

Caracterización
de los
mecanismos
de acción de
microRNAs.

Tesis de Doctorado.
Programa de Doctorado en
Ciencias Biomédicas.
UNAM.

Alumno:
Carlos Fabián Flores Jasso

Tutor principal:
Luis Alfonso Vaca Domínguez



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.

*A mí Alma Mater,
Universidad Nacional Autónoma de México.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por abrir espacios y ofrecer oportunidades.

Al Dr. Luis Alfonso Vaca, por haberme dejado ser parte de su grupo de investigación.

A mi comité tutorial Jesús Chimal, Herminia Loza e Iván Velasco, por toda su paciencia durante mis estudios de doctorado.

A mi comité sinodal de tesis, por enriquecer el escrito final.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Quiero aprovechar la oportunidad de agradecer a todos los que directa e indirectamente, colaboraron con la realización de la investigación, escritura de tesis y proceso de graduación:

A Selma Eréndira Avendaño Vázquez, por moldear mi mente en todo momento. Por levantarme cuando estuve en el piso; por bajarme cuando el estrellato me abrumaba; por escucharme y por entender mis garabatos y esbozos de ideas en servilletas. Por tu amor; ya que sin él, habría estado muy, muy difícil.

A Serendipia, por la catarsis de las *botellas* y *el cognac* que tanto ayuda en la investigación. Por los planes, por las ideas, por el futuro. Porque sin tu ayuda, pienso que seguiría con los trámites.

A los miembros del lab. 126 norte que se cruzaron conmigo durante mi estancia, ya que las tardes de *turuu* me hicieron llevadera la frustrante vida de la investigación y marcaron en mí una etapa importante que no olvidaré nunca.

A mis cuernavacos favoritos, Pepe, Caty, Alejandra, Cecilia, por todo lo que me enseñaron y por alentarme a volar alto. Porque sin ellos esta tesis no se hubiera hecho nunca *literalmente*.

A mis *salvavidas vacacionales findesemanescos* que me salvaron el pellejo varias veces cuando no tenía nadie a quien recurrir: los Félix y Valentín.

A Benito, carnalito gracias por todos tus consejos de la vida, si ellos estoy seguro que no estaría donde estoy ahora, *may the force!*

To Phil Zamore, for all your support, and comprehension for my thesis. For teaching me science, and for giving me an opportunity.

To the Zamorons, Thank you guys for all your support while I was writing my thesis, and for pushing me forward on my defense. Specially, Stefan and Jen, for bugging me up *every day* until I finished writing.

A mi familia, Julia, Juan, Roberto, Margarita, Guadalupe y Aurelia, por haberme apoyado hasta este momento de mi vida incondicionalmente. Por quitarse el pan de la boca para que yo comiera y llegara hasta este nivel de estudios. Por nunca desalentarme. Por cuidarme. Y por enseñarme lo que significa la perseverancia.

Y por último quiero agradecer a mi madre, porque gracias a ella entendí que la vida a veces ofrece cosas que uno puede tomar fácilmente; pero cuando no es así, uno tiene que ir y arrebataráselas.

ÍNDICE

Página

ABSTRACT.....	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 El descubrimiento de los miRNAs y del RNAi.	6
1.2 Biogénesis general de los miRNAs.	9
1.3 Reconocimiento de mRNAs por miRNAs: Una mirada más cercana.	11
1.4 Identificación de miRNAs.	15
1.5 Dicer y el modelo de corte.	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVO	22
2.1 Objetivos específicos.	23

RESULTADOS	25
3.1 Precursores usados en este trabajo.....	25
3.2 Corte de precursores por Dicer recombinante.....	31
3.3 Dicer procesa diferencialmente las hebras en los pre-miRNAs.....	34
3.4 Identificación de los productos de Dicer.....	39
DISCUSIÓN.....	44
PERSPECTIVAS.....	51
MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
REFERENCIAS.....	57
ANEXOS.....	63

ABSTRACT

Human Dicer (hDicer) is a ~220 kDa protein that contains an N-terminal DExH-box RNA helicase-like domain, a domain of unknown function (DUF283), a PIWI-Argonaute-Zwille (PAZ) domain, two RNase-III domains (RIIIa and RIIIb), and a double stranded RNA binding domain (dsRBD). Biochemical and crystallographic analyses of hDicer indicate that Mg^{2+} is required for RNA cleavage, whereas ATP is not required. Analysis of dsRNA processing using hDicer enzymes engineered with specific RIII domain mutations reveals that hDicer contains a single dsRNA processing center formed via intramolecular dimerization of the two RIII domains that function independently to cleave phosphodiester bonds on opposite strands of the dsRNA substrate. hDicer has been shown to associate with a molecular protein partner— the human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein (TRBP)— to process pre-miRNAs.

Our aim was to investigate the existence of a differential first-cleavage in human pre-miRNAs by human Dicer *in vitro*. We used a series of *in vitro* transcribed pre-miRNAs radioactively labeled at their 5' or 3' ends. Pre-miRNAs samples were purified by denaturing and native PAGE and only the stem-loop structures were used for experiments with a recombinant human Dicer or HeLa cytoplasmic S100 extracts. Products of cleavage reactions were resolved by denaturing PAGE, and scanned by phosphor-imaging. Our results show that recombinant hDicer performs a first-cleavage in the pre-let-

7b and hsa-pre-miR-17 3' strand. This result is recapitulated in HeLa S100 cytoplasmic extracts. We conclude that the differential first-nick is observed in cleavage reactions only when stem-loops are substrates for hDicer. We propose new model to explain such differences.

RESUMEN

Los microRNAs son RNAs de ~22 nucleótidos, no-codificantes, que detienen la traducción de RNAs mensajeros al unirse a las regiones 3' no traducibles de éstos. En el núcleo, los precursores de microRNAs forman estructuras de tallo y asa que son exportadas al citoplasma. En el citoplasma, la RNasa Dicer corta precursores de microRNAs y remueve el asa para dar lugar a los microRNAs maduros. A pesar de la intensa investigación que hay acerca de la biogénesis y funcionamiento de microRNAs, poco se sabe del procesamiento de la RNasa Dicer sobre los precursores en forma de tallo y asa. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo fue investigar cómo es el procesamiento de Dicer de humano sobre diversos precursores de miRNAs. Nuestros resultados demuestran que la RNasa Dicer de humano no corta con precisión los precursores de tallo y asa sino que da una gama de cortes muy cercanos al sitio de corte *bona fide*. Encontramos también que al cortar el tallo, Dicer prefiere cortar una de las dos hebras primero; es decir, que el primer nick no es indistinto sino que, dependiendo del precursor de que se trate, se escoge una de las dos hebras. Con base en nuestros resultados hemos propuesto un modelo molecular que explica— además de nuestros resultados— algunas discrepancias que existen en el modelo actual de biogénesis de microRNAs.

El mejor guerrero, no es el que conquista al mundo entero, sino el que se conquista a sí mismo.

INTRODUCCIÓN

En la última década, la forma de estudiar las ciencias de la vida ha sido transformada profundamente debido al desarrollo de nuevas y poderosas técnicas de biología molecular. Esta transformación ha ocurrido desde varios frentes, uno de ellos fue el descubrimiento de pequeños RNAs no codificantes que— además de ser una herramienta muy útil— regulan, de manera natural, la expresión de genes y genomas⁵. Dicha regulación puede ocurrir en varios niveles del modelo central de la biología molecular; por ejemplo, traducción de proteínas, estabilidad del RNAs mensajeros (mRNAs), e inclusive transcripción de RNAs y modificación de la cromatina^{6,7}. El efecto de los RNAs pequeños es principalmente inhibitorio sobre los procesos celulares a los que regulan; razón por la cual, a este tipo de inhibición se le conoce como silenciamiento por RNA^{8,9}.

Una característica fundamental del silenciamiento por RNA es que los RNAs pequeños “guían” el efecto inhibitorio por complementación base–base con sus RNAs blanco¹⁰. Las proteínas que promueven la complementación

base–base pertenecen a la súper familia de Argonautas; las cuales son, finalmente, los componentes efectores que disparan el silenciamiento por RNA^{11,12}.

Aunque cientos de RNAs pequeños han sido identificados a la fecha, varios aspectos de sus orígenes, estructuras, proteínas efectoras asociadas, y sus funciones biológicas, han permitido agruparlos en tres grandes categorías^{6,7}: RNAs pequeños interferentes (siRNAs—del inglés short interfering RNAs)¹³; microRNAs (miRNAs)^{14,15}; y RNAs que interaccionan con piwi (piRNAs—del inglés piwi interacting RNAs)¹⁶. Estos RNAs han sido identificados solamente en eucariontes, aunque las proteínas efectoras o los dominios proteínicos más representativos han sido encontrados en algunas bacterias y arqueas^{11,17-23}. Mientras más se sabe de las tres clases de RNAs pequeños, más difícil es identificar las fronteras biológicas que los caracterizan; así como sus correspondientes roles catalíticos. Sin embargo, por las funciones que llevan a cabo se sabe que los miRNAs y siRNAs son la clase más representativa⁶, y ejercen sus efectos regulando la estabilidad de sus mRNAs complementarios; en plantas y algunos animales, regulan— además— la estructura de la cromatina⁶. Los piRNAs son la clase encontrada más recientemente, y ejercen sus efectos en la línea germinal regulando transposones en animales^{6,7}; en plantas, los RNAs equivalentes a piRNAs son conocidos como rasiRNAs (del inglés Repeat Associated small interfering RNAs)^{19,24}.

En la presente tesis, nuestro trabajo estuvo enfocado a la biogénesis de los miRNAs en humanos, así como a las posibles implicaciones de su fisiología y efecto regulatorio sobre sus mRNA blanco.

1.1 El descubrimiento de los miRNAs y del RNAi.

En el año 1993, un grupo de investigadores de la Universidad de Harvard se encontraba estudiando la regulación del desarrollo larvario en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*²⁵. El gen en el que centraban su atención era *lin-4*, el cual es esencial para el desarrollo del nematodo. Lo único que sabían era que, en la etapa larvaria 1, el gen *lin-4* regula negativamente los niveles de una proteína llamada LIN-14. Mostrando una gran pericia y perseverancia, el grupo dirigido por Victor Ambros encontró que *lin-4* no es un gen que codifica para una proteína, sino que da origen a dos RNAs: uno de 22 nucleótidos (nt), y el otro aproximadamente de 60 nt— que podría ser el precursor del primer²⁶. Tiempo después, se descubrió que la manera en la que el RNA *lin-4* de 22 nt regula la producción de la proteína LIN-14, es uniéndose al mRNA de *lin-4* por complementariedad de bases en su región no traducible 3' (UTR 3'), evitando así, su traducción²⁷. Éstas fueron las primeras observaciones descritas en las que un RNA pequeño se unía directamente a un mRNA para inhibir su expresión⁵. Sin embargo, la importancia de dicho descubrimiento se mantuvo latente hasta el año 2001, cuando se encontraron decenas de RNAs cercanos a los 21 nt en el mismo

nemátodo (*C. elegans*)^{28,29}, en plantas (*Arabidopsis thaliana*)²⁹, en moscas (*D. melanogaster*)³⁰ y en vertebrados (*H. sapiens*)³⁰. A estos RNAs recién descubiertos se les bautizó como microRNAs²⁸⁻³¹.

Actualmente, se sabe que los miRNAs regulan la expresión de un sinnúmero de mRNAs involucrados en diferentes procesos celulares y tisulares tales como la diferenciación, la proliferación y la muerte celular, metabolismo de azúcar, hipertrofia cardíaca, formación de tumores, control de infecciones virales, entre muchas otras³²⁻³⁵. A la fecha, se han encontrado cientos de miRNAs; algunos se encuentran conservados en especies filogenéticamente muy alejadas, lo que sugiere que la regulación por miRNAs es un mecanismo que adoptaron los organismos multicelulares tempranamente en la evolución³⁶⁻⁴². El enorme número de miRNAs que se han descubierto fue motivo para que la comunidad que los estudia desarrollara una base de datos especializada en la que se anotan y organizan, y en algunos casos, se incluye información sobre los posibles mRNA que éstos regulan⁴³⁻⁴⁶. A pesar de que la lista de miRNAs encontrados experimentalmente sigue creciendo, aún no se han identificado todos: en humanos se calcula que aproximadamente el 1-2 % de los genes corresponden a miRNAs, y éstos, a su vez, podrían regular hasta un 30% del genoma humano⁴³⁻⁴⁶.

Casi paralelamente a los primeros ejemplos de clonación e identificación de miRNAs— en 1998, se hizo uno de los descubrimientos más

asombrosos de la biología moderna. En su trabajo— conocido como “*el paper de Fire y Mello*”, el grupo de Craig Mello reportó en la revista *Nature*, que al introducir en *C. elegans* RNA de doble hebra (dsRNA), éste disparaba la degradación del mRNA al cual era complementario⁴⁷. Dicho descubrimiento no pasó desapercibido para la comunidad científica que trabajaba con RNA; rápidamente, algunos laboratorios se dieron a la tarea de estudiar los mecanismos básicos de este fenómeno, y a comprobar si éste ocurría también en otras especies. Al ser comprobado en plantas, levaduras y en mamíferos (incluyendo células humanas), el fenómeno se dio a conocer como interferencia por RNA (RNAi; del inglés RNA interference); descubrimiento que en el año 2006 fue galardonado con el Premio Nobel⁵.

Uno de los aspectos más interesantes del descubrimiento del RNAi— como lo señalaron sus descubridores— es que “Probablemente existe por una razón biológica”⁴⁷. Y tal es el caso. Inmediatamente después de su reporte en animales, comenzó una oleada de trabajos dedicados a disecar bioquímicamente el RNAi⁴⁸. Fue entonces cuando los mecanismos celulares de los miRNAs empezaron a descubrirse, ya que las proteínas que llevan a cabo el RNAi, son las responsables de procesar y regular a los miRNAs⁴⁸⁻⁵¹.

1.2 Biogénesis general de los miRNAs.

Aunque los miRNAs son RNAs no codificantes, son considerados genes que regulan otros genes¹⁵. Existen numerosos ejemplos en donde los miRNAs están embebidos dentro de regiones intergénicas que son transcritas por promotores no completamente identificados⁵²; también pueden ser encontrados dentro de regiones codificadoras⁵² o en intrones⁵³. El modelo actual de la biogénesis de los miRNAs en mamíferos es el siguiente: los RNAs que contienen a los miRNAs son transcritos ya sea por RNA polimerasas tipo II o III (Figura 1, parte superior, región en rojo); tales transcritos pueden contener uno o varios miRNAs concatenados. La región que contiene al miRNA se pliega a manera de tallo y asa (pri-miRNA), y es reconocida y procesada por el Complejo microprocesador, el cual contiene a la RNasa tipo III llamada Drosha⁵⁴, que junto con su pareja catalítica DGCR8⁵⁵, acortan el tallo, produciendo así, lo que se conoce como precursores de miRNAs (pre-miRNAs)⁵⁶ (Figura 1). En un proceso dependiente de GTP, los pre-miRNAs son exportados hacia el citoplasma por medio de la Exportina 5^{57,58}, donde son reconocidos por otra RNasa tipo III llamada Dicer^{3,51,59}, que actúa junto con la proteína TRBP para remover el asa del pre-miRNA^{60,61}. La doble hebra del miRNA (miRNA dúplex), es cargada en el complejo multi-proteínico RISC (del inglés RNA Induced Silencing Complex)^{60,62-64}, que contiene a la proteína Argonauta (Ago/RISC)⁶⁰. El cargado del miRNA dúplex es simultáneo a la destrucción de una de las dos hebras en el dúplex (miRNA*), quedando así, el miRNA maduro en Ago/RISC (Figura 1, miRNA

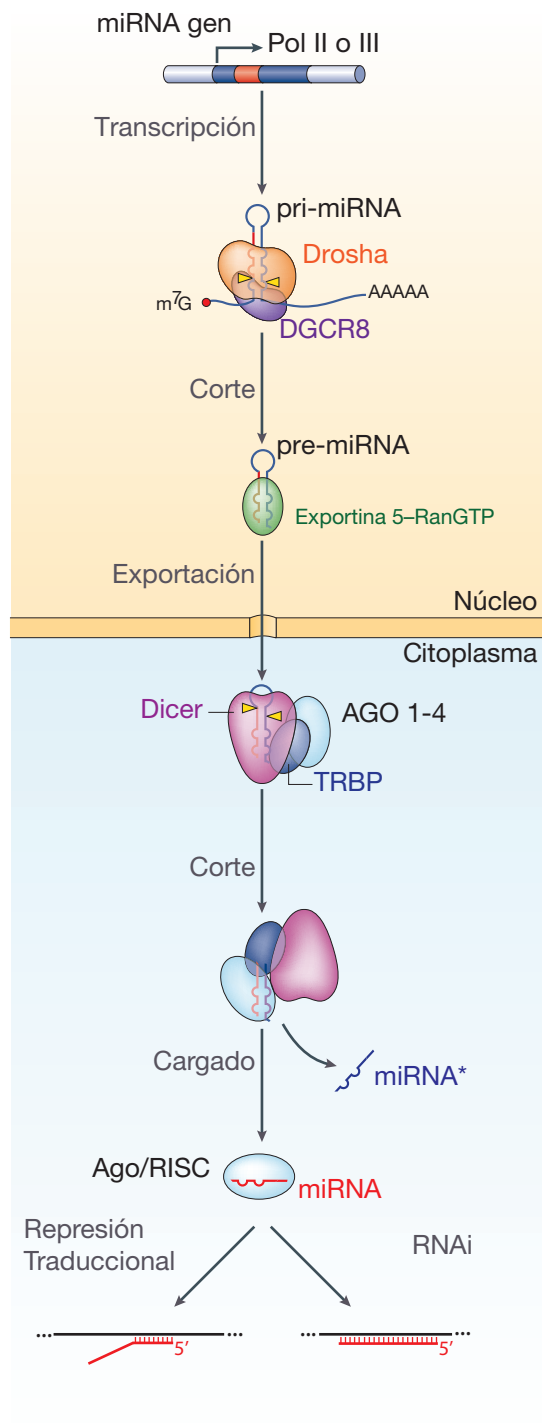


Figura 1. Biogénesis de miRNAs

rojo)⁶⁵. El complejo Ago/RISC-miRNA puede entonces hibridar al miRNA con un mRNA blanco. Cuando la hibridación se lleva a cabo en las regiones UTR 3' y es parcial, se genera la Represión Traduccional del mRNA^{66,67}; sin embargo, cuando la hibridación es completa y en las regiones codificantes de los mRNAs, se dispara el RNAi y se degrada el mRNA en cuestión⁶⁶⁻⁶⁸.

1.3 Reconocimiento de mRNAs por miRNAs: una mirada cercana.

Una de las cuestiones más intrigantes de los miRNAs es qué es lo que convierte a un RNA en miRNA, y cómo reconocen éstos a sus mRNAs blanco. Hasta el momento no se sabe con exactitud. El panorama que se tiene actualmente es el siguiente: Drosha procesa a los pri-miRNAs reconociendo tallos y asas de RNA (que regularmente no muestran apareamientos perfectos) de cierto tamaño en el núcleo⁶⁹. Por un mecanismo poco comprendido molecularmente, se ha propuesto que Drosha “mide” la longitud del tallo, y corta en la región más distal al asa— aproximadamente 30 nt (Figura 2, A; flechas amarillas)⁶⁹. En el citoplasma, ocurre algo parecido, sólo que esta vez, Dicer corta al pre-miRNA midiendo aproximadamente 22 nt a partir del extremo que el Drosha definió (Figura 2, B; flechas amarillas)^{1,31,70}. Es importante señalar que tanto Drosha o Dicer no reconocen ningún tipo de secuencia específica, por lo tanto, hasta este paso catalítico, es imposible saber cuál de las dos hebras es el miRNA. Un sello característico de las RNAsa tipo III, es que el producto del corte es un dsRNA que contiene 2

nt salientes y grupos OH en los extremos 3'; y monofosfatos en los extremos 5' (Figura 2, B)^{1,31,70}.

Al ser generado el miRNA dúplex y ser cargado en Ago/RISC, ocurre la selección del miRNA; o hebra guía, para el caso de siRNAs. En un trabajo excepcionalmente elegante, el grupo de Phillip Zamore demostró cómo ocurre este proceso en *D. melanogaster*⁷¹. Usando lysados de embrión de moscas, Zamore y colaboradores mostraron que una proteína con dos dominios de unión a dsRNA llamada R2D2, es un *sensor de asimetría* capaz de diferenciar cuál de los dos extremos del dúplex es más fácil deshibridar⁷². En otras palabras, R2D2 ayuda a Ago/RISC a conservar la hebra cuyo extremo 5' tenga un ΔG de apareamiento menos negativo⁷¹. Por ejemplo, si el extremo derecho es más fácil de deshibridar que el izquierdo (recuadros en gris), Ago/RISC destruirá la hebra de arriba (azul), y conservará la de abajo (roja) (Figura 2, C y D); y viceversa. De este modo y hasta este momento, es cuando se define cuál será la hebra correspondiente al miRNA. Un cambio de una sola base en cualquiera de las dos hebras puede ser suficiente para cambiar la asimetría del dúplex⁷¹, y hacer que el miRNA* se seleccione como miRNA, y viceversa— lo cual provoca que se seleccione un blanco distinto. Por lo tanto, la función de las RNasas que procesan a los miRNA es esencial para definir lo que será finalmente un miRNA. Después del corte por Dicer y Drosha, no hay otro paso catalítico— reportado a la fecha— que modifique los extremos del dúplex, y por lo tanto, la precisión con la que corten es un paso definitivo para establecer tanto la secuencia como la longitud del miRNA.

