

MicroRNAs implicados en la determinación del sexo



Francisca Martínez Real

Tesis Doctoral
8 de Julio de 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Francisca Martínez Real
D.L.: GR 669-2012
ISBN: 978-84-694-6368-0



Instituto de
Biotecnología



Facultad de
Ciencias



Universidad de
Granada



Estudios de
Biología



Departamento
de Genética

CIBM

Centro de
Investigación
Biomédica

MicroRNAs implicados en la determinación del sexo

Dirigida por los Doctores:

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la Licenciada Francisca Martínez Real para optar al grado de “Doctor por la Universidad de Granada”.

Dr. Miguel Burgos Poyatos

Dr. Rafael Jiménez Medina

8 de Julio de 2011

El presente trabajo se ha desarrollado en los laboratorios del Departamento de Genética y del Instituto de Biotecnología en la Facultad de Ciencias y en el Centro de Investigación Biomédica (CIBM) de la Universidad de Granada. La investigación realizada ha sido financiada por la Junta de Andalucía, mediante la concesión de una beca predoctoral. Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía, a través del Programa de Ayudas a Grupos de Investigación (Grupo PAI BIO-109) y de un Proyecto de Excelencia (CVI-2057).

Agradecimientos

Esta Tesis es el resultado de un proyecto en el que he puesto mucho esfuerzo e ilusión, pero que no lo hubiera logrado sin la participación de muchas personas a las que me gustaría mostrarle mi más sincera gratitud:

A mis directores de tesis, los doctores Miguel Burgos y Rafael Jiménez, por invertir toda su experiencia y sabiduría en mi formación como investigadora y como persona, demostrándome su afecto y recibiendo un trato personal inmejorable. Me honra haberlos tenido como padres científicos, gracias de corazón.

Al Dr. Federico Zurita por su dedicación en mis comienzos como alumna interna, así como su ayuda durante este tiempo.

A Darío por ser siempre mi compañero y mi amigo, constituyendo un apoyo muy importante tanto en lo profesional como en lo personal.

Al Dr. Barrionuevo, gracias Pacuqui por darme los mejores consejos cuando más los he necesitado.

A Ezequiel por aguantar mis regañinas y demostrarme constantemente que siempre puedo contar con él.

A David por ser para mí como un hermano mayor, preocupándose y ayudándome de una forma incondicional.

A Rajesh por nuestras curiosas charlas en spanglish haciendo más ameno el día a día.

A toda las personas que han pasado por el laboratorio en especial a Lara (mi mirna), Alfonsa, Jennifer, Valeria, Pepillo y Carmen, me quedo con algo de cada uno de ellos.

A todos los miembros del Departamento de Genética por acogerme tan amablemente, facilitándome siempre el camino con sus sabios consejos.

Al Dr. Robin Lovell-Badge (Developmental Genetics and Stem Cells Division, NIMR, Londres, UK) por permitirme realizar dos estancias en su laboratorio, así como a todos los miembros de su equipo por darme un trato excepcional, en especial a Ryo por haberme enseñado tanto con una infinita paciencia.

A mis compañeros del Instituto López-Neyra, Juandi (pek-eño), Sonia (chupichú), Patri (potito), Kiko compañero y ToÑi, por demostrarme sobradamente que son unos verdaderos amigos, y permitirme, en ocasiones, parasitar sus laboratorios.

A Belén, Carola y Jose Miguel por su comprensión, y esas charlas “tan esperanzadoras” sobre la ciencia y la vida en general.

A mis niñas de Graná, María del Mar, Emma y Luni por aquellos maravillosos años que compartimos bajo el mismo techo, y demostrarme en incontables ocasiones que siempre estarán ahí cuando las necesite.

A mis bonicas, Elisa, Sara, Estela, Carolina, Rocío, Patri, Denisse y Bea porque siempre han sabido animarme en los malos momentos y celebrar a mi lado los buenos, demostrando que son unas amigas excepcionales.

A mi familia, en especial a mi abuela Antonia que siempre ha confiado en mi.

A mis cuñaos, Antonio y Estrella, por tratarme y quererme como a un hermana chica, además de agrandar la familia con mis sobrinos, Sara, Mariel, Andrés y Clara con los que pasamos tantos buenos ratos.

A Sarilla por soportar cariñosamente y con paciencia a una compi de piso desquiciada con una tesis.

A mis manitos, Tony y Ambrosio, por haber sido hermanos, padres y amigos. Contagiándome de sus gustos y aficiones e inculcándome los mejores valores para abrirme camino en la vida.

A mis padres, Andrés y Mari, por haberme criado con todo su amor, cariño y comprensión. Son mi modelo a seguir como persona, gracias por guiarme durante toda mi vida. No estaría escribiendo esto si no fuera por ellos.

Y a todas aquellas personas que de una forma u otra han hecho posible que realizara esta Tesis.

Gracias a todos.

Dedicado a mis Padres
y también a mis Hermanos

*Siembra un pensamiento y cosecharás un acto,
siembra un acto y cosecharás un hábito,
siembra un hábito y cosecharás un carácter,
siembra un carácter y cosecharas un destino.*

Charles Reade

Índice general

1. Abstract	1
2. Introducción y Objetivos	25
3. Antecedentes	27
3.1. Determinación y diferenciación sexual en mamíferos	27
3.1.1. Desarrollo gonadal en mamíferos	28
3.1.2. Control genético de la determinación del sexo	31
3.2. Regulación de la expresión génica	43
3.2.1. Regulación a nivel de la transcripción	44
3.2.2. Regulación a nivel de la traducción	45
3.3. MicroRNAs	49
3.3.1. Biología de los microRNAs	49
3.3.2. Implicación de los microRNAs en los procesos biológicos	78
3.3.3. Herramientas bioinformáticas en el estudio de los microRNAs	84
3.3.4. Aplicaciones biotecnológicas del RNAi	93
3.3.5. Los microRNAs y el desarrollo gonadal	97
4. Material y Métodos	99
4.1. Material Analizado	99
4.2. Métodos	100
4.2.1. Obtención y sexado del material	100

4.2.2.	Microarray para microRNAs	103
4.2.3.	Cultivos celulares y Transfecciones	109
4.2.4.	Métodos de análisis molecular	116
4.2.5.	Métodos inmunológicos	136
4.3.	μ iRNAM (MicroRNA Mining)	137
4.3.1.	Base de datos	138
4.3.2.	Otención de las listas de miRNAs y sus potenciales dianas	139
4.3.3.	Obtención de términos GO	139
4.3.4.	Obtención de las descripciones asociadas con los transcritos	139
4.3.5.	Interfaz web de consultas	140
4.4.	Preparación de soluciones y medios	144
5.	Resultados	149
5.1.	Microarray	150
5.1.1.	Análisis de los resultados del microarray	150
5.1.2.	Validación Microarray	160
5.2.	Minería de datos: μ iRNAM	166
5.2.1.	Criterios de búsquedas de dianas con el programa μ iRNAM	166
5.2.2.	Resultados de la salida del programa μ iRNAM	167
5.2.3.	Descripción de las dianas resultantes	173
5.2.4.	Localización genómica y posible regulación de los principales miRNAs identificados	177
5.3.	<i>mmu-miR-124</i>	180
5.3.1.	Localización genómica y posible regulación de <i>mmu-mir-124</i>	180
5.3.2.	Expresión diferencial de miR-124 entre estadios y sexo	184
5.3.3.	Validación funcional de la diana de miR-124 en la región 3'UTR de <i>Sox9</i>	187
5.3.4.	Inhibición de miR-124 <i>in vitro</i> en células gonadales embrionarias XX de 13.5 dpc	187

5.3.5. Efectos de la expresión ectópica de miR-124 en células gonadales embrionarias XY de 13.5 dpc y en condrocitos cultivados <i>in vitro</i>	191
5.3.6. Sobre-expresión de miR-124 <i>in vitro</i> en células gonadales XY de 11.5 dpc	195
5.4. <i>mmu-miR-144</i>	203
5.4.1. Localización genómica y posible regulación de <i>mmu-mir-144</i>	203
5.4.2. Expresión diferencial de miR-144 entre estadios y sexo	204
5.4.3. Validación de la diana de <i>Rspo1</i> para miR-144	204
5.4.4. Inhibición de miR-144 <i>in vitro</i> en células gonadales XY de 13.5 dpc	207
5.4.5. Sobre-expresión de miR-144 en células gonadales XX de 13.5 dpc cultivadas <i>in vitro</i>	212
6. Discusión	215
6.1. Microarray	215
6.2. μ iRNAM	220
6.3. miR-124	229
6.4. miR-144	234
7. Conclusiones	239
7.1. Conclusiones	239
Bibliografía	241

Índice de figuras

3.1. Esquema de la determinación y diferenciación sexual	42
3.2. Biogénesis de los miRNAs	53
3.3. Mecanismo de acción de miRNAs propuesto por Huntzinger	71
4.1. <i>Microarrays</i> : distribución de densidad de puntos	107
4.2. <i>Microarrays</i> : <i>box-plot</i> de las \log_2 ratios de las medianas . . .	108
4.3. RT-Q-PCR miRNAs, <i>Exiqon miRCURY LNA microRNA System</i>	122
4.4. RT-Q-PCR miRNAs, <i>miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR</i>	126
4.5. RT-Q-PCR, <i>TaqMan microRNA assays</i>	128
4.6. μ iRNAM, consultas	140
4.7. μ iRNAM. Consulta nueva	141
4.8. μ iRNAM. Inclusión de miRNAs y términos GO	142
4.9. μ iRNAM. miRNAs con dianas en un gen de interés	142
4.10. μ iRNAM. Listado de transcritos	143
4.11. μ iRNAM. dianas miRNA presentes en un gen de interés . .	143
5.1. Gel de agarosa de PCRs dúplex para la identificación del sexo de las muestras del <i>microarray</i>	151
5.2. Gel de agarosa del RNA de las muestras utilizadas para el <i>microarray</i>	152
5.3. Electroforegramas de las muestras de 11.5 dpc utilizadas en el <i>microarray</i>	153
5.4. Electroforegramas de las muestras de 13.5 dpc utilizadas en el <i>microarray</i>	154

5.5. Diagrama <i>heatmap</i> del <i>microarray</i> del perfil de expresión de miRNAs en gónadas embrionarias	158
5.6. RT-Q-PCR para <i>mmu-mir-103</i> para validar el <i>microarray</i> . .	162
5.7. RT-Q-PCR para <i>mmu-mir-135a</i> para validar el <i>microarray</i> .	162
5.8. RT-Q-PCR para <i>mmu-mir-126</i> para validar el <i>microarray</i> . .	163
5.9. RT-Q-PCR para <i>mmu-mir-96</i> para validar el <i>microarray</i> . .	163
5.10. RT-Q-PCR para <i>mmu-mir-193</i> para validar el <i>microarray</i> . .	164
5.11. RT-Q-PCR para <i>mmu-mir-183</i> para validar el <i>microarray</i> . .	164
5.12. RT-Q-PCR para <i>mmu-mir-202</i> para validar el <i>microarray</i> . .	165
5.13. RT-Q-PCR para <i>mmu-mir-182</i> para validar el <i>microarray</i> . .	165
5.14. Localización genómica de miRNAs en el cromosoma X	178
5.15. Localización genómica de miRNAs en el cromosoma 12 . . .	179
5.16. <i>mmu-mir-124-1</i>	181
5.17. <i>mmu-mir-124-2</i>	182
5.18. <i>mmu-mir-124-3</i>	182
5.19. Bucle de los precursores <i>mmu-mir-124-1, 2 y 3</i>	183
5.20. Amplificación de los precursores de miR-124 en gónadas de 13.5 dpc	184
5.21. RT-Q-PCR para miR-124 en gónadas embrionarias de 11.5 y 13.5 dpc	185
5.22. Hibridación <i>in situ</i> para miR-124 en gónadas embrionarias de 11.5 y 13.5 dpc	186
5.23. Ensayo de luciferasa para la diana miR-124 en 3'UTR de <i>Sox9</i>	188
5.24. Amplificación de miR-124 por RT-Q-PCR tras el experimento de inhibición de la expresión de miR-124 en células gonadales XX	189
5.25. RT-Q-PCR para <i>Sox9</i> tras el experimento de inhibición de la expresión de miR-124 en células gonadales	190
5.26. Detección de SOX9 mediante inmunofluorescencia en células gonadales transfectadas con el <i>antagomir</i> para miR-124.	192
5.27. RT-Q-PCR para miR-124 tras el experimento de sobreexpresión de miR-124 en células gonadales XY de 13.5 dpc y en condrocitos.	193

5.28.Efecto de la expresión ectópica de miR-124 en los niveles de mRNA de <i>Sox9</i> en células gonadales XY de 13. dpc y en condrocitos.	194
5.29.Detección de SOX9 mediante inmunofluorescencia en células gonadales XY de 13.5 dpc transfectadas con el vector de expresión <i>mmu-mir-124-2</i>	196
5.30.Detección de SOX9 mediante inmunofluorescencia en condrocitos transfectadas con el vector de expresión <i>mmu-mir-124-2</i>	197
5.31.Porcentaje de células gonadales XY de 13.5 dpc y condrocitos transfectados que expresan SOX9	198
5.32.RT-Q-PCR para miR-124 tras el experimento de sobre-expresión de miR-124 en células gonadales XY de 11.5 dpc.	199
5.33.RT-Q-PCR para <i>Sox9</i> tras el experimento de sobre-expresión de miR-124 en células gonadales XY de 11.5 dpc.	200
5.34.Porcentaje de células transfectadas SOX9+ en células gonadales XY de 11.5 dpc	201
5.35.Detección de SOX9 mediante inmunofluorescencia en células gonadales XY de 11.5 dpc transfectadas con el vector de expresión <i>mmu-mir-124-2</i>	202
5.36. <i>mmu-mir-144</i>	203
5.37.Bucle del precursor de miR-144	204
5.38.Cuantificación por RT-Q-PCR de la expresión de <i>miR-124</i> en gónadas embrionarias de 11.5 y 13.5 dpc	205
5.39.Hibridación <i>in situ</i> para miR-144 en gónadas embrionarias de 11.5 y 13.5 dpc	206
5.40.Ensayo de luciferasa para corroborar la diana de miR-144 de <i>Rspo1</i>	208
5.41.Eficiencia de la transfección evidenciada por la fluorescencia de la proteína GFP <i>in vivo</i>	209
5.42.Cuantificación por RT-Q-PCR de la expresión de miR-144 tras el experimento de inhibición con Ag-144.	210
5.43.Cuantificación por RT-Q-PCR de la expresión de <i>Rspo1</i> tras el experimento de inhibición de miR-144 en células gonadales XY de 13.5 dpc	211
5.44.Cuantificación por RT-Q-PCR de la expresión de miR-144 tras el experimento de sobre-expresión de miR-144 en células gonadales XX de 13.5 dpc.	213

5.45. Cuantificación por RT-Q-PCR de los niveles de mRNA de <i>Rspo1</i> tras el experimento de sobre-expresión de miR-144 en células gonadales XX de 13.5 dpc.	214
6.1. Hipótesis sobre el posible papel de miR-124 y miR-144 en el control genético del desarrollo gonadal.	238

Índice de cuadros

4.1. Cebadores utilizados para el sexado de embriones	102
4.2. <i>Antagomirs</i> utilizados para la inhibición de miRNAs	112
4.3. Plásmidos utilizados para la sobre-expresión de miRNAs	113
4.4. Vectores de expresión de extremos 3' UTR de genes codificantes	114
4.5. Cebadores RT-Q-PCR para Genes Codificantes	119
4.6. Cebadores RT-Q-PCR de miRNAs para validación del <i>microarray</i>	123
4.7. Cebadores RT-Q-PCR para miR-144	125
4.8. Cebadores RT-Q-PCR para miR-124	129
4.9. Cebadores para la amplificación de los tres precursores de miR-124	131
4.10. Sondas utilizadas en la hibridación <i>in situ</i>	131
4.11. Anticuerpos utilizados en la detección de proteínas	137
5.1. Número de gónadas utilizadas en la extracción del RNA para la hibridación con el <i>microarray</i>	150
5.2. Concentraciones de las muestras de RNA utilizadas para el <i>microarray</i>	151
5.3. Mediana de las señales de las réplicas de cada sonda para los miRNAs con expresión diferencial	157
5.4. miRNAs seleccionados para la validación del <i>microarray</i>	161
5.5. μ iRNAM=lista de miRNAs	166
5.6. μ iRNAM=lista de términos GO	167
5.7. μ iRNAM=GO:Gonad development	168

5.8. μ iRNAM=GO:Sex differentiation	168
5.9. μ iRNAM=GO:Male sex determination	169
5.10. μ iRNAM=GO:Male sex differentiation	169
5.11. μ iRNAM=GO:Male gonad development	169
5.12. μ iRNAM=GO:Androgen receptor signaling pathway	170
5.13. μ iRNAM=GO:Male somatic sex determination	170
5.14. μ iRNAM=GO:Wnt receptor signaling pathway	171
5.15. μ iRNAM=GO:female gonad development	172
5.16. μ iRNAM=GO:Germ cell development	172
5.17. μ iRNAM=GO:Male germ-line sex determination	173
5.18. μ iRNAM =descripción de los genes resultantes	176
6.1. Trabajos publicados sobre miRNAs durante el desarrollo sexual en mamíferos	218

Abreviaturas

ac-pre-miRNA miRNA precursor AGO2-cortado

ADARs adenosin desaminasas que actúan sobre el RNA

AGO argonauta

AMH Hormona antimulleriana

CDS Secuencias codificantes

CLL leucemia crónica linfocítica

COL2A1 colágeno de tipo II

DAX1 orphan nuclear receptor Dax-1

DCP2 enzima eliminadora de la caperuza

DGCR8 Proteína 8 de la región de DiGeorge

DHH Desert hedgehog gene (gen del erizo del desierto).

