo 3 y pre-let7c brazo 4. Los resultados mostrados en la Fig. 13 indican productos de extensión en el caso del pre-let7c canónico utilizado como control y en el del carril correspondiente al brazo 3, no así en el caso del brazo 4 con cuyo oligonucleótido no se detectó ningún producto de amplificación. La señal obtenida en el caso del brazo tres parece ser más intensa inclusive que la generada por el pre-let7c canónico por lo que el experimento fue confirmado en dos ocasiones. El hecho de que el brazo 4 no pudo ser amplificado también fue confirmado en dos experimentos más.



Figura 13. Extensión de cebador para detectar el precursor de let7c, así como los brazos 3 y 4 del transcrito primario (electroforesis en gel de 7.5 x 12.5 cm). Los oligonucleótidos utilizados para la reacción son en contra de la región del asa y la bandas observadas corresponden al producto amplificado a partir del oligonucleótido en dirección 5'. La flecha indica el único producto de amplificación detectada con el oligonucleótido complementario a la región del asa del brazo 3. Las bandas que aparecen en los carriles 2 y 3 corresponden a las ya detectadas en la figura 10 con el oligonucleótido complementario con la región del asa del pre-let7c canónico. Los carriles 6 y 7 correspondientes al brazo 4 no muestran ningún producto de amplificación.

Debido a que las dimensiones del gel de la figura 13 no permitían dilucidar de manera correcta el tamaño del producto amplificado en el caso del brazo tres, se realizó una electroforesis en un gel de mayores dimensiones (20 x 20 cm) (figura 14) en el cual se pudo apreciar con claridad que el producto amplificado tenía una longitud de 48 bases, además de ser un producto único. Se confirmó una vez más ausencia de amplificación para el caso del brazo cuatro. También se utilizaron RNAs de *Rattus novergicus* y *Spodhoptera frugiperda* como control de especificidad del oligonucleótido utilizado. Cabe mencionar que aunque *Rattus novergicus* comparte la presencia del miRNA let-7c con humano, las secuencias de sus precursores son distintas.



Figura 14. Extensión de cebador para detectar el precursor de Let7c, así como los brazos 3 y 4 del transcrito primario (electroforesis en gel de 20 x 20 cm). Los oligonucleótidos utilizados para la reacción son en contra de la región del asa y las bandas observadas corresponden al producto amplificado a partir del oligonucleótido en dirección 5'. Se utilizó como control RNA de *Rattus novergicus y Spodhoptera frugiperda*. Se indica el tamaño del producto amplificado en los carriles 2 y 3 con el oligonucleótido complementario a la región del asa del brazo 3 (48 nt). Las otras bandas en el gel corresponden a la longitud del oligonucleótido utilizado para el ensayo.

Una vez confirmada la generación de un producto de extensión para el brazo 3 se inició la clonación del mismo siguiendo el protocolo utilizado para los otros brazos, con la diferencia de que en este caso no se intentó la concatenación de fragmentos ya que como quedó demostrado en la figura 14 se genera un producto único. El producto obtenido de la clonación de todos los brazos probados se muestra de manera esquemática en la figura 15. La secuencia clonada del brazo 3 corresponde a la siguiente:

5'- CCCTATTAGATTATTCCATTTGTATCTGCTTATGAACAATGTCAAAAT- 3'



Figura 15. Representación esquemática de las secuencias clonadas. Las flechas indican el inicio y el término de los fragmentos clonados y secuenciados. Rojo Brazo 1, Verde pre-let7c canónico, Negro Brazo 5, Azul Brazo 3.Se indica también los extremos 3' y 5' del transcrito utilizando el programa MFOLD 3.0.

En las figuras 16 y 17 se muestra el ensayo de extensión de cebador para todos los brazos que componen al pri-let7c incluyendo al pre-let7c canónico en las dos líneas celulares utilizadas en este trabajo.



Figura 16. Extensión de cebador para detectar el precursor de let-7c, así como los brazos 1, 3, 4 y 5 del transcrito primario en RNA total de células HeLa. Los oligonucleótidos utilizados para la reacción son complementarios a la región del asa y las bandas observadas corresponden al producto amplificado a partir del oligonucleótido en dirección 5'.



Figura 17. Extensión de cebador para detectar el precursor de let-7c, así como los brazos 1, 3, 4 y 5 del transcrito primario en RNA total de células HEK. Los oligonucleótidos utilizados para la reacción son complementarios a la región del asa y las bandas observadas corresponden al producto amplificado a partir del oligonucleótido en dirección 5'

6.2 Búsqueda de estructuras de tallo-asa del pri-let7c en fracciones celulares (extractos nuclear y citoplasmático).

Hasta el momento hemos visto que estructuras de tallo-asa diferentes a las conocidas como generadoras de miRNAs (brazos 1,3 y 5 del pri-let7c) pueden ser procesadas en el núcleo generando estructuras de un tamaño similar al del precursor canónico de let-7c.

Debido a que la maduración de los miRNAs se lleva a cabo en diferentes compartimientos celulares, se realizó el fraccionamiento celular en núcleo y citoplasma con la finalidad de realizar experimentos de extensión de cebador a partir de RNA de cada uno de dichos compartimentos determinando con ello si las estructuras de tallo-asa probadas (brazos del pri-let7c) salían del núcleo. Dada la importancia de trabajar con fracciones puras se realizó un ensayo de Northern Blot para validar el correcto fraccionamiento así como una prueba de integridad de la muestra de RNA (Figura 18 y 19). La sonda utilizada en el ensayo fue U6 cuya señal sólo puede detectarse en fracciones nucleares o con contaminación de núcleos.



Figura 18. Northern Blot para validar el correcto fraccionamiento de núcleo y citoplasma, se utilizó a U6 como sonda (únicamente presente en núcleos). En el panel superior se muestra la prueba con RNA de HeLa, de derecha a izquierda con 2 y 5 μ g de RNA respectivamente. En el panel inferior se muestra la prueba con RNA de HEK, de derecha a izquierda con 2 y 5 μ g de RNA, respectivamente.