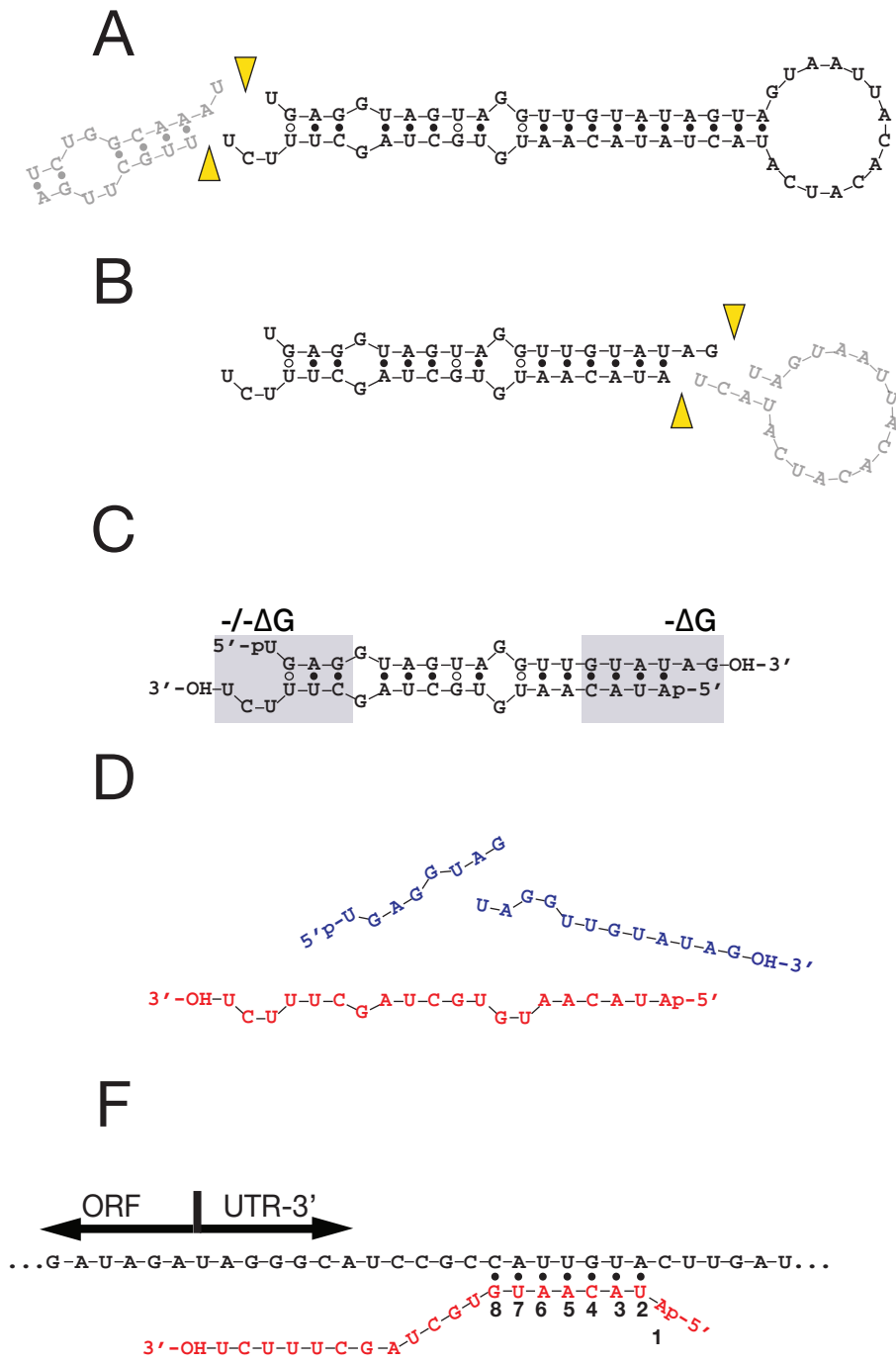


Figura 2. Procesamiento de miRNAs

Una vez cargado el miRNA de hebra sencilla de aproximadamente 22 nt y ensamblado el complejo Ago/RISC— cuyas proteínas no han sido identificadas por completo, éste hibrida a un mRNA para efectuar la represión traduccional⁷¹. Al encontrar su blanco, las bases del miRNA que se aparean con las regiones UTR 3' son únicamente las que corresponden a las posiciones 2 a 8; todas las demás posiciones pueden estar deshibridadas, y aún así, el miRNA es completamente funcional (Figura 2, F)⁴¹. De estudios cristalográficos y bioquímicos, se sabe que la posición 1 del miRNA está dentro de una bolsa de unión (binding pocket), y no participa en la unión al blanco incluso si dicha posición es complementaria a éste último⁷³⁻⁷⁵. El desapareamiento en las posiciones 10 y 11 son importantes para que se lleve a cabo la represión traduccional y no se corte el blanco— como ocurre en el RNAi⁷⁴. Poco se sabe de la función de las bases 12 en adelante (Figura 2, F); se ha propuesto que el extremo 3' está asociado al dominio PAZ, que es característico en la familia de los Argonautas^{12,76-78}.

Es difícil imaginar cómo habiendo una complementariedad tan reducida se logra la especificidad entre los miles de transcritos y millones de posibles secuencias a los que cada miRNA se puede hibridar. El encontrar a los blancos *bona fide* de cada miRNA es todo un paradigma para el campo actualmente^{41,52}. Se han desarrollado una veintena de algoritmos de predicción de blancos de miRNAs; todos ellos consideran combinatorias distintas en los parámetros de predicción y arrojan diferentes resultados al resto^{41,52}. No existe uno solo que sea 100% eficaz, ya que para cada miRNA

existen en promedio 100 diferentes blancos; y para cada blanco existen al menos 20 diferentes miRNAs que potencialmente podrían regular a dicho mRNA. Hay casos en los que más de un algoritmo predice, con alta probabilidad, un cierto blanco para un miRNA dado, sin embargo, al intentar comprobar experimentalmente, no se encuentra ninguna asociación entre ambos⁴¹; lo cual constituye un motivo de desconcierto en la comunidad que estudia miRNAs.

1.4 Identificación de miRNAs.

La identificación de miRNAs es una tarea muy laboriosa y compleja. La razón de ello es sencilla, no todos los RNAs de 22 nucleótidos son miRNAs. Cuando alguien se da a la tarea de identificar miRNAs por técnicas de clonación, la degradación de RNA es algo inherente al método que se escoge, sea cual sea la técnica. Así que, entre los cientos y en algunos casos miles, de secuencias de posibles miRNAs es necesario descartar todas aquellas de las que se sospeche sean un producto de degradación de un RNA de mayor tamaño. Desafortunadamente, la única forma de descartarlas es identificándolas una por una, y esto sólo ocurre después de haberlas clonado y secuenciado. En general, los miRNAs sólo corresponden a un pequeño porcentaje del total de las secuencias obtenidas, ya que en su mayoría se aíslan fragmentos de RNAs ribosomales, fragmentos de mRNAs

abundantes, de tRNAs, etc., en pocas palabras, es posible clonar cualquier RNA que se degrade.

Entonces, ¿cómo se identifica a un microRNA? Una de las estrategias más utilizadas consiste en realizar un análisis bioinformático a partir de los cientos de secuencias de RNAs pequeños obtenidas de la clonación y secuenciación, y compararlas con diferentes bases de datos⁷⁹⁻⁹³. Todo ello con la finalidad primaria de identificar a qué corresponde cada una de las secuencias aisladas. De esta manera se eliminan los fragmentos que corresponden a RNAs previamente conocidos (RNAs ribosomales, tRNAs, etc). Sin embargo, no todos los RNAs depurados corresponden a miRNAs; todavía podrían existir muchas secuencias que no hayan sido identificadas que podrían ser confundidas con miRNAs. Por lo tanto, el siguiente paso es ubicar el *locus* o los posibles *loci* en el genoma, y explorar si los posibles transcritos de éste (o éstos), pueden formar una estructura tallo y asa. La formación del tallo y asa en la secuencia del *locus* correspondiente es un requerimiento esencial para considerar a un miRNA como verdadero. Sin embargo, no necesariamente todos los tallos y asas son pre-miRNAs (!). Por esta última razón se hace obligatorio un análisis bioinformático adicional dirigido a identificar secuencias conservadas en otras especies. Por ejemplo, el miRNA let-7 es exactamente igual entre *C. elegans*, *D. melanogaster* y *H. sapiens*^{28,30}. Por último y como confirmación, generalmente se hacen experimentos tipo Northern blot con la finalidad de comprobar la expresión

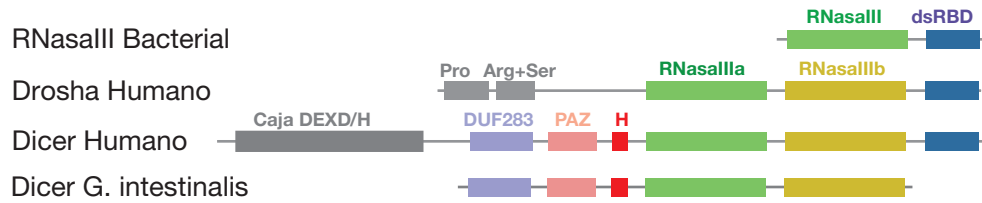
individual de las secuencias candidato. De esta manera es como se han registrado miles de miRNAs en la base de datos MirBase desde el año 2001 (<http://microrna.sanger.ac.uk>), los cuales son el resultado de largas horas de depuración bioinformática⁴³⁻⁴⁶. Aunque una buena parte de los miRNAs en humanos reportados hasta la fecha son de aproximadamente 22 nt, el tamaño de éstos puede ir desde un mínimo de 17 nt, hasta un máximo de 25 nt⁴³⁻⁴⁶.

1.5 Dicer y el modelo de corte.

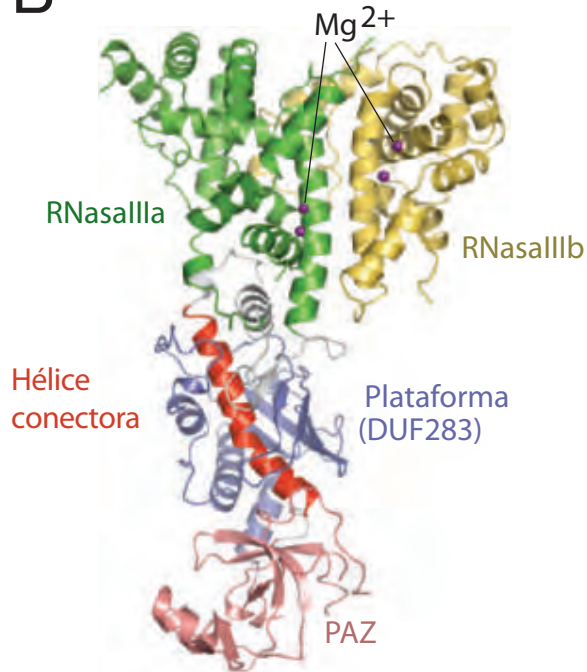
El último paso generador de los miRNAs es el corte de sus precursores por Dicer. Dicer pertenece a la familia de las RNAsas de tipo III— que son RNAsas que reconocen y cortan dsRNA⁹⁴. De ensayos bioquímicos, se sabe que Dicer corta el dsRNA perfectamente bien apareado de longitudes mayores a 30 nt en fragmentos de 21 nt^{31,70,95}. Los dsRNAs menores a 30 nt, no son sustratos para Dicer¹. El corte del dsRNA requiere de Mg²⁺, y se cree que Dicer es una RNasa “procesiva”— esto es que, dsRNAs mayores a 30 nt son cortados a fragmentos de 21 sin liberar al sustrato, hasta convertir todos los múltiplos de 21 en moléculas independientes¹(y comunicación personal).

En humanos, Dicer— como otras RNAsas tipo III— contiene un dominio de unión a dsRNA (dsRBD) y dos dominios de RNasa (RNasa a y b) (Figura 3, A)⁹⁶. Contiene además un supuesto dominio de helicasa (Figura 3, A;

A

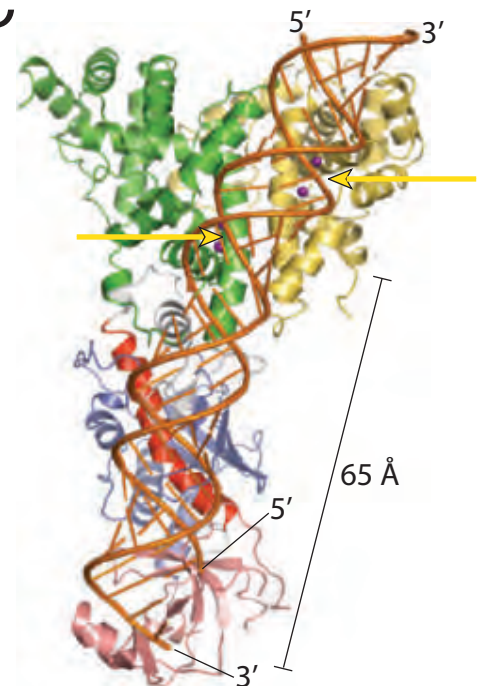


B



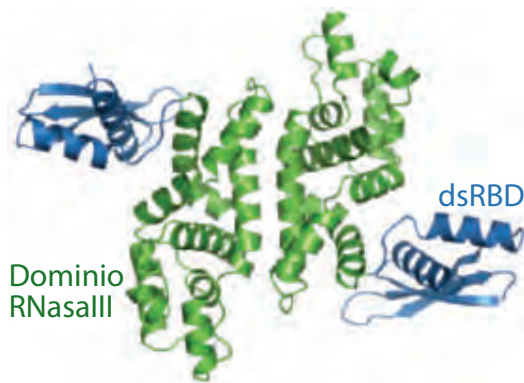
G. intestinalis Dicer

C



Modelado de Dicer con dsRNA

D



T. maritima RNasIII

E



Modelado de RNasIII con dsRNA

Figura 3. Dicer y sus modelos estructurales.

DEXD/H-gris), cuya función aún no se ha demostrado; un dominio de función desconocida (DUF283); una caja DEXD, que es rica en argininas, prolinas y serinas, (se sabe que estas cajas son dominios de unión con otras proteínas); y un dominio PAZ (por Piwi, Argonauta, Zuille), que es característico de las proteínas de la familia de los Argonautas (Figura 3, A)¹¹.

De estudios cristalográficos del Dicer de *Giardia intestinalis*, se sabe que el dominio PAZ, está alejado de los dominios de RNasa por medio de una hélice conectora (H, rojo), y el dominio DUF283, que se especula que es un dominio que puede funcionar como una plataforma para posar el dsRNA (Figura 3, B)^{97,98}. Previamente se sabía que el dominio PAZ sólo, con dsRNA perfectamente apareado, une al dsRNA por los extremos 5' y 3', y más específicamente, a los extremos 3' salientes del dsRNA⁹⁹. Utilizando esto como ayuda, se modeló el cristal de Dicer de *G. intestinalis* con dsRNA (Figura 3, C)⁹⁸. Se propuso que la plataforma y la hélice conectora proveen la distancia necesaria entre el dominio PAZ y los centros catalíticos de los dos dominios de RNasa. El dominio PAZ fijaría uno de los extremos del dsRNA, y los dominios de RNasa, alejados a una distancia de de 65 Å aproximadamente, cortan el dsRNA en fragmentos de 21 nt (Figura 3, C; flechas amarillas)⁹⁸. Después de la obtención del cristal del Dicer de *G. intestinalis*, comenzó a llamarse a Dicer “la regla molecular” (molecular ruler), dado que este modelo satisfacía la interrogante de qué hace que Dicer corte cada 21 nt los siRNAs tan característicos del RNAi⁹⁸.

En otro trabajo de cristalografía, pero esta vez de la RNasa bacteriana *T. marítima*, se encontró que ésta se encuentra en forma de homo-dímero antiparalelo (Figura 3, D)¹⁰⁰. Éste es un dato interesante, ya que el monómero contiene solamente un centro catalítico; por lo tanto, el modelo explica satisfactoriamente que para poder cortar las dos hebras del dsRNA, la RNasa bacteriana *T. marítima* actúe como homo-dímero antiparalelo (Figura 3, E)¹⁰⁰. En humanos, Dicer, a pesar de que tiene dos dominios de RNasa, solamente uno de ellos es catalítico, por lo tanto se ha propuesto que debería actuar— al igual que la RNasa bacteriana *T. marítima*, como un homo-dímero¹⁰¹.

Una pregunta fundamental para entender el modo de acción de los miRNAs es cómo reconoce Dicer el sitio preciso de corte en un precursor. Como mencioné antes, un cambio en una sola base en el dúplex, provocaría que la asimetría se cambiara y entonces se escogiera al miRNA* como miRNA. Por lo tanto, el corte por Dicer (al igual que por Drosha), debe ser lo más preciso posible para poder conservar la asimetría, y a su vez, la secuencia del miRNA. En humanos, existen 706 miRNAs reportados hasta la fecha (MirBase 13.0, Marzo 2009), y todos provienen de tallos y asas “imperfectas”⁴³⁻⁴⁶. Es decir, los tallos— además de tener desapareamientos, “*mismatches y bulges*”— son de muy diversos tamaños; igualmente, las asas de los precursores son muy variables en tamaño y forma (ver Figura 5). Dado que en humanos existe, a diferencia de otras especies, un sólo gen que codifica para Dicer. ¿Cómo, entonces, una sola proteína hace para reconocer

el sitio preciso de corte, teniendo tantos y tan diversos precursores como sustrato?

Es importante señalar que la identificación masiva de miRNA, ya sea por métodos convencionales, o por— muy recientemente— Secuenciación Profunda (Deep Sequencing), ha dado como resultado que los miRNAs no siempre muestran los extremos definidos con exactitud^{6,28-30}. En otras palabras, los extremos 5' y 3' pueden variar ligeramente; por lo tanto, de un mismo pre-miRNA, puede salir más de un miRNA con ligeras variaciones en los extremos 5' y 3'. La interpretación más sencilla es que esto se debe a un procesamiento impreciso por Dicer o por Drosha; o por diferencias debidas al método de clonación y secuenciación. Un dato interesante es que los extremos 5' casi no varían en comparación con los 3'^{102,103}. Por ejemplo, un miRNA que regularmente se identifica como una secuencia de 22 nt, con frecuencia tiene variaciones de dos o tres nt en el 3'; mientras que el 5', permanece con frecuencia intacto.

*Más vale proyecto en mano, que un
ciento volando.*

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y

OBJETIVO

A pesar de que el modelo de regla molecular satisface la incógnita de cómo procesa Dicer al dsRNA perfectamente bien apareado hasta convertirlo en fragmentos de 21 nt, no resuelve enteramente la incógnita de cómo selecciona Dicer sus sitios de corte en los pre-miRNAs. Las razones son las siguientes:

- a) Los experimentos bioquímicos y cristalográficos que se han hecho hasta la fecha con los diferentes Dicers, han sido únicamente con dsRNA, no con miRNAs o tallos y asas que simulen miRNAs.
- b) Debido a que los precursores de miRNAs varían enormemente en tamaño, termodinámica de apareamiento, secuencia y estructura, es posible que Dicer no los corte al igual que lo hace con dsRNAs de un tamaño definido.

- c) La clonación masiva de miRNAs ha dado como resultado variación en las secuencias de éstos. Con frecuencia se encuentran variaciones en el extremo 3', mientras que el 5' se mantiene fijo.
- d) No todos los miRNAs maduros son de 22 nt (no 21 nt), el intervalo de tamaño varía desde 17 nt hasta 25 nt; hecho que no corresponde con el modelo propuesto para la actividad de Dicer de regla molecular.

A pesar de que existen dichas discrepancias entre los tamaños de los miRNAs y el modelo de regla molecular de Dicer, no se ha investigado la actividad de corte con sustratos que se asemejen a los miRNAs. Es posible que la actividad de Dicer sea fundamentalmente distinta sobre los tallos y asa de miRNAs. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo fue investigar cómo es el procesamiento de Dicer de humano sobre diversos precursores de miRNAs.

2.1 Objetivos específicos.

- i) Debido a que casi no existen ejemplos de pre-miRNAs de los cuales se conozcan precisamente sus extremos 5' y 3', el primer objetivo fue mapear por clonación y secuenciación los extremos de algunos pre-miRNAs.
- ii) Teniendo identificados los extremos de los pre-miRNAs que usaríamos, hicimos la síntesis *in vitro* de los precursores marcándolos interna- o externamente con [³² P], para después hacer reacciones *in*

in vitro con un Dicer recombinante de humano y analizar los productos de los cortes por PAGE desnaturalizantes.

iii) El último objetivo fue clonar y secuenciar los productos de los cortes por Dicer recombinante, y hacer una biblioteca de los mismos para poder analizar con exactitud los extremos de los miRNAs.