DMRT1 DSX- and MAB3-related transcription factors family, gene 1
(gen 1 de la familia DMRT).

dpc Días post-coitum

dsRNA RNA de cadena doble

ds-RNA RNA de hebra doble

eIFs Factores eucarióticos de iniciación de la traducción

ESCRT complejo endosomal

ESCs células madre embrionarias

evo-devo evolución de los procesos de desarrollo

EXP5 exportin-5

FGF9 fibroblast growth factor 9

FOG2 friend of GATA

FOXL2 forkhead box L2

FU dominios furina

FZ receptores de membrana FRIZZLED

GATA4 GATA binding protein 4

GO Gene ontology

GW182 proteína que contiene repeticiones de trinucleótidos glicina-triptófano de 182 KDa

HDACs histonas deacetilasas

HEK-293 Células de riñón embrión humano

HMG high-mobility group

HSP4 gen del síndrome 4 Hermansky-Pudlak

HTS high-throughput screening

IRES secuencias internas del ribosoma

JNK proteína quinasa c-Jun NH2-terminal

KATs histonas acetiltransferasas

KDMs histonas demetilasas

KMTs histonas metiltransferasas

LNA Ácido Nucléico bloqueado

MGI mouse gene detail

MLLE dominio C-terminal PABC o

MRE Emparejamiento de un miRNA y un mRNA

mRNA pre-mRNA precursores de

mRNA RNA mensajero

mRNP mRNA-proteína

NLS señal de putativa localización nuclear

NMD mecanismo mediado por la degradación del mRNA sin sentido

NR5A1 nuclear receptor subfamily type 5, group A, member 1 gene

PABPC Proteína citoplásmica de unión a poliA

PABP proteína de unión a poliA

PAIP2 proteína 1 y 2 de interacción con PABP PAIP1,

PAM2 motivo 2 de interacción con PABPC

PDGFR Platelet-derived growth factor receptor (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas).

PGC células germinales primordiales

PKC proteína C quinasa

piRNA PIWI-RNA

PIWI P-element induced wimpy testis

pre-miRNA miRNA precursor

pri-miRNA miRNA primario

PRPS1 fosforribosil pirofosfato sintetasa

PTC codones de prematura terminación

PTGDS Prostaglandin D2 synthase (sintasa de la Prostaglandina D2).

RBP proteínas de unión al RNA

RISC o miRISC, complejo de silenciamiento inducido por miRNAs

RNAi RNA de interferencia

RRM1-4 dominios N-terminal de reconocimiento de RNA

RSPO1 R-Spondin 1

SD dominio bipartito de silenciamiento

SF1 steroidogenic factor 1

shmiRNAs pequeños microRNAs horquillados

shRNAs pequeños RNAs horquillados

SILAC marcaje de isótopos con aminoácidos en cultivos de células

siRNA RNA de interferencia sintéticos

SOX SRY-related HMG box

SOX8 sry-box containing gene 8

SOX9 sry-box containing gene 9

SP péptido de señalización N-terminal

SRY sex determining region Y

SSCs células madre espermatogoniales

ss-RNA RNA de hebra simple

TESCO core testis-specific enhancer of Sox9

TRBP/TAR proteína receptiva a la transactivación

TSP1 dominio trombospondina

UTR región no transcrita

WNT4 wingless-type MMTV integration site family, member 4

WT1 Wilms' tumour suppressor gene 1

XRN1 complejo citoplasmático de exonucleasas 5'-3'

1. Abstract

MicroRNAs involved in sex determination

Introduction

Considering the growing incidence of human infertility, which is also involving domestic mammals and endangered species, the social interest in improving our understanding of the reproductive biology is also increasing. In scientific terms, this mainly translates into an interest to clarify the physiological, endocrine, and genetic processes involved in the development and function of the gonads, the gamete-producing organs, and the sex hormones. The knowledge of the basic genetics of the gonadal development will allow us to explain, and if so to approach in therapeutic and conservation terms, the pathology that causes reproductive disorders. To name some of them, we can include azoospermia, premature ovarian failure, gonadal dysgenesis, true hermaphroditism and male or female pseudohermaphroditism, and also others, most of which have a genetic origin which makes it necessary to diagnose and to explain. According to the high interest of reproductive disorders, the international scientific community has made significant efforts in recent years to elucidate the genetic basis of sex determination, a genetic process which decides whether gonads of an individual will become testes or ovaries, and as a result, if this individual will develop into a male or a female. Although a substantial progress has been made in this field, the current situation is still far from achieving a full understanding of this process, so we must continue putting in an effort.

Today we know that in mammals the presence of a Y chromosome determines the male sex, while its absence implies a female development. At the beginning of its embryonic development, the gonad is undifferentiated and bipotential, which means it can follow two alternative developmental paths which are mutually exclusive under normal conditions: either testis or ovary. In the embryonic XY gonad, the *SRY* gene (located on the Y chromosome) initiates a chain of gene activation that causes a sub-group of somatic cells to differentiate as Sertoli cells, which are responsible for organizing the testicular development (Gubbay *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*,

1. Abstract

1990b; Koopman *et al.*, 1991a). Sertoli cells get arranged to form sex cords (precursors of the adult testis seminiferous tubules), the germ cells located inside the sex cords initiate a “mitotic arrest”. Sertoli cells also control the differentiation of Leydig cells, secretory cells of testosterone and dihydrotestosterone which will masculinize the body. During mouse gonadal developmental, SRY protein binds, along with steroidogenic factor SF1, to a testis-specific enhancer of the *Sox9* gene and activates it (Sekido y Lovell-Badge, 2008). Gain-of-function mutations in *SOX9* induce XX gonads to follow the testicular pathway (Huang *et al.*, 1999) and loss-of-function mutations of this gene provoke XY gonads to develop as ovaries (Barrionuevo *et al.*, 2006b). Therefore, SRY as well as SOX9, are both necessary and sufficient to activate testicular organogenesis. SOX9 activates *Fgf9* gene, which in turn stabilizes the expression of *Sox9* establishing a self-maintenance loop of expression of *Sox9* in the male gonad. SOX9 also activates the expression of other genes such as *Amh* (anti-müllerian hormone; Barbara *et al.* (1998), *Vnn1* (Vanin-1; (Wilson *et al.*, 2005b)), and *Pgds* (prostaglandin synthase; (Wilhelm *et al.*, 2007)); known to be involved in testicular differentiation. According to these facts, it is clear that *Sox9* is the pivotal gene of testis development, and this is true not only in mammals but also in all vertebrates investigated.

In the XX gonad the absence of Y chromosome, and therefore the SRY protein, involves the inactivation of *Sox9* and the activation of *Rspo1* and *Wnt4*, initiating a cascade of gene activation that leads to ovarian development. If *Sox9* gene is not expressed, the bipotential somatic cells in the embryonic gonad will differentiate as pre-follicle cells (not as pre-Sertoli cells), whereas the cells of steroidogenic lineage will differentiate as theca cells (instead of Leydig cells), and germ cells initiate meiosis, and some afterwards they enter “meiotic arrest”. In summary, in the absence of *SRY*, the gonadal organogenesis follows the ovarian pathway and the somatic phenotype of the individual will be female.

The classical view introduced by Jost (1953), which established ovarian development as the “default” pathway, has changed based on new data that describe total or partial sex reversal in XX mice (with the common denominator of the activation of *Sox9*), showing the existence of loss-of-function mutations in genes such as *Wnt4*, and *Rspo1*. *Wnt4*^{-/-} XX Individuals showed partially masculinized gonads with *Sox9* and *Fgf9* expression, Leydig cell differentiation, cell migration from the adjacent mesonephros into the gonad (Parma *et al.* (2006b) reported a loss-of-function mutation in the *Rspo1* gene that causes a complete female-to-male sex reversal (XX males). This was the first reported case of a single mutation in a gene that causes this kind of complete sex reversal and this mutation puts *RSPO1* as the likely ovarian determinant in mammals. *RSPO1* activates genes involved in ovarian development and either directly or indirectly inhibits genes implicated in testicular development.

Another gene involved in ovarian organogenesis is *Foxl2* which is necessary for the development and the maintenance of the ovarian structure (Schmidt *et al.*, 2004). The absence of functional granulosa cells induces a premature initiation of folliculogenesis and subsequent ovarian failure. However, the absence of complete female-to-male sex reversal in *Foxl2*^{-/-} mutant mice indicates that this is not an ovarian determinant (Uda *et al.*, 2004).

Available data suggest that the *Sox9* gene expression is repressed by *Rspo1* and *Wnt4* in XX gonads during the embryonic period, while in the adult stage it seems to be inhibited by *Foxl2* gene. The abolition of the latter gene in the adult ovary is sufficient to induce the activation of *Sox9* (Uhlenhaut *et al.*, 2009). The result is a trans-differentiation of ovarian somatic cells into cells with typical testicular phenotype: Sertoli cells and Leydig cells (which produce testosterone), showing that the maintenance of the ovarian structure must be an active and ongoing process. In the XX gonads of mice, the RSPO1 protein either activates WNT4 or has a redundant function along with it (both genes are synergistic), in order to stabilize cytoplasmic β -CATENIN, which forms a complex with TCF (T-cell factor) and migrates to the nucleus and activates genes involved in ovarian development. In the XY gonad the reason for the inactivity of *Rspo1* is not known. The molecular context that emerges from the embryonic gonad, comes from a bipotential indifferentiated gonad which maintains an “equilibrium” between the two opposing signals that activate two cascades of gene expression, one leading to the development of testis and the other to the development of the ovary. In males, the presence of *Sry* causes an imbalance between the signals, thus inducing testicular organogenesis and inhibiting the ovarian one.

Nevertheless, 20 years after the discovery of the Y-linked testis-determining gene (*SRY*), the process is not completely understood. This fact suggests the need for new research approaches in this field. Recent studies have demonstrated that translation of many genes is controlled by microRNAs (miRNAs), mainly in developmental processes. In the present scientific project we want to identify and study the possible involvement of miRNAs in the control of genes responsible for mammalian sex determination and differentiation.

Biological function of microRNAs.

MicroRNAs (miRNAs) were initially described in *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993). They are small RNAs involved in post-transcriptional regulation of gene expression at the crucial moments of development. Subsequent investigations identified miRNAs with the ability to regulate gene expression in different organisms: protozoa, fungi, plants and animals. The control of gene expression at the post-

1. Abstract

transcriptional level is carried out at different levels including renewal, processing, longevity and translation of messenger RNAs, and permit cells to regulate protein content after transcription has taken place. The discovery of non-coding RNAs like antisense transcripts and the so-called interfering RNAs (microRNAs and siRNAs) introduces a new mechanism for post-transcriptional regulation.

The path of miRNAs begins in the nucleus where the transcription of the corresponding genes originate primary miRNAs or pri-miRNAs which undergo further processing by the Drosha endonuclease producing fragments in a form of a loop called pre-miRNAs (double-stranded RNAs) (Figure 3.2 page 53). These are transported to the cytoplasm where they are processed by the Dicer endonuclease (an RNase III specific for double-stranded RNA) that gives rise to mature miRNAs (21 to 23 nucleotides). These are incorporated into a RISC complex (RNA-Induced Silencing Complex), which binds to the miRNA-specific target sequences in the non-translated 3' end (3'UTR) of this mRNA, either causing its degradation or inhibiting its translation. Pairing between the miRNA and its target can be specific in its entire length and in this case, the miRNA-RISC complex mediates the degradation of the involved mRNA.

Several hypotheses have been proposed on how miRNAs operate on their target genes. One hypothesis states that miRNAs inhibit translation by actually repressing the initiation of translation. Another hypothesis indicates that miRNAs are involved in a step stimulating degradation of a nascent peptide subsequent to the initiation of translation. More recent studies discuss why this regulation occurs by degradation of the messenger, as there are many studies that show how miRNAs decrease the level of mRNA of its target genes.

Huntzinger y Izaurralde (2011) have recently proposed a new step by step silencing model, in animals, which begins with the recognition of a target by a complex of miRNA with an AGO protein (Figure 3.3 page 71). miRNAs bound to AGO proteins recognize their target messengers by an imperfect matching in their binding sites. AGO interacts with GW182, which in turn interacts with PABPC joined to the polyA tail of mRNA. The assembly of this complex on mRNA ultimately triggers deadenylation. Thus, miRNAs lead their target to the cellular degradation pathway of mRNA 5'-3', where the messengers are deadenylated by the CAF1-CCR4-NOT deadenylase complex. Depending on cell type and/or specificity of the target, the deadenylated mRNAs can be stored in a translational repression state or continue with the degradation process where the next step is decapping and finally degradation by means of a 5'-3', XRN1 cytoplasmic exonuclease complex.

The importance of the regulation of gene expression by miRNAs in the developmental process was evidenced by the *Dicer* mutant mice

that could not process the pre-miRNAs. These mutant mice showed embryonic lethality at E7.5 stage which manifested that miRNAs are involved in the control of developmental from very early stages (Bernstein *et al.*, 2003). Furthermore, it was found that in these mice some DICER activity remained, and therefore the processing of miRNAs was still being produced in the early stages of development, due to the presence of protein DICER transmitted through the cytoplasm of the oocyte. The elimination of this DICER activity and that of the zygote itself has further dramatic phenotypic consequences (Giraldez *et al.*, 2006).

Role of miRNAs in sexual differentiation.

Although the role of protein-coding genes as regulators of gene expression, continues being investigated, a new piece of knowledge has arisen that focuses on the regulatory role of gene expression by non-coding RNA. Regarding mammalian sex determination and differentiation, it is known that two genes involved in gonadal development, *WT1* and *FOXL2* are regulated not only by proteins but also by antisense transcripts (Gong *et al.*, 2001; Cocquet *et al.*, 2005).

By comparing the expression profiles of miRNAs between embryonic gonads of XX and XY mouse embryos, several miRNAs showing sexually dimorphic expression have been identified at the 13.5 dpc stage (Takada *et al.*, 2009). However, although the expression profiles of miRNAs in gonads at the time of sex determination in mice (11.5 dpc) have not yet been established, the fact that differences between XX and XY gonads have been detected at 13.5 dpc, clearly suggests that sexually dimorphic expression profiles of miRNAs are probably established at the beginning of gonadal development and that they must play an important specific regulatory role that would depend on the chromosomal constitution of the gonad (XX or XY).

As mentioned above, the activation of *Sox9* is the key to trigger testicular development in the embryonic gonad. *Sox9* is also known to be involved in neurogenesis and it has been demonstrated that its expression in the brain is regulated by miR-124 (Cheng *et al.*, 2009). This data suggest that, possibly, it may be regulated by this miRNA also in the gonad. Accordingly, Kim *et al.* (2010) have shown that *Dicer* is required for proper function and survival of Sertoli cells in the adult. Conditional *Dicer* knock-out mice (*Dicer*^{-/-}) in the Sertoli cells are indistinguishable from the normal ones at birth but Sertoli cells of these mutant mice show a significant drop in the levels of expression of several sertolian markers (*Sox9*, *Amh*, *Sox8*, *Fgf9* and *Dhh*) and spermatogenic failure which increases with age, most likely related to the spermatogonial stem cells (SSCs) depletion process, observed in them. The phenotype of these mice also displays an increase in the number of apoptotic cells. Papaioannou

1. Abstract

et al. (2009); Kim *et al.* (2010), using the same Cre mouse strain but with a different *Dicer* allele, have also reported a severe spermatogenic failure, massive apoptosis of Sertoli cells and germ cells and a decrease in the transcription of the key regulators of testicular development and spermatogenesis. These facts show that miRNAs must have an essential role in fertility and reproduction, and that this is a new field of research that deserves to be approached immediately.