Figura 19. Integridad del RNA utilizado. Prueba de integridad del 1 μ g de RNA total, nuclear y citoplásmico de HeLa y HEK en un gel de agarosa al 1%.

Una vez corroborada la pureza e integridad de las muestras de RNA se realizó el ensayo de extensión de cebador a partir de RNA nuclear y citoplásmico de las células HeLa y HEK los resultados se muestran en la figura 20 en el caso de los brazos 1 y 5, y en la figura 21 para el caso del brazo 3.



Figura 20. Extensión de cebador para detectar el pre-let7c y los brazos 1 y 5 en RNA total así como en extractos nucleares y citoplasmáticos de células HeLa y HEK. A) Extensión de cebador para detectar el precursor de let-7c y los brazos 1 y 5 del transcrito primario en RNA total de células HeLa así como en extractos nucleares y citoplasmáticos. Los oligonucleótidos utilizados para la reacción son complementarios a la región del asa y la bandas observadas corresponden al producto amplificado a partir del oligonucleótido en dirección 5'. B) Extensión de cebador para detectar el precursor de let-7c y los brazos 1 y 5 del transcrito primario en RNA total de células HEK así como en extractos nucleares y citoplasmáticos. Los oligonucleótidos utilizados para la reacción son complementarios o en dirección 5'. B) Extensión de cebador para detectar el precursor de let-7c y los brazos 1 y 5 del transcrito primario en RNA total de células HEK así como en extractos nucleares y citoplasmáticos. Los oligonucleótidos utilizados para la reacción son complementarios a la región del asa y la bandas observadas corresponden en extractos nucleares y citoplasmáticos. Los oligonucleótidos utilizados para la reacción son complementarios a la región del asa y la bandas observadas corresponden al producto amplificado a partir del oligonucleótido en dirección 5'.

Como se muestra en las figuras 20 y 21 no se detectaron productos de amplificación en la fracción citoplasmática de ninguna de las líneas celulares. Tampoco fue posible obtener productos de amplificación con el pre-let7c canónico el cual debe estar siendo procesado a nivel citoplásmico dada la presencia de su producto maduro (Figura 9B y 23B). Ya que el método de detección está basado en la complementariedad del oligonucleótido con la región del asa y en el segundo paso de la vía de biogénesis dicha región es removida, es posible que los fragmentos si estén siendo exportados del núcleo pero Dicer, la RNAsa que corta los precursores en el citoplasma los procesa muy rápidamente como para detectarlos.



Figura 21. Extensión de cebador para detectar el brazo 3 del transcrito primario en RNA total, extractos nucleares y citoplasmáticos de células HeLa y HEK. A) Extensión de cebador para detectar el brazo 3 del transcrito primario en RNA total, extractos nucleares y citoplasmáticos de células HeLa. Los oligonucleótidos utilizados para la reacción son complementarias a la región del asa y la bandas observadas corresponden al producto amplificado a partir del oligonucleótido en dirección 5'. B) Extensión de cebador para detectar el brazo 3 del transcrito primario en RNA total, extractos nucleares y citoplasmáticos de células HeLa. Los observadas corresponden al producto amplificado a partir del oligonucleótido en dirección 5'. B) Extensión de cebador para detectar el brazo 3 del transcrito primario en RNA total, extractos nucleares y citoplasmáticos de células HEK. Los oligonucleótidos utilizados para la reacción son en contra de la región del asa y la bandas observadas corresponden al producto amplificado a partir del oligonucleótido en dirección 5'.

6.3 Búsqueda de secuencias maduras (22 nt) generadas a partir de las estructuras de tallo-asa del pri-let7c.

El hecho de no poder detectar productos de amplificación en el citoplasma aun en el caso del precursor canónico nos llevó a pensar que el procesamiento de los brazos del pri-let7c puede no estar restringido al núcleo. Si los brazos del pri-let7c se exportaran al citoplasma siguiendo la vía de maduración de los miRNAs serían procesados por Dicer generando un dúplex de RNA del cual a su vez se generaría un producto maduro (miRNA 22 nt. aproximadamente). Para dilucidar esto buscamos por Northern blot productos maduros de 22 nt. Como desconocíamos de que lado del tallo (3'o 5') podría generarse un producto maduro decidimos utilizar sondas que se complementaran con cada una de las diferentes regiones. Para detectar productos originados del lado 5' utilizamos las regiones clonadas como producto del ensayo de extensión de cebador. En el caso de productos generados del lado 3' se diseñaron oligonucleótidos complementarios específicos para utilizarlos como sonda (Figura 22).



Figura 22. A) Northern Blot para detectar productos de 22 nt en 20 µg de RNA total de HeLa y HEK. El brazo probado así como el lado del tallo contra el cual se diseñó la sonda se indican debajo de cada recuadro.

B) Northern Blot para detectar a let7c en 20 μg RNA total
de HeLa y HEK. En ambos casos (A y B) se utilizó la
sonda contra U6 como control de degradación y cargado.



Como se observa en la figura 22 A no fue posible observar ningún producto de alrededor de 22 nt el cual nos indicaría un producto final de procesamiento. El let7c canónico fue detectado con claridad cómo se muestra en la figura 22 B.

6.4 Comparación de las características intrínsecas de cada una de las estructuras de tallo-asa del pri-let7c.

De acuerdo con la figura 13 no fue posible detectar uno de los brazos estudiados (brazo 4), debido a ello se realizó un análisis comparativo de las características de los brazos incluyendo al precursor canónico, con la finalidad de establecer posibles diferencias entre los brazos que pudieran llevar a su procesamiento. En dicho análisis, resumido en la tabla 2, las diferencias más notorias entre los brazos detectados y el no detectado están en la energía libre, el número máximo de desapareamientos por "loop" y la distancia del último desapareamiento al final del precursor.