Don't waste clear thinking on dirty enzymes.

RESULTADOS

MirBase es la base de datos en la que se depositan todas las nuevas de miRNAs que se van encontrando en diferentes especies. En ésta, están contenidos tanto las secuencias y tamaños de miRNAs clonados con más frecuencia, como las posibles estructuras secundarias de sus precursores⁴³. Dado que los verdaderos extremos 5' y 3' de cada precursor no se conocen (salvo algunas excepciones), las secuencias de pre-miRNAs incluidas en MirBase contienen lo que debería corresponder al precursor *bona fide*, pero incluyen además, algunos nt extra que, en teoría, corresponden al pri-miRNA de cada uno.

3.1 Precursores usados en este trabajo.

Para llevar a cabo nuestro primer objetivo, hicimos un mapeo de los extremos 5' y 3' fisiológicos del pre-miR-17 de humano (extraído de células HeLa) usando un método previamente reportado (Figura 4)¹⁰⁴. El método

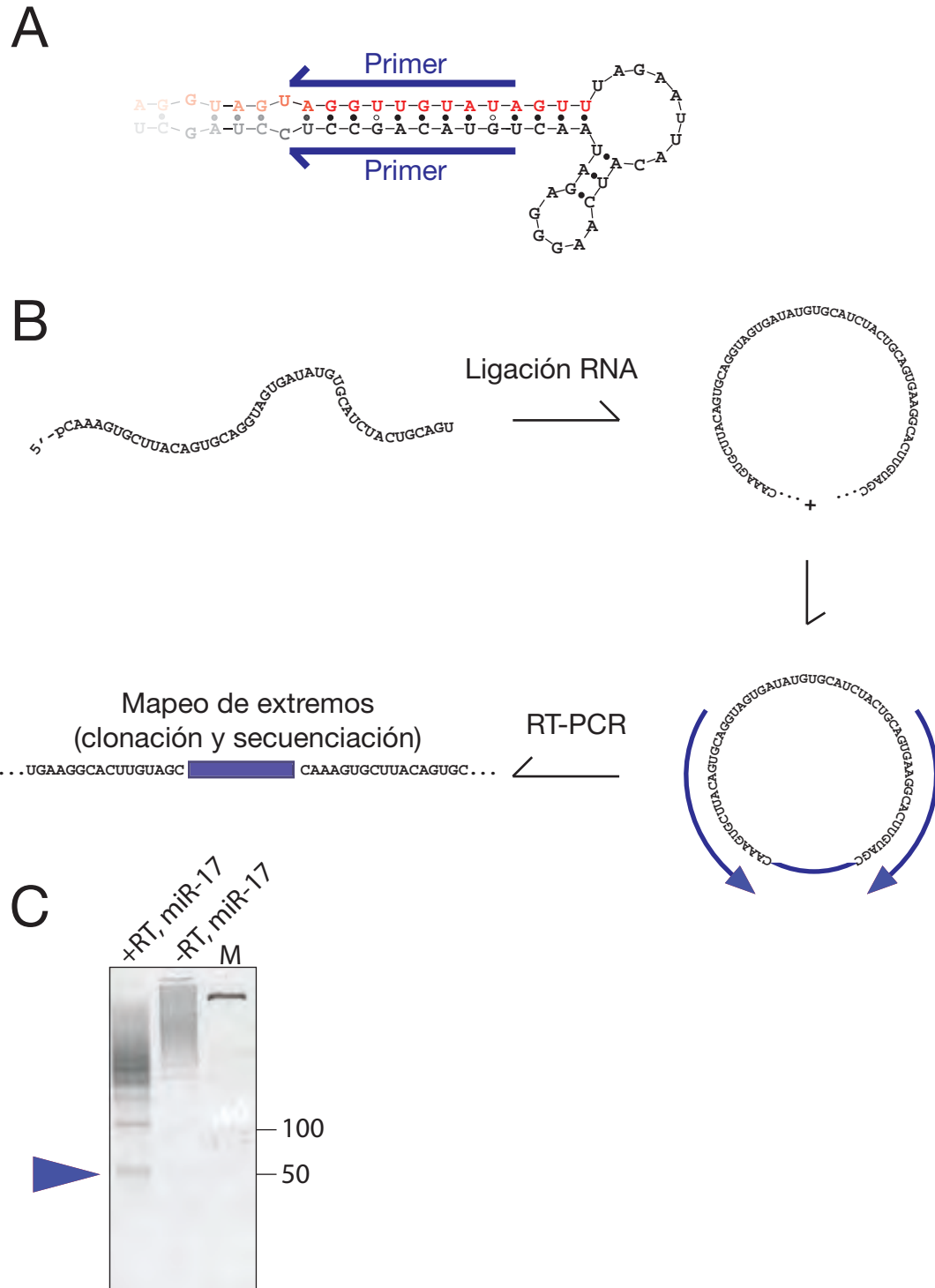


Figura 4. Mapeo de pre-miRNAs

consiste en lo siguiente. Primero se diseñan primers complementarios a las hebras del pre-miRNA para hacer un RT-PCR invertido (Figura 4, A). Después se extrae el RNA y se liga con ligasa de RNA para formar círculos y se procede al RT-PCR (Figura 4, B). El producto de PCR (aproximadamente 50 nt, Figura 4, C) se clona y se secuencia. La secuencia flanqueada por los primers corresponde a los extremos 5' y 3' reales del precursor y que se encuentran unidos uno con otro (Figura 4, B; región en azul). El último paso es comparar las secuencias obtenidas con la MirBase y usar los nt que flanquean a los miRNAs como molde, y así, identificar los productos correspondientes. En nuestro análisis intentamos mapear los extremos de 6 diferentes precursores, aunque solamente logramos mapear los extremos de pre-miR-17 (Figura 4, C; y datos no mostrados).

El mapeo de los extremos de pre-miR-17 dio como resultado que el 5' corresponde exactamente con el 5' del miR-17 maduro. Sin embargo, el extremo 3' tiene una citosina extra que sí se encuentra en el RNA correspondiente al pri-miR-17 en el MirBase. Éste es un resultado interesante ya que es comúnmente aceptado que los extremos de los miRNAs corresponden exactamente con los de sus precursores. Para nuestro estudio, hemos incluido, además de pre-miR-17, los demás precursores cuyos extremos han sido identificados a la fecha (Figura 5)¹⁰⁴. Los extremos de pre-let-7a-2, pre-let-7b y pre-mir-30a, al igual que en nuestro mapeo de pre-miR-17, no corresponden exactamente con los de sus miRNAs

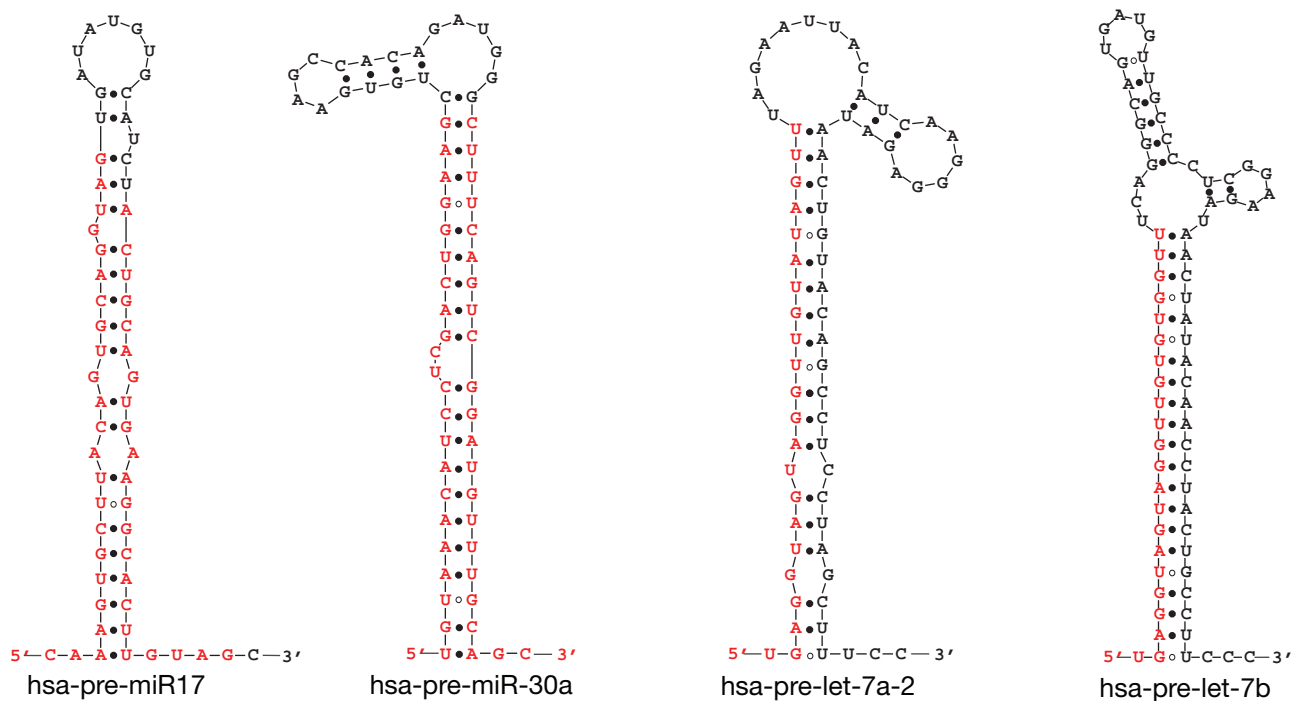


FIGURA 5. Estructuras secundarias de los precursores. Las estructuras secundarias de pre-let-7a-2, pre-let-7b, pre-mir-30a y pre-mir-17 de *Homo sapiens* fueron predichas usando el algoritmo Mfold. Las secuencias en rojo corresponden a los miRNAs maduros después del corte de Dicer. En el caso de pre-mir-30a y pre-mir-17, se ha encontrado que las dos hebras del precursor dan origen a miRNA maduros igualmente abundantes. La citidina extra en pre-mir-17 del resultado del mapeo está coloreada en negro en el extremo 3'.

correspondientes, lo que sugiere que— para estos miRNAs maduros— Drosha no definió los extremos 5'¹⁰⁴.

Para poder determinar cómo Dicer procesa los pre-miRNAs desarrollamos un método de purificación RNAs plegados en forma de tallos y asas que consiste en dos pasos de extracción de gel (PAGE). Después de la transcripción *in vitro*, los RNAs internamente marcados con ³²P se corrieron en geles desnaturizantes (UREA-PAGE), y se extrajeron las bandas correspondientes a los pre-miRNAs (Figura 6, A). Luego comprobamos su integridad en un segundo UREA-PAGE; solamente RNAs que no mostraran degradación eran considerados para el siguiente paso de purificación. Es importante señalar que después de la primera purificación desnaturizante, las RNAs que forman tallos y asas pueden seguir dos plegamientos distintos: formar un tallo y asa (Figura 6, B); o formar un homo-dímero antiparalelo (Figura 6, C). Al ser encontrado por Dicer, el homo-dímero sería reconocido como cualquier dsRNA ya que contiene los extremos característicos de las RNAsas tipo III, y el dominio PAZ podría unirlos— para después ser procesado. Por tal motivo, en todos los casos y para todas las reacciones de corte seguido de la extracción desnaturizante, hicimos una separación por PAGE nativo (Figura 6, D). Para tratar de minimizar la formación del homo-dímero, los precursores separados por PAGE desnaturizante se plegaron calentando las muestras a 95° C y se separaron por PAGE nativos; sin embargo, la formación de dímeros incrementó con respecto a las muestras no calentadas (Figura 6, D; izquierda, N— No calentado; C— Calentado).

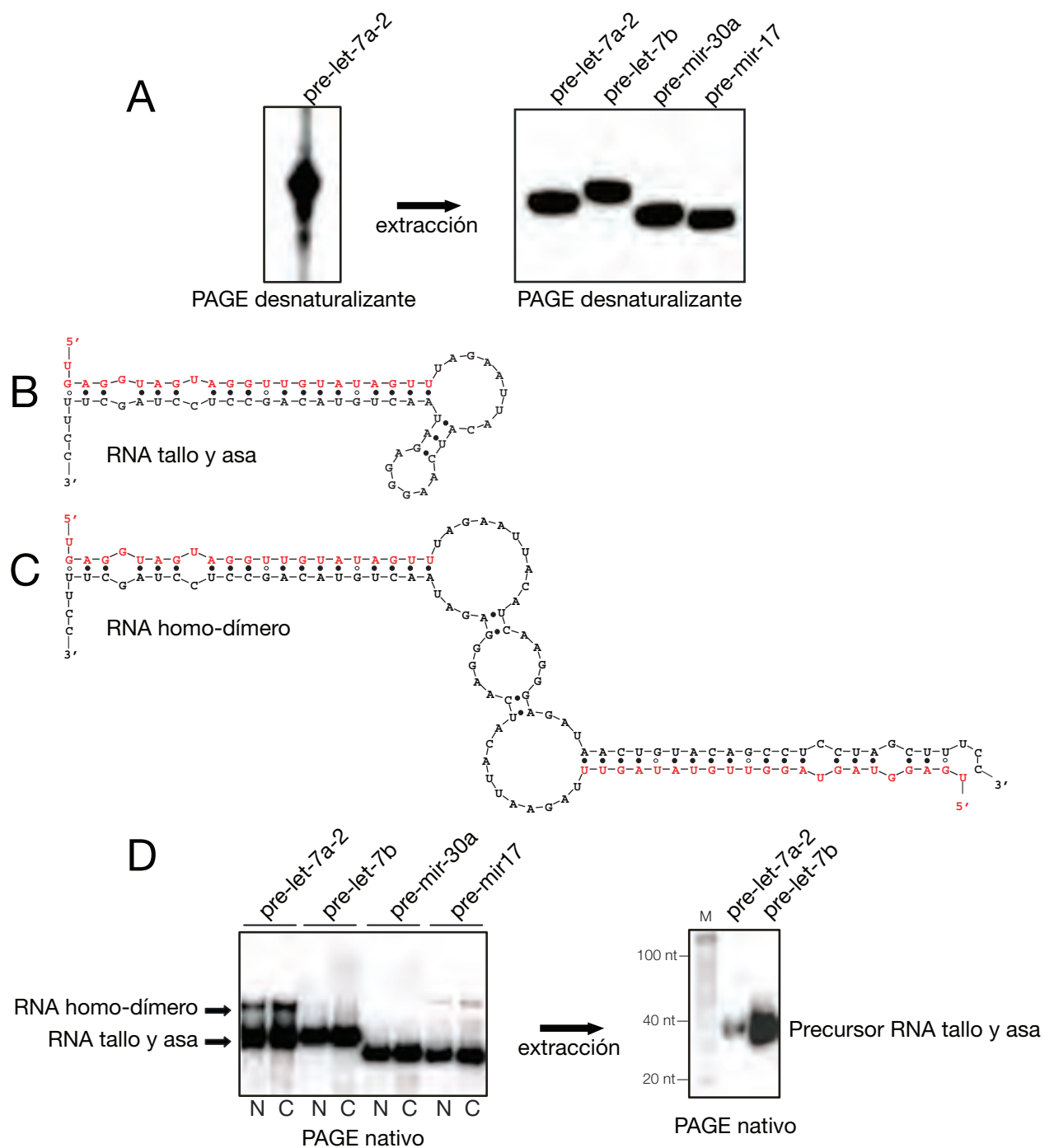


FIGURA 6. Purificación de estructuras de tallo y asa. A, Primero los pre-miRNAs marcados radiactivamente se separaban por UREA-PAGE y se extrajeron las bandas correspondientes a éstos. B, Estructuras de tallo y asa de pre-let-7a-2, y C, dímero de pre-let-7a-2. D, Purificación por PAGE nativo de los tallos y asas. N, No calentado; C, calentado

Después, extrajimos las bandas correspondientes únicamente a los tallos y asas; las muestras se mantuvieron a temperaturas iguales o menores a 37° C para mantener las estructuras. Para comprobar que los RNA no adoptaban nuevamente la estructura de dímeros, separábamos una parte de las muestras en PAGE nativo (Figura 6, D; derecha). Si no observábamos dímeros, proseguíamos con los experimentos de corte con Dicer.

3.2 Corte de precursores por Dicer recombinante.

Para visualizar los productos del corte por Dicer sobre los tallos y asas, incubamos precursores internamente marcados con [α -³²P]-UTP e hicimos cursos temporales con un Dicer purificado recombinante de humano. Los productos de la reacciones se separaron por PAGE desnaturalizante y se revelaron por medio de un *phosphorimager* (Typhoon trio, Health Care). Todos los precursores fueron cortados por Dicer dando como productos principales bandas cercanas a los 22 nt a medida del curso temporal (Figura 7, A-D; flechas grises). Además de las bandas de ~22 nt, observamos otras bandas de diversos tamaños; la mayoría de éstas incrementaron con el curso temporal. Todas son presumiblemente productos de corte de Dicer— y no degradación, ya que los controles negativos, sin Dicer, pero con todos los componentes de la reacción, no presentaron estas bandas (Figura 7, A-D; gráficas).

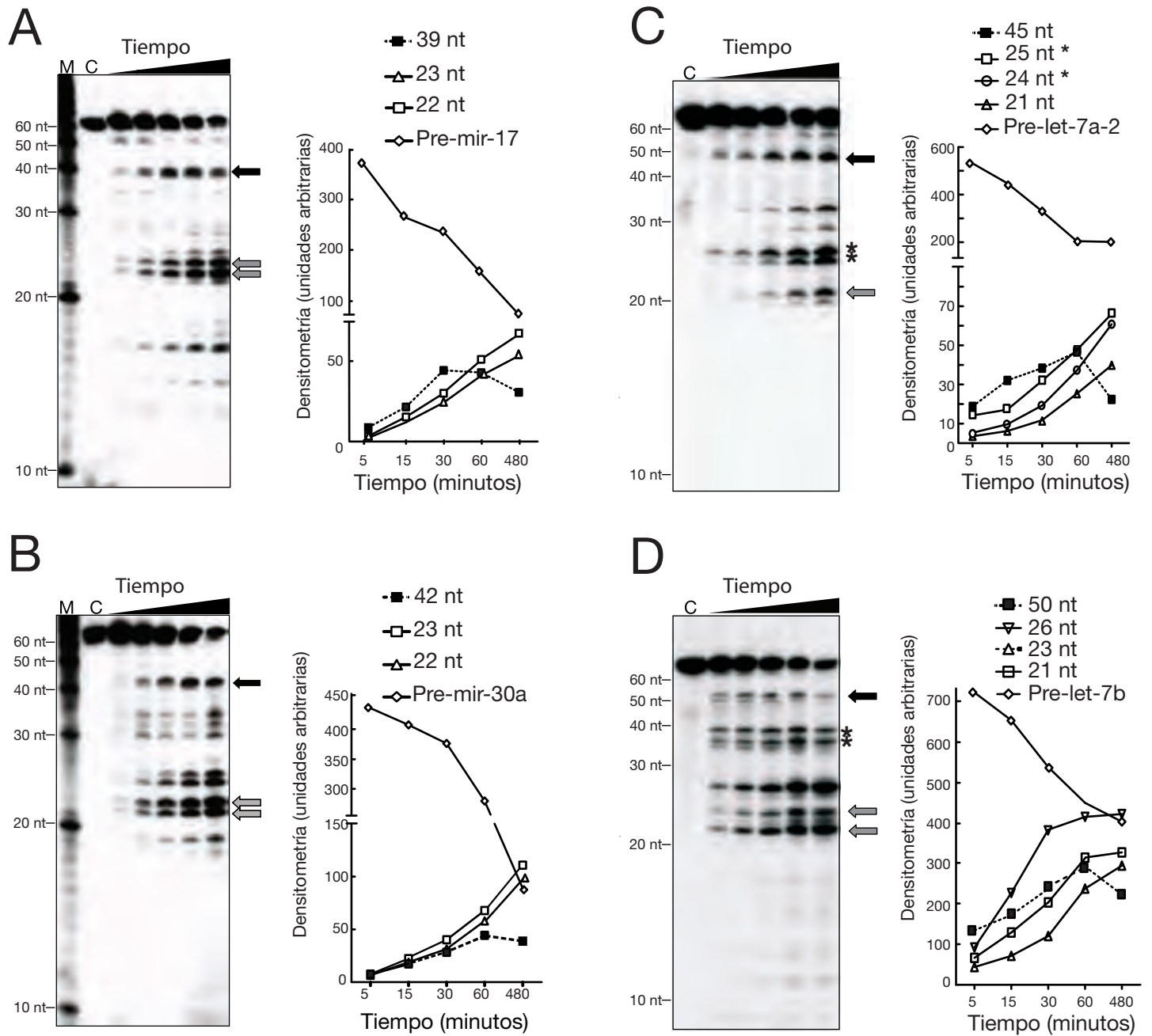


Figura 7. Corte de precursores marcados internamente.