Objectives

In this doctoral thesis our main objective was to investigate if miRNAs play a role in sex determination, by regulating the genes involved in gonadal differentiation. To do this we set out to conduct a space/temporal study of the expression profiles of miRNAs via microarray technology.

The high quantity of information that can be derived from these studies makes it necessary to address the data analysis utilizing bioinformatics tools. There are tools which allow us to standardize, identify and organize the data provided by microarray, which would allow us to identify the possible miRNAs that might play a role in sexual differentiation, and there are also databases that can identify genes that have potential targets for these miRNAs. These potential targets are also determined by bioinformatics methods which can result in a high number of false positives, in addition many targets, despite being functional, may not have a relevant significant biological role in a given context. That is why a need to develop new tools that would allow, under certain criteria, to select from all possible routes of regulation that would result from the microarray analysis, those with a higher real biological potential arose.

We decided to conduct a profound study of some of these miRNAs and their target genes that are particularly relevant regarding sexual differentiation by means of inhibition studies of over-expression of miRNAs on their target genes, analyzing the effects that these manipulations may have on their possible target genes. Although *a priori* was unable to decide to study concrete miRNAs, as this depended on the results of previous analysis, they finally located the key genes which could possibly be regulated by microRNAs for which we have conducted this deep study, which so far is the first to provide evidence of the engagement of microRNAs in the time of sex determination, opening further elaborations for future research.

Material and Methods

The microarray hybridizations for miRNAs were carried out from the total RNA of mice gonads (Swiss strain) at age 11.5 dpc and 13.5 dpc. The results of these microarray for 8 miRNAs were validated by real time RT-PCR. A bioinformatics tool called μ iRNAM was developed, to search for

real biological significant targets, where the results are filtered according to the biological process in which they intervene consistent with GO ends (Gene ontology) which are selected according to our study. Two pairs of miRNAs and genes for further study were selected in order of importance: miR-124 and *Sox9* on the one hand, and on the other hand miR-144 and *Rspo1*.

Ovary-specific expression of 13.5 dpc of miR-124 was validated by Q-RT-PCR and *in-situ* hybridization, and PCRs were performed to detect the 3 precursors of miR-124 in gonad. Luciferase assays were carried out with the 3'UTR end of *Sox9* and with an over-expression plasmid of miR-124 in HEK293 cells. The regulation of *Sox9* and miR-124 were tested using lipofectamine transfection experiments in primary cultures of gonadal cells of 13.5 and 11.5 dpc and in chondrocytes. Specific antagomirs inhibiting miRNA in female and activating it in male and in chondrocytes with over-expression plasmids for miR-124 were used. Forty-eight or seventy-two hours after transfection changes in the levels of miR-124 were detected through Q-RT-PCR. Changes in the levels of gene expression of *Sox9* were detected by Q-RT-PCR and indirect immunofluorescence.

Validation of the testis-specific expression of 13.5 dpc of miR-144 was also carried out by Q-RT-PCR and *in-situ* hybridization. Likewise luciferase assays were performed with the 3'UTR of *Rspo1* and an over-expression plasmid of miR-144 in HEK293 cells. Primary cultures of gonadal cells of 13.5 dpc XX and XY were transfected by nucleofection. The inhibition of miR-144 in the male was made with a specific antagomir and the activation of this miRNA in the female was performed by means of an over-expression plasmid. Forty-eight hours after transfection, the levels of miR-144 was checked by Q-RT-PCR, and mRNA levels of *Rspo1* was confirmed by Q-RT-PCR.

Results

Microarray.

Among 757 miRNAs included in the miRCURY LNA microarray slides (Exiqon) used in this experiment, 71 showed differential expression when comparing either between sexes or between developmental stages. The expression profiles of these miRNAs are shown as a heat map diagram (Figure 5.5 page 158), where rows represent miRNAs and columns represent different samples. This diagram also includes a two-way hierarchical clustering of genes and samples. The miRNA clustering tree, performed on $\log_2(\text{Hy}_3/\text{Hy}_5)$ ratios (standard deviation >0.5 between the four samples), permits the identification of 5 different gene clusters, labeled as A-E in figure 5.5 (page 158). Clusters A and E correspond to

1. Abstract

those miRNAs that are either down-regulated (A) or up-regulated (E) during the transition between the two developmental stages investigated (11.5 and 13.5 dpc), but show no significant differences of expression between testes and ovaries at 13.5 dpc. According to this expression pattern, these miRNAs are probably not involved in gonad differentiation and have thus little interest in this study. Contrarily, the 20 miRNAs included in clusters B-D showed sex-specific expression differences in 13.5 but not in 11.5 gonads, and may thus be good candidates to be involved in sex determination. Cluster B includes 3 miRNAs which are strongly up-regulated in 13.5 dpc ovaries and down-regulated in 13.5 testes, suggesting a potential role in ovarian development. Cluster C contains 6 miRNAs which are strongly up-regulated in 13.5 dpc testes but not in 13.5 dpc ovaries, suggesting a role in testis development. Finally, cluster D includes 11 miRNAs strongly up-regulated in 13.5 dpc ovaries but not in 13.5 dpc testes and, like miRNAs in cluster B, could be involved in ovarian development. The outcomes of our miRNA microarray profiling experiment have been validated by Q-RT-PCR. The expression levels of a total of 8 selected miRNAs, included in all 5 clusters, were measured in the four samples and compared with the corresponding array expression profiles (Figures 5.6—5.13 pages 162—165). In general, microarray values correlated quite well with the Q-RT-PCR ones according to regression analysis ($R^2=0.97$, $P=0.0128$). Although the clustering analysis placed *mmu-mir-126-5p* and *mmu-mir-103* in cluster A because differences in expression between developmental stages are higher than differences between sexes at 13.5 dpc, the differential expression in 13.5 male and female gonads should be taken into account. Thus, we included these miRNAs in the Q-RT-PCR validation set. Our results confirmed that both miRNAs are significantly more expressed in female gonads at 13.5 dpc (miR-103 also at 11.5 dpc), suggesting a potential role in ovarian development.

μiRNAM.

In order to find possible candidate genes to be regulated by some of the 22 miRNAs (Table 5.5 page 166) which show differential expression in microarray we performed specific searches with the program *μiRNAM*, according to the distinct GO ends (Table 5.6 page 167). The results of these searches are listed in 11 tables, one for each GO end (Tables 5.7—5.17 pages 168—173). Identifying a total of 106 genes (Table 5.18 page 176), but highlighting 11 for its known direct involvement in sexual development process: *Ar*, *Dmrt1*, *Sox9*, *Sox8*, *Sry*, *Nr0b1*, *Cyp17a1*, *Fhl2*, *Fshr*, *Fst*, *Rspo1*.

From these 22 miRNAs, 9 are located independently in the genome and 13 are grouped in clusters. We have found two large clusters specifically, one on chromosome X (Figure 5.14 page 178) and one on chromo-

some 12 (Figure 5.15 page 179). We used the bioinformatics program TESS (Transcription Element Search System) to look for possible regulatory sequences of miRNA genes of miRNAs resulting in transcription factors as interesting as SRY, AR, WT1, SF1, REST and AMH, among others.

mmu-mir-124 and Sox9.

We identified miR-124 as a good candidate gene for ovarian development as several genes involved in sex development share potential targets of this miRNA in the 3' UTR region, including *Sox9*, *Sox8*, *Dmrt1* and *Ar*. Furthermore, miR-124 was included in the cluster B of our microarray screening (differentially expressed in developing ovaries). These data strongly suggested that miR-124 may play an important role in early steps of ovarian development and thus, that this miRNA deserved closer study.

In order to confirm the expression data reported by our microarray screening for miR-124, we also performed Q-RT-PCR analyses and *in situ* hybridization on mouse embryonic gonads. Expression quantification by Q-RT-PCR confirmed that miR-124 is up-regulated in the ovary but not in the testis during the critical period of gonad differentiation in mouse embryos between 11.5 and 13.5 dpc (Figure 5.21 page 185). Similarly, *in-situ* hybridization with a miR-124-specific probe confirmed the female specific expression of this miRNA and showed that expression is mainly produced at the cortical region of the 13.5 dpc female gonad (Figure 5.22 page 186). The medullary region showed a labeling level similar to that of the adjacent mesonephros or the male gonad.

Since the 3'UTR region of *Sox9* contains a miR-124 target sequence, we hypothesize that miR-124 could be responsible for maintaining down-regulation of *Sox9* in the female gonad during the sex differentiation process between 11.5 and 13.5 dpc. To test this hypothesis, we transfected 13.5 dpc embryonic gonadal cells with a specific miR-124-silencing probe, designated as Ag-124, that antagonizes the action of miR-124 (Exiqon). The expected knock-down effect in the expression level of miR-124 in cells transfected with the antagomir was confirmed by Q-RT-PCR (Figure 5.24 page 189). Immunofluorescence analysis revealed that the SOX9 protein was absent in the nucleus of untreated XX embryonic gonadal cells and in those of XX cells transfected with the control antagomir, Ag-144. Contrarily, SOX9 was ectopically produced in XX gonadal cells transfected with the mir-124-specific antagomir, as well as in XY gonadal cells, which express *Sox9* in normal conditions (Figure 5.26 page 192). The levels of *Sox9* mRNA were determined by Q-RT-PCR, showing a significant increase of *Sox9* mRNA in XX gonadal cells transfected with Ag-124, but not in untreated XX cells and in those transfected with Ag-144 (Figure 5.25 page 190).

1. Abstract

In the other hand, over-expression of miR-124 induces down-regulation of *Sox9* in embryonic chondrocytes but not in XY gonadal cells. According to the above hypothesis, over-expression of miR-124 would be expected to induce down-regulation of *Sox9* in cells expressing this gene naturally. To test this possibility, we transfected both cultured chondrocytes and XY gonadal cells with either a precursor miRNA expression vector containing the mouse *mmu-mir-124-2* gene, or a negative control vector containing a scrambled miRNA sequence (Genecopoeia). The levels of miR-124 increased considerably in cells transfected with the expression vector, as measured by Q-RT-PCR (Figure 5.27 page 193). The immunofluorescence analyses in chondrocytes demonstrated that the percentage of transfected chondrocytes containing SOX9 protein was significantly lower in cells transfected with the *mmu-mir-124-2* expression vector than in those transfected with the control vector. However, this effect was not observed in XY gonadal cells, in which the percentage of cells expressing SOX9 did not decrease in cells transfected with the *mmu-mir-124-2* expression vector (Figure 5.31 page 198). Q-RT-PCR showed that the levels of *Sox9* mRNA was significantly reduced in chondrocytes transfected with the *mmu-mir-124-2* expression vector in relation to those transfected with the control vector, whereas no significant difference was observed in XY gonadal cells, which is consistent with the results of the immunofluorescence studies (Figures 5.29 page 196 and 5.30 page 197). Since SOX9 expression is very robust in 13.5 dpc mouse embryonic testes, we have repeated the entire experiment using 11.5 dpc XY gonadal cells, where SOX9 transcription has just started. However, we obtained similar results, confirming that overexpression of miR-124 is not sufficient to affect SOX9 expression in XY gonadal cells (Figures 5.32–5.35 pages 199–202).

mmu-mir-144 and Rspo1.

miR-144 showed differential expression in testes of 13.5 dpc according to our microarray data. These data were validated by Q-RT-PCR and in-situ hybridization (Figures 5.38 page 205 and 5.39 page 206). The use of the TESS program to find regulatory sequences in 5' end of gene *mmu-mir-144* resulted in several transcription factors, highlighting SRY and AMH. Through the program μ IRNAM we noticed that *Rspo1* and *Fst* were potential target for miR-144. In order of importance, we have focused on studying the possible regulation of *Rspo1* by miR-144. To do this we did luciferase assays with the 3' UTR end of the gene *Rspo1* and an over-expression plasmid for miR-144, confirming that miR-144 has a functional target in the 3' UTR end of *Rspo1* (Figure 5.40 page 208).

On the basis of the discussion above, we conducted over-expression experiments and inhibition of miR-144 in primary cultures of XX and XY gonads cells. Levels of miR-144 were inhibited with a specific antagomir in the male gonadal cells. The Q-RT-PCR for miR-144 confirmed that the

endogenous levels had decreased significantly (Figure ?? page ??). The effect on the messenger of *Rspo1* was measured by Q-RT-PCR (Figure 5.43 page 211) but the results were not significant, showing that in vitro inhibition of miR-144 with a antagomir is not sufficient to activate the expression of *Rspo1* in males. On the other hand experiments on over-expression in XX gonadal cells with a plasmid specific for miR-144 were carried out. Similarly miR-144 levels after transfection were measured by RT-Q-PCR, confirming that this miRNA was significantly activated (Figure 5.44 page 213). We also measured the effect on mRNA of *Rspo1* but a significant decrease in the female was not observed (Figure 5.45 page 214).

Discussion

-miRNAs play crucial roles in sex determination.

Despite the discovery of the mammalian testis-determining gene *SRY* twenty years ago (Gubbay *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990b), critical aspects of the genetic basis of mammalian sex determination remain to be understood. Although many genes are currently known to be involved in the process, it is thought that some are still missing, particularly those involved in specifying the ovary, making it difficult to unravel the regulatory network controlling early gonad development. Since miRNAs are involved in many developmental processes, it is reasonable to suspect that they may also have some role in sex determination. Several recent studies reporting the existence of some miRNAs with sexually dimorphic expression (Takada *et al.*, 2009), and showing that DICER is required for the maintenance of Sertoli cell phenotype and function Papaioannou *et al.* (2009); Kim *et al.* (2010), strongly suggest that this is the case in mammals. Using miRNA microarray technology, we have identified 22 miRNAs showing both sexually dimorphic and developmental stage-dependent expression patterns in the gonads at the critical period of sex determination.

In our expression profiling studies, a high number of miRNAs (71 among 757) showed differential expression in the gonads when comparing either between sexes or between developmental stages (11.5 and 13.5 dpc), suggesting that miRNAs may play multiple roles in gonad development, both prior to and after sexual differentiation. Since the genes responsible for sex determination are known to be expressed in somatic cells of the supporting lineage (Albrecht y Eicher, 2001), a portion of these 71 miRNAs, those expressed in other cell types (endothelial, steroidogenic lineage precursors and germ cells), are probably not involved in the process of sex determination. However, 22 of them were shown to be either up- or down-regulated during the critical period of sexual development in a sex-specific manner, indicating that they could indeed participate in

1. Abstract

sex determination (see Figure 5.5 page 158). Using a cloning-based miRNA amplification profiling method (mRAP), Takada *et al.* (2009) have reported that some miRNAs show a sex-dependent expression pattern in 13.5 dpc mouse gonads. Concerning some of the miRNAs identified by these authors, miR-124 for instance, their results contradict those of our microarray-based screening. However, our data, particularly those related to miR-124, have been repeatedly validated by RT-Q-PCR, which is not the case of the Takada's study. It is interesting to point out that among the 22 miRNAs identified as potentially involved in early gonad development, only 6 of them (group C in Figure 5.5 page 158) show an expression pattern consistent with a role in testis development, whereas the remaining 16 miRNAs are more likely involved in ovary development. Considering that miRNAs act as negative regulators of mRNA translation, this striking unbalance could probably have a biological significance. This fact might be seen as indirect evidence that the number of testis-promoting genes that have to be repressed in the developing ovary is higher than the number of ovary-promoting genes that require repression in the developing testis.

- μ iRNAM is a new bioinformatics tool for identifying biologically relevant miRNAs

Form the total of 106 genes selected by the search that was done by the program μ iRNAM, we have focused on eleven of them to discuss their possible regulation by one or more than 22 miRNAs identified in our microarray experiment. We have selected these eleven genes because we know they have a known and direct involvement in determination and/or sex differentiation and we set up different hypothesis about regulation for each gene and miRNA summarized in the table below.