Otra posibilidad por la cual no es posible detectar el brazo 4, es que la longitud real del pri-miRNA de let7c sea menor a la que se consideró para este trabajo. De acuerdo con el esquema de la figura 15 la estructura del brazo 4 se forma cerca del extremo 5' del pri-let7c (longitud considerada en este trabajo), si la longitud del pri-let7c real es menor dicho brazo no estaría formándose y por lo tanto sería imposible detectarlo. Para esclarecer este punto se intentó la clonación del pri-let7c completo en varias ocasiones mediante una modificación a la técnica 3' y 5' RACE (para mapear extremos 3' y 5' de transcritos) sin embargo dichos intentos no fueron exitosos.

| Característica | pre-let7c | pre-let7c brazo 1 | pre-let7c brazo 3 | pre-let7c brazo 4 | pre-let7c brazo 5 |
|--|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Longitud del precursor (nt) | 84 | 76 | 68 | 68 | 80 |
| Tamaño del "loop" apical (nt) | 7 | 7 | 9 | 7 | 6 |
| Distancia del primer desapareamiento del "loop" apical (nt) | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 |
| ΛG ^o Kcal | -26.40 | -17.50 | -17.30 | -14.20 | -21.70 |
| Tamaño de los desapareamientos (nt) promedio | 1.5 | 1.8 | 3.6 | 3 | 2.2 |
| No. máximo de bps consecutivos en el tallo | 14 | 9 | 11 | 12 | 11 |
| No. de "loops" internos | 5 | 5 | 2 | 4 | 3 |
| No. máximo de desapareamientos por "loop" (nt) | 3 | 4 | 4 | 9 | 6 |
| Talla de los "loops" internos (nt) promedio | 6.8 | 7 | 10 | 10 | 6.6 |
| No. De desapareamientos | 9 | 12 | 12 | 15 | 8 |
| % de aparici ó n de nt A% | 20.23 | 26.3 | 27.94 | 30.8 | 30 |
| C% | 19.04 | 17.10 | 14.70 | 17.64 | 16.25 |
| G% | 28.5 | 22.36 | 17.64 | 23.52 | 22.5 |
| U% | 23.8 | 34.21 | 39.70 | 27.94 | 31.25 |
| Distancia del sitio de procesamiento 5' al "loop" inicial | 34 | 31 | 29 | | 36 |
| Distancia del último desapareamiento del final (nt) | 4 | 2 | 9 | 14 | 7 |

Tabla 2. Características del precursor de let7c y de los distintos brazos que forman el transcrito primario. El cálculo de la energía libre se realizó con el el programa MFOLD (tomado de Zucker *et al.*, 1999). Se resaltan las características que difieren más entre las estructuras analizadas.

6.5 Predicción de secuencias maduras (22 nt) generadas a partir de las estructuras de tallo-asa del pri-let7c y búsqueda de mensajeros blanco para los mismos.

La última parte de esta tesis consiste en una serie de análisis *in silico* dentro de los cuales se incluye la predicción del inicio y término de la secuencia de los posibles productos finales de maduración, así como una búsqueda de blancos para los mismos.

En la figura 23 panel C se muestran las secuencias de 22 nt más probables generadas de cada uno de los brazos para llegar a ellas fue necesario hacer un cuidadoso análisis que incluye: Longitud promedio de miRNAs, sitio de corte para la enzima Dicer a partir del sitio de corte putativo encontrado para la enzima

Drosha (Lee *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005b), Δ G de ambos lados del brazo para encontrar aquel que fuera más fácil de separar tomando en cuenta la "regla del vecino más cercano" (Schwarz *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003), porcentaje de As y Us (Saetrom *et al.*, 2006, Ritchie *et al.*, 2007), y conservación evolutiva (Ambros *et al.*, 2003). Figura 23 paneles A y B.





Secuencia derivada del 5' % A, U = 57.11. ΔG 5' -4.91 kcal/mol 5' uaucuauauccuugccaagccc ^{3'}

Secuencia derivada del 3'

% A, U = 61.70 ∆G 5´ -2.24 kcal/mol

| | Braz | zo 1 | Brazo 3 | | Brazo 5 | | pre-let7c | |
|----------------|--|--|----------------------------------|--|--|----------------------------------|--|--|
| Especie | Secuencia originada del 3 ⁻ | Secuencia originada del 5 ⁻ | Secuencia originada del 3´ | Secuencia originada del 5 ⁻ | Secuencia originada del 3 ⁻ | Secuencia originada del 5´ | Secuencia originada del 3 ⁻ | Secuencia originada del 5 [°] . |
| M. mulata | Х | √ 100% | Х | Х | Х | √ 100% | 68% | √ 100% |
| P. troglodytes | 80% | √ 100% | 80% | 90% | Х | √ 100% | 72% | ✓ 100% |
| P. Paniscus | 80% | ✓ 100% | 80% | Х | Х | ✓ 100% | 68% | √ 100% |
| L. Lagotica | 80% | ✓ 100% | 80% | Х | Х | √ 100% | 68% | ✓ 100% |
| S. Labiatus | 80% | √ 100% | Х | Х | Х | √ 100% | 68% | √ 100% |
| G. Gorilla | 80% | √ 100% | Х | Х | Х | √ 100% | 68% | ✓ 100% |
| M. Musculus | Х | 90 % | Х | 90% | 80% | 80% | 76% | ✓ 100% |
| R. Novergicus | Х | 80 % | Х | Х | Х | 76% | Х | ✓ 100% |
| C. Familiaris | Х | Х | Х | Х | Х | X | Х | √ 100% |
| D. rerio | Х | 85% | Х | 90% | 85% | 90% | 76% | √ 100% |

C)

B)