Este resultado es interesante ya que, a diferencia de dsRNA perfectamente bien apareado, Dicer no produjo una sola banda de 21 nt— como en el caso del RNAi— sino que hay toda una gama de bandas cercanas a 22 nt que no se habían reportado a la fecha. Por los tamaños, podría intuirse que hay algunas que corresponden a las asas ((Figura 7, A–D; asteriscos); sin embargo, hay otras que es difícil interpretar a qué podrían corresponder.

Una posible interpretación a las múltiples bandas observadas, es que el corte de los precursores no fue preciso— y esto podría deberse a que el sustrato de Dicer es un RNA que contiene desapareamientos y *mismatches*, que, de acuerdo con el modelo de regla molecular⁹⁴, distorsionarían la unión del tallo con la plataforma y causarían un cambio en las posiciones del corte (ver figura 3, B).

Además de las bandas que incrementan, encontramos una banda abundante de ~40–50 nt que incrementó rápidamente y decayó en el curso temporal (Figura 7, A–D; flechas negras). Por el tamaño de la banda de ~40–50, podría ser un intermediario de la reacción. De tal modo que éste contiene una de las dos hebras y el— o parte— del loop; a este tipo de cortes se les conoce comúnmente como “*nicks*” (Figura 7, A–D, gráficas, líneas punteadas). Este resultado es interesante ya que, si el modelo de homodímero propuesto para Dicer es verdadero, uno esperaría que el intermediario no se viera en los geles ya que las dos hebras serían cortadas casi— o, al mismo tiempo. La aparición del intermediario, que en algunos casos iguala la

cantidad de productos de ~22 nt, sugiere que el nick de una sola hebra en el precursor es un evento que ocurre con frecuencia.

3.3 Dicer procesa diferencialmente las hebras en los pre-miRNAs.

Para estudiar con más detalle la aparición del producto intermediario, marcamos con fósforo radiactivo únicamente un extremo del precursor— ya sea el 5' ó 3', y separamos los productos de los cursos temporales con Dicer recombinante en PAGE desnaturizantes. Encontramos que el procesamiento de las hebras de los precursores no es indistinto, es decir, Dicer tiene preferencia por hacer el nick en una hebra para cada tallo y asa (Figura 8, A-D). Mientras que para pre-mir-30a, no hay diferencia en la aparición del intermediario cuando se marca una hebra o la otra, en el caso de pre-let-7a-2, pre-let-7b y pre-mir-17 sí la hay. Dicer hace el nick preferentemente la hebra del lado 3' en el tallo (Figura 8, A-D; flechas en los precursores). Este es un resultado inesperado, ya que sugiere que la estructura es importante para el posicionamiento del precursor en Dicer.

Investigamos si esta actividad se recapitula en extractos citoplasmáticos de células HeLa, ya que en los experimentos mostrados hasta el momento, usamos un Dicer recombinante purificado. Al incubar los precursores, ya sea radiactivos en el extremo 5' ó 3', encontramos un efecto similar al del Dicer recombinante (Figura 9, A-D). Para pre-let-7b y pre-mir-17, el nick se hace principalmente en la hebra del extremo 3', tal y como lo hizo el

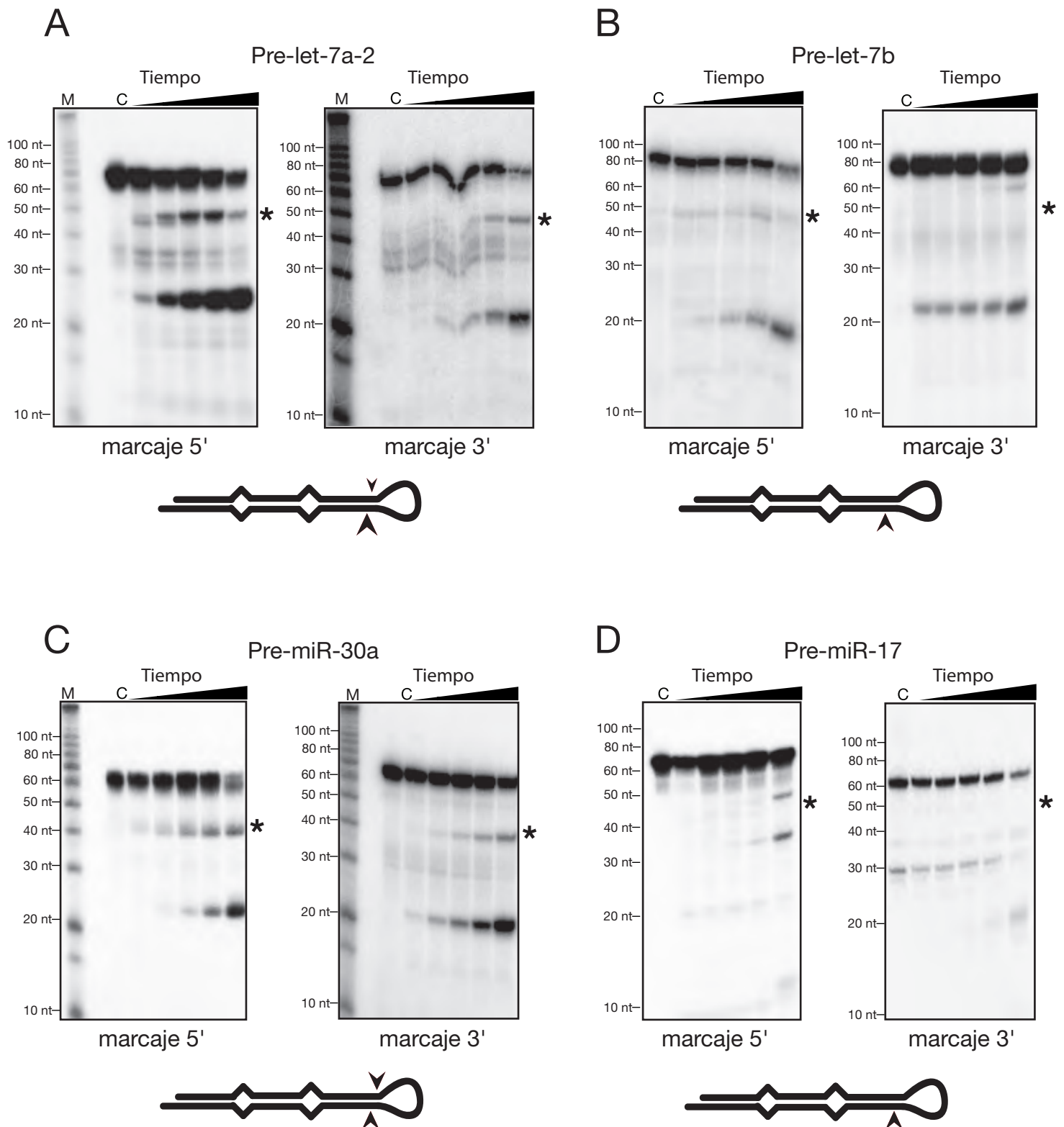


Figura 8. Corte de precursores marcados en extremos 5' y 3'.

Dicer recombinante (Figura 9, B y D). Sin embargo, en pre-mir-30a, el nick que hizo Dicer indistintamente en el tallo y asa se cambió, y estuvo más representado en la hebra 3' del tallo (Figura 9, C). En pre-let-7a-2, el nick se invirtió, de tal manera que se observó mayoritariamente en la hebra 5' del tallo (Figura 9, A).

Existen reportes en los que se ha descrito que el dominio PAZ une los extremos salientes 3' en dsRNA— Dicer de humano es una proteína que contiene un dominio PAZ^{75,97}. Por tal motivo, investigamos si los extremos 3' de los precursores eran importantes para la posición del primer nick. Modificamos los extremos de los precursores que estudiamos en este trabajo de tal manera que en vez de tener los extremos salientes en el 3', tuvieran 2 nt salientes en el 5' (Figura 10, cuadros en gris); y repetimos los cursos temporales con Dicer recombinante. Encontramos que el corte por Dicer en pre-let-7b y pre-mir-17, fueron cortados indistintamente en las dos hebras (Figura 11, B y D). El nick en pre-let-7a-2 y pre-mir-30a fue hecho en la hebra 5' a diferencia de los precursores no modificados (Figura 11, A y C). Un hecho interesante es que en algunos casos, el tamaño del intermediario cambió, sugiriendo que el posicionamiento en Dicer fue modificado al cambiar el extremo saliente.

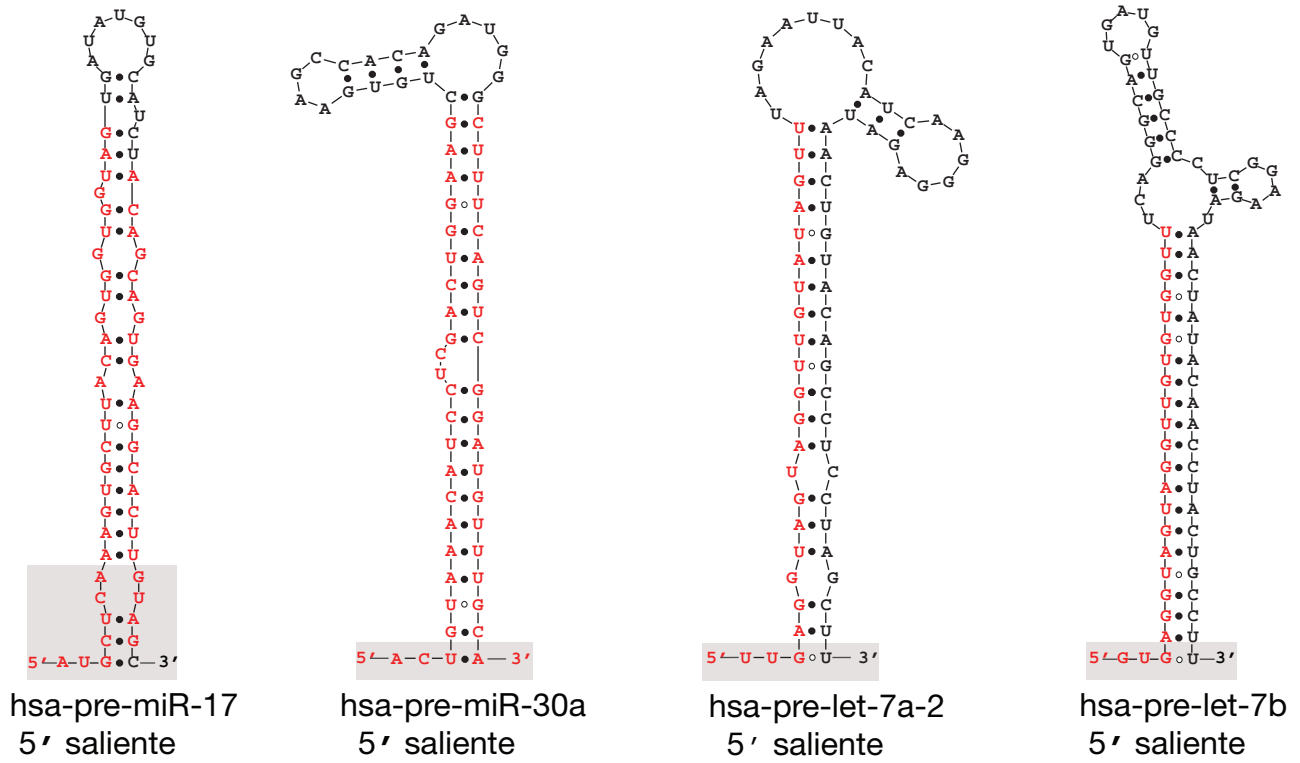


Figura 10. Precursores modificados.

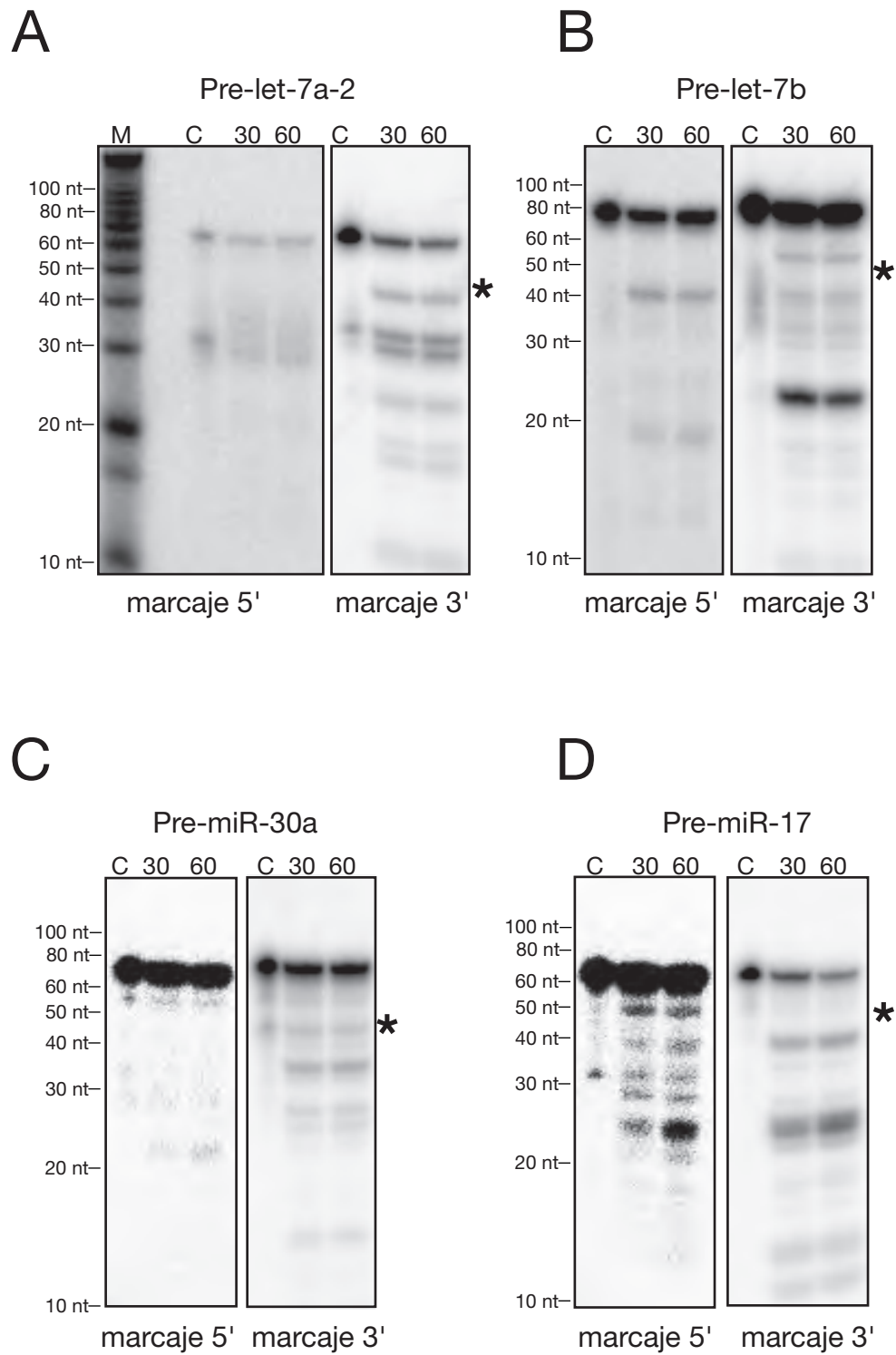


Figura 11. Corte de precursores modificados.

3.4 Identificación de los productos de Dicer.

Un hecho común a todos nuestros ensayos con Dicer recombinante fue que encontramos que los productos de corte no siempre fueron de 22 nt. Sin embargo, con los cursos temporales y precursores radiactivos es difícil identificar con exactitud la identidad de las bandas que aparecieron. Por ello, clonamos y secuenciamos los productos del corte, e hicimos una biblioteca de las secuencias obtenidas. La manera de hacer la biblioteca está representada en la figura 12. Brevemente, se extrae el RNA total de la reacción y se liga el primer adaptador en el extremo 3' del RNA— el adaptador está bloqueado en su extremo 3' para evitar ligaciones consigo mismo (1). Los RNAs ligados se separan por PAGE desnaturizante y se extraen las bandas de tamaño deseado. Después, se liga el segundo adaptador al extremo 5' (2), se separa la reacción en PAGE desnaturizante y se extraen las bandas del tamaño deseado (3). Se hace un RT-PCR para generar DNA de doble hebra (4), y con un segundo PCR (5), se añaden sitios de restricción que sirven para concatenar los fragmentos (6). Por último, se ligan clonan los fragmentos en un vector y se secuencian los fragmentos concatenados.

Secuenciamos los productos de corte de pre-mir-17 y pre-mir-30a (desde ~18 nt hasta ~45 nt) producidos con el Dicer recombinante. Al alinear las secuencias, encontramos que, como lo suponíamos, los productos no son únicamente de 22 nt, sino que hay toda una variedad de cortes (Figuras

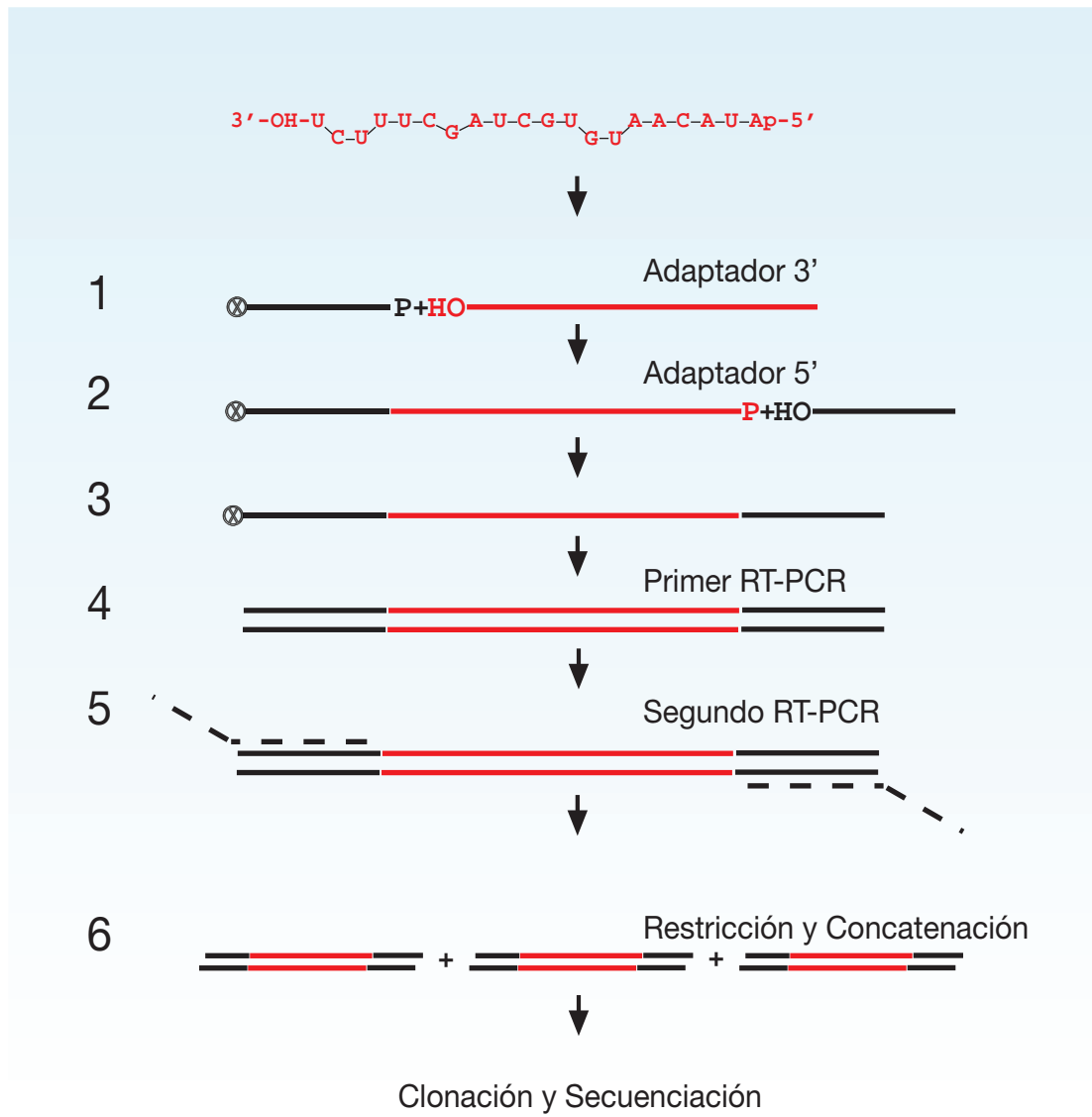


Figura 12. Biblioteca de cortes.