-Clustered miRNAs show coordinated regulation

Many genes of miRNAs are located in isolated and scattered forms throughout the genome, but there is a proportion of them which forms clusters so that their transcription can be carried out by the way of a long common transcript regulated by a single promoter or other regulatory sequences (Rodriguez *et al.*, 2004). Many of the miRNAs identified in our study are organized in this way. A clear example is the cluster located in the band A7.1 of the long arm of chromosome X in mouse, where 7 genes of miRNAs differentially expressed in ovary 13.5 dpc are located (Figure 5.14 page 178). This cluster is divided into two regions under the control of two different regulatory sequences as well as two alternative transcription initiation sites. All miRNAs located in the left region are differentially expressed in the ovary of 13.5, while in the right region 3 miRNAs are found which change their expression pattern between 11.5 and 13.5 dpc, but they do it in an independent way of the sex. The slightly-higher level of expression observed in ovary is not statistically significant,

Gen	miRNA	Tissue	Regulation hypothesis
<i>Ar</i>	124, 878-3p, 471	ovary	might have a regulatory role in the adult
	455*, 202-3p	testis	are minority versions of miRNA that degrade more easily during their processing
<i>Dmtr1</i>	124	ovary	may be regulated by 124 in embryos and adult
	668	testis	may be is a false positive
<i>Sox9</i>	124	ovary	in this paper we studied its regulation by miR-124
<i>Sox8</i>	124	ovary	Could be inhibited in females by miR-124
<i>Sry</i>	878-3p, 881	ovary	they could inhibit Sry in other tissues, being false positive or being an evolutionary trace of other Sox genes
<i>Dax1</i>	96, 741	ovary	Due to not being clear on the regulation of this gene any hypothesis about its possible regulation by miRNAs would be speculative at this time
<i>Cyp17a1</i>	672	ovary	could regulate Cyp17a1 in ovary
	202-3p	testis	this regulation is less likely because it is the minority version of miRNA
<i>Fhl2</i>	138, 743a, 183, 103	ovary	as a major co-activator of transcription factors, testicular determinant, it could finely be regulated by one or more miRNAs
<i>Fshr</i>	471, 103	ovary	it is possible that these miRNAs are expressed in different cell types for this gene so now we can not speculate anything about its regulation
<i>Fst</i>	144, 184	testis	probably are involved in its regulation, which deserves further study in the future
<i>Rspo1</i>	144	testis	In this paper we studied its regulation by miR-144

1. Abstract

according to our microarray data. miR-465 has three different genes, a, b and c, located in the cluster region. In addition, the genes b and c are repeated, so in total there are 5 copies of this miRNA in the same cluster. Taking the differences in expression of the two regions of the cluster into account, we can postulate that one of the two regulatory regions is specific to sex and the other is not, at least at the time of sex determination. Moreover, miRNAs with ovary-specific expression of this cluster identified in our microarray, have targets in the genes known in testicular route.

It is noteworthy to mention that Song *et al.* (2009) showed that these 10 miRNAs are mostly expressed in testis than in ovary in adults. These authors present results regarding the miRNAs which are found on chromosome X and show that a high percentage of them skip the meiotic sex chromosome inactivation (MSCI). One of the explanations they proposed for this escape from MSCI is that they could be involved in the inactivation process itself and thus play an important role in spermatogenesis.

The different expression patterns of miRNAs identified in our project and located on the X chromosome cluster, the genomic organization of this cluster, divided into two regions with different transcriptional control and different expression patterns during sexual differentiation and meiosis, allow us to postulate the existence of different combinations of transcription factors that can modulate the expression of this cluster in different situations. The analysis of potential regulatory areas has enabled us to locate the recognition sites of many transcription factors in these regions, from the activating factors of the testicular route such as SRY and AR or the promoter factors of the feminine route such as ER and SMAD3, to transcriptional repressors such as CTCF, which gives us a rough idea of the complexity that is likely to involve the regulation of gene expression of miRNAs.

According to the hypothesis that we propose, during sexual differentiation, both regulatory regions would promote transcription of the genes in their downstream loci. The regulatory region on the right would stimulate transcription of the genes of miRNAs in 13.5 dpc in the right area of the cluster regardless of the sex (marked with round corners frames in the figure 5.14 page 178), such as miR-465, as mentioned above. The regulatory region on the left triggers the transcription in a sex-dependent way, making it more intense in ovary than in testis and controlling the genes of miRNAs on the left side of the cluster (marked with square corners frames in the figure 5.14 page 178). It is interesting to note that miRNAs miR-470 and miR-871 can be found downstream from the regulatory region on the left, but its expression does not appear to be controlled by this, because according to our data, no sex-specific differential expression is shown. This would imply that the initiation point of transcription of

the regulatory region on the left would be found downstream from these two miRNAs. This assumption is supported by the fact that the transcript predictions made by GenScan and included in Ensembl show two possible transcripts in this region, one of which begins just downstream from these two miRNAs. The left portion of the cluster, transcribed from the left regulatory region, would be responsible for the highest expression in the ovary among all the other miRNAs that we identified in our study.

Among the possible targets which we identified for these 10 miRNAs male-route genes and genes located on sex chromosomes, such as: *Ar*, *Dax1*, *Sry*, *Zfy* and *Zfx* were found. The site and the timing of their expression, their distribution, and their potential target genes are therefore compatible with a role of these miRNAs, during sexual differentiation, inhibiting the male-route genes in ovarian development, and as well during the process of meiotic inactivation of sex chromosomes in spermatocytes. On the other hand, this could be a clear example of an arranged regulation of a group of miRNA genes that have functions in the same biological process, determined by grouping these genes and their transcriptional control led by common regulatory elements, as it has been described in other cases mentioned (Yuan *et al.*, 2009).

-Identification of mmu-mir-124 as a candidate gene for ovarian development

Several findings suggested that miR-124 could have an important role during ovarian development. First, our miRNA microarray profiling showed that miR-124 is differentially expressed in the XX but not the XY gonad during the transition from 11.5 to 13.5 dpc stages, which is the critical period of sex differentiation in the mouse. The levels of the differential expression were also validated by Q-RT-PCR. Interestingly, *in situ* hybridization studies showed that miR-124 is present mainly in the cortical region of the female gonad at 13.5 dpc, the portion from which the ovarian tissue mostly develops (see ref. Bishop *et al.*, 2000). Second, the computational analysis carried out for the miRNAs selected from our microarray results, using the data mining bioinformatics tool developed in our laboratory, identified potential targets for miR-124 in the 3'UTR regions of four genes of the male pathway in both human and mouse: *Sox9*, *Sox8*, *Ar* and *Dmrt1*. Third, a recent paper reported by Cheng *et al.* (2009) showed that the mouse miR-124 regulates adult neurogenesis and that it does so by repressing SOX9 production in the subventricular zone of the brain. These authors demonstrated that *Sox9* is indeed a physiological target of miR-124, raising the possibility that this miRNA could act also in the gonad. Overall, these findings strongly suggested that the main role of miR-124 in the ovary would be to inhibit the production of SOX9 protein, a testis-promoting factor. We tested this hypothesis by performing both knock-down and over-expression functional experiments

1. Abstract

with primary cultures of embryonic gonadal cells. Transfection with a miR-124-specific antagomir induced the ectopic production of the SOX9 protein in XX gonadal cells, as well as a significant increase of the Sox9 messenger levels, showing that this miRNA actively represses Sox9 in female gonadal cells. Nevertheless, the increased expression levels of Sox9 in XX cells transfected with the antagomir are lower than those observed in XY gonadal cells, showing that SRY-mediated up-regulation of Sox9 is needed to reach the male expression level. In the developing mouse testis, Sox9 is primarily activated, probably by SF1, in both XY and XX gonads prior to sex differentiation (Sekido *et al.*, 2004b). At the time of sex determination, Sox9 is up-regulated in the XY gonad by the combined, synergistic action of SRY and SF1 on a testis-specific core (TESCO) Sox9 enhancer (Sekido y Lovell-Badge, 2008), and down-regulated in the XX gonad. Afterwards, Sox9 expression is maintained in the developing testis despite the fact that Sry expression is very transient in the mouse testis. Several redundant molecular mechanisms contribute to the maintenance of Sox9 expression. One is the autoregulatory action of the SOX9 protein, that, like SRY, can synergize with SF1 to activate the TESCO enhancer (Sekido y Lovell-Badge, 2008). Also, positive feed-forward loops can be established between Sox9 and Sf1 (Shen y Ingraham, 2002) and between Sox9 and Fgf9 (Kim *et al.*, 2006b), that maintains the expression of these genes at high levels. Finally, SOX9 activates prostaglandin D synthase (*Ptgds*), whose product, prostaglandin D2 (PGD2), mediates the import of SOX9 into the nucleus, enabling this way all the previous molecular interactions (see refs. Sekido y Lovell-Badge, 2009; Sekido, 2010, for reviews). Since XX gonadal cells lack Sry, we propose that the up-regulation of Sox9 transcription in these cells following miR-124 knockdown is a secondary consequence of the induced ectopic production of SOX9 protein, which could then activate one or more of the positive feed-forward loops mentioned above. These data suggest that complete silencing of miR-124 in the gonads of XX embryos could be potentially capable of inducing female-to-male sex reversal *in vivo*. Furthermore, we have shown that over-expression of miR-124 induces repression of Sox9 in chondrocytes but not in Sertoli cells, although Sox9 is endogenously expressed in both cell types. Similarly, Cheng *et al.* (2009) reported evidence that Sox9 expression could be reduced in neurons of the subventricular zone by inducing miR-124 over-expression. Our findings indicate that ectopic over-expression of miR-124 is a repression mechanism strong enough to reduce Sox9 expression in chondrocytes, but not in Sertoli cells, even when the levels of ectopic miR-124 expression in the reach much higher values than those observed in XX gonadal cells, where this miRNA is expressed endogenously. The fact that the results obtained using 13.5 dpc XY gonadal cells, were similar to those observed in 11.5 dpc cells, indicate that the expression of Sox9

is already very robust by 11.5 dpc in developing mouse testes, when up-regulation is still very recent. These findings suggest that the distinct regulatory mechanisms controlling *Sox9* expression in chondrocytes and pre-Sertoli cells determine their different response to the over-expression experiments. In chondrocytes, *Sox9* expression is mainly regulated by factors like BMP (bone morphogenic protein) and TGF β (transforming growth factor beta), and a chondrogenesis-specific enhancer is thought to be involved (see ref. Kawakami *et al.*, 2006, for a review). No positive feed-forward regulatory loop has been defined, although a recent survey of potential *Sox9* targets in chondrocytes found several that could enhance its own transcription (do Oh *et al.*, 2010). Moreover, our finding that over-expression of miR-124 results in a significant decrease of both protein and mRNA levels, suggest that some autoregulatory mechanism also occurs in chondrocytes, although feed-forward loops with Sf1 or Fgf9 are not possible here, as these genes do not express in these cells. However, in chondrocytes *Sox9* expression needs to be downregulated to permit bone formation (Hattori *et al.*, 2010), which might imply that positive feedback regulation of *Sox9* will be less robust compared with Sertoli cells, where high levels of *Sox9* are maintained throughout life. Overall, existing data show that several redundant molecular regulatory mechanisms have been selected to ensure *Sox9* expression in Sertoli cells, including a low (but not null) activity of the *mmu-mir-124* genes, although this condition seems to be unnecessary in these cells. This is, therefore, an example of a gene whose expression is preserved against miRNA-mediated repression in a specific cell type. We report here the first evidence that a miRNA, miR-124, plays a key role at the very early steps of ovarian development. We have shown that inhibition of miR-124 in XX gonadal cells results in up-regulation of *Sox9*, indicating that this miRNA is at least partly responsible of *Sox9* repression in the female gonad. Two sets of evidence strongly indicate that *Sox9* must be repressed in the female gonad in order to avoid female-to-male sex reversal; first, it is known that XX gonads expressing *Sox9* develop as testes (Bishop *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001), and secondly, *Sox9* is down-regulated in the female gonad at the time of sex determination, when up-regulation occurs in the male gonad (Kent *et al.*, 1996b; da Silva *et al.*, 1996). *Wnt4* plays an anti-testis role in the female gonad. In the gonads of *Wnt4*^{-/-} null mutant XX mice, *Sox9* and *Fgf9* are transiently up-regulated and the ovary is masculinised, but complete sex reversal is not observed, suggesting that additional ovary-promoting / anti-testis factor(s) may also be operating (see ref. DiNapoli y Capel, 2008, for a review). Here we show that miR-124 is likely to be one such factor that reinforces the ovarian developmental pathway by repressing *Sox9* in the XX mouse gonad at the time of sex-determination. Future studies on the role that other miRNAs identified in this study may play in gonad development, will probably permit the discovery of

1. Abstract

new pieces of the complex puzzle of genes controlling mammalian sex determination.

-Regulatory sequences and promoters of mmu-mir-124 The repressor role that RE1-Silencing Transcription Factor (REST) plays over *mmu-mir-124* in the nervous system is already known (Conaco *et al.*, 2006). We have consulted in the database GEO (Gene Expression Omnibus) to find out data suggesting that REST acts during the critical period of sex determination. The results of the experiment called "Gonadal somatic cells During The critical period of sex determination: time course"(Record GDS1724) a work of Beverdam and Koopman (Hum Mol Genet 1; 15:417-431) show an increase in the expression of REST in 11.5 dpc mice, which does not occur in females (Beverdam y Koopman, 2006). This expression pattern is consistent with our microarray results which show that *mmu-mir-124* is expressed in embryonic gonads of 13.5 dpc in females, but not in males of the same stage.

The analysis of potential regulatory regions near the 5' end of the three genes of miR-124 carried out by bioinformatics tool TESS indicated possible binding sites of SF1, WT1 and AR, just to name some. As for SF1, we know that is a transcription factor that is expressed in XX and XY gonads and is involved in the formation of the gonadal primordium in both sexes, in subsequent differentiation and testicular steroidogenesis in XY gonads (see ref. Sekido y Lovell-Badge, 2008). Regarding WT1, it is advisable to remember that it is a transcription factor that is expressed in the gonad of both sexes, from their undifferentiated state into adulthood (Armstrong *et al.*, 1993; Rackley *et al.*, 1993), so it is possible that both transcription factors act together to activate expression of *mmu-mir-124* in the onset of gonadal development.

If REST unites to the promoter region of *mmu-mir-124* efficiently, it would provoke a reduction in the levels of miR-124 and a subsequent increase in the levels of SOX9 protein and its mRNA. Keeping in mind the specific expression profile of the sex of REST at the critical time of gonadal differentiation and the presence of REST binding sites in the promoter region of *mmu-mir-124*, it is possible that REST inhibits the expression of this miR-124 in gonad which would allow us to explain why it is not expressed in pre-Sertoli cells even though they contain potential transcription factors necessary for it. On the other hand, if indeed SF1 and/or WT1 activate *mmu-mir-124*, they could then compete with REST for control of the expression of this miRNA. Thus, expression of SF1 in the female gonads of 11.5 dpc, where it would not compete with REST, would allow the expression of *mmu-mir-124*, so that it could inhibit the production of SOX9 protein, whose presence here would be counterproductive. This would respond to the current mystery of why *Sox9* is inactivated in the female gonad. Future experiments will enable us to elucidate the mechanism for regulating the expression of miR-124.

Regarding AR, its possible regulatory role in this process is less likely, since its expression starts in 14.5 dpc in males, after miR-124 has already been activated in the female. However, studies on miRNAs expression conducted in adult gonads detect miR-124 in adult testis (Mishima *et al.*, 2008), where *Ar* is also seen. In addition to encoding a transcription factor, which could activate *mmu-mir-124*, *Ar* gene has also a potential target for this miRNA in its 3'UTR end. Thus, it is possible that miR-124 regulates its own transcription by means of a negative feedback circle, in which AR stimulates transcription of miR-124 which, in its turn, represses the expression of *Ar*, in a similar manner how miR-133 and PITX3 regulate their expression in the neuronal differentiation control (Kim *et al.*, 2007). It is also known that it is the same androgen that regulates the expression of androgen receptor, though the underlying molecular mechanism is unclear. Nevertheless, the fact that deregulation of this system is associated with induction of prostate cancer or breast cancer (Yeap *et al.*, 1999), indicates that the regulation of *Ar* should be very strict and it is possible that certain miRNAs may be involved in it.

-Possible role of miR-144 in testicular development

The validated results from our microarray experiment, which show the activation of miR-144 in testis of 13.5 dpc, along with the fact that this miRNA has a potential target in the key genes of the female route such as *Rspo1* or *Fst*, justified the need for a more profound study about their possible involvement in testicular development, suppressing pro-ovarian genes. Specifically, we focused on *Rspo1* because it is the master gene of the female route for gonad development (see ref. DiNapoli y Capel, 2008, for review), although further studies will allow investigating the possible relationship between miR-144 and *Fst*. Nevertheless, given that the results of luciferase assays confirmed that *Rspo1* has a functional target for miR-144, the rest of our current research has focused on checking if this target is biologically active in primary cultures of XX and XY gonadal cells.