Brazo 1: 5'-gaggaauucuucaucacuuuaa-3' Brazo 3: 5'-cccuauuattccauuuguaucu-3' 5'-uuggguaaucuuuaugguaaa-3' Brazo 5: 5'-gaauaguauagaagucagucga-3'

Figura 23. Representación esquemática de los parámetros utilizados para predecir la secuencia de productos maduros generados a partir de cada uno de los brazos. A) En cada estructura se indica los sitios de corte predichos para Drosha y Dicer así como el contenido de Adeninas y Uracilos y el Δ° G de los extremos 5'. La secuencia subrayada corresponde a aquella con la cual se quedaría el RISC. B) Cuadro comparativo de la

conservación evolutiva de las secuencias predichas. Se indica con una X aquellas secuencias no conservadas en las especies estudiadas, se indica también el porcentaje de las que se hallan medianamente conservadas y se resalta en color aquellas que se encuentran conservadas en un 100%. Esta comparación se hizo utilizando el programa BLAST de NCBI con la opción de modificación para secuencias cortas. C) Secuencias de 22 nt (maduras) predichas tomando en cuenta los criterios descritos en los paneles A y B.

La presencia de productos tan pequeños puede tener una duración muy corta en el ambiente celular esto debido a la presencia de enzimas de degradación (RNasas). En caso de que dichos productos se estuvieran generando a partir del transcrito primario, la ausencia de protección (ausencia de blanco que los mantuviera en la maquinaria del RISC o una falta de asociación a dicho complejo) o la degradación específica para los mismos impediría su permanencia y por lo tanto su detección.

Una vez determinadas las secuencias de los posibles productos maduros generados a partir de las estructuras de tallo-asa probadas, se realizó una búsqueda de blancos celulares para los mismos. Con la ayuda del programa computacional mirTAR se determinó el número de mensajeros que potencialmente pudieran aparearse con la región semilla (nt 1 al 8) de nuestros "miRNAs" predichos. En la figura 24 se muestran los resultados de esta búsqueda así como la comparación con miRNAs ya clonados y anotados en la base de datos miRBASE. Cabe mencionar la diferencia evidente entre el número de blancos que se predicen para miRNAs que se han clonado (> 900) y el número predicho para los nuestros (1).

Para los miRNAs ya clonados que se muestran en la figura 24 incluyendo a let-7c se predice un gran número de blancos, lo cual amplía la posibilidad de que más allá de la predicción la regulación de uno o más de estos mensajeros sea real.

Debido al pequeño número de nucleótidos que se toman en cuenta (región semilla) para la predicción de mensajeros blancos se esperaría que las secuencias predichas en este trabajo (figura 23) generaran varios mensajeros blanco; sin embargo sólo se predice un mensajero al que podrían regular sugiriendo con ello que probablemente el reconocimiento de lo que será un miRNA está dado a nivel funcional, es decir, por el blanco celular que esté regulando.



Predicción de blancos para distintos miRNAs

Figura 24. Representación del número de mensajeros blanco predichos para distintos miRNAs de acuerdo con el programa de predicción mirTAR, se incluye también el número de mensajeros blanco predichos para las secuencias descritas en la figura 23 panel C.

VII. DISCUSIÓN

El procesamiento de los transcritos primarios (pri-miRNAs) es un evento crítico en la biogénesis de los miRNAs. Dicho procesamiento inicial predetermina las secuencia final del miRNA generando uno de los extremos de la forma madura (Lee *et al.*, 2003; Lund *et al.*, 2004). El microprocesador (Drosha y DGCR8) facilita la producción de miRNAs generando extremos 3' característicos, los cuales son reconocidos eficientemente por la Exp5 y Dicer (Basyuk *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Lund *et al.*, 2004). Sin embargo, aun no está claro como hace el microprocesador para reconocer su blanco y hacer cortes específicos. Ya que no existe un elemento de secuencia común en los pri-miRNAs Drosha y su cofactor deben estar reconociendo características estructurales compartidas entre los diferentes transcritos primarios (Han *et al.*, 2006).

Debido a ello nosotros pensamos que estructuras de tallo-asa diferentes a las conocidas como generadoras de miRNAs pueden ser reconocidas por el microprocesador e iniciar su procesamiento.

En el presente trabajo; a través de experimentos de extensión de cebador demostramos que el procesamiento de un transcrito primario que origina un miRNA, no se restringe sólo a la región de la cual surge el producto maduro clonado (let7c) si no también se presenta en otras regiones del transcrito que comparten la estructura de tallo-asa. Para todos los brazos probados los productos detectados en mayor cantidad (Figura 10 y 13) corresponden en longitud a los extremos de los brazos del pri-let7c como se indica en la Figura 12 por lo que su escición del transcrito primario generaría RNAs en forma de tallo y asa de entre 68 y 80 nt que corresponde al tamaño promedio de los precursores de miRNAs (Bartel 2004).

Además de los productos antes mencionados, se detectaron otros productos menos abundantes en el caso de los brazos 1 y 5 (Figura 11) los cuales pueden corresponder a subproductos del corte del microprocesador. Como se ha mencionado no se sabe cómo es que el microprocesador reconoce con precisión su sitio de corte por lo que no se descarta la posibilidad de que Drosha y su cofactor puedan generar más de un producto precursor. Esto explicaría al menos

en parte la presencia de fragmentos de distintos tamaños como el de 55 nt el cual tiene un patrón de expresión similar al de 53 nt (fragmento clonado). De manera interesante, en las clonaciones masivas de miRNAs se han detectado productos maduros con secuencias desfazadas por algunos nucleótidos las cuales han sido descartadas pensando que corresponden a productos que sufrieron algún tipo de degradación reportando así como la secuencia madura aquella que corresponde a la secuencia más larga. Sin embargo no existe evidencia que sugiera que las otras secuencias detectadas no pudieran ser generadas por la vía de biogénesis (Lagos-Quintana *et al.*, 2003; Landgraf *et al.*, 2007). En el laboratorio se ha estudiado el procesamiento de precursores por la RNasa Dicer, de estos experimentos se ha concluido que esta enzima no tiene un sitio único de procesamiento sino que puede cortar en diferentes nucleótidos a lo largo del precursor (Flores-Jaso datos sin publicar).