13 y 14). Por ejemplo, tanto las hebra 5' como la 3' en ambos precursores tienen extremos variables, es decir que no todos los fragmentos de 22 nt se sobreponen exactamente con el miRNA o miRNA*. Encontramos además, que el tamaño de los fragmentos varía entre 15 nt— como tamaño más pequeño, hasta 40— como máximo. Entre la gama de secuencias, encontramos fragmentos tanto las dos hebras, como de secuencias que corresponden a las asas. Un hecho importante es que algunas de las se secuencias provenientes de las hebras 5' contienen parte del asa, indicando que clonamos fragmentos en donde Dicer no había cortado las dos hebras, sino que apenas había hecho el primer nick. No encontramos alguna tendencia hacia el corte en un nucleótido específico, lo que confirma que Dicer es una RNasa tipo III que no reconoce secuencias específicas. Muchos de los extremos 5' en las hebras 5', contienen el mismo nucleótido que en el precursor; sin embargo, hay muchos fragmentos donde el 5' no se sobrepone al del precursor; un caso similar es el extremo 5' en las hebras 3'. Este resultado es interesante, ya que de acuerdo con trabajos reportados sobre secuenciación de miRNAs, en general los extremos 5' no varían mucho en comparación con los 3'^{30,103}. Discutiremos la importancia de este resultado más adelante.

Asa

24 23 22 19 18 17 17 17 17

```

U U C U
C C C C
G G G G
G G G G
U U U U
A A A A
A A A A
C C C C
A A A A
C C C C
G G G G
A A A A
G G G G
U U U U
U U U U
C C C C
G A A A
A A A A

```

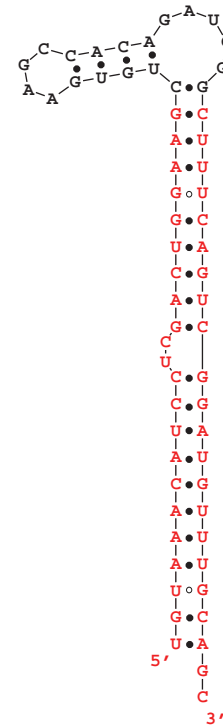
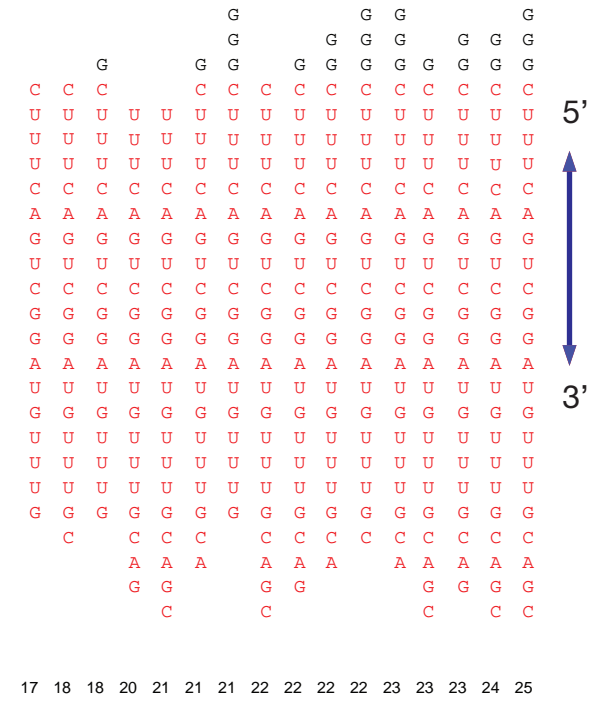
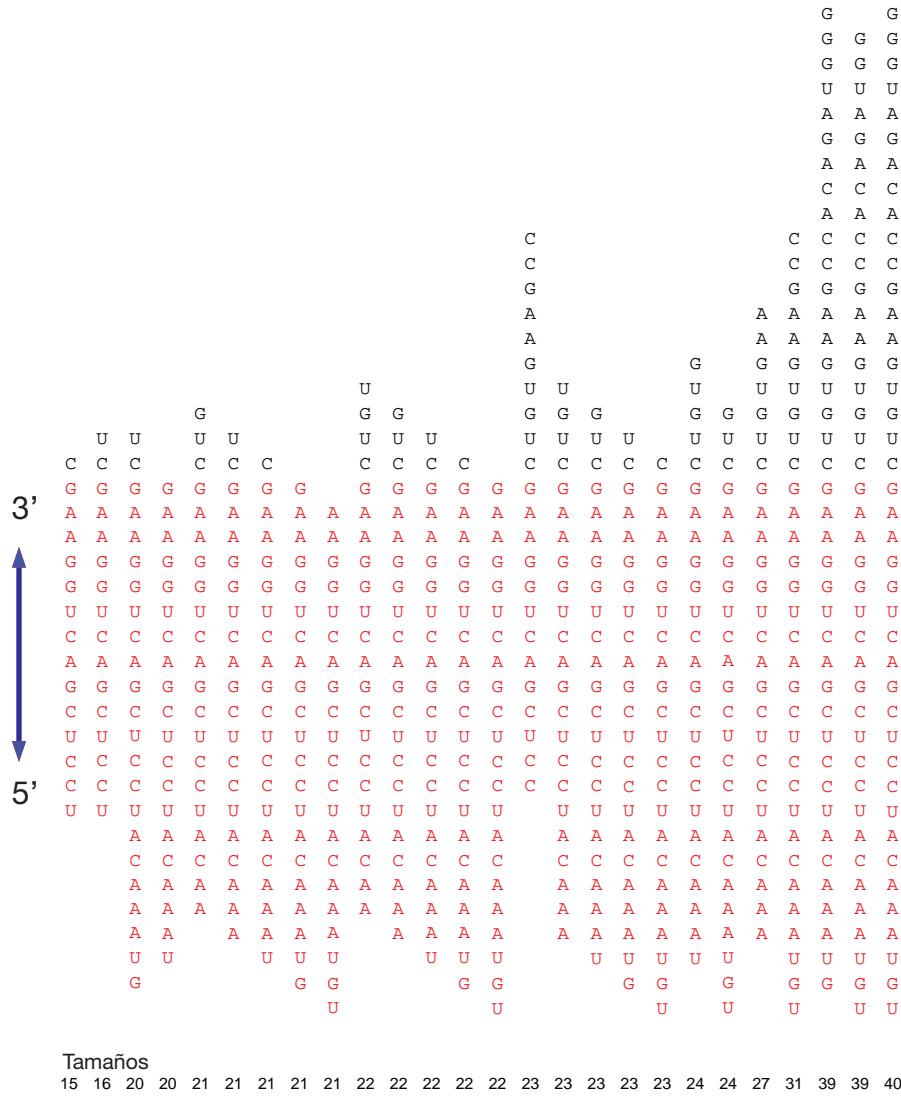


Figura 14. Secuenciación de Cortes mir-30a.



Hebra 5'

hsa-pre-miR-30a

Hebra 3'

La madurez del hombre llega cuando comienza a jugar con la seriedad con la que jugaba cuando era niño.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, estudiamos la actividad de Dicer humano sobre miRNAs que están plegados en forma de tallo y asa. Para ello, usamos únicamente estructuras de tallo y asa y cursos temporales con un Dicer recombinante y extractos citoplasmáticos de células HeLa. Nuestros resultados indican que Dicer hace un primer nick en una de las dos hebras, y éste no es indistinto de la hebra, sino que, aparentemente, hay una preferencia hacia una de ellas en los pre-miRNAs estudiados.

Los resultados muestran además que al intercambiar los extremos salientes 3', por 5' se produce un cambio en la preferencia del primer nick; lo cual sugiere que, para actuar como regla molecular, Dicer une primero el extremo saliente 3'— al dominio PAZ— y después lleva a cabo el corte (Figura 3). Es posible que al no poder unir un extremo 3' saliente disponible, Dicer une el 5' y esto causa una distorsión en el posicionamiento del precursor, de tal manera que el tallo tiene una rotación de 180°; lo cual explica el cambio de tamaño en el intermediario cuando el extremo saliente se encuentra en el 5'

(Figura 11). Los desapareamientos y bulges del tallo, característicos de los pre-miRNAs, provocan aún más distorsiones en el posicionamiento, hecho que se ve reflejado en el cambio de tamaño del intermediario.

Se ha propuesto que Dicer humano actúa como un homo-dímero al cortar el dsRNA⁷⁵; sin embargo, nuestros resultados no soportan este modelo. El encontrar intermediarios que contienen el asa, indica que el corte no se hace en las dos hebras del tallo al mismo tiempo— como lo propone el modelo de homo-dímero. Por lo tanto, es posible que el corte del precursor se produzca haciendo primero un nick— como lo muestran nuestros datos *in vitro*— liberando el intermediario, y por último Dicer puede tomar como sustrato al intermediario, o en su defecto, a una nueva molécula de precursor completo. El intermediario incrementa y decae con el transcurso del tiempo, mientras que los productos de ~22 incrementan, lo cual soporta un modelo donde la constante de disociación del intermediario es mayor a la del precursor completo. De este modo, y dado que fisiológicamente los sustratos de Dicer, son pre-miRNAs, proponemos que Dicer de humano no es una RNasa procesiva, sino que es capaz de liberar al intermediario antes de producir sus productos finales. Por lo tanto, es posible que Dicer de humano, no actúe como un homo-dímero, sino como monómero. El resultado de la secuenciación de los cortes concuerda con el modelo de monómero, ya que las hebras 5' tienen acortados los extremos 5' (Figura 13 y 14): si Dicer no liberara al intermediario, dichos extremos estarían intactos ya que sólo unirían al dominio PAZ y no participarían en el procesamiento catalítico. Es posible

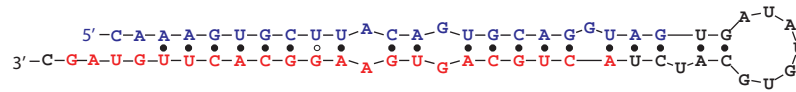
entonces que, Dicer, al liberar y unir nuevamente al intermediario, lo haga por la región del asa; que después del primer nick queda extendida, y el precursor se ha convertido en un dsRNA con un extremo saliente 3' de mayor longitud (Figura 13 y 14; hebras 5').

A diferencia del modelo de regla molecular propuesto para explicar cómo corta Dicer el dsRNA perfectamente apareado, en nuestro análisis no observamos únicamente un producto de 21 nt³¹, sino que hay una variedad de cortes cercanos a los 22 nt. La variabilidad en los cortes indica que Dicer no cortó con precisión los precursores. Esta variabilidad, también puede deberse a los diferentes desapareamientos, bulges y mismatches que contienen los precursores que usamos en el estudio. Sin embargo, no explica cómo, *in vivo*, los extremos que varían son los 3'— y no los 5'. En los trabajos en los que se ha reportado la clonación de miRNAs, ya sea por métodos convencionales o Deep Sequencing, el nucleótido 5' es encontrado con mucha frecuencia fijo. ¿Cómo es posible que Dicer produzca extremos 3' variables en la hebra 5'—y en la hebra 3' fije el extremo 5' (Figura 13 y 14)? Para explicar dicha incógnita, proponemos el siguiente modelo.

Dicer actúa como una regla molecular “flexible” que corta los precursores a fragmentos cercanos a 22 nt, pero no de un tamaño fijo (Figura 15, A). De tal manera que se producen una variabilidad de dúplex de distintos tamaños cercanos a 22 nt, todos ellos tienen extremos 5' y 3' distintos, y solamente algunos de los dúplex contienen al miRNA maduro con los

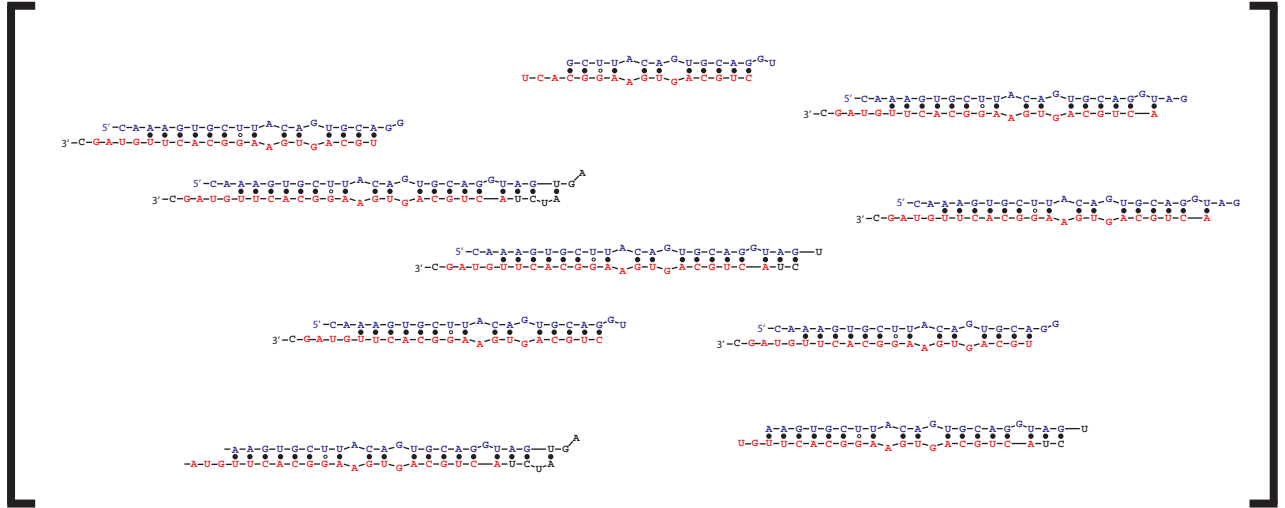
extremos precisos. El paso de selección del miRNA *bona fide* no lo lleva a cabo Dicer, sino que es un paso posterior en la vía (Figura 15, C). Dicha selección consiste en tres pasos:

- 1) *Selección de la hebra*. Se sabe que el complejo Ago/RISC selecciona una de las dos hebras de acuerdo con la estabilidad de los extremos del dúplex⁷¹. Es posible que al cambiar un solo nucleótido, la selección de la hebra cambie. Tal evento puede ser provocado por la imprecisión del corte por Dicer; aunque, en algunos casos, la imprecisión podría revertir la selección de la hebra miRNA*(como ocurre artificialmente⁷¹).
- 2) *Selección por tamaño*. Se sabe que los Argonautas 1 a 4 en humanos co-inmunoprecipitan con fragmentos de RNA de ~22 nt preferentemente. En este paso, todos los fragmentos no cercanos a 22 nt no se cargarían adecuadamente en Ago/RISC y al no estar protegidos por el complejo serían rápidamente destruidos por las RNasas celulares.
- 3) *Selección por secuencia*. Éste es el último paso de selección en el que se fija el extremo 5'. Una vez cargados en Ago/RISC las hebras resultantes del paso 2, el complejo encuentra un blanco al cual regular. El blanco debe ser, mínimamente, complementario al miRNA en las posiciones 2 a 8 (Figura 15, C). Como mencioné antes, la posición 1 no se hibrida con el blanco, sino que se encuentra fija



A

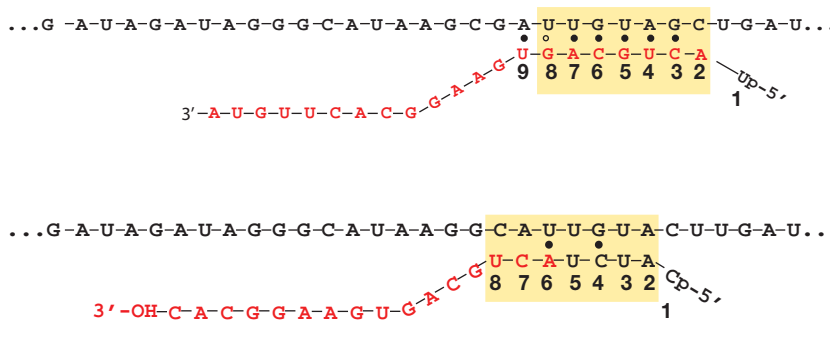
Dicer



B

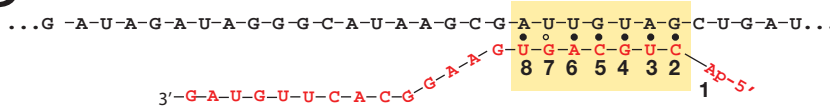
- 1) Selección de hebra
- 2) Selección de tamaño
- 3) Selección de secuencia

C



Selección negativa

D



Selección positiva

Figura 15. Modelo de selección positiva.

en el binding pocket en Ago/RISC⁹⁶. Al fijar la posición 1, se define cuáles son las siguientes posiciones, de tal modo que, aunque la hebra cargada (ya sea miRNA o miRNA*) contengan los nucleótidos necesarios para el apareamiento, las posiciones únicamente se aparearán si se fijaron de la manera correcta (Figura 15, C; selección negativa). A este tipo de apareamiento lo llamamos *Selección negativa*, ya que dichos miRNAs no contribuirían a la represión traduccional, y serían destruidos si no encuentran un blanco al cual unirse. Por ejemplo, cuando hay un solo nt extra en el extremo 5' del miRNA (Figura 15, C; arriba), a pesar de que hay suficientes nt para aparearse con suficiente energía al blanco, no se cumple la regla de aparearse las posiciones 2 a 8, ya que la posición 2 está desapareada. Cuando hay más de un nt extra en el extremo 5' del miRNA (Figura 15, C; abajo), solamente se pueden unir 2 de las 7 posiciones necesarias.

Solamente aquellos cortes cuyos extremos 5' sean complementarios al blanco, y cumplan las reglas de apareamiento de las posiciones 2 a 8 serán seleccionados positivamente (Figura 15, D). Dado que las uniones de los nt cercanos al extremo 3' no son necesarios para la unión, no importa fijarlos como los 5'.

Este modelo, además de explicar nuestros resultados de secuenciación, explicaría además porqué los extremos 5' varían menos que los 3'.

El modelo de la selección positiva es atractivo, además, porque uno de los pasos en la identificación de miRNAs es la conservación entre diferentes especies. La conservación debe existir entre miRNAs, y, además, entre sus blancos. De tal forma que los miRNAs no solamente deben tener secuencias idénticas, sino que además deben regular a los mismos blancos entre distintas especies. Con el modelo de selección positiva es posible explicar, cómo, durante la evolución de los organismos se han ido conservando los miRNAs y sus blancos paralelamente.

*No existen los límites, son nuestros
miedos lo que nos limita.*

PERSPECTIVAS

En el presente trabajo estudiamos el procesamiento de cuatro diferentes precursores de miRNAs de humano. Para poder hacer una conclusión más generalizada sobre los sitios de corte de Dicer, sería importante hacer un estudio a gran escala usando los precursores de los 706 miRNAs reportados hasta la fecha y cortarlos con Dicer; después hacer deep-sequencing y analizar la biblioteca entera de los diferentes cortes. Sería interesante además, estudiar si alguna de las proteínas efectoras conocidas hasta el momento modifica de alguna manera los cortes.

Otra perspectiva es tratar de comprobar si el modelo de selección positiva es real. Un acercamiento sería, generar todos los cortes de los precursores, tal como en la perspectiva anterior, y remover Dicer para dejar solamente los dúplex. A los dúplex agregar Ago/RISC y hacer deep-sequencing de los RNAs asociados con Ago. Por último, comparar la biblioteca de los cortes de Dicer con la de Ago y comprobar si el modelo es correcto o no.

MATERIALES Y MÉTODOS

Moldes para transcripciones *in vitro*.

Los oligonucleótidos de DNA fueron sintetizados químicamente por SIGMA/GENOSYS o IDT y purificados por PAGE desnaturizante. Cada oligo contiene una secuencia de DNA complementaria al precursor de miRNA más la secuencia del promotor del bacteriofago T7 (Tabla 1). Los moldes de DNA de doble hebra se prepararon usando la DNA polimerasa I del fragmento Klenow (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las reacciones se calentaron a 95° C y se dejaron enfriar lentamente hasta 37° C, para alinear los oligos; después se añadió la polimerasa. Las reacciones se incubaron por 1 hr, y el DNA se extrajo con fenol/cloroformo, y fue disuelto en ~50 µl de agua tratada con DEPC.

Transcripciones *in vitro* y purificación de RNAs.

Los precursores se prepararon usando la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (New England Biolabs). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen

120µl cada una y contuvieron 150 pmoles de DNA molde; 4 µl de ribonucleótidos, 100 mM cada uno; 20 µl de MgCl⁺⁺, 50 mM; 12 µl de buffer de reacción 10x; y 500 unidades de RNA polimerasa T7. Las reacciones se hicieron a 37° C toda la noche. Para los precursores internamente radiactivos, añadimos 100 µCi de [α -³²P] UTP a cada una de las reacciones. Después, los RNAs se extrajeron con fenol y cloroformo y se disolvieron en agua libre de RNAsas. Se añadieron 10 unidades de fosfatasa alcalina y DNAsa (ambas de Roche), y se incubaron por 30 minutos. Los RNAs se separaron en PAGE desnaturalizantes al 10% acrilamida. Las bandas se cortaron y se eluyeron en agua 0.3 M de NaCl, y se precipitaron con etanol 100%. Todos los RNAs se fosforilaron nuevamente con ATP frío o [γ -³²P] ATP (4500 Ci/mmol; Amersham) con polinucleótido cinasa T4 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del vendedor. Para las fosforilaciones en el extremo 3' usamos ligasa de RNA (Ambion) y [α -³²P] pCp y seguimos las recomendaciones del vendedor.

Mapeo de extremos 5' y 3' de pre-mir-17.

Los extremos de pre-mir-17 fueron identificados de acuerdo al método propuesto previamente Basyuk y colaboradores¹⁰⁴. Se secuenciaron siete clonas individuales derivadas de tres extracciones de RNA independientes. Todas las clonas fueron idénticas.