The expression of *Rspo1* in the gonad begins at low levels in both male and female embryos to 10.5 dpc. Two days later, this expression strongly increases in female while in the male it stays at low levels (Smith *et al.*, 2008). Consistent with our results, we suggest that miR-144 contributes to keeping the RSPO1 expression down in male, but probably together with other factors since we did not notice a significant direct effect between the inhibition of miR-144 and the activation in *Rspo1* in male gonad. It therefore appears that the exclusive inhibition of miR-144 is not sufficient to significantly increase the expression of *Rspo1*, but it is also possible that its potential activating factors are not present in testis, which would not allow us to detect a substantial increase in its expression. This situation obviously contrasts the result shown in this work for miR-124 in the female gonad. In this case *Sox9* positively autoregulates itself

1. Abstract

so that the slight increase in the levels of messenger derived from the elimination of miRNA permits us to detect a significant effect of its expression in the experiment. Another alternative explanation could be that, despite *Rspo1* being a potential target of miR-144, this miRNA is not involved in its regulation. Even if this is the case, one cannot rule out that it acts downstream in the signaling cascade, regulating *Fst*, given that there are some indirect evidence suggesting that this miRNA plays a role in regulating genes of the female route, a possibility to be investigated later. More advanced experiments in vivo, would consist of obtaining mice that over-express a stable homologue of this miRNA and the analysis of transgenic embryos from 10.5 to 15.5 dpc, what will probably provide more relevant results.

On the other hand, the over-expression of miR-144 in female has not produced a visible effect on mRNA levels of *Rspo1*. It is known that several miRNAs can regulate the same gene, (An *et al.*, 2010), and precisely a high number of potential targets of miRNAs exist in 3'UTR region of *Rspo1*. Depending on the algorithm used for its identification, the number of targets can vary between 50 and 60, and it would be reasonable to think that this gene was redundantly regulated by several miRNAs, especially if we consider it a master gene in ovarian route. Nevertheless, the elimination of this gene in ovary causes only a partial sex reversal (Chassot *et al.*, 2008; Tomizuka *et al.*, 2008), so hopefully there are other routes operating in ovarian development.

Six of the miRNAs which have potential targets in the 3'UTR region of *Rspo1* appear in our microarray (miR-10, miR-342, miR-675-5p, miR-710, miR-743rd, miR-465), although their expression profiles vary. Among them we must highlight 465a/b/c, which is activated in the gonad of 13.5 dpc of both sexes and it could be regulated by SRY, according to our bioinformatic analysis. Thus, there is probably some kind of complex interaction in the regulation of this gene by the miRNAs, which deserves a more detailed future study, studying, for example, the effect of inhibition or over-expression along with two or more miRNAs (miR-144 and miR-465, for example).

Despite the fact that most miRNAs cause a decrease in the levels of mRNA of its target genes (Guo *et al.*, 2010), the absence of effects on mRNA of *Rspo1* does not rule out that, this miRNA may significantly affect its translation, reducing levels of protein so much. However, there are no commercial antibodies that detect this mouse antibody efficiently, despite having several of them tested. The possible role of miR-144 on the translation of *Rspo1* can go on being investigated in the future, using new antibodies that can be generated or by the production of transgenic mice that over-express constructs containing this miRNA.

-Regulatory sequences and promoters of mmu-mir-144

It is known that GATA4 triggers transcription of miR-144 in cardiomyocytes (Zhang *et al.*, 2010). *Gata4* gene is a transcription factor that is expressed early in the genital crest of both sexes, increasing its expression in testis shortly after its development and assisting in the activation of several genes important in male differentiation such as *Sf1* or *Amh*. It is reasonable to think that this transcription factor may act in the embryonic testis as well as in heart, activating the promoter of *mmu-mir-144*. The analysis done using TESS also revealed the presence of an alleged binding site to transcription factor SRY in this region, which is expressed in pre-Sertoli cells of XY gonadal primordium in mice, just before sexual differentiation (Koopman *et al.*, 1990; Sekido y Lovell-Badge, 2008). These data suggest that some or several transcription factors typical of the male route would activate miRNA or miRNAs in charge of inhibiting genes in the female route. It is possible that SRY and GATA4 act together to activate miR-144 at the beginning of gonadal development and later to increase expression of this miRNA by the action of GATA4, whose levels increase significantly in males coinciding with an increase of miR-144 .

Although the available bioinformatics data allow us to come up with an attractive model of negative regulation of *Rspo1* by miR-144 in testis, where activation of miRNA would depend on SRY, the experimental results obtained do not support this hypothesis at this moment, possibly because the regulation of this important master gene in the ovarian development involves more elements, which could be other miRNAs and transcription factors.

-Hypothesis on the possible intervention role of miR-124 and miR-144 in gonadal development

Considering the observation of the results collected in these early studies on the regulation of the major sex-determining genes by miRNAs, we have summarized the main findings in a hypothesis that covers several regulatory elements, including miRNAs. Therefore, this hypothesis (Figure 6.1 page 238) summarizes the current state of knowledge on the regulation of ovarian and testicular routes, introducing miRNAs as new regulatory elements. At the top of the figure the ovarian differentiation route can be depicted which operates in XX individuals, where we can see how SF1 and/or WT1 would activate the expression of miR-124, which would provoke a drop of the levels in the messenger and protein SOX9, which is necessary to suppress the initiation of testicular development and, consequently, to allow the XX gonad to develop as ovary. This model identifies the inhibitor element of *Sox9* in XX gonads, which provided an intriguing mystery in the process of sex determination in mammals for years. On the other hand, the absence of SRY protein in the female gonad would make miR-144, and possibly other miRNAs, not to activate and therefore would not reduce *Rspo1* expression levels and/or *Fst*, an essential

1. Abstract

factor in order for the gonad to develop as ovary. In the case of testicular route (the bottom part of Figure 6.1 page 238), the presence of SRY and/or GATA4 would activate the promoter of *mmu-mir-144*, and possibly other miRNAs, which would be responsible to suppress *Rspo1* and/or *Fst*, preventing it from starting ovarian route. In addition, REST would inhibit the expression of miR-124 preventing it from reducing the expression of *Sox9*, which would be triggered by the SRY + SF1 tandem thus initiating the testis differentiation route. Identification of miRNAs involved in the regulation of the genes leaders of sex determination in mammals, offers an explanation why 20 years after the discovery of SRY, this process is not fully elucidated yet.

CONCLUSIONS

1. The sex-specific differential expression pattern of several miRNAs during the critical period of sex determination, along with identification of potential targets for these miRNAs in the master genes which control this process, suggest that miRNAs play critical roles in regulating these genes in mammals.
2. The number of miRNAs involved in ovarian development is higher than in testicular development, and the number of pro-testis genes with potential targets is greater than pro-ovarian genes. These two facts suggest that an active inhibition of pro-testis genes in the female development route is more necessary than the opposite in males.
3. The miRNAs identified in the conducted microarray experiment, along with the data obtained from the program mirnam open up a whole new field of study, considering the multitude of new possible mechanisms and gene regulation points in which these miRNAs could be involved during the identification and sexual differentiation.
4. Bioinformatics analysis of the putative regulatory sequences of several miRNAs suggest a coordinated expression of clustered miRNAs. Our microarray experiments support this coordinated expression.
5. Two miRNAs stand out as the potential candidates in the regulation of gonadal development: 124 would act as a regulator of female route, due to its functional target *Sox9*, and its potential targets in other major pro-testis genes, such as *Sox8*, *Dmrt1* or *Ar* ; 144 would be as a regulator of male route given its potential targets in pro-ovarian genes such as *Rspo1* and *Fst*.

-
6. Inhibition of miR-124 in XX gonadal cells activates the ectopic expression of Sox9, clearly indicating that this miRNA is responsible for a drop in Sox9 expression in female gonads at the critical time of sex determination.
 7. The ectopic over-expression of miR-124 reduces the levels of Sox9 in chondrocytes but not in XY gonadal cells, demonstrating that the expression of this gene is very strong in testis from the earliest stages of gonadal differentiation and that in both cell types different regulatory mechanisms function for this gene.
 8. Rspo1 has a functional target for miR-144, though the ex-vivo manipulation of the levels of this miRNA does not produce significant effects on mRNA levels of this gene.
 9. Bioinformatic data, together with our experimental results allow to elaborate a model for the regulation of the expression of genes involved in sex determination in which microRNAs play relevant roles.

1. Abstract

2. Introducción y Objetivos

El desarrollo gonadal de mamíferos es un proceso altamente complejo que suscita un gran interés en la comunidad científica, ya que los desajustes en éste pueden originar problemas de infertilidad o desórdenes en el desarrollo sexual. Desde el descubrimiento del gen determinante de testículo, *SRY* (Gubbay *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990b; Koopman *et al.*, 1991a), se pensó que rápidamente se llegaría a entender la base genética de la determinación y diferenciación sexual. Sin embargo, la realidad es que han transcurrido más de 20 años desde entonces, y aunque se han descubierto muchos, aunque probablemente no todos, los elementos genéticos que intervienen en este proceso, aún no se ha conseguido descifrar por completo sus relaciones moleculares y su trama de mecanismos reguladores.

El desarrollo gonadal embrionario parte de una gónada indiferenciada que puede seguir dos rutas alternativas de diferenciación dependientes de su dotación génica, según sea un individuo XX o XY (ver revisión Sekido y Lovell-Badge, 2009). La expresión de genes promotores de testículo o de ovario en el momento preciso de la determinación sexual dará lugar a que este órgano bipotencial se encamine bien hacia una ruta ovárica o bien hacia una ruta testicular. Así, la presencia de *SRY*, localizado en el cromosoma Y, es el encargado de poner en marcha la ruta masculina, y su ausencia en individuos XX permite que la gónada siga una ruta ovárica. Posteriormente, la producción de hormonas (AMH y andrógenos) por parte de los testículos diferenciados, hace que se desarrollen las características sexuales secundarias de los machos y la ausencia de hormonas gonadales en las hembras permite un desarrollo somático femenino. La presencia de anomalías o desregulaciones en cualquier punto de estas rutas génicas puede ocasionar trastornos variables, desde ligeras deficiencias gonadales hasta reversiones sexuales completas, que originan hembras XY o machos XX, que son estériles.

El reciente descubrimiento de los microRNAs (miRNAs) como elementos reguladores clave en procesos de desarrollo, proliferación celular, diferenciación, apoptosis, metabolismo y oncogénesis (Valencia-Sanchez *et al.*,

2. Introducción y Objetivos

2006) nos hizo pensar que podrían intervenir también en el desarrollo sexual. Un nuevo enfoque en el estudio de la determinación sexual en el que se tengan en cuenta los miRNAs podría dar respuesta a algunas de las incógnitas, que aun hoy día, giran en torno a este proceso.

Los miRNAs son una familia de pequeños RNAs no codificantes que regulan post-transcripcionalmente la expresión de sus genes diana de una forma específica de secuencia (Ambros, 2004; Bartel, 2004). Actúan mediante el establecimiento de emparejamientos imperfectos en las regiones 3' no transcritas de los mRNAs, promoviendo su degradación o la inhibición de su traducción. De esta forma permiten un ajuste fino de la concentración de proteína en un momento determinado o en un tipo celular específico (Krol *et al.*, 2010b).

En este proyecto de tesis doctoral nuestro principal objetivo ha sido investigar si los miRNAs juegan algún papel en la determinación del sexo, regulando genes del determinismo del sexo y la diferenciación gonadal. Para ello, nos propusimos realizar un estudio espacio/temporal de los perfiles de expresión de microRNAs mediante la tecnología de *microarrays*.

La alta cantidad de información que puede derivarse de este tipo de estudios hace necesario abordar el análisis de los datos mediante herramientas bioinformáticas. Existen herramientas que permiten normalizar, identificar y organizar los datos proporcionados por los *microarrays*, que nos permitirían identificar los posibles miRNAs que pudieran tener algún papel en la diferenciación sexual, y existen bases de datos en las que se pueden identificar los genes que poseen posibles dianas para estos miRNAs. Estas posibles dianas están determinadas también por métodos bioinformáticos que proporcionan un elevado número de falsos positivos, además de que muchas dianas, a pesar de ser funcionales, pueden no tener un papel biológico relevante en un contexto celular determinado. Por ello surgió la necesidad de desarrollar nuevas herramientas que permitieran, bajo ciertos criterios, seleccionar, de entre todos las posibles rutas de regulación que se derivarían del análisis de *microarrays*, aquellas con un mayor potencial biológico real.

Nos propusimos asimismo realizar un estudio más profundo de algunos de aquellos miRNAs y sus genes diana que resultasen especialmente relevantes en relación con la diferenciación sexual mediante la inhibición y la sobre-expresión de los miRNAs y el posterior estudio de los efectos causados sobre sus genes diana. Concebido así, este sería el primer estudio realizado hasta la fecha en abordar la identificación de miRNAs con funciones biológicamente relevantes en el periodo crítico de la determinación sexual de mamíferos.

3. Antecedentes

Contenidos

3.1. Determinación y diferenciación sexual en mamíferos	27
3.1.1. Desarrollo gonadal en mamíferos	28
3.1.2. Control genético de la determinación del sexo	31
3.2. Regulación de la expresión génica	43
3.2.1. Regulación a nivel de la transcripción	44
3.2.2. Regulación a nivel de la traducción	45
3.3. MicroRNAs	49
3.3.1. Biología de los microRNAs	49
3.3.2. Implicación de los microRNAs en los procesos biológicos	78
3.3.3. Herramientas bioinformáticas en el estudio de los microRNAs	84
3.3.4. Aplicaciones biotecnológicas del RNAi	93
3.3.5. Los microRNAs y el desarrollo gonadal	97

3.1. Procesos de determinación y diferenciación del sexo en mamíferos

La mayoría de seres vivos se reproducen sexualmente, lo que implica la existencia de dos sexos diferenciados, macho y hembra. Aunque los mecanismos de determinación del sexo son muy variados, en general, podemos clasificarlos en dos grandes grupos: ambientales y genéticos.

Los sistemas ambientales de determinación sexual se basan en la presencia de una señal externa que determina el tipo de diferenciación sexual del individuo, como macho o como hembra, evento que se produce en un momento posterior a la fecundación. La producción de estas señales ambientales depende de factores muy variados, tales como la presencia o ausencia de ciertas bacterias (Rousset *et al.*, 1992), el pH del medio (Shapiro, 1990), la densidad de población (Crews, 1993) o la temperatura ambiental (Crews, 1994). Este último mecanismo es muy común en diversas especies de reptiles, como por ejemplo la especie de tortuga

3. Antecedentes

Trachemys scripta, en que el sexo se determina por la temperatura de incubación de los huevos. Así, a temperaturas de incubación superiores a 30°C, sólo se generan hembras, mientras que a 25°C sólo se obtienen machos, y a una temperatura intermedia de 28.5°C, se produce un número similar de machos que de hembras.

En los sistemas genéticos de determinación sexual, el sexo del individuo queda determinado en el momento de la fecundación, ya que los individuos de diferente sexo son genéticamente distintos. Estas diferencias pueden deberse a la existencia de cromosomas sexuales, regiones cromosómicas heteromórficas, asimetrías en la dosis de cromosomas, o al efecto acumulativo de variantes alélicas en el genoma. Sin embargo, el mecanismo genético más generalizado consiste en la existencia de cromosomas sexuales heteromórficos. Los mamíferos poseen un sistema de cromosomas sexuales heteromórficos, denominado XX/XY, en el que los machos son XY y las hembras XX. Por tanto, los machos representan el sexo heterogamético ya que produce dos tipos de gametos (espermatozoides con cromosoma X o con cromosoma Y), mientras que la hembra es el sexo homogamético ya que sólo produce gametos (óvulos) con cromosoma X (ver Smith y Sinclair, 2004). En otros vertebrados, como aves y anfibios, existe el sistema de cromosomas sexuales ZZ/ZW, siendo machos los individuos ZZ y hembra los ZW. En este caso, el sexo heterogamético es el femenino, puesto que produce dos tipos distintos de gametos (con cromosoma Z o con cromosoma W), mientras que el sexo homogamético es el masculino ya que produce un sólo tipo de gametos (portadores del cromosoma Z).

3.1.1. Desarrollo gonadal en mamíferos

La determinación genética del sexo de un individuo precede y determina su desarrollo gonadal, siendo éste un evento único en la organogénesis de mamíferos, ya que se parte de un primordio gonadal indiferenciado que es bipotencial, pudiendo desarrollarse tanto como ovario o como testículo. El desarrollo hacia una ruta testicular o una ruta ovárica depende de la presencia o ausencia del gen *SRY*, que codifica un factor de transcripción de tipo SOX (Sinclair *et al.*, 1990a). En ratón, la expresión de este gen es de muy corta duración en un momento clave de la diferenciación gonadal durante el desarrollo embrionario; sin embargo, esta efímera expresión es suficiente para desencadenar todos los procesos necesarios para la diferenciación testicular, y a su vez, inhibir la ruta ovárica. Una vez producida la diferenciación gonadal, la producción de andrógenos por parte del testículo hace posible la diferenciación somática masculina y la aparición de las características sexuales secundarias propias del macho. En el caso de las hembras es la ausencia de andrógenos lo que permite un desarrollo somático femenino.