Algunos de los productos detectados pueden tener explicaciones particulares. En el caso del brazo 1 (Figura 11) se aprecia un producto de amplificación de 72 nt que posiblemente corresponde a la amplificación del transcrito que queda como resultado del corte del pre-let7c canónico. Utilizando el oligonucleótido específico para el brazo 5 encontramos un producto de 100 nt el cual puede indicarnos el extremo 5'del transcrito primario ya que dicho transcrito no ha sido clonado en su totalidad, de ser así el transcrito estaría terminando antes de poder formar el brazo no. 4 el cual como se muestra en las figuras 13,14,16 y 17 no pudo ser amplificado.

Dentro de los productos generados con el oligonucleótido específico para el prelet7c canónico detectamos un producto de 40 nt; este fragmento puede generarse por el corte erróneo del microprocesador. De acuerdo con resultados obtenidos por Han y colaboradores en el 2006 el microprocesador reconoce el lado de la estructura de tallo-asa sobre la cual debe posicionarse en base a que el precursor está enmarcado por RNA de hebra sencilla, es decir por una secuencia no apareada; sin embargo en el caso del transcrito primario de let-7c el precursor generado a partir de él no se encuentra enmarcado por secuencias de este tipo por lo cual es probable que el microprocesador se posicione de manera estocástica ya sea sobre el tallo del brazo generando el precursor correcto o bien sobre el asa que también corresponde a una región desapareada generando un precursor erróneo. Con base en los resultados de este grupo podemos pensar en una posible explicación para la señal obtenida para el brazo 3, la cual como se muestra en las figuras 13,14,16 y 17 es muy fuerte, es decir a un exceso de producto en comparación con el generado para el caso de los otros brazos. El brazo 3 se ubica al término de la secuencia utilizada como modelo para este trabajo (extremo 3'). El transcrito primario completo muy posiblemente cuenta con una longitud mayor ocasionando con ello que el brazo 3 esté enmarcado por una región de RNA de hebra sencilla la cual de acuerdo a Han favorecería su corte por el microprocesador explicando su abundancia.

En las fracciones citoplasmáticas de ambas líneas celulares utilizadas no fue posible la detección de productos de amplificación en ningún caso, lo que nos sugiere dos posibles escenarios el primero es que los productos detectados inicialmente en RNA total estén restringidos al procesamiento nuclear; sin embargo si el procesamiento de estos fragmentos está dado por el microprocesador los requerimientos para la exportación de los mismos estarían cubiertos (Bohnsack, 2004; Gwizdek, 2003), el segundo escenario nos sugiere que los fragmentos de amplificación detectados si están siendo exportados al citoplasma pero que la RNasa Dicer remueve la región del asa tan rápidamente que es imposible detectar los fragmentos ya que el método de detección se basa en la complementariedad de un oligonucleótido específico con dicha región. Esta propuesta es apoyada por el hecho que el pre-let7c canónico el cual forzosamente debe estar siendo exportado tampoco es detectado en la fracción citoplásmica abriendo con ello la posibilidad de que los otros brazos puedan compartir la vía de procesamiento; sin embargo nada nos hace descartar que pudieran seguir una vía distinta.

El análisis de las características propias de cada brazo nos permitió comparar algunos de los parámetros que han sido considerados como importantes para la definición de un pre-miRNA (Saetrom *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Bonnet *et al.*, 2004; Ritchie *et al.*, 2007) Dentro de dichas características encontramos que todos los brazos cumplen con la longitud promedio de los precursores entre 60 y 80 nt, cuentan además con una formación significativa de puentes de hidrógeno

es decir, la mayoría de sus nucleótidos se encuentran apareados (> 60%), el contenido de adeninas y uracilos es alto en comparación con otros RNAs no codificantes (Zhang *et al.*, 2006), lo que facilitaría la separación de la secuencia madura del complejo miRNA:miRNA* cuando éste dúplex entra al complejo RISC. Otras características compartidas son el tamaño del asa apical, el número máximo de apareamientos consecutivos en el tallo y la distancia del sitio de procesamiento 5'al loop apical. Existen también características que no se comparten con los parámetros predichos entre las que encontramos: el tamaño de los desapareamientos, el número de "loops" internos, el número de desapareamientos, la talla de los "loops" internos, la distancia del primer desapareamiento del "loop" apical y la distancia del último desapareamiento del final del precursor.

Cabe mencionar que a pesar de que los brazos generados de nuestro transcrito en estudio no comparten ciertas características promedio con otros precursores si son muy parecidos al precursor canónico que se genera de este RNA ya que de 15 características estudiadas comparten 12 (Tabla 2).

Una de las características que más llama la atención en la Tabla 2 y que no ha sido discutida hasta el momento es la energía libre que presenta la estructura de cada uno de los brazos. En el caso de los pre-miRNAs los cuales no presentan interacciones estrechas con proteínas antes de su procesamiento, presentan una estructura secundaria estable necesaria para evitar su degradación temprana. Hay trabajos en donde por algoritmos y predicciones computacionales se sugiere que el valor promedio de Δ G para un pre-miRNA está alrededor de -33 kcal/mol; sin embargo se han reportado valores de hasta -18 kcal/mol (miR 69) (Ritchie *et al.*, 2007). El caso del brazo 4 es particular ya que tiene un Δ G de -14.20 kcal/mol razón por la cual podría no ser un buen candidato para su procesamiento.