Tabla 1. Oligonucleótidos de DNA.

Oligonucleótido	Secuencia
Hsa-Pre-let-7a-2	GGAAAGCTAGGAGGCTGTACAGTTATCTCCCTTGATGTAATTCTAAACTATACAACCTACTACCTCACTATAGTGAGTCGTATTA
Hsa-Pre-let-7b	GGGAAGGCAGTAGGTTGTATAGTTATCTCCGAGGGGCAACATCACTGCCCTGAAACCACACAACCTACTACCTCACTATAGTGAGTCGTATTA
Hsa-Pre-miR-30a	GCTGCAAACATCCGACTGAAAGCCCATCTGTGGCTTCACAGCTTCCAGTCGAGGATGTTTACACTATAGTGAGTCGTATTA
Hsa-Pre-miR-17	GCTACAAGTGCCTTCACTGCAGTAGATGCACATATCACTACCTGCACTGTAAGCACTTTGCTATAGTGAGTCGTATTA
Hsa-Pre-let-7a-2, 5' saliente	AAGCTAGGAGGCTGTACAGTTATCTCCCTTGATGTAATTCTAAACTATACAACCTACTACCTCAACTATAGTGAGTCGTATTA
Hsa-Pre-let-7b, 5' saliente	AAGGCAGTAGGTTGTATAGTTATCTCCGAGGGGCAACATCACTGCCCTGAAACCACACAACCTACTACCTCACCTATAGTGAGTCGTATTA
Hsa-Pre-miR-30a, 5' saliente	TGCAAACATCCGACTGAAAGCCCATCTGTGGCTTCACAGCTTCCAGTCGAGGATGTTTACAGTCTATAGTGAGTCGTATTA
Hsa-Pre-miR-17, 5' saliente	GCTACAAGTGCCTTCACTGCAGTAGATGCACATATCACTACCTGCACTGTAAGCACTTTGAGCATCTATAGTGAGTCGTATTA
T7 promotor	TAATACGACTCACTATAG
Hsa-pre-mir-17 forward (para mapear los extremos)	CTACTTCACTATCTGCACTAGATGC
Hsa-pre-mir-17 reverse (para mapear los extremos)	TTAGCATCTACTGCCCTAAGTG

Purificación de estructuras tallo y asa por PAGE nativos.

Para separar las estructuras de tallos y asa de los precursores, separamos en PAGEs nativos (sin UREA) con 10% de acrilamida (acrilamida/bisacrilamida). Únicamente las bandas que eran los precursores en forma de tallo y asa fueron escindidas y eluidas para los experimentos con Dicer recombinante o extractos citoplasmáticos. Para prevenir que las estructuras de dímero se formaran nuevamente, mantuvimos los precursores a 37° C o menos durante todos los ensayos. Las estructuras secundarias fueron predichas con el algoritmo Mfold 3.2¹⁰⁵.

Reacciones *in vitro* con Dicer recombinante y con extractos citoplasmáticos de células HeLa.

Para las reacciones *in vitro* con el Dicer recombinante, incubamos aproximadamente 5×10^4 cpm de los precursores marcados radiactivamente con 1 U del Dicer recombinante (Gelantis) de acuerdo con las instrucciones del vendedor. Las reacciones con extractos citoplasmáticos de células HeLa se llevaron a cabo con extractos donados por Phillip Zamore (Universidad de Massachusetts) usando aproximadamente 5×10^4 cpm de los precursores radiactivos. Con 25 μ g de extracto celular, 3.2 mM de Mg^{++} y 0.5 mM de ATP a 37° C a los tiempos indicados. Las reacciones se detuvieron añadiendo un volumen igual de buffer de cargado (7 M UREA), y se calentaron a 95° C por 5 min. Después se separaron las reacciones en geles de poliacrilamida (PAGE) que contenían UREA 7 M (para geles desnaturizantes únicamente).

Después de la electroforesis, los geles se expusieron en pantallas y se escanearon en un phosphorimager (Typhoon, Health Care). La eficiencia de procesamiento del precursor fue determinada de la siguiente manera: eficiencia de procesamiento = $\text{corte}_{\text{IDV}} / (\text{corte}_{\text{IDV}} + \text{precursor}_{\text{IDV}})$. IDV: Valor de intensidad integrado.

Generación de bibliotecas de cortes por Dicer.

Para la clonación de RNAs pequeños seguimos íntegramente el protocolo publicado en Currents Protocols in Molecular Biology¹⁰⁶.

Uno solamente cree en lo que quiere creer.

REFERENCIAS

1. Provost P, Dishart D, Doucet J, Freundewey D, Samuelsson B, Radmark O. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. The EMBO journal 2002; 21: 5864-5874.
2. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. Cell 2004; 118: 57-68.
3. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. The EMBO journal 2002; 21: 5875-5885.
4. Takeshita D, Zenno S, Lee WC, Nagata K, Saigo K, Tanokura M. Homodimeric structure and double-stranded RNA cleavage activity of the C-terminal RNase III domain of human dicer. Journal of molecular biology 2007; 374: 106-120.
5. Zamore PD. RNA interference: big applause for silencing in Stockholm. Cell 2006; 127: 1083-1086.
6. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. Nature reviews 2009; 10: 94-108.
7. Hannon GJ, Rivas FV, Murchison EP, Steitz JA. The expanding universe of noncoding RNAs. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology 2006; 71: 551-564.
8. Bernstein E, Denli AM, Hannon GJ. The rest is silence. RNA (New York, N.Y 2001; 7: 1509-1521.
9. Hannon GJ. RNA interference. Nature 2002; 418: 244-251.
10. Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways. Molecular cell 2002; 10: 537-548.
11. Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. Genes & development 2002; 16: 2733-2742.
12. Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. Genes & development 2005; 19: 517-529.

13. Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & development* 1999; 13: 3191-3197.
14. Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 2001; 107: 823-826.
15. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, *et al.* A uniform system for microRNA annotation. *RNA* (New York, N.Y 2003; 9: 277-279.
16. Vagin VV, Sigova A, Li C, Seitz H, Gvozdev V, Zamore PD. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science* (New York, N.Y 2006; 313: 320-324.
17. Peters L, Meister G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Molecular cell* 2007; 26: 611-623.
18. Joshua-Tor L. The Argonautes. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 2006; 71: 67-72.
19. Parker JS, Barford D. Argonaute: A scaffold for the function of short regulatory RNAs. *Trends in biochemical sciences* 2006; 31: 622-630.
20. Kim VN. Small RNAs just got bigger: Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in mammalian testes. *Genes & development* 2006; 20: 1993-1997.
21. Bonnet E, Van de Peer Y, Rouze P. The small RNA world of plants. *The New phytologist* 2006; 171: 451-468.
22. Hall TM. Structure and function of argonaute proteins. *Structure* 2005; 13: 1403-1408.
23. Hammond SM. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS letters* 2005; 579: 5822-5829.
24. Farazi TA, Juranek SA, Tuschl T. The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development* (Cambridge, England) 2008; 135: 1201-1214.
25. Ambros V, Moss EG. Heterochronic genes and the temporal control of *C. elegans* development. *Trends Genet* 1994; 10: 123-127.
26. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-854.
27. Olsen PH, Ambros V. The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Developmental biology* 1999; 216: 671-680.
28. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* (New York, N.Y 2001; 294: 862-864.
29. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* (New York, N.Y 2001; 294: 858-862.
30. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* (New York, N.Y 2001; 294: 853-858.
31. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & development* 2001; 15: 188-200.
32. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431: 350-355.
33. Check E. RNA interference: hitting the on switch. *Nature* 2007; 448: 855-858.
34. Ruvkun G. The perfect storm of tiny RNAs. *Nature medicine* 2008; 14: 1041-1045.

35. Cullen BR. Viral and cellular messenger RNA targets of viral microRNAs. *Nature* 2009; 457: 421-425.
36. Ying SY, Chang DC, Miller JD, Lin SL. The microRNA: overview of the RNA gene that modulates gene functions. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J 2006; 342: 1-18.
37. Stark A, Lin MF, Kheradpour P, Pedersen JS, Parts L, Carlson JW, *et al.* Discovery of functional elements in 12 *Drosophila* genomes using evolutionary signatures. *Nature* 2007; 450: 219-232.
38. Grimson A, Srivastava M, Fahey B, Woodcroft BJ, Chiang HR, King N, *et al.* Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature* 2008; 455: 1193-1197.
39. Guo AY, Zhu QH, Gu X, Ge S, Yang J, Luo J. Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene* 2008; 418: 1-8.
40. Technau U. Evolutionary biology: Small regulatory RNAs pitch in. *Nature* 2008; 455: 1184-1185.
41. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215-233.
42. Das S. Evolutionary origin and genomic organization of micro-RNA genes in immunoglobulin lambda variable region gene family. *Molecular biology and evolution* 2009; 26: 1179-1189.
43. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic acids research* 2004; 32: D109-111.
44. Griffiths-Jones S. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J 2006; 342: 129-138.
45. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research* 2006; 34: D140-144.
46. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research* 2008; 36: D154-158.
47. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811.
48. Bartel B. MicroRNAs directing siRNA biogenesis. *Nature structural & molecular biology* 2005; 12: 569-571.
49. Caudy AA, Hannon GJ. Induction and biochemical purification of RNA-induced silencing complex from *Drosophila* S2 cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J 2004; 265: 59-72.
50. Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & development* 2003; 17: 49-63.
51. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* (New York, N.Y 2002; 297: 2056-2060.
52. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297.
53. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 2007; 448: 83-86.
54. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-419.
55. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development* 2004; 18: 3016-3027.

56. Tomari Y, Zamore PD. MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner. *Curr Biol* 2005; 15: R61-64.
57. Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Molecular cell* 2004; 16: 861-865.
58. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science (New York, N.Y)* 2004; 303: 95-98.
59. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal* 2002; 21: 4663-4670.
60. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005; 436: 740-744.
61. Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Laine S, Sack R, Gatignol A, *et al.* TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO reports* 2005; 6: 961-967.
62. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005; 123: 631-640.
63. MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna JA. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105: 512-517.
64. Maniataki E, Mourelatos Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes & development* 2005; 19: 2979-2990.
65. Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 2005; 123: 607-620.
66. Susi P, Hohkuri M, Wahlroos T, Kilby NJ. Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant molecular biology* 2004; 54: 157-174.
67. Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, *et al.* Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 2004; 117: 69-81.
68. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular cell* 2004; 15: 185-197.
69. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, *et al.* Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006; 125: 887-901.
70. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-366.
71. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003; 115: 199-208.
72. Tomari Y, Matranga C, Haley B, Martinez N, Zamore PD. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science (New York, N.Y)* 2004; 306: 1377-1380.
73. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *The EMBO journal* 2001; 20: 6877-6888.

74. Parker JS, Parizotto EA, Wang M, Roe SM, Barford D. Enhancement of the seed-target recognition step in RNA silencing by a PIWI/MID domain protein. *Molecular cell* 2009; 33: 204-214.
75. Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* 2005; 434: 666-670.
76. Ameres SL, Martinez J, Schroeder R. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell* 2007; 130: 101-112.
77. Leuschner PJ, Ameres SL, Kueng S, Martinez J. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO reports* 2006; 7: 314-320.
78. Tafer H, Ameres SL, Obernosterer G, Gebeshuber CA, Schroeder R, Martinez J, *et al.* The impact of target site accessibility on the design of effective siRNAs. *Nature biotechnology* 2008; 26: 578-583.
79. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, *et al.* Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature genetics* 2005; 37: 766-770.
80. Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 2005; 120: 21-24.
81. Friedlander MR, Chen W, Adamidi C, Maaskola J, Einspanier R, Knespel S, *et al.* Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nature biotechnology* 2008; 26: 407-415.
82. German MA, Pillay M, Jeong DH, Hetawal A, Luo S, Janardhanan P, *et al.* Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nature biotechnology* 2008; 26: 941-946.
83. Hendrickson DG, Hogan DJ, Herschlag D, Ferrell JE, Brown PO. Systematic identification of mRNAs recruited to argonaute 2 by specific microRNAs and corresponding changes in transcript abundance. *PLoS ONE* 2008; 3: e2126.
84. Huttenhofer A, Brosius J, Bachellerie JP. RNomics: identification and function of small, non-messenger RNAs. *Current opinion in chemical biology* 2002; 6: 835-843.
85. Jayaswal V, Lutherborrow M, Ma DD, Hwa Yang Y. Identification of microRNAs with regulatory potential using a matched microRNA-mRNA time-course data. *Nucleic acids research* 2009; 37: e60.
86. Kosik KS. The neuronal microRNA system. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 911-920.
87. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002; 12: 735-739.
88. Meister G, Landthaler M, Peters L, Chen PY, Urlaub H, Luhrmann R, *et al.* Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol* 2005; 15: 2149-2155.
89. Nam JW, Kim J, Kim SK, Zhang BT. ProMiR II: a web server for the probabilistic prediction of clustered, nonclustered, conserved and nonconserved microRNAs. *Nucleic acids research* 2006; 34: W455-458.
90. Ouellet DL, Plante I, Landry P, Barat C, Janelle ME, Flamand L, *et al.* Identification of functional microRNAs released through asymmetrical processing of HIV-1 TAR element. *Nucleic acids research* 2008; 36: 2353-2365.

91. Sandmann T, Cohen SM. Identification of novel *Drosophila melanogaster* microRNAs. *PLoS ONE* 2007; 2: e1265.
92. Sethupathy P, Megraw M, Hatzigeorgiou AG. A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. *Nature methods* 2006; 3: 881-886.
93. Wang X, Zhang J, Li F, Gu J, He T, Zhang X, *et al.* MicroRNA identification based on sequence and structure alignment. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2005; 21: 3610-3614.
94. MacRae IJ, Doudna JA. Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Current opinion in structural biology* 2007; 17: 138-145.
95. Flores-Jasso CF, Valdes VJ, Sampieri A, Valadez-Graham V, Recillas-Targa F, Vaca L. Silencing structural and nonstructural genes in baculovirus by RNA interference. *Virus research* 2004; 102: 75-84.
96. Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 2009; 457: 405-412.
97. Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, *et al.* Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science (New York, N.Y)* 2006; 311: 195-198.
98. Macrae IJ, Zhou K, Doudna JA. Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nature structural & molecular biology* 2007; 14: 934-940.
99. Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M. Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* 2003; 426: 465-469.
100. Gan J, Tropea JE, Austin BP, Court DL, Waugh DS, Ji X. Structural insight into the mechanism of double-stranded RNA processing by ribonuclease III. *Cell* 2006; 124: 355-366.
101. Kolb FA, Zhang H, Jaronczyk K, Tahbaz N, Hobman TC, Filipowicz W. Human dicer: purification, properties, and interaction with PAZ PIWI domain proteins. *Methods in enzymology* 2005; 392: 316-336.
102. Ghildiyal M, Seitz H, Horwich MD, Li C, Du T, Lee S, *et al.* Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science (New York, N.Y)* 2008; 320: 1077-1081.
103. Seitz H, Ghildiyal M, Zamore PD. Argonaute loading improves the 5' precision of both MicroRNAs and their miRNA strands in flies. *Curr Biol* 2008; 18: 147-151.
104. Basyuk E, Suavet F, Doglio A, Bordonne R, Bertrand E. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic acids research* 2003; 31: 6593-6597.
105. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* 2003; 31: 3406-3415.
106. Ausubel FM, *Current protocols in molecular biology*. (Wiley, New York, 1987).

Original Article

First step in pre-miRNAs processing by human Dicer

Carlos Fabián FLORES-JASSO^{1,3}, Catalina ARENAS-HUERTERO^{2,4}, Jose Luis REYES², Cecilia CONTRERAS-CUBAS^{1,3}, Alejandra COVARRUBIAS², Luis VACA^{1,*}

¹Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM Apartado Postal 70–600, Circuito exterior s/n Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacan, CP 04510, México DF; ²Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap Postal 565-A, 62210 Cuernavaca, Mor México; ³Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM; ⁴Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM

Aim: To investigate the strand preference of the initial cleavage of human pre-miRNAs by human Dicer *in vitro*.

Methods: We used a series of *in vitro* transcribed pre-miRNAs that were radioactively labeled at their 5' or 3' ends in cleavage reactions with recombinant human Dicer or HeLa cytoplasmic S100 extracts. Pre-miRNAs samples were purified by denaturing and native PAGE and only the stem-loop structures were used in the experiments. Products of cleavage reactions were resolved by denaturing PAGE, and scanned by phosphor-imaging.

Results: Recombinant hDicer performs a biased first-cleavage in the pre-let-7b and hsa-pre-miR-17 3' strand. This result is recapitulated in HeLa S100 cytoplasmic extracts.

Conclusion: The differential first-nick is observed in cleavage reactions only when stem-loops are substrates for hDicer.

Keywords: human Dicer; hsa-pre-miRNA; stem-loop; *in vitro*; first-nick

Acta Pharmacologica Sinica (2009) 30: 1177–1185; doi: 10.1038/aps.2009.108

Introduction

In mammals, microRNA (miRNAs) biogenesis begins when primary microRNAs (pri-miRNAs) are processed by the microprocessor complex (Drosha/DGCR8) to form ~60–80 nt hairpin-like precursors (pre-miRNAs) inside the nucleus. These precursors are subsequently exported to the cytoplasm via exportin 5^[1–3], where they are further processed by Dicer, a type III RNase that cleaves the stem-loop to yield shorter, double-stranded miRNAs (duplex miRNAs) with characteristic 2 nt 3' overhangs, 3' OH groups and 5' phosphates^[4,5].

Human Dicer (hDicer) is a ~220 kDa protein that contains an N-terminal DExH-box RNA helicase-like domain, a domain of unknown function (DUF283), a PIWI-Argonaute-Zwille (PAZ) domain, two RNase-III domains (RIIIa and RIIIb), and a double stranded RNA binding domain (dsRBD)^[6]. Biochemical and crystallographic analyses of hDicer indicate that Mg²⁺, but not ATP, is required for RNA cleavage^[7–9]. Analysis of dsRNA processing by hDicer enzymes that are engineered with specific RIII domain mutations revealed that hDicer contains a single dsRNA processing center, which is formed via intramo-

lecular dimerization of the two RIII domains; these domains function independently to cleave phosphodiester bonds on opposite strands of the dsRNA substrate^[8,10]. hDicer has been shown to associate with the human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein (TRBP) to process pre-miRNAs.

Despite our current knowledge of hDicer biochemistry and its activity on perfectly matched double-stranded RNAs, little is known about the first step in the pre-miRNA processing. Some studies have used radioactive pre-miRNAs to show that when hDicer finds and cleaves a pre-miRNA, cleavage does not occur simultaneously in both strands^[11–13] due to the fact that Dicer contains only one catalytic center. In those studies, an intermediate band (~50 nt) between the intact pre-miRNA and the mature miRNA was visualized, ... suggesting that hDicer cleaves (or makes a first-nick in) a specific strand. However, it is not clear whether hDicer cleaves the 5' or 3' strand preferentially, or whether its preference is dependent on the substrate. Using a series of precursor stem-loops and differential labeling, we show that recombinant hDicer makes a first-nick in a specific strand and that this activity is recapitulated in S100 HeLa cytoplasmic extracts. We also show that 3' overhangs influence the strand selection for the first-nick. Our *in vitro* results suggest that hDicer selects the pre-miRNA strand by first positioning the 3' overhang.

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail lvaca@ifc.unam.mx

Received 2009-02-18 Accepted 2009-05-27

Materials and methods

DNA templates for *in vitro* transcription

DNA oligonucleotides were chemically synthesized by SIGMA/Genosys (St Louis, MO) or IDT (Coralville, IA) and purified by PAGE. Each oligonucleotide contains a DNA sequence complementary to the microRNA precursor sequences and to the sequence of T7 RNA polymerase promoter at the 3' end (Table 1). The double-stranded templates for *in vitro* transcription were prepared with the Klenow fragment of DNA polymerase I. The DNA template reaction for each precursor contained 6 μ L of 50 μ mol/L T7 primer, 6 μ L of 50 μ mol/L precursor oligonucleotide, 20 μ L 10 \times Klenow reaction buffer, 5 μ L of 10 μ mol/L dNTPs and 158 μ L of water. The mixture was heated for 2 min at 94 $^{\circ}$ C and slowly cooled to 37 $^{\circ}$ C. Once cooled, 2 units of Klenow enzyme were added and incubated for 1 h at 37 $^{\circ}$ C. Finally, the reactions were phenol/chloroform extracted and diluted in 50 μ L of DEPC-treated water.