3.1. Determinación y diferenciación sexual en mamíferos

A continuación se describirán los procesos de desarrollo necesarios para la diferenciación de la gónada bipotencial, considerando ambos destinos, tanto el ovárico como el testicular, y centrándonos en el ratón ya que es el animal modelo objeto de este estudio.

El sistema genitourinario de los mamíferos se forma a partir del mesodermo intermedio del embrión, que se puede dividir en tres regiones: pronefros, mesonefros y metanefros, siguiendo el eje antero-posterior del conducto *néfrico* o conducto de *Wolff*. En ratón, la superficie ventrolateral de la parte intermedia de este eje, el mesonefros, comienza a mostrar un engrosamiento a los 9.5 días *post-coitum* (dpc), que origina la llamada “cresta genital”, a partir de la cual se desarrollará la gónada (Merchant-Larios y Taketo, 1991a). Este engrosamiento se produce mediante una proliferación del componente somático de la gónada (células mesoteliales, mesenquimáticas y endoteliales), acompañada por un incremento del número de células germinales primordiales (PGC), que migran hacia esta región desde el mesodermo extraembrionario, atravesando el primordio intestinal y el mesenterio dorsal (McLaren, 2003). Una vez que las PGCs han colonizado la cresta genital, se produce una proliferación tanto de las células somáticas como de las germinales, encontrando en este momento tres tipos celulares bipotenciales: las **células germinales**, capaces de comenzar la oogenesis (XX) o la espermatogénesis (XY), las **células de sostén**, que se diferenciarán en células de Sertoli en el macho o células foliculares en la hembra, y las **células esteroideogénicas**, precursoras de las células de Leydig en el macho o de las células de las tecas en la hembra, y responsables de la producción de hormonas esteroideas. La diferenciación hacia un tipo celular u otro dependerá de la dotación genética del embrión (Swain y Lovell-Badge, 1999). Existe un cuarto tipo celular, consistente en **células endoteliales** que formarán el sistema vascular de la gónada, tanto en ovario como en testículo, aunque su desarrollo es mayor en testículos (Merchant-Larios y Taketo, 1991a).

Diferenciación testicular

En la mayoría de los mamíferos, los primeros signos de diferenciación sexual ocurren en la gónada XY (Merchant-Larios, 1976; Merchant-Larios y Taketo, 1991b). Concretamente en ratón, los eventos clave en la formación de un testículo se producen entre 11.5 y 13.5 dpc según un proceso que está bastante conservado en las especie analizadas. El proceso comienza con la migración de células endoteliales desde el mesonefros adyacente hasta la gónada, lo que lleva a la formación de una red vascular específica del testículo (Brennan *et al.*, 2002; Coveney *et al.*, 2008; Cool *et al.*, 2008; Combes *et al.*, 2009), y a la formación de los cordones testiculares mediante la agregación de células somáticas

3. Antecedentes

sustentaculares (pre-Sertoli) y células germinales, rodeadas por una lámina basal (Buehr *et al.*, 1993; Merchant-Larios *et al.*, 1993; Tilmann y Capel, 1999). Las células pre-Sertoli aparecen como consecuencia de la proliferación y diferenciación de células del epitelio celómico y, una vez formados los cordones, se diferencian como células de Sertoli embrionarias (Schmahl *et al.*, 2000). Su papel es crucial en el desarrollo testicular, ya que forman los cordones testiculares, exportan señales paracrinas que inducen la diferenciación de otros tipos celulares como las células de Leydig y las células mióides perotubulares, y además producen hormona antimulleriana (AMH), que inhibe la formación de los conductos de Müller, precursores de los órganos sexuales femeninos (Munsterberg y Lovell-Badge, 1991). La diferenciación de las células mióides peritubulares, que rodean los cordones testiculares confiriéndoles capacidad contráctil (Tung y Fritz, 1987), y las células de Leydig, que producen testosterona, se produce entre 12.5 y 13.5 dpc. La testosterona estimula el desarrollo de los conductos de Wolf, precursores de los conductos eferentes, las vesículas seminales y el epidídimo (Habert *et al.*, 2001).

Diferenciación ovárica

La diferenciación ovárica, al contrario de lo que ocurre con la testicular, muestra notables diferencias entre los distintos taxones (Jiménez, 2009). Se describen a continuación los procesos más significativos del desarrollo ovárico del ratón. A los 10.5-11.5 dpc no se produce la formación de cordones ni la migración desde el mesonefros adyacente en la gónada indiferenciada, de forma que el sistema vascular primitivo que se forma en la gónada XX deriva de proyecciones provenientes de los vasos mesonéfricos preexistentes (Coveney *et al.*, 2008). Este hecho es consecuencia del efecto inhibitorio de la ruta masculina que ejercen los genes específicos de la ruta femenina (ver más adelante el control genético del desarrollo ovárico). De hecho, no se observa ningún cambio morfológico hasta 13.5 dpc, momento en el que las células germinales XX (oocitos) entran en meiosis. Una vez que se inicia la meiosis, se refuerza la inhibición del desarrollo de la ruta testicular por parte de los oocitos (Yao *et al.*, 2003). Alrededor del nacimiento comienza el proceso de foliculogénesis con la diferenciación de las células foliculares, y en la pubertad se inicia el proceso por el que las células del estroma se diferencian como células de las tecas, las células esteroideogénicas del ovario. La correcta formación de los folículos primordiales es esencial para la maduración de los oocitos y su liberación durante la ovulación en la vida adulta (Choi y Rajkovic, 2006; Sato *et al.*, 2006).

3.1. Determinación y diferenciación sexual en mamíferos

3.1.2. Control genético de la determinación del sexo

El desarrollo gonadal antes mencionado se corresponde con un patrón de expresión génica diferencial específico para cada sexo. Sin embargo, el estudio preciso de todos los genes que intervienen en cada ruta resulta especialmente complicado, debido al reducido espacio temporal entre la aparición de la gónada y el comienzo de la diferenciación. No obstante, se ha conseguido identificar algunos de los genes que intervienen en ambas rutas de diferenciación, ovárica y testicular, aunque muchas de las relaciones moleculares entre ellos y sus mecanismos de regulación aún no se han resuelto.

Existen varios genes que se expresan tempranamente en la gónada bipotencial, y que son comunes en las dos rutas de diferenciación, como son *Wt1*, *Sf1*, *Gata4* y *Fog2* entre otros. Se describen a continuación sus características más importantes.

Wt1, *Wilms' tumour suppressor gene 1* (Gessler *et al.*, 1992). Se trata de un factor de transcripción, cuya expresión se detecta en 9.5 dpc en el mesodermo intermedio, donde se originará la cresta genital, estando implicado en el desarrollo de la cresta genital y siendo esencial para la supervivencia del primordio gonadal (Hammes *et al.*, 2001). Conforme avanza el desarrollo se observa expresión de este gen en el epitelio celómico, en los cordones sexuales de la gónada indiferenciada (en las especies en que éstos aparecen) y en el mesonefros (Armstrong *et al.*, 1993; Rackley *et al.*, 1993). En la edad adulta, dicha expresión se mantiene en las células de Sertoli de los testículos y en las células foliculares de los ovarios.

Sf1, *steroidogenic factor 1*. También conocido como *Nr5a1* (*nuclear receptor subfamily type 5, group A, member 1 gene*), codifica una proteína nuclear que pertenece a la familia de receptores nucleares que incluye receptores de hormonas como andrógenos, estrógenos, progesterona, vitamina D y retinoides (Mangelsdorf *et al.*, 1995). En el primordio gonadal de ratón se observa expresión de *Sf1* en ambos sexos a partir de 9.5 dpc, estableciéndose un claro dimorfismo sexual a partir de 11.5 dpc, cuando aumenta en las gónadas XY y disminuye en las XX. En el testículo se expresa en células de Leydig y de Sertoli (Hatano *et al.*, 1994; Ikeda *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 1994). *Sf1* interviene en la proliferación y supervivencia de células de la cresta genital (Luo *et al.*, 1994) y en la regulación de síntesis de enzimas esteroideas (Hatano *et al.*, 1994; Ikeda *et al.*, 1994). Además, SF1 activa el promotor del gen *Amh* (Giuli *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1994) con la posible colaboración de WT1, GATA4, SOX8 y SOX9 (Nachtigal *et al.*, 1998; Tremblay y Viger, 1999; De Santa Barbara

3. Antecedentes

et al., 2000; Schepers *et al.*, 2003). SF1 también coopera con SRY para activar la expresión de *Sox9*, interaccionando después con la proteína SOX9 para mantener la expresión de ésta, una vez que la proteína SRY ha desaparecido (Sekido y Lovell-Badge, 2008).

Gata4, *GATA binding protein 4*. Pertenece a la familia de factores de transcripción GATA con dominios de dedos de zinc que le permiten unirse al DNA reconociendo promotores que contienen la secuencia consenso GATA (Patient y McGhee, 2002). Se expresa abundantemente en la cresta genital, tanto en machos como en hembras. Esta expresión se produce en las células somáticas del primordio gonadal, y a partir de 13.5 dpc aumenta su expresión en testículos y disminuye en ovarios. En la gónada masculina, existen altos niveles de expresión en las células de Sertoli y de Leydig, niveles que persisten hasta la edad adulta, momento en el que vuelve a aparecer expresión en los ovarios, principalmente en las células foliculares (Heikinheimo *et al.*, 1997; Viger *et al.*, 1998; Ketola *et al.*, 1999). Se han encontrado dianas de GATA4 en los promotores de *Sry*, *Sf1* (Tremblay y Viger, 2001) y *Dmrt1* (Lei y Heckert, 2004). Por tanto, *Gata4* parece estar implicado en el desarrollo del primordio gonadal, la diferenciación testicular y de células de Sertoli y Leydig, y en la esteroidogénesis (Tevosian *et al.*, 2002; Tremblay y Viger, 2003b,a).

Fog2, *friend of GATA*. Se trata de un factor de transcripción también llamado *Zfpm2* (*zinc finger protein multitype 2*). La expresión de *Fog2* comienza en el primordio gonadal de ratón a los 10.5 dpc en ambos sexos. En 12.5 dpc se detecta expresión en células de Sertoli en machos y en células somáticas en hembras y se mantiene constante en la gónada XX hasta el estadio adulto, donde se localiza en las células foliculares, pero en la gónada masculina comienza a declinar, siendo muy baja en 13.5 dpc, momento en que aumenta la expresión de *Gata4* y *Amh*. La proteína FOG se encuentra implicada en procesos de diferenciación en sistema nervioso, corazón y gónadas (Tevosian *et al.*, 1999). Una de las funciones del complejo GATA4/FOG2 es la regulación de los niveles de SOX9, como demuestran diversos experimentos realizados en ratón (Manuylov *et al.*, 2007; Bouma *et al.*, 2007). Estudios más recientes han demostrado que el complejo GATA4/FOG2 resulta imprescindible para el desarrollo ovárico, reprimiendo el gen *Dkk1*, que codifica un inhibidor de la ruta canónica de señalización por β -CAT (Manuylov *et al.*, 2008).

Genes implicados en la ruta testicular

El descubrimiento de que la presencia de un cromosoma Y se asociaba con el desarrollo de un fenotipo masculino (Ford *et al.*, 1959; Jacobs y

3.1. Determinación y diferenciación sexual en mamíferos

Strong, 1959; Welshons y Russell, 1959), sugirió que este cromosoma debería contener un gen maestro que fuera responsable de la determinación sexual en mamíferos. Este gen fue denominado *TDF* (*testis determining factor*) en humanos y *Tdy* (*testis determining Y gene*) en ratón. Mediante la construcción de mapas de deleción del cromosoma Y humano, a fin de encontrar la región exacta que debía contener a ese gen maestro, se encontró un gen candidato, al que llamaron *SRY* (*Sex-determining Region Y*), que aparecía mutado en mujeres XY (Berta *et al.*, 1990; Jager *et al.*, 1990; Harley *et al.*, 1992; Hawkins *et al.*, 1992). Finalmente, la producción de ratones XX transgénicos para el gen *Sry*, que mostraban fenotipo masculino, confirmó la identidad entre *SRY* y *Tdy* (Koopman *et al.*, 1991b). Posteriormente se han descubierto muchos genes implicados en la ruta de la determinación masculina, aguas abajo de *Sry*, como son: *Sox9*, *Fgf9*, *Amh*, *Dhh*, *Ptgds*, *Ar*, *P450* y *Dmrt1*, entre otros. Algunos de los más importantes los revisaremos a continuación.

La figura 3.1 (páginas 40, 41 y 42) muestra un esquema de la función conocida para los genes mencionados en este apartado.

Sry, *sex determining region Y*. Fue el primer elemento identificado en la familia de genes *SOX* (*SRY-related HMG box*), que codifican factores de transcripción que presentan un dominio de unión al DNA llamado caja HMG (*high-mobility group*) (Sinclair *et al.*, 1990a). La proteína *SRY* es de localización nuclear y está poco conservada, habiéndose encontrado exclusivamente en mamíferos. La proteína *SRY* se une específicamente a secuencias consenso del tipo (A/T)AACAA(T/A) (Harley *et al.*, 1994).

La expresión de *Sry* en ratón comienza muy temprano en el desarrollo, alrededor de 10.5 dpc en los precursores de las células de Sertoli de la cresta genital. Alcanza un pico a los 11.5 dpc y justo antes de 12.5 dpc cesa su expresión (Hacker *et al.*, 1995; Bullejos y Koopman, 2001; Sekido *et al.*, 2004a). Este pico coincide con el inicio de la diferenciación de las células de Sertoli. Esta expresión sigue un patrón espacial definido que se inicia en el centro de la gónada extendiéndose hacia los polos, a través del eje antero-posterior (Bullejos y Koopman, 2001). Tras la expresión de *Sry*, las células pre-Sertoli se diferencian rápidamente como células de Sertoli, caracterizadas por unos altos niveles de expresión de *Sox9* (Sekido *et al.*, 2004a).

Se sabe que ciertas proteínas tales como *GATA4*, *FOG2* o *WT1* se encuentran implicadas en la regulación de *SRY*, modulando su transcripción o induciendo modificaciones post-transcripcionales (Hammes *et al.*, 2001; Tevosian *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha observado una cooperación sinérgica entre *SRY* y *SF1* para activar al gen *Sox9* a través de un intensificador (*enhancer*) específico de

3. Antecedentes

Sox9 en testículo (TESCO, *core testis-specific enhancer of Sox9*), lo que resulta necesario para inducir la diferenciación de células de Sertoli (Sekido y Lovell-Badge, 2008). Esto apoya la idea de que SRY interacciona con SF1 a través de su caja HMG, al igual que ocurre con SOX9, elevando los niveles del propio gen *Sox9*. Además, la activación de *Sox9* debe producirse dentro de una ventana temporal muy estrecha, tal y como se ha demostrado en experimentos donde SRY puede desencadenar la diferenciación testicular mediante la activación de *Sox9* en embriones entre 11.0 dpc y 11.5 dpc, pero no en aquellos desarrollados más allá de 11.5 dpc (Hiramatsu *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha demostrado que la proteína SRY de ratón es capaz de inhibir la ruta de señalización femenina WNT/ β -CAT (Vainio *et al.*, 1999; Maatouk *et al.*, 2008).

Sox9, *Sry related HMG box-9*. Este gen codifica un factor de transcripción con una caja HMG de unión a DNA, igual que la de *Sry*, y forma parte del grupo E de genes *Sox*, como *Sox8* y *Sox10* (Bowles *et al.*, 2000). A través de este dominio HMG es capaz de unirse a las secuencias consenso AACAAAT y AACAAAG, como SRY y otras proteínas SOX, aunque también se ha demostrado que interacciona con las secuencias ATGAAT y CACAAT, que se encuentran en el intensificador específico de condrocito en el primer intrón del gen *COL2A1* (colágeno de tipo II) humano (Bell *et al.*, 1997). En el extremo C-terminal encontramos una región rica en prolina, glutamina y serina, parecida a los dominios de trans-activación de los factores de transcripción (Foster *et al.*, 1994). También ha sido identificado un dominio situado antes de la caja HMG e involucrado en la dimerización de la proteína, aunque este proceso parece no ser necesario para la determinación del sexo, sino para procesos de condrogénesis.

La relación de *SOX9* con la determinación del sexo se descubrió estudiando pacientes con displasia campomélica, enfermedad caracterizada por una malformación de los huesos largos y deficiencias en diversos órganos como oído interno, cerebro, páncreas y corazón (Houston *et al.*, 1983; Mansour *et al.*, 1995, 2002). Ya se conocía la función de *SOX9* en la condrogénesis, pero en estos pacientes además se observaron otras alteraciones como la reversión sexual (Tommerup *et al.*, 1993; Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994), lo que confirmó que *SOX9* es también un gen clave en la diferenciación testicular.