Las limitaciones de la técnica utilizada para detectar los productos en la fracción citoplásmica nos llevó a tratar de aislar productos maduros generados a partir de los brazos procesados en el núcleo, a pesar de no haber podido detectar ningún producto de alrededor de 22 nt (miRNA maduro) en ninguno de los brazos probados nosotros pensamos que no se puede descartar la posibilidad de que se estén generando y no se mantengan debido a la ausencia de un blanco que los retenga en el RISC y los proteja de la degradación. Con esto en mente la continuación de este trabajo incluirá el diseño de MREs (Sitios de reconocimiento para miRNAs) fusionados a un gen reportero que servirá como blanco artificial para analizar su funcionalidad y rescatar estos posibles "miRNAs" aun no identificados. En esta tesis se hace un último análisis "in silico" para tratar de definir las secuencias más probables que tendrían los productos maduros. Las secuencias anotadas en la figura 23 fueron escogidas con base en una serie de criterios establecidos para la definición de un miRNA. El brazo 1 y 5 muestran una clara diferencia en el patrón de conservación evolutiva para las secuencias generadas del lado 3' y 5' siendo este último la región más conservada en ambos casos. El lado 5´ del brazo 1 también cumple con el criterio de poseer un mayor porcentaje de adeninas y uracilos en su secuencia, además sus valores de ΔG en los extremos 5' de las dos secuencias son parecidos lo que nos indica que de entrar al RISC tendrían posibilidades similares de ser seleccionados, por lo tanto la secuencia elegida como posible secuencia madura para el brazo 1 es la proveniente del lado 5´ del tallo. El caso del brazo 5 resultó un poco más complicado ya que el cálculo del AG sugería que el producto generado del lado 3 del tallo sería seleccionado con mayor eficiencia por el RISC así mismo el contenido de adeninas y uracilos; sin embargo el análisis de conservación evolutiva sugería lo contrario como la conservación es uno de los criterios más aceptados en la definición de un miRNA decidimos sugerir la prueba de ambas secuencias para el diseño de los MREs. En el brazo 3 para el cual no se encontró conservación evolutiva significativa en ninguno de los casos (secuencia originada del 3' y del 5') se tomaron en cuenta los otros dos criterios los cuales favorecían a la secuencia generada a partir del lado 3´ del tallo.

Una vez hecha la predicción de las posibles secuencias maduras se utilizó el programa miRTAR para la predicción de posibles blancos para estas secuencias y de manera curiosa ésta búsqueda arrojó un solo blanco en el caso de las secuencias predichas para los brazos 1, 3 y 5 mientras que el promedio de blancos predichos para un miRNA promedio se encuentra alrededor de 1000 (Figura 24).

Nuestros resultados nos permiten proponer un modelo que se ilustra en la figura 25 de acuerdo con el cual el transcrito primario de let7c es procesado en el núcleo por el microprocesador no solo a nivel del precursor de dicho miRNA sino también en otros puntos de la secuencia (brazos 1, 3 y 5). Dichas estructuras se exportan al citoplasma junto con el pre-let7c una vez ahí son procesadas por Dicer de manera eficiente lo que genera que no las podamos detectar. Siguiendo la vía de maduración de los miRNAs estas estructuras podrían estarse cargando en el RISC sin embargo la ausencia de un mensajero blanco promueve su degradación evitando con ello su detección.



Figura 25. Representación del modelo propuesto para el procesamiento del transcrito primario que origina a let-7c. El transcrito primario de let-7c es procesado en el núcleo por el microprocesador no solo a nivel del precursor canónico sino también en otros puntos de la secuencia (brazos 1, 3 y 5). Dichas estructuras se exportan al citoplasma junto con el pre-let7c. Estas estructuras podrían cargarse en el RISC; sin embargo la ausencia de un mensajero blanco promueve su degradación.

La implicación de que la selección de lo que será un miRNA esté dada por la presencia o no de un blanco es interesante ya que sugiere que evolutivamente hablando el surgimiento de nuevos miRNAs va de la mano con una necesidad constante de regulación y que de requerirse un nuevo conjunto de moléculas

reguladoras no sería necesario la modificación de la maquinaria que las genera o la aparición de una nueva.

VIII. CONCLUSIONES

- A Las estructuras de tallo y asa presentes en el transcrito primario de let7c, diferentes al precursor son procesadas en el núcleo generando productos de tamaño similar al del precursor canónico.
- A Las estructuras de tallo y asa no difieren significativamente en sus características intrínsecas comparados con precursores de miRNAs y difieren aun menos si son comparadas con el pre-let7c.
- Las secuencias predichas para generar un producto maduro cumplen con los criterios establecidos para la anotación de un miRNA (conservación evolutiva y % de Adeninas y Uracilos, son generadas a partir de un precursor que forma una estructura de tallo y asa).
- \bigcirc Los brazos que generan productos de amplificación (1, 3 y 5) tienen un ∆G mayor al del brazo que no pudo ser detectado (4).

IX. PERSPECTIVAS

Con la finalidad de esclarecer si las estructuras de tallo-asa probadas en este estudio en realidad siguen la vía completa de maduración de los miRNAs y si este fenómeno no sólo se restringe al transcrito primario que da origen a let-7c propongo las siguientes perspectivas:

- Q Demostrar si el microprocesador es el responsable de la biogénesis de las estructuras detectadas (RNAi contra DROSHA y/o DGCR8).
- Investigar si estas estructuras de tallo y asa (tipo pre-miRNAs) se procesan por Dicer y posteriormente se asocian a RISC (RNAi contra Dicer y ensayos de función con un gen reportero fusionado a MREs).
- Real Explorar otros transcritos primarios que generen estructuras similares.