In vitro transcription and RNA purification

The pre-microRNAs used in this study were prepared by *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA). Transcription reactions were carried out in a 120 μ L volume containing 150 pmol of DNA template, 4 μ L of each rNTP at 100 mmol/L, 20 μ L of MgCl₂ at 50 mmol/L, 12 μ L of 10 \times T7 reaction buffer and 500 units of T7 RNA polymerase. The transcription reactions were incubated at 37 $^{\circ}$ C overnight. [α -³²P] UTP was added to internally labeled RNAs (100 μ Ci each). Then, 10 units of RNase-free DNase (Roche, Indianapolis, IN) and alkaline phosphatase (Roche, Indianapolis, IN) were added and the reaction was incubated for 1 h at 37 $^{\circ}$ C to remove the 5' triphosphates added by the T7 transcription. Transcripts were run on denaturing 8 mol/L urea, 10% PAGE (acrylamide/bisacrylamide, 19/1) gels in 0.5 \times TBE, gel-excised, eluted from the gel in 0.3 mol/L sodium acetate, pH 5.2, 0.5 mmol/L EDTA, and 0.1% SDS, and precipitated with ethanol. All transcripts were phosphorylated at the 5'-end by T4 polynucleotide kinase with

cold or [γ -³²P] ATP (4500 Ci/mmol; Amersham) and phenol/chloroform extracted. For 3' end labeled RNAs, RNA ligase (Ambion, Austin, TX) and [α -³²P] pCp were used according to the manufacturer's recommendations. As pCp labeling leaves a 3' phosphate, we removed the extra phosphate using either T4 kinase (New England Biolabs, Ipswich, MA) or alkaline phosphatase. The samples were then phenol/chloroform extracted, precipitated, and subjected to another round of 5' labeling with cold ATP.

Stem-loop structure purification by native PAGE

We analyzed the RNA structure homogeneity of all investigated transcripts by native 10% PAGE (acrylamide/bisacrylamide, 19/1) in 0.5 \times TBE. Only the bands containing hairpin-like structures were excised, eluted overnight and ethanol precipitated. To prevent the disruption of the stem-loop structures, the samples were maintained at 4 $^{\circ}$ C until the experiments with the Dicer enzyme were carried out. Secondary structures were predicted using the Mfold algorithm (release 3.2)^[14].

Hsa-pre-miR-17 5' and 3' end mapping

The ends of hsa-pre-miR-17 were identified according to the procedure used previously for human let-7 precursors^[15]. Briefly, total RNA was obtained from HeLa cells using Trizol (Ambion, Austin, TX), and the \leq 100 nt fraction was collected using FlashPage electrophoresis (Ambion, Austin, TX). The RNA was self-ligated with T4 RNA ligase. Following ligation, the RNA was phenol/chloroform extracted and precipitated with ethanol. The hsa-pre-miR-17 sequence was amplified by RT-PCR using specific hsa-pre-miR-17 primers (Table 1). PCR products were resolved in a 4% LMP agarose gel (Invitrogen, Carlsbad, CA) and the band was excised, column-purified (Invitrogen, Carlsbad CA) and cloned with the pDrive cloning kit (Qiagen). Plasmid DNA from seven individual clones derived from three independent RNA extractions were sequenced and found to be identical (data not shown).

Table 1. DNA oligonucleotides.

Oligonucleotide	Sequence (5'–3')
Hsa-Pre-let-7a-2	GGAAAGCTAGGAGGCTGTACAGTTATCTCCCTTGATGTAATTCTAAACTATACAACCTACTACCTCACTATAGTGAGTCGTATTA
Hsa-Pre-let-7b	GGGAAGGCAGTAGGTTGTATAGTTATCTCCGAGGGGCAACATCACTGCCCTGAAACCACACAACCTACTACCTCACTATAGTGAGTCGTATTA
Hsa-Pre-miR-30a	GCTGCAACATCCGACTGAAAGCCCATCTGTGGCTTCACAGCTCCAGTCGAGGATGTTTACACTATAGTGAGTCGTATTA
Hsa-Pre-miR-17	GCTACAAGTGCCCTCACTGCAGTAGATGCACATATCACTACCTGCAGCTGTAAGCACTTTGCTATAGTGAGTCGTATTA
Hsa-Pre-let-7a-2, 5' overhang	AAGCTAGGAGGCTGTACAGTTATCTCCCTTGATGTAATTCTAAACTATACAACCTACTACCTCAACTATAGTGAGTCGTATTA
Hsa-Pre-let-7b, 5' overhang	AAGGCAGTAGGTTGTATAGTTATCTCCGAGGGGCAACATCACTGCCCTGAAACCACACAACCTACTACCTCACTATAGTGAGTCGTATTA
Hsa-Pre-miR-30a, 5' overhang	TGCAACATCCGACTGAAAGCCCATCTGTGGCTTCACAGCTCCAGTCGAGGATGTTTACAGTCTATAGTGAGTCGTATTA
Hsa-Pre-miR-17, 5' overhang	GCTACAAGTGCCCTCACTGCAGTAGATGCACATATCACTACCTGCAGCTGTAAGCACTTTGAGCATCTATAGTGAGTCGTATTA
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAG
Hsa-pre-mir-17 forward (to map the 5' and 3' ends)	CTACTTCACTATCTGCACTAGATGC
Hsa-pre-mir-17 reverse (to map the 5' and 3' ends)	TTAGCATCTACTGCCCTAAGTG

***In vitro* reactions using hDicer and cytoplasmic HeLa extracts**

For *in vitro* reactions using recombinant hDicer, we incubated 5×10^4 – 10×10^4 cpm. of labeled precursor with 1 U of rDicer (Genlantis) according to the manufacturer's instructions. For *in vitro* reactions using HeLa cell S100 cytoplasmic extracts (kindly provided by Phillip D ZAMORE, University of Massachusetts), we incubated 5×10^4 – 1×10^5 cpm. of labeled precursor with 25 μ g of cell extract, 3.2 mmol/L $MgCl_2$ and 0.5 mmol/L ATP at 37 °C for the indicated times. Reactions were stopped by the addition of loading buffer containing 7.5 mol/L urea, heated at 95 °C for 5 min, and immediately run in 15%–20% denaturing PAGE. After electrophoresis, the gel containing the separated RNAs was exposed to a phosphor-screen and analyzed by phosphorimaging. The processing efficiency for each hairpin RNA (Figure 1) was determined as previously reported^[16]: $\text{processing efficiency} = \frac{\text{mature}_{\text{IDV}}}{\text{mature}_{\text{IDV}} + \text{precursor}_{\text{IDV}}}$. IDV: Integrated Density Value.

Results

Precursor miRNAs used in this study

miRBase is the public database where the sequences of all newly discovered mature microRNAs are deposited for classification^[17–19]. However, precursor miRNAs (either pre-miRNAs or pri-miRNAs) are not annotated for actual sequences; the predicted stem-loop sequences in the database are not strictly pre-miRNAs, but include the pre-miRNA and some flanking sequence from the presumed primary transcript. Currently, ends have been mapped for only a few pre-miRNAs. For this reason, we mapped the 5' and 3' ends of hsa-pre-miR-17 from HeLa cells using a method reported previously (see Methods and Figure 1A). This pre-miRNA was initially reported to contain only one mature miRNA (miR-17, 23 nt), but another miRNA was later identified in the complementary strand (miR-17*, 22 nt)^[17–19]. Notably, we found that pre-miR-17 contains an extra cytosine that is not found in the mature miR-17* sequence. Recent studies have reported variability in pre-miRNA ends due to Drosha processing^[6, 20, 21], which may explain why we observed this extra nucleotide. We used this sequence as the actual pre-miR-17 throughout this study. In addition to pre-miR-17, we included three other pre-miRNAs, the ends of which have been mapped previously: hsa-pre-miR-30 (pre-miR-30a), hsa-pre-let-7a-2 (pre-let-7b), and hsa-pre-let-7b (pre-let-7b)^[15] (Figure 1A).

We aimed to determine whether differential cleavage occurs in the first step of cleavage by hDicer on the miRNA or miRNA* strands when hDicer finds a stem-loop. For this reason we double-purified all RNAs by denaturation and native PAGE (Figure 2). Following transcription, we purified the RNAs by denaturing PAGE and tested the samples for degradation and purity (Figure 2A). After this step, RNA molecules adopted one of two major structures, an RNA stem-loop or an RNA dimer (Figure 2B and 2C), which we then resolved by native PAGE (Figure 2D, left). Denaturing gel extraction did not entirely prevent RNA dimer formation, even when we heated the samples at 95 °C and slowly cooled them to RT. On the contrary, heating the samples promoted dimer formation.

Therefore, we subsequently gel extracted only the stem-loops and verified their integrity by a subsequent native PAGE prior to each experiment (Figure 2D, right).

First-nick step in pre-miRNA processing by recombinant hDicer

We incubated internally labeled pre-miRNAs with recombinant hDicer and allowed the cleavage reactions to proceed until the indicated time points (Figure 3A–3D). All precursor RNAs were processed by hDicer to produce two bands near 20 nt (gray arrows), which correspond to mature miRNAs and might also correspond to a piece of or the entire loop sequence. The abundance of mature miRNAs increased in a time-dependent manner as a result of hDicer activity. In addition to the mature miRNAs, bands near ~40–50 nt were observed (Figure 3A–3D, black arrows). The length of the fragments obtained indicates that these bands correspond to a first-nick step in the processing that occurs near the loop of the pre-miRNAs. Interestingly, the first-nick intermediates decreased in abundance over the time course, in contrast to the mature miRNAs, which continued to accumulate for the entire incubation time (Figure 3A–3D, right graphs).

To test whether the first nick was made in the miRNA or miRNA* strand (namely 5' or 3' strand), we labeled either the 5' or the 3' end of each pre-miRNA and incubated the samples with hDicer (Figure 4A–4D). Time course experiments indicated that recombinant hDicer is able to discriminate the 5' strand from the 3' strand. First-nick intermediates for pre-let-7a-2, pre-let-7b and pre-miR-17 appeared to be labeled at the 5' end (Figure 4A, 4B and 4D, asterisks), indicating that hDicer made the first nick in the 3' strand of the stem-loop. In the case of pre-miR-30a, hDicer cleaved both strands with similar efficiency (Figure 4C, asterisks), indicating that recombinant hDicer can make the first nick on either strand. Next, we determined whether these results could be recapitulated in HeLa S100 cytoplasmic extracts. Pre-let-7b and pre-miR-17 were preferentially cleaved first in their 3' strands (Figure 5B and 5D, asterisks); the 5' strand of pre-let-7b was barely cleaved, and the first-nick in the 5' strand of pre-miR-17 was negligible. Experiments with pre-let-7a-2 revealed a tendency to make the first nick on the 5' strand. By contrast, pre-miR-30a was preferentially nicked on the 3' strand (Figure 5A and 5C, asterisks). To determine the identity of the pre-let-7b and pre-miR-17 recombinant hDicer reaction products, we cloned and sequenced all reaction products from 19–60 nt (data not shown). This analysis revealed that first-nick intermediates possessed the 5' strand and the loop in a 5:1 ratio. These results indicate that *in vitro* hDicer discriminates between strands when making the first nick, and that its choice of strand depends on the specific pre-miRNA. The first-nick bias does not seem to be related to the position of the mature miRNA or miRNA* (Figure 1A).

Since most pre-miRNAs are Drosha products generated in the nucleus^[22–25], pre-miRNAs bear the characteristic signature of RNase III products: 2 nt, 3' end overhangs^[1, 12, 20, 26]. As it is known that the PAZ domain binds double-stranded RNA by anchoring 3' end overhangs^[1, 3, 5, 26, 27], we investigated whether

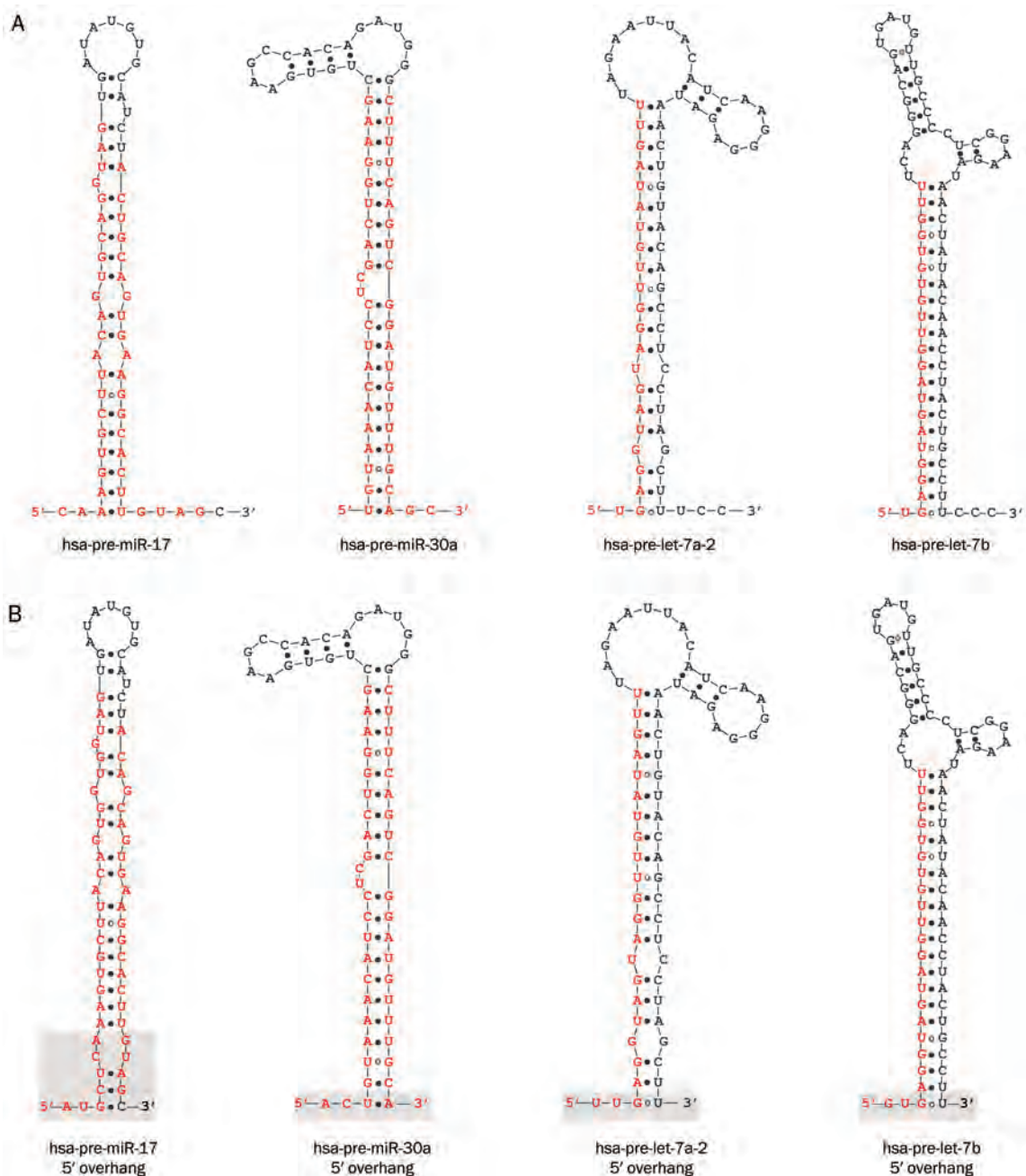


Figure 1. MicroRNA precursors used in this study. Secondary structures were predicted using Mfold (version 3.2)⁴¹. (A) Human miRNA precursors — pre-let-7a-2, pre-let-7b, and pre-miR-30a — 5' and 3' ends were used based on previous studies whereas human pre-miR-17 5' and 3' ends were identified in this work. (B) Precursors used in (A) having a 5' overhang. To produce 5' overhangs, indicated with grey boxes, we used the naturally nucleotides appearing in each primary precursor as templates (miRBase 12.0)²⁻⁴¹ to overhang the 5' ends, and cropped the 3' ends leaving 2-nucleotide, 5' overhangs. Nucleotides in red indicate mature miRNA sequences.

the overhang position influenced the strand preference for the first-nick introduced by hDicer. We modified the ends of all pre-miRNAs tested to leave 2 nt 5' overhangs (Figure 1B), incubated these modified pre-miRNAs with recombinant hDicer and resolved the reactions by denaturing PAGE (Figure 6). Our results indicate that 2 nt 5' overhangs modified the first-nick strand preference, allowing the cleavage of both strands for pre-let-7b and pre-miR-17 (Figure 6B and 6D, asterisks) and

biasing initial cleavage to the 5' strand of pre-let-7a-2 and pre-miR-30a. Interestingly, pre-let-7b and pre-miR-30a intermediates changed in size when labeled at their 5' or 3' ends rather than possessing 3' overhangs (Figures 4 and 5), indicating that the scissile phosphate was changed. These results suggest that hDicer anchors the PAZ domain as a first step in pre-miRNA cleavage, and therefore acts as a molecular ruler to cleave the precursor to a specific size by introducing the first-nick.

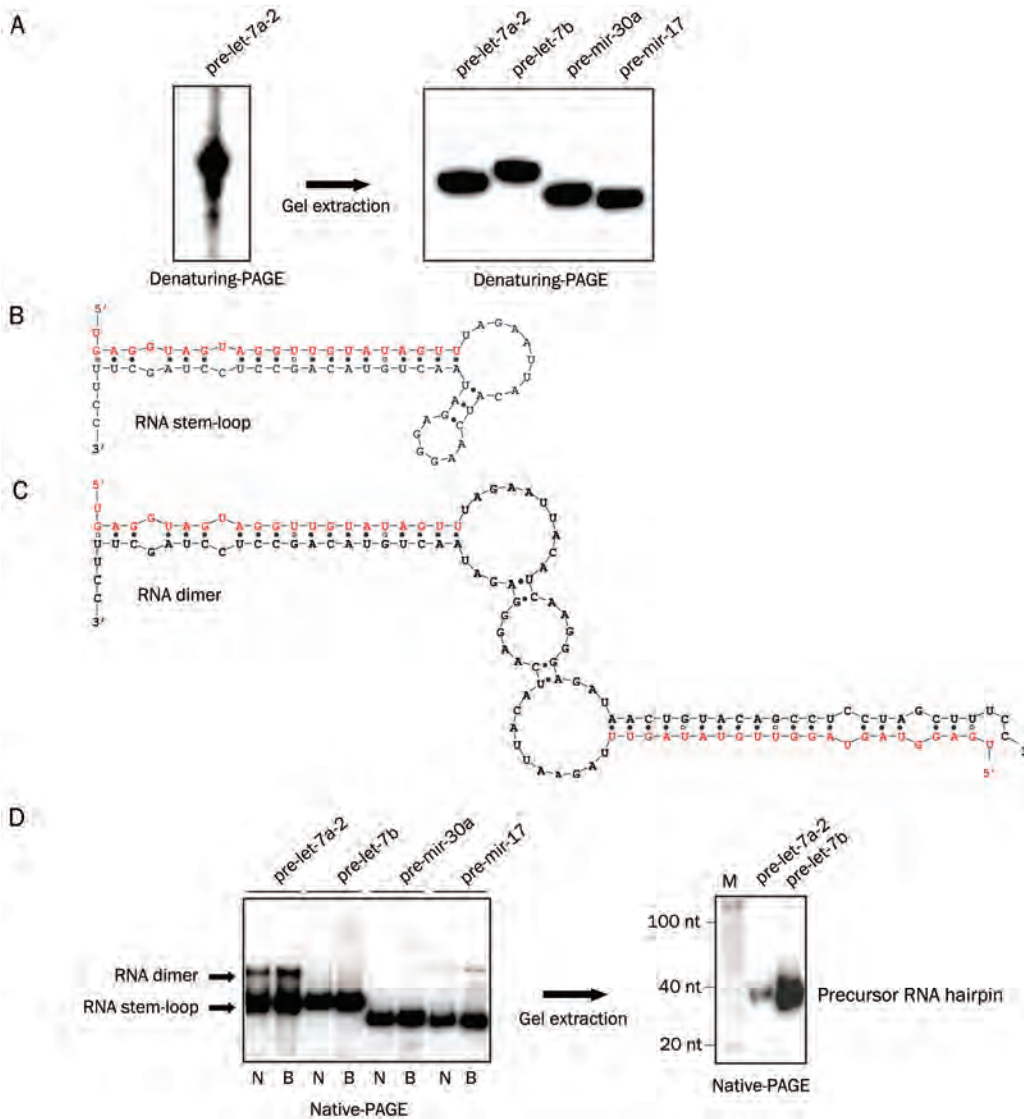


Figure 2. RNA preparation and purification. MicroRNA precursors were synthesized using T7 polymerase. (A) Following transcription, each RNA was resolved by UREA-PAGE (eg, pre-let-7a-2), gel-extracted and tested again for integrity by denaturing PAGE (left and right). (B) While the RNA molecules aligned, two major folding types appeared: a precursor RNA dimer (B), and a precursor RNA hairpin (C). (D) Following denaturing gel extraction, we resolved all RNAs by Native-PAGE and only stem-loop precursor structures were gel-extracted (left). Each hairpin structure was tested again by Native-PAGE to confirm that did not form precursor RNA dimers (right; pre-let-7a-2 and pre-let-7b are shown as examples). To test whether dimer structures could be avoided, samples were heated to 95 °C and slowly cooled down to RT (B, boiled; N, not boiled). Heating the samples did not disrupt RNA dimer structures but, in contrast, promoted their formation.