Mediante la producción de ratones mutantes condicionales en los que la función de *Sox9* se había inhibido específicamente en la gónada, se indujo la reversión sexual completa de individuos XY, detectándose además expresión de marcadores de la ruta femenina

3.1. Determinación y diferenciación sexual en mamíferos

como *Wnt4* o *Foxl2* (Barrionuevo *et al.*, 2006a). Se demostró así la implicación de *Sox9* en el desarrollo testicular, actuando junto con *Sry* durante la diferenciación sexual en estadios tempranos. Al observarse su expresión poco después de *Sry* y en células pre-Sertoli, se llegó a la conclusión de que *Sox9* podría estar regulado por este gen (Austin y Edwards, 1981; Kent *et al.*, 1996a; Canning y Lovell-Badge, 2002).

Diversos estudios han revelado que en la gónada bipotencial de ratón y de humanos (10.5 dpc en ratón, y en torno a la sexta semana de gestación en humanos) se detecta expresión de *SOX9* en ambos sexos, mostrando la proteína *SOX9* una localización citoplasmática. Sin embargo, después de la expresión de *Sry* en machos, se detectan altos niveles nucleares de *SOX9* en el mismo tipo celular y, posteriormente, estas células se diferencian como células de Sertoli que continúan expresando *Sox9* hasta la edad adulta. Por el contrario, en la gónada XX, dirigiendo la organogénesis femenina, esta expresión desaparece. Se sospecha que la translocación al núcleo de la proteína *SOX9* en las células pre-Sertoli es esencial para que pueda actuar correctamente en la determinación del sexo (Argentaro *et al.*, 2003). Dicha translocación se produce gracias a la formación de un complejo *SOX9/Calmodulina* que induce un cambio conformacional en la proteína (Preiss *et al.*, 2001; Argentaro *et al.*, 2003), proceso en el que colabora también *PGD2*.

En cuanto a la regulación de *Sox9*, el *enhancer* específico de testículo en ratón, denominado *TESCO*, y de un tamaño de 3.2 Kb, es activado por *SRY* y *SF1*. Una vez que la expresión de *SOX9* alcanza un nivel determinado, se establece un bucle de retroalimentación positiva mediante la interacción de *SOX9* y *SF1* con *TESCO*, lo que es necesario para el mantenimiento de la expresión del propio *Sox9* (Sekido y Lovell-Badge, 2008). A partir de 11.5 dpc, actúan otros dos bucles de retroalimentación positiva. Uno se establece con *FGF9*, también necesario para inhibir la ruta de señalización femenina *Wnt* (Kim *et al.*, 2006a). El otro se produce cuando *SOX9* activa al promotor de *Ptgds*, enzima que cataliza la producción de *PGD2*, la cual origina una translocación de *SOX9* al núcleo y dispara la diferenciación de células de Sertoli de manera autocrina y paracrina (Malki *et al.*, 2005; Wilhelm, 2007). Además se ha observado que *PGD2* produce una masculinización parcial de las células epiteliales en la gónada XX en cultivo, haciendo que se diferencien como células de Sertoli (Adams y McLaren, 2002). Se ha detectado expresión de *PGD2* en células germinales, lo que podría además favorecer este bucle de retroalimentación (Adams y McLaren, 2002). La detección de *SOX9* en gónadas que no han expresado previamente *SRY*, apoya la posible activación de *SOX9* vía *PGD2* de manera autocrina y

3. Antecedentes

paracrina (Wilhelm *et al.*, 2005). Los ratones XX con mutaciones en *Sox9* continúan expresando *Sry* en las gónadas, por lo que se ha sugerido que SOX9 podría ser responsable de la desactivación de *Sry* en 12.5 dpc (Chaboissier *et al.*, 2004; Sekido *et al.*, 2004a; Wilhelm *et al.*, 2005). El complejo transcripcional FOG2/GATA4 se encarga de regular los niveles de *Sox9* en la gónada temprana, y cambios en la dosis de estos genes originan desregulaciones que conducen a la reversión sexual (Bouma *et al.*, 2007; Manuylov *et al.*, 2007).

Sox9 parece ser el principal factor en el proceso de diferenciación de las células de Sertoli y la formación de cordones testiculares. Se sabe que *Amh* y *Vanin-1* (*Vnn1*) son dianas directas de SOX9 (Wilson *et al.*, 2005a), y ambas están co-reguladas por SF1 y CBLN4 (Bradford *et al.*, 2009). La función que tienen *Vanin-1* y *Cbln4* en el desarrollo testicular todavía no se conoce, pero se sabe que *Amh* codifica la hormona anti-mulleriana, que produce la regresión de los conductos de Müller y su expresión depende de *Sox9* (Chaboissier *et al.*, 2004; Barrionuevo *et al.*, 2006a). La inactivación de *Sox9* en las gónadas de ratones 14.0 dpc produce una reducción en la expresión de *Amh*, pero los transcritos que quedan son suficientes para producir la regresión de los conductos de Müller (Barrionuevo *et al.*, 2009). Estudios *in vitro* han revelado la existencia de un lugar de unión de SOX9 en el promotor de *Amh* donde se une SOX9 y mediante interacción con SF1 se activa la expresión de *Amh* (De Santa Barbara *et al.*, 1998). Mutaciones en este lugar de unión producen pérdida de expresión de *Amh* (Arango *et al.*, 1999). En procesos de condrogénesis SOX9 es capaz de unirse a β -CAT, inhibiendo así la ruta *Wnt* mediante la activación de la fosforilación que conduce a su degradación (Topol *et al.*, 2009).

El hecho de que la expresión de *Sox9* se mantenga tras la formación de los cordones sugiere que este gen puede tener otras funciones en el desarrollo testicular, tales como el control de la espermatogénesis. Esto se refuerza por el hecho de que al detener la expresión en 14.0 dpc en ratón se produce esterilidad a los 5 meses de vida, aunque los ratones siguen su desarrollo testicular y alcanzan la pubertad (Barrionuevo *et al.*, 2009).

Genes implicados en la ruta ovárica

En el momento de la diferenciación gonadal, la ausencia de *Sry* en individuos XX, permite desarrollo ovárico, un proceso mucho menos conservado que el testicular (Jiménez, 2009). Aún así, podemos destacar varios genes maestros en la ruta de determinación sexual femenina, como son: *Dax1*, *Rspo1*, *Wnt4*, *Foxl2* y *Fst*, destacando como genes principales a *Rspo1* y *Wnt4*.

3.1. Determinación y diferenciación sexual en mamíferos

Rspo1, *R-Spondin 1*. Pertenece a una familia de factores de crecimiento, compuesta por cuatro miembros que codifican proteínas de secreción ricas en cisteína y que comparten un péptido de señalización N-terminal (SP), dos dominios furina (FU), un dominio trombospondina (TSP1) y una señal putativa de localización nuclear (NLS) (Kazanskaya *et al.*, 2004; Kamata *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2002). Los dominios FU son necesarios para la interacción con la ruta de señalización *Wnt/β-CAT* que puede ser activada por cualquiera de los miembros de la familia *R-Spondin*, al menos *in vitro*.

Su expresión en ratón comienza a los 10.5 dpc en la cresta urogenital de ambos sexos. En el momento de la diferenciación ovárica, entre 12.5-15.5 dpc, la expresión de *Rspo1* se localiza en células somáticas de la gónada XX, detectándose también una pequeña expresión en las células germinales (Smith *et al.*, 2008). En gónadas XY, se detecta expresión en el epitelio celómico, y más débilmente en algunas células intersticiales a partir de 12.5 dpc (Parma *et al.*, 2006a; Chassot *et al.*, 2008).

RSPO1 actúa como activador de la ruta de señalización canónica de β -CAT en ovario, dado que una activación ectópica de β -CAT es capaz de rescatar el fenotipo normal en gónadas XX *Rspo1*^{-/-}, originando hembras fértiles con ovarios funcionales (Chassot *et al.*, 2008). Los Ratones XX *Rspo1*^{-/-} muestran reversión sexual variable que va desde gónadas hipoplásicas a ovotestes (Chassot *et al.*, 2008; Tomizuka *et al.*, 2008). Estas gónadas son ovotestes que contienen regiones con cordones testiculares y otras con grupos de oocitos en paquitene, y en el adulto se produce una muerte masiva de las células germinales tras el nacimiento (Isotani *et al.*, 2005). Además, se produce una fuerte activación de *Sox9* en células somáticas y diferenciación de células de Sertoli, alrededor del nacimiento. En todos los casos, la gónada izquierda mostraba una mayor afectación, indicando que podría haber un efecto de asimetría izquierda/derecha. Este fenotipo es muy parecido al que presentan los ratones *knockout* para *Wnt4*, lo que sugiere su actuación en la misma ruta molecular. Como resultado de las alteraciones ocasionadas en la vasculogénesis de la gónada, se produce la formación de un vaso celómico, como ocurre durante el desarrollo testicular. Además, se produce la presencia de células esteroideogénicas funcionales, hechos que se son coherentes con la drástica disminución en la expresión de *Wnt4* observada a partir 11.5 dpc, debido a la ausencia de su activación por parte de *Rspo1*. *Wnt9a* también parece hallarse bajo control de RSPO1, puesto que se ha encontrado que interacciona con WNT4, pudiendo tener un papel similar a éste en el desarrollo ovárico (Später *et al.*, 2006). Sin embargo, los individuos XX *Rspo1*^{-/-} muestran hermafroditismo en los genitales, mientras

3. Antecedentes

que los ratones XX *Wnt4*^{-/-} presentan una ausencia completa de genitales externos femeninos.

Wnt4, *Wingless-related MMTV integration site 4*. Pertenece a la familia de genes *Wnt* que codifican proteínas de acción local que desencadenan cascadas de señalización que derivan en la activación transcripcional de diversos genes, interviniendo en procesos del desarrollo como el establecimiento de los ejes del embrión y polaridad celular, gastrulación, mantenimiento y diferenciación de células madre y desarrollo de órganos (Cadigan y Nusse, 1997; Dale, 1998). WNT es una familia de moléculas que se secretan y actúan de manera paracrina induciendo cambios en procesos implicados en el desarrollo, mediante asociación con receptores de membrana FRIZZLED (FZ) (He *et al.*, 2004). La unión entre WNT4 y FZ desencadena una cascada de señalización que disminuye la degradación de β -CAT y permite su transporte al núcleo, lo que induce la activación de genes dependientes de WNT (Nusse, 2003). Las proteínas WNT también son capaces de actuar mediante una vía no-canónica independiente de β -CAT que involucra a la proteína C quinasa (PKC) y la quinasa c-Jun NH2-terminal (JNK) (Pandur *et al.*, 2002).

Wnt4 se expresa antes de que la cresta genital haga su aparición en el mesénquima mesonéfrico. Esta expresión pasa a localizarse en torno a 11.5 dpc en las células somáticas del primordio gonadal de ambos sexos, pero va aumentando en la gónada XX y disminuyendo en la XY. Durante el desarrollo fetal, también se detecta expresión de *Wnt4* en el conducto de Müller (Vainio *et al.*, 1999).

Los ratones transgénicos que sobre-expresan *Wnt4* muestran niveles de testosterona reducidos y anomalías en la formación de la vasculatura del testículo, pero no llegan a sufrir reversión sexual, lo que sugiere que WNT4 podría suprimir la migración de células endoteliales al interior de la gónada XX e inhibir la esteroidogénesis, ya sea reprimiendo a *Sfl* o inhibiendo la migración de precursores esteroidogénicos (Jordan *et al.*, 2003; Jeays-Ward *et al.*, 2003). Por el contrario, los ratones transgénicos homocigotos para un alelo nulo de *Wnt4* mueren por insuficiencia renal después del nacimiento y presentan múltiples defectos en el desarrollo ovárico (Vainio *et al.*, 1999), incluyendo la formación ectópica de un vaso celómico (Jeays-Ward *et al.*, 2003). Presentan, por tanto, un fenotipo masculinizado tanto en gónadas como en conductos sexuales, acompañado de la expresión de *Sox9* y *Fgf9* (Kim *et al.*, 2006a). El análisis de los ratones homocigotos para un alelo nulo de *Sox9* (Barrionuevo *et al.*, 2006a) y *Fgf9* (Kim *et al.*, 2006a), reveló un aumento en la expresión de *Wnt4*, lo que sugiere que FGF9 y WNT4 podrían actuar como señales antagónicas durante la determinación sexual (Kim *et al.*, 2006a). Tam-

3.1. Determinación y diferenciación sexual en mamíferos

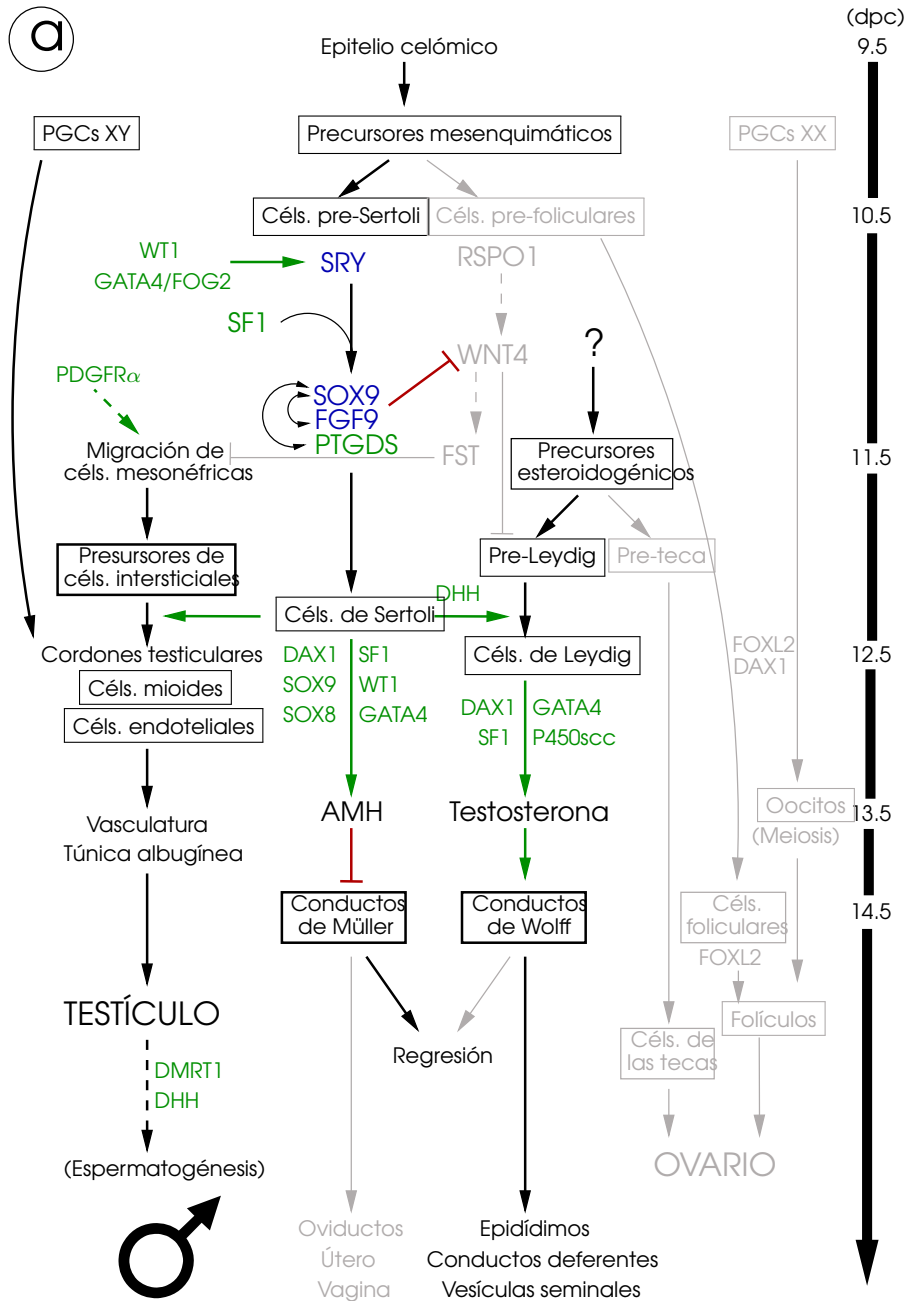
bién se ha observado que los ratones donde se han inactivado *Wnt4* y *Foxl2* presentan reversión sexual de hembra a macho (Ottolenghi *et al.*, 2007). Estos datos, junto con el hecho de que *Wnt* es reprimido en la gónada XY durante la determinación sexual, sugieren que este gen es clave en la ruta de diferenciación ovárica y/o en la inhibición de la ruta testicular.