X. REFERENCIAS BIBILOGRÁFICAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002) Molecular Biology of the cell. Garland Science. USA
- Andersson MG, Haasnoot PC, Xu N, Berenjian S, Berkhou B, Akusjarvi G. (2005). Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. J Virol 79: 9556–9565.
- Apirion D, Miczak A (1993): RNA processing in prokaryotic cells. Bioessays, 15:113-120.
- Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T. (2003). The small RNA profile during Drosophila melanogaster development. Dev. Cell 5: 337–350.
- Axtell MJ, Bowman JL. (2008). Evolution of plant microRNAs and their targets.Trends Plant Sci. 13: 343-349.
- Bartel DP. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116: 281–297.
- Basyuk E, Suavet F, Doglio A, Bordone R, Bertrand E. (2003). Human let-7 precursors harbor features of RNase III cleavage products. Nucleid Acids Res. 31:6593-6597.
- Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC. (2007). Mol. Cell 28:328–336.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409: 363–366.
- Billy E, Brondani V, Zhang H, Muller U, Filipowicz W. (2001). Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. Proc Natl Acad Sci USA 98: 14428–14433.
- Blaszczyk J, Tropea JE, Bubunenko M, Routzahn KM, Waugh DS, Court DL, Ji X (2001), Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. Structure 9:1225-1236
- Blow MJ, Grocock RJ, van Dongen S, Enright AJ, Dicks E, Futreal PA (2006). RNA editing of human micro- RNAs. Genome Biol 7: R27.
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. RNA 10: 185–191.
- Bonnet E, Wuyst J, Rouze P, Van de Peer Y. (2004). Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower holding free energies than random secuences. Bioinformatics 20: 2911-2917.
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. Nat. Struct. Mol. Biol. 13: 1097–1101.
- Bracht J, Hunter S, Enchus R, Weeks P, Pasquinelli AE. (2004). Trans-splicing and polyadenylation of let-7 micro-RNA primary transcripts. RNA 10: 1586– 1594.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. (2005). Principles of microRNAtarget recognition. PLoS Biol 3: e85.
- Brown TA. (1999) Genomes. Wiley-Liss. New York.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as RNAms. RNA 10: 1957–1966.
- Caudy AA, Ketting R F, Hammond S M, Denli A M, Bathoorn A M, Tops B B, Silva JM, Myers MM, Hannon GJ, Plasterk RH. (2003). A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. Nature 425: 411 -414
- Caudy AA, Myers M, Hannon GJ, Hammond SM. (2002). Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. Genes Dev 16: 2491–2496.
- Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J,Cooch N, Nishikura K. (2005). TRBP recruits the Principles of micro-RNA production and maturation Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature 436: 740–744.
- Conaco C, Otto S, Han JJ, Mandel G. (2006). Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. Proc Natl Acad Sci USA 103: 2422–2427.
- Cullen BR. (2004). Transcription and processing of human microRNA precursors. Mol Cell 16: 861–865.
- Diederichs S, Haber D. (2006). Sequence variations in microRNA in human cancer: alterations in the predicted secondary structure do no affect the processing. Cancer Res 66: 6097-6104.

- Diederichs S, Haber D. (2007) Dual Role for Argonautes in MicroRNA Processing and Posttranscripcional Regulation of MicroRNA expression. Cell 131:1097-1108.
- Drider D, Condon C. (2004) The continuing story of endoribonuclease III. J Mol Microbiol Biotechnol 8:195-200.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, y Tuschl T. (2001) Duplexes of 21-nucleotides RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411: 494-498.
- Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C. (2005). A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. Cell 123: 819–831.
- Feinbaum R, Ambros V. (1999). The timing of lin-4 RNA accumulation controls the timing of postembryonic developmental events in *Caenorhabditis elegans*. Dev Biol 210: 87–95.
- Felsenfeld G, Groudine M. (2003) Controlling the double helix. Nature 421: 448-453.
- Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb F, Pillai RS. (2005) Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. Curr. Op. Estr. Biol. 15: 331-341.
- Filippov V, Solovyev V, Filippova M, Gill SS. (2000). A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. Gene 245: 213–221
- Fortin KR, Nicholson RH, Nicholson AW. (2002). Mouse ribonuclease III. cDNA structure, expression analysis, and chromosomal location. BMC Genomics 3: 26
- Gan J, Tropea JE, Austin BP, Court DL, Waugh DS, Ji X (2006), Structural insight into the mechanism of double-stranded RNA processing by ribonuclease III. Cell 124:355-366.
- Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N. (2004). The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. Nature 432: 235–240.
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. Cell 106: 23–34.

- Gwizdek C, Ossareh-Nazari B, Brownawell AM, Doglio A, Bertrand E, Macara IG. (2003). Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. J Biol Chem 278: 5505–5508.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. (2004). The Drosha–DGCR8 complex in primary microRNA processing. Genes Dev 18: 3016–3027.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. Cell 125: 887–901.
- Johnson SM, Lin S-Y, Slack FJ. (2003). The time of appearance of the C. elegans let-7 microRNA is transcriptionally controlled utilizing a temporal regulatory element in its promoter. Dev Biol 259: 364–379.
- Johnston Jr RJ, Hobert O. (2003). A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in Caenorhabditis elegans. Nature 426: 845–849.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell 115: 209–216.
- Kim VN. (2005a) Small RNAs: Classification, Biogenesis, and Function *Mol. Cells, Vol. 19, No. 1, pp. 1-15
- Kim VN. (2005b). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat Rev Mol Cell Biol 6: 376–385.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science 294: 853–858.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. (2003). New microRNAs from mouse and human. *9*: 175–179
- Lai EC. (2004). Predicting and validating microRNA targets. Genome Biol. 5: 115
- Lamontagne B, Larose S, Boulanger J, Elela SA (2001) The RNase III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism. Curr Issues Mol Biol, 3:71-78.
- Landgraf Pablo Landgraf, Mirabela Rusu, Robert Sheridan, Alain Sewer, Incola Iovino, Alexei Aravin, Sebastien Pfeffer, Amanda Rice, 1 Alice O. Kamphorst, Markus Landthaler, Carolina Lin, Nicholas D. Socci, Leandro Hermida, Valerio Fulci, Sabina Chiaretti, Robin Foa, Julia Schliwka, Uta Fuchs, Astrid Novosel, Roman-Ulrich Müller, Bernhard Schermer, Ute Bissels, Jason Inman, Quang Phan, Minchen Chien, David B. Weir, Ruchi Choksi, Gabriella De Vita, Daniela Frezzetti, Hans-Ingo Trompeter, Veit Hornung, Grace Teng, Gunther Hartmann, Miklos Palkovits, Roberto Di Lauro, Peter Wernet, Giuseppe Macino, Charles E. Rogler, James W. Nagle, Jingyue Ju, F. Nina