Discussion

Here, we show that hDicer differentiates between miRNA precursor strands and introduces a first-nick either in the 5' or 3' strand. The choice of first-nick strand can be modified by the presence of a 2 nt 5' overhang in the precursor, supporting the model in which hDicer binds 3' ends through its PAZ domain^[6]. Our results suggest that, in order to act as a molecular ruler, hDicer initiates pre-miRNA processing after anchoring the 3' end overhang. If improper binding of the 3' overhang to the PAZ domain occurs, the processing of the pre-miRNA will be altered by a shift at the scissile phosphate (Figure 6B and 6D). This might be the result of the “wrong” positioning of the stem-loop in hDicer owing to the 5' overhang. The stem loop adopts a helical shape^[10], so the incorrect anchoring of the 5' end could cause a shift in the cleavage site; a shift of two helical turns of the RNA would cause the observed ~22 nt product change. This in turn causes the intermediate to become longer or shorter. Lima *et al* reported recently that 3' overhangs are important for the affinity of

hDicer and siRNAs, as well as for biased strand loading into the RNA-induced silencing complex^[28]. The erratic cleavage position of precursors with 5' overhangs is interesting as none of these species has been reported endogenously. In light of our results, this suggests that the location of the first-nick might influence miRNA loading on Argonaute 2. Further studies will be required to verify this hypothesis.

Intermediates in pre-miRNAs processing have been visualized in denaturing gels previously^[11, 13, 16, 29]; however, differential first-nicks have not been reported. We attribute our ability to see the differential first-nick to the gel-extraction and subsequent analysis of only the stem-loop precursor. Failure to perform this isolation step results in a mix of two major RNA structures in the samples — a stem loop and a dimer. Although the proportion of the RNA dimer is small compared with the stem loop (Figure 2C), the dimer is a substrate of hDicer. Consequently, no difference in the first nick could be visualized with a denaturing PAGE gel, as hDicer is able to enter from either end and cleave the RNA dimer (Figure 7A

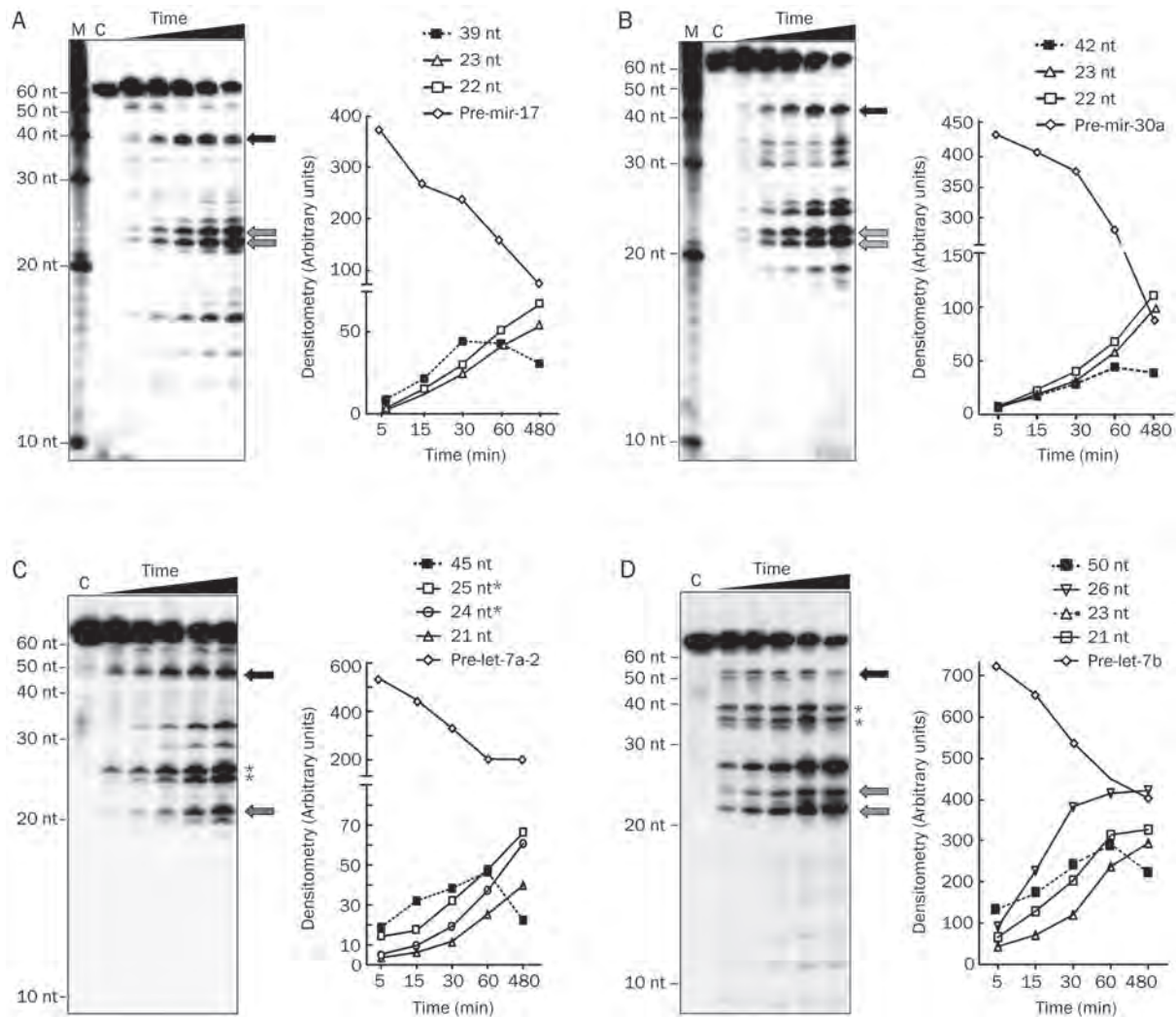


Figure 3. Precursor microRNA processing by, recombinant hDicer *in vitro*. Internally labeled ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP) pre-miRNAs were incubated with recombinant hDicer. Reactions were stopped at different time points (5, 15, 30, 60, and 480 min) and resolved by 20% (v/v) denaturing PAGE (A–D). Grey arrows indicate the bands expected from cleavage reactions (mature miRNAs); black arrows indicate the cleavage first nick product. Note that the first nick product (~40–50 nt) reaches its maximum at ~60 min and decreases at ~480 min whereas the mature products increment. C, 0-time point; M, decade marker. Asterisks indicate precursor loops.

and 7B). Therefore, a mix of dimer and stem-loop RNAs in the cleavage reaction masks the existence of the differential first-nick. This finding is particularly important because the standard method to form stem-loops is by heating the pre-miRNA samples; however, boiling the samples promotes RNA dimer formation.

Another interesting finding was that recombinant hDicer and HeLa cell extracts did not process pre-miRNAs identically. While a recombinant hDicer generated a differential first nick in pre-let-7b and pre-miR-17, we observed only a small bias towards one strand in pre-let-7a-2 and pre-miR-30a in HeLa cell extracts. This suggests that other pathway components, as well as their compartmentalization, might influence strand selection in endogenous pre-miRNA stem loops.

It will be important to investigate whether such differential first nick occurs in all human pre-miRNAs in living cells, as

well as to identify other factors that might be involved in the processing.

Acknowledgements

We thank P ZAMORE for helpful discussions and for kindly sharing the facilities in his laboratory. We would also like to thank the members of our lab and the Zamore lab for helpful discussions. This work was supported by CONACyT (#42469) and DEGEP.

Author contribution

Carlos Fabián FLORES-JASSO designed and performed research, and wrote the paper. Catalina ARENAS-HUERTERO and Jose Luis REYES performed research and contributed ideas. Cecilia CONTRERAS-CUBAS performed research. Alejandra COVARRUBIAS contributed ideas and reagents.

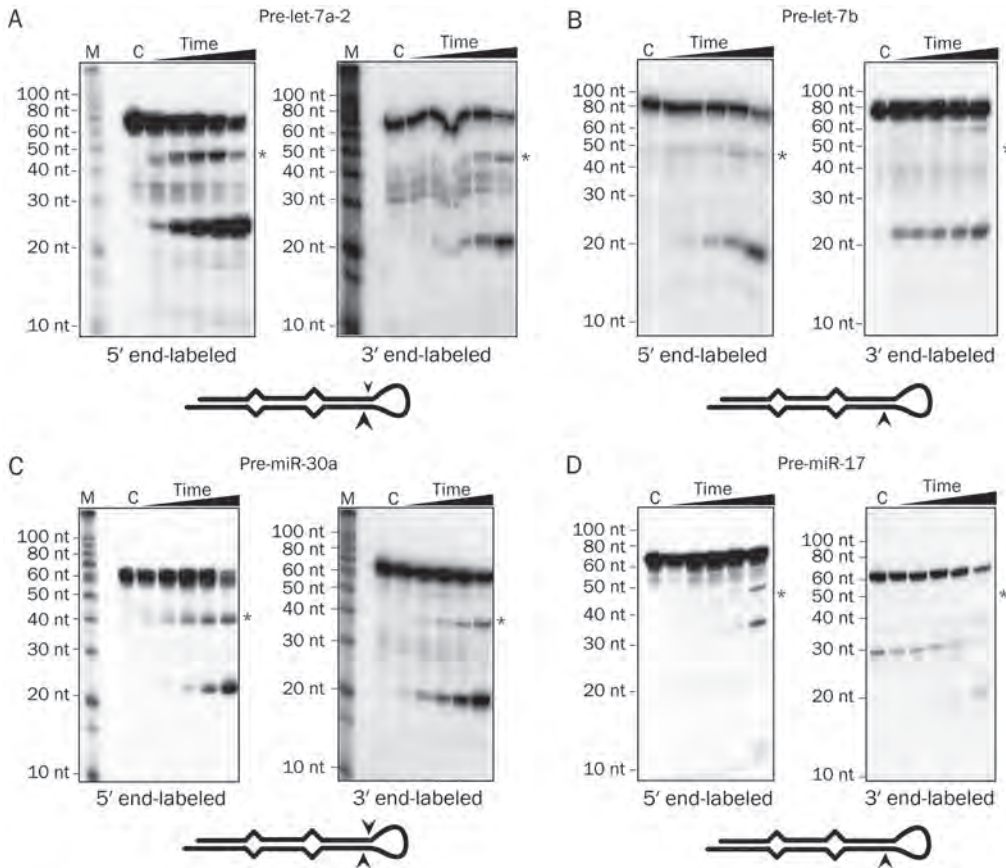


Figure 4. Recombinant hDicer makes differential cleavages on pre-miRNAs. Pre-miRNAs were labeled radioactively either on their 5' or 3' ends and incubated with hDicer. Reactions were stopped at 5, 15, 30, 60, and 480 min and resolved by 20% (v/v) denaturing PAGE. Asterisks indicate the position of the first-nick product (~40–50 nt). hDicer cleaves pre-let-7a-2, pre-let-7b and pre-mir-17 stem-loops preferentially on one strand (3' end strand), whereas pre-miR-30a is cleaved similarly on both strands. Arrows on the stem-loop drawings represent the preferential first-nick for each precursor. C, 0-time point; M, decade marker.

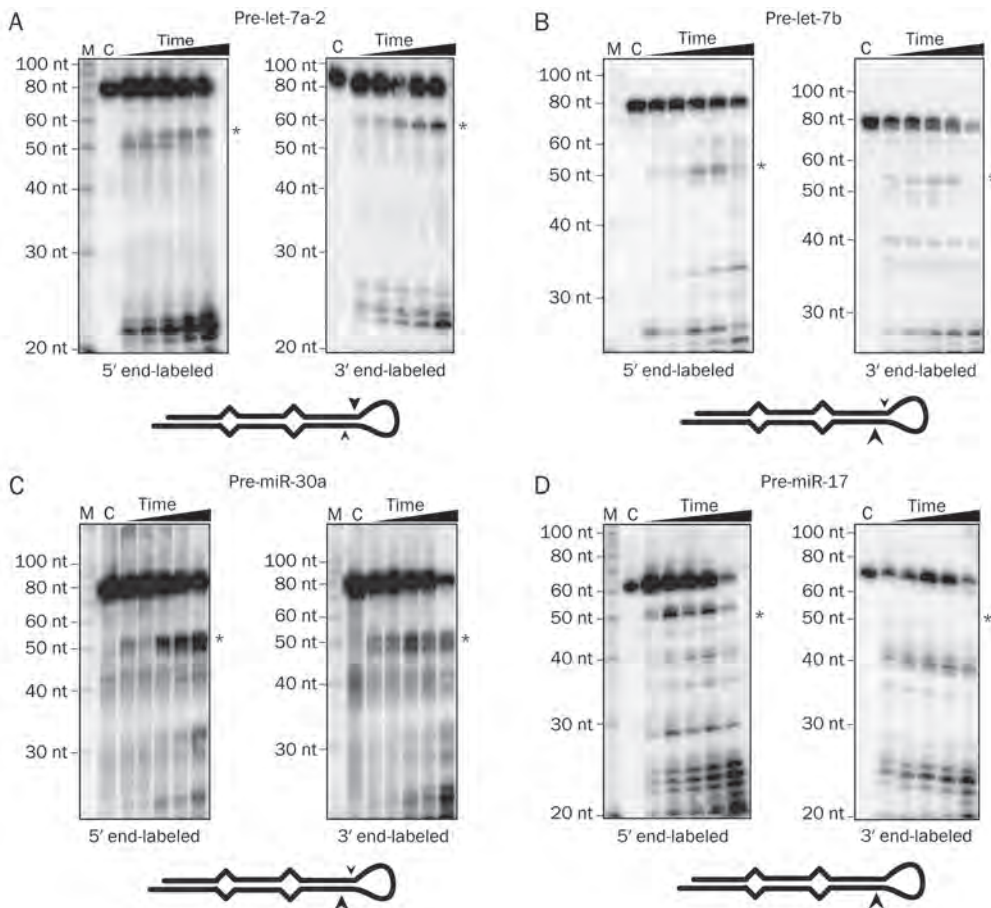


Figure 5. hDicer makes differential cleavages on pre-miRNAs in HeLa cytoplasmic extracts. Pre-miRNAs were labeled radioactively either on their 5' or 3' ends and incubated with HeLa cytoplasmic extracts. Reactions were stopped at 5, 15, 30, 60, and 480 min and resolved by 15% (v/v) denaturing PAGE. Asterisks indicate the position of the first-nick product (~40–50 nt). hDicer cleaves pre-let-7b and pre-mir-17 stem-loops preferentially on one strand (3' end strand), whereas the first nick on pre-let-7a-2 — in contrast to our experiments using recombinant hDicer — is preferentially on the 5' strand. There was a tendency towards the 3' strand in pre-miR-30a. Arrow-sizes on the stem-loop drawings indicate the preferential first-nick for each precursor. C, 0-time point; M, decade marker.

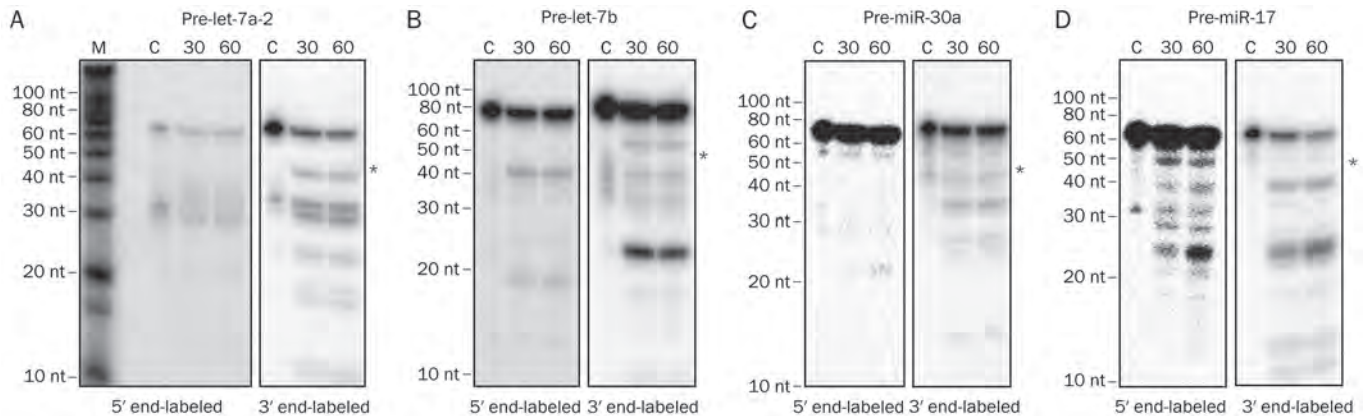


Figure 6. The first-nick made by recombinant hDicer is influenced by the overhang position in the pre-miRNAs. Pre-miRNAs having a 5' end overhang were radioactively labeled either on their 5' or 3' ends, incubated with hDicer at 30 or 60 min time points and reactions were resolved by 20% (v/v) denaturing PAGE. Asterisks indicate the position of the first-nick product (~40–50 nt). C, 0-time point; M, decade marker.

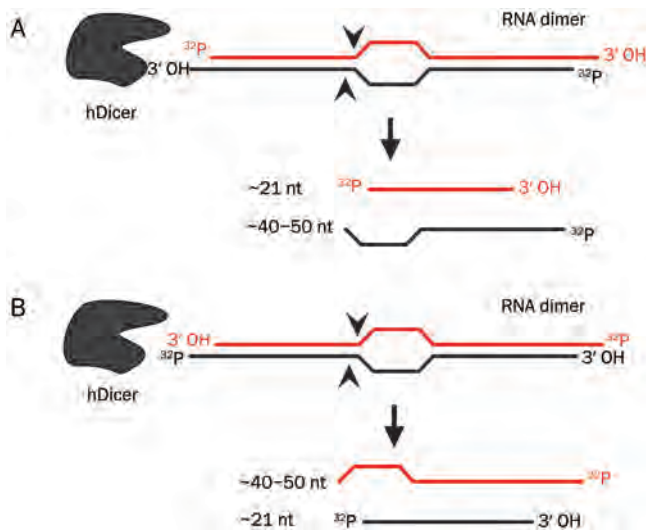


Figure 7. First-nick in RNA dimers by hDicer. (A) When the RNA precursors are labeled at the 5' end, hDicer enters and introduces a nick (from either end) in the corresponding strand. The second-nick yields two labeled products — a ~21 nt and the ~40–50 nt intermediate. (B) If the RNA precursors are labeled at the 3' end, there is no difference in size compared to 5' labeled precursor dimer when the products are resolved by denaturing PAGE; hDicer activity will appear as if there is no discrimination for the precursor strands.

Luis VACA contributed ideas and wrote the paper.

References

- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 2004; 18: 3016–27.
- Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303: 95–8.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 3011–6.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001; 15: 188–200.
- Tomari Y, Zamore PD. MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner. *Curr Biol* 2005; 15: R61–64.
- MacRae IJ, Doudna JA. Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 2007; 17: 138–45.
- Provost P, Dishart D, Doucet J, Frenthewey D, Samuelsson B, Radmark O. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J* 2002; 21: 5864–74.
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 2004; 118: 57–68.
- Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J* 2002; 21: 5875–85.
- Takeshita D, Zenno S, Lee WC, Nagata K, Saigo K, Tanokura M. Homodimeric structure and double-stranded RNA cleavage activity of the C-terminal RNase III domain of human dicer. *J Mol Biol* 2007; 374: 106–20.
- Leuschner PJ, Martinez J. *In vitro* analysis of microRNA processing using recombinant Dicer and cytoplasmic extracts of HeLa cells. *Methods* 2007; 43: 105–9.
- Lund E, Dahlberg JE. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006; 71: 59–66.
- Obernosterer G, Leuschner PJ, Alenius M, Martinez J. Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA* 2006; 12: 1161–7.
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 3406–15.
- Basyuk E, Suavet F, Doglio A, Bordonne R, Bertrand E. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 6593–7.
- Soifer HS, Sano M, Sakurai K, Chomchan P, Saetrom P, Sherman MA, *et al.* A role for the Dicer helicase domain in the processing of thermodynamically unstable hairpin RNAs. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 6511–22.
- Griffiths-Jones S. The microRNA registry. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: D109–11.
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: D140–4.

- 19 Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: D154-8.
- 20 Helvik SA, Snove O Jr, Saetrom P. Reliable prediction of Drosha processing sites improves microRNA gene prediction. *Bioinformatics* 2007; 23: 142-9.
- 21 Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, *et al*. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006; 125: 887-901.
- 22 Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* 2007; 28: 328-36.
- 23 Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev* 2008; 22: 2773-85.
- 24 Okamura K, Chung WJ, Lai EC. The long and short of inverted repeat genes in animals: microRNAs, mirtrons and hairpin RNAs. *Cell Cycle* 2008; 7: 2840-5.
- 25 Martin R, Smibert P, Yalcin A, Tyler DM, Schafer U, Tuschl T, *et al*. A *Drosophila* pasha mutant distinguishes the canonical microRNA and mirtron pathways. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 861-70.
- 26 Carmell MA, Hannon GJ. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 214-8.
- 27 Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, *et al*. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-9.
- 28 Lima WF, Murray H, Nichols JG, Wu H, Sun H, Prakash TP, *et al*. Human Dicer binds short single-strand and double-strand RNA with high affinity and interacts with different regions of the nucleic acids. *J Biol Chem* 2009; 284: 2535-48.
- 29 Ye X, Paroo Z, Liu Q. Functional anatomy of the *Drosophila* microRNA-generating enzyme. *J Biol Chem* 2007; 282: 28373-8.