Papavasiliou, Thomas Benzing, Peter Lichter, Wayne Tam, Michael J. Brownstein, Andreas Bosio, Arndt Borkhardt, James J. Russo, Chris Sander, Mihaela Zavolan, Thomas Tuschl. (2007) A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. Cell, 129:1401-1414.

- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. Science 294: 858–862.
- Lee RC, Ambros V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. Science 294: 862–864.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J. (2003). The nuclear RNaseIII Drosha initiates microRNA processing. Nature 425: 415–419.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. EMBO J. 21: 4663-4670.
- Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. EMBO J 25: 522–532.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. EMBO J 23: 4051–4060.
- Lewin, B. (2004). Genes VIII. Pearson Prentice Hall. NJ
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel, DP, Burge CB. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. Cell 115: 787 -798
- Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW. (2003). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. Genes Dev 17: 991–1008.
- Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M. (2003). Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. Nature 426: 465–469.
- Liu J. (2008). Control of protein synthesis and RNAm degradation by microRNAs. Curr Opin Cell Biol 20: 214-221
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. Science 305: 1437– 1441.
- Luciano DJ, Mirsky H, Vendetti NJ, Maas S. (2004). RNA editing of a miRNA precursor. RNA 10: 1174–1177.
- Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. Science 303: 95–98.

- Mallory AC, Bouché N. (2008). MicroRNA-directed regulation: to cleave or not to cleave. Trends Plant Sci.13: 359-67.
- Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. Genes Dev 16: 720–728.
- Nelson DL, Cox MM. (2005). Lehninger. Principios de Bioquímica Omega. España.
- Nelson P, Kiriakidou M, Sharma A, Mourelatos Z. (2003). The microRNA world: small is mighty. Trends Biochem Sci 28: 534-540.
- Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. (2007). Cell 130: 89–100.
- Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grasser FA. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. Nat Methods 2: 269–276.
- Qi Y, Denli AM, Hannon GJ. (2005). Biochemical Specialization within Arabidopsis RNA Silencing Pathways. *Mol. Cell* 19: 421-428.
- Rand TA, Ginalski K, Grishin NV, Wang X. (2004). Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 14385 -14389.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. Nature 403: 901–906.
- Ritchie W, Legendre M, Gautheret D. (2007). RNA stem-loops: To be or not to be cleaved by RNAse III. HYPOTHESIS 13: 1-6.
- Robertson H, Webster R, Zinder N (1968). Purification and properties of ribonuclease III fron *Escherichia coli*. J Biol Chem 243: 82-91.
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. Genome Res 14: 1902–1910.
- Roush S, Slack F. (2008). The *let-7* family of microRNAs. Trends in Cell Biology 18: 505-516.
- Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. Nature 448: 83–86.

- Saetrom P, Snove O, Nedland M, Grunfeld T, Canon J. (2006). Conserved MicroRNA Characteristics in Mammals. Oligonucleotides 16: 115-144.
- Sarnow P, Jopling CL, Norman KL, Shutz S, Wehner KA. (2006). MicroRNAs: expression, avoidance and subversion by vertebrate viruses. Nat. Rev. Microbiol. 4:651-659.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. Cell 115: 199–208.
- Seitz H, Ghildiyal M, Zamore PD. (2008). Argonaute loading improves the 5' precision of both microRNAs an their miRNA* strands in flies. Current Biology 18:147-151
- Shukla LI, Chinnusamy V, Sunkar R. (2008) The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses. Biochim Biophys Acta. 1779: 743-8.
- Sokol NS, Ambros V. (2005). Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. Genes Dev 19: 2343–2354.
- Song JJ, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. Nat Struct Biol 10: 1026–1032.
- Tam W. (2001). Identification and characterization of human BIC a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. Gene 274: 157–167.
- Westphal H, Crouch RJ: Cleavage of adenovirus messenger RNA and of 28S and 18S ribosomal RNA by RNase III (1975). Proc Natl Acad Sci USA, 72: 3077-3081.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. Cell 75: 855–862.
- Wu H, Xu H, Miraglia LJ, Crooke ST. (2000). Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. J. Biol. Chem. 275: 36957– 36965.
- Wu H, Henras A, Chanfreau G, Feigon J (2004). Structural basis for recognition of the AGNN tetraloop RNA fold by the doublestranded RNA-binding domain of Rnt1p RNase III. Proc Natl Acad Sci USA 101: 8307-8312.
- Yan KS, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L, Zhou MM. (2003). Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. Nature 426: 465–469.

- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes Dev 17: 3011–3016.
- Hervé Seitz, Phillip D. Zamore. (2006). Rethinking the Microprocessor. Cell 125: 827-829.
- Zeng Y, Cullen BR. (2003). Sequence requirements for microRNA processing and function in human cells. RNA 9: 112–123.
- Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. EMBO J 21: 5875–5885.
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNaseIII. Cell 118: 57–68.
- Zhang H, Pan X, Cox S, Cobb G, Anderson T. (2006). Evidence that miRNAs are different from other RNAs. Cell Mol Life Sci 63: 246-254.
- Zhao Y, Samal E, Srivastava D. (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. Nature 436: 214–220.