Los ratones transgénicos condicionados que carecen de expresión gonadal de *Sox9*, presentan expresión de *Wnt4* a los 12.5 y 15.5 dpc en la gónada XY, lo que hace pensar que SOX9 inhibe a WNT4 (Barrionuevo *et al.*, 2006a). Esta hipótesis se refuerza con el hecho de que una expresión ectópica de *Sox9* en la gónada XX origina un descenso de los niveles de *Wnt4* (Qin y Bishop, 2005).

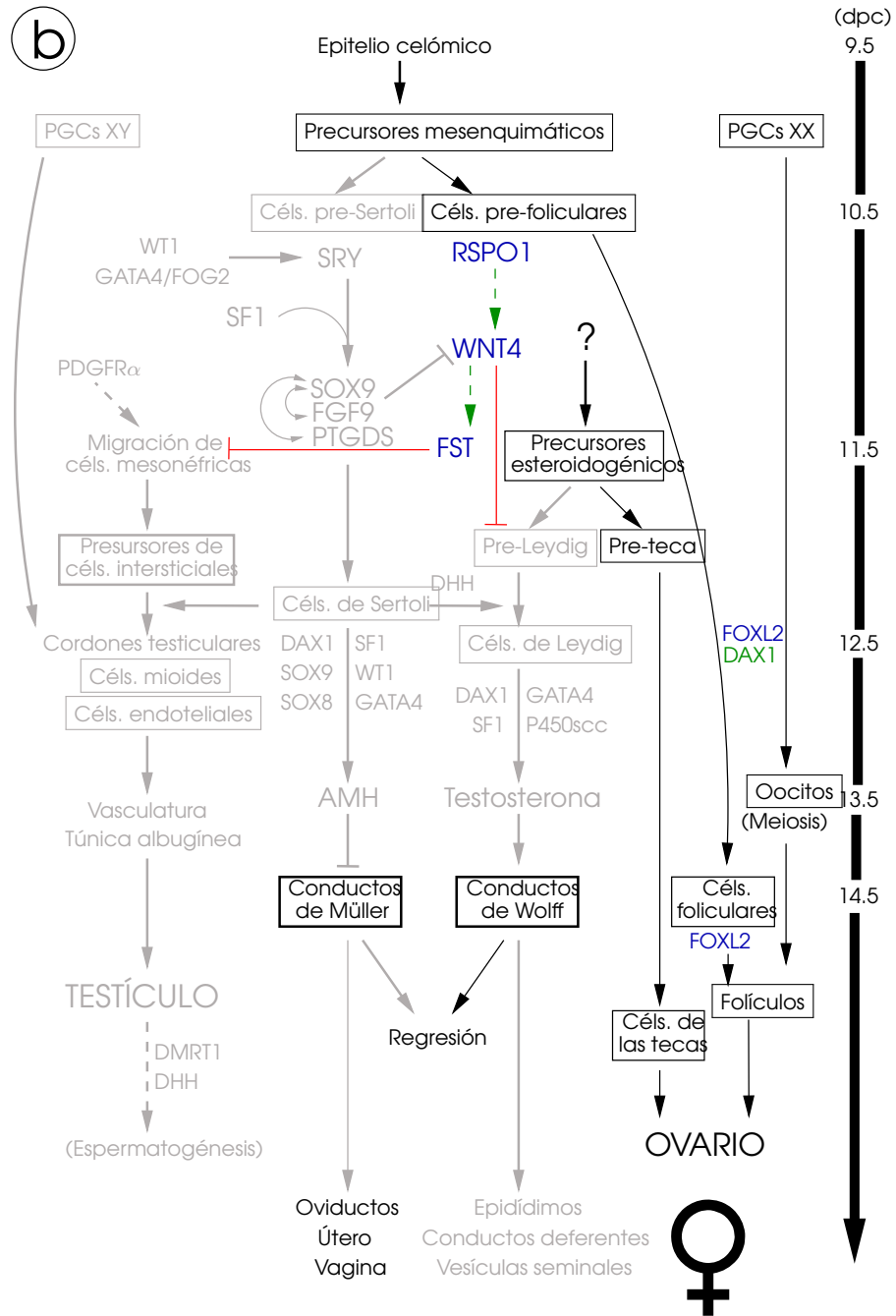
Interacciones génicas durante el desarrollo gonadal

En la figura 3.1 se muestra un esquema general de las interacciones que ocurren entre los diferentes genes y procesos que tienen lugar durante la determinación y diferenciación sexual en ratón. Como se ha comentado anteriormente, la expresión del gen *Sry* en células pre-Sertoli alrededor de los 10.5 dpc desencadena la activación de la ruta masculina, produciéndose la inhibición de la femenina. Como consecuencia de esta expresión, las células pre-Sertoli se diferencian como células de Sertoli, expresando *Sox9* lo que origina la inhibición de *Wnt4*, gen específico de la ruta ovárica. Este tipo celular será responsable de la consecución de numerosos eventos clave durante la diferenciación masculina. Por el contrario, la ausencia de *Sry* evita que genes específicos de ovario, como *Rspo1* sufran represión alguna, activándose la ruta ovárica.

3. Antecedentes



3.1. Determinación y diferenciación sexual en mamíferos



3. Antecedentes

Figura 3.1: Esquema de la determinación y diferenciación sexual masculina (a) y femenina (b) en mamíferos según los datos obtenidos en ratón. El avance cronológico relativo del desarrollo gonadal está representado a la derecha de ambas figuras con una barra gruesa en la que se indican los días post-coito de gestación (dpc). Los tipos celulares y las estructuras morfológicas que aparecen a lo largo del desarrollo se muestran en el interior de cajas. Los principales genes implicados en el proceso de la determinación sexual están representados en azul. El resto de los genes aparecen en verde cuando están activos. Las flechas verdes indican procesos de activación génica, mientras que las líneas rojas indican procesos de inhibición. Las flechas negras apuntan al paso siguiente en el proceso de desarrollo. Las flechas discontinuas indican que no se conoce si la actuación correspondiente se produce de forma directa o indirecta. En ambas figuras se representan en gris todos aquellos eventos inhibidos correspondientes al sexo opuesto (femenino en *a* y masculino en *b*).

3.2. Regulación de la expresión génica

Los procesos de determinación y diferenciación genética del sexo en mamíferos son de alto interés científico, por cuanto la dilucidación de los sistemas genéticos que conducen al desarrollo del carácter sexo permitirá resolver, entre otros aspectos, problemas de esterilidad y desarrollo sexual en humanos y en especies de mamíferos domésticos. Por otra parte, a pesar de que los procesos de determinación del sexo y diferenciación gonadal llevan estudiándose por multitud de grupos de investigación en todo el mundo, desde hace más de 20 años que se descubrió el gen *SRY*, todavía quedan muchos interrogantes por responder. Así, la determinación del sexo se está mostrando como un proceso extraordinariamente complejo, en el que actúan numerosos elementos génicos, probablemente relacionados entre sí por una trama complicada de actuaciones reguladoras que está lejos de ser dilucidada por completo. Y aunque se conocen genes que aumentan o disminuyen sus niveles de expresión a lo largo del desarrollo gonadal, se desconocen los mecanismos que controlan su expresión en la gran mayoría de los casos. Con respecto a los estudios de regulación que se han hecho hasta el momento, por lo general, se han centrado en el control de la transcripción, buscando posibles factores de transcripción responsables del patrón de expresión diferencial observado entre machos y hembras. Es razonable pensar que el estudio de la regulación de estos genes desde nuevos enfoques, por ejemplo a nivel post-transcripcional, pueda ayudar a dislumbrar las incógnitas que rodean a esta entramada red génica. En este sentido, es interesante investigar si los microRNAs, conocidos recientemente por su importante papel regulador, pueden ejercer regulación a nivel de la traducción de los genes implicados en el desarrollo y diferenciación gonadal.

3.2. Regulación de la expresión génica

El RNA mensajero (mRNA) media la transferencia de información genética desde el núcleo a los ribosomas del citoplasma, donde sirve como molde para la síntesis de proteínas. Para que las células eucarióticas y los tejidos funcionen adecuadamente, cada proteína celular debe estar disponible en una cierta cantidad, en una localización concreta y en un momento adecuado. Esta es una tarea de gran importancia y complejidad dada la gran cantidad de genes presentes en la célula, por lo que cada mRNA compite por la actividad traduccional de los ribosomas para generar una proteína específica. Estos hechos demuestran la necesidad de sistemas precisos de control de la regulación de la traducción. Los factores de transcripción regulan la expresión génica controlando la producción de mRNAs, pero el control de la traducción de esos mRNAs proporciona un medio más directo y rápido de control de dicha expresión. Así, un mismo mRNA puede ser eficientemente traducido por múltiples ribosomas,

3. Antecedentes

almacenado para su posterior traducción o ser pobremente traducido e incluso degradado (Axelsen y Sneppen, 2004). Además, algunos mensajeros que son inicialmente traducidos pueden ser inmediatamente degradados, siendo finalmente todos degradados. La decisión del destino que tendrá cada mRNA es altamente dependiente de las proteínas a las que se una, formando complejos mRNA-proteína (mRNP), que pueden variar desde uniones muy estables a otras que están sujetas a intercambios dinámicos (Moore, 2005). Todos estos hechos demuestran que los procesos de regulación génica, no sólo ocurren a nivel de la transcripción, sino también a nivel post-transcripcional.

3.2.1. Regulación a nivel de la transcripción

La regulación transcripcional es un proceso central para todas las acciones fisiológicas de procariotas y eucariotas. En eucariotas el complejo de DNA genómico y nucleosomas, referido como cromatina, en muchos casos reprime la transcripción génica porque bloquea los sitios de unión de proteínas al DNA (Razin, 1998). Las decisiones fundamentales en el desarrollo, tales como la diferenciación de las células, son mediadas por un programa de larga duración de la cromatina (Mohn y Schübeler, 2009). Sin embargo, los efectos epigenéticos pueden provocar cambios altamente dinámicos y permitir estados efímeros, tales como una respuesta de la cromatina a señales de estrés (Talbert y Henikoff, 2006). Los principales cambios epigenéticos que encontramos son modificaciones reversibles post-traduccionales, como la acetilación y la metilación de histonas (Narlikar *et al.*, 2002). El código de histonas consiste en un conjunto específico de modificaciones de las histonas, que permiten que se asocien con genes que son transcritos o reprimidos activamente (Turner, 1991; Jenuwein y Allis, 2001). Además, la plasticidad de la cromatina es inducida por complejos de remodelamiento dependientes de ATP, que reorganizan los nucleosomas (Hager *et al.*, 2000). Estos rápidos cambios en la activación de la cromatina la hacen permisiva a la regulación transcripcional.

No hay duda de que la regulación transcripcional es un proceso dinámico, siendo varios los factores que intervienen en este fenómeno cíclico, como son los factores de transcripción y la asociación de coreguladores a las regiones reguladoras de la cromatina. Existen muchos ligandos reguladores de los receptores nucleares, tales como los receptores de estrógenos, receptor de glucocorticoides, receptor de la vitamina D, y receptores de peroxisomas, que se engloban dentro de los factores de transcripción más estudiados. Además la naturaleza dinámica de la regulación transcripcional, fue observada por primera vez en diferentes miembros de la superfamilia de receptores nucleares, pero actualmente

3.2. Regulación de la expresión génica

se ha extendido también a otros factores de transcripción, como el factor nuclear κ B, que controla la transcripción del DNA en respuesta a estímulos externos, como estrés o infecciones. Estos cambios dinámicos y los procesos cíclicos, en parte, se observaron a nivel de la translocación al núcleo, viendo la asociación con sitios de unión al genoma, intercambio de co-reguladores y modificadores de la cromatina, encontrando marcas en la cromatina y diferentes actividades de la RNA polimerasa II que da lugar a la síntesis del mRNA (Carlberg y Seuter, 2010).

Tal como se ha indicado anteriormente, aunque la regulación de la transcripción juega papeles importantes en la producción de proteínas en las células, la regulación traduccional supone un mecanismo de regulación más directo.

3.2.2. Regulación a nivel de la traducción

Breve descripción del proceso de traducción. El proceso de traducción del mensaje genético desde el mRNA hasta la proteína se puede dividir en tres fases: iniciación, elongación y terminación, cada uno de las cuales requiere un determinado conjunto de condiciones y factores. La fase de iniciación es el paso limitante, requiriendo la participación de múltiples factores eucarióticos de iniciación (eIFs) y comenzando con la unión de eIF4F a la caperuza del mRNA en 5' (Pestova *et al.*, 1996; Sonenberg, 2008). Éste es un complejo compuesto de tres proteínas (eIF4E, eIF4G y eIF4A), cada uno con su papel específico crucial para la eficiente traducción del mRNA. La proteína de unión a la caperuza del mRNA en 5', eIF4E, y una helicasa dependiente de ATP, eIF4A, se unen a la proteína andamio, eIF4G, que contiene dominios de unión a mRNA, PABP y eIF3 (Tahara *et al.*, 1981; Gingras *et al.*, 1999). Estas interacciones sirven para estabilizar y circularizar el complejo eIF4F:mRNA y reclutar la subunidad pequeña del ribosoma (Wells *et al.*, 1998; Gingras *et al.*, 1999). El modelo de un bucle cerrado propone la capacidad de eIF4G para unir la caperuza (*cap*) en 5' del mRNA (vía eIF4E) a la cola de poliA (vía PABP) incrementando en gran medida la eficiencia de la traducción (Derry *et al.*, 2006). Una vez reclutada la subunidad pequeña, 40S, explora el mRNA hasta que alcanza el codón de inicio, AUG y recluta la subunidad mayor del ribosoma, 60S, para formar el ribosoma traduccional competente, 80S (Jackson *et al.*, 2010).

Tras la producción de los precursores de mRNAs (pre-mRNAs) en el núcleo ocurren muchos eventos antes de la traducción del mRNA maduro, que afectan al rendimiento de las proteínas funcionales (Mansfield y Keene, 2009). Inicialmente, muchos pre-mRNAs están sujetos a procesamiento de corte y empalme, *splicing*, para eliminar los intrones. Es obvio que las proteínas que se unen al RNA y median la maduración (*splicing*) alternativa, presentan un claro potencial como reguladores. Además, tanto la cola de poliA, como la proteína que se une a ella (PABP) son cruciales para una posterior traducción eficiente. El mRNA resultante debe ser entonces exportado desde el núcleo al citoplasma, donde tiene lugar la traducción.

3. Antecedentes

La regulación traduccional determina qué mRNAs son traducidos a proteína bajo el control de un conjunto de condiciones, como son: estímulos extracelulares, tipo de célula o tejido y localización subcelular. Esta capacidad permite un ajuste preciso espacio/temporal de los niveles de proteína, para que tenga lugar una función fisiológica normal.

Las nuevas tecnologías de micromatrices, (*microarrays*), permiten hacer un rápido perfil de todo el genoma de las células eucarióticas, proporcionando una estimación de los mRNAs que se expresan en una situación problema en comparación con un control, por ejemplo, células cancerosas frente a tejidos sanos. El objetivo de estos estudios es con frecuencia identificar productos génicos aberrantes responsables de algún fenotipo de interés. Estudiando estos casos, se ha teorizado que la diagnosis molecular de un producto génico que conduce a una enfermedad puede ser de gran utilidad para determinar el mejor tratamiento personalizado (Weinstein, 2002). Por otro lado, los estudios comparativos de genómica frente a proteómica han indicado que la expresión de un mRNA es sólo un pobre indicador de los niveles de proteína en eucariotas (Gygi *et al.*, 1999; Ideker *et al.*, 2001). Por tanto, los mecanismos post-transcripcionales que controlan la expresión génica cobran una importancia relevante en el entendimiento del control de la abundancia de las proteínas celulares.

Mecanismos de control de la traducción del mRNA y su degradación

La mayoría de las proteínas celulares en eucariotas son generadas por traducción de mRNAs que han pasado con éxito una serie de pasos de control de calidad. Los transcritos que fallan en esta selección son degradados evitando que se formen proteínas defectuosas. Este control se puede ejercer tanto a nivel de la transcripción como de la traducción. En el caso de la traducción, generalmente, la caperuza y la cola de poliA contribuyen a dar estabilidad al mRNA en el citoplasma, presumiblemente estimulando la traducción y, por otro lado, lo protegen físicamente de la accesibilidad a las nucleasas (Mitchell y Tollervey, 2000).

Las RNasas son enzimas que intervienen en el procesamiento, degradación y control de calidad de todos los tipos de RNAs. La familia de enzimas de RNasas de eucariotas son las RNasas II cuya expresión es ubicua. Estas exoribonucleasas degradan el RNA desde el extremo 3' al 5' liberando nucleótidos monofosfato. Un número limitado de RNasas pueden ejercer un nivel determinante de control actuando como red global de regulación, vigilando y adaptando los niveles de RNA según las necesidades de la célula. Las RNasas pueden actuar solas o pueden cooperar en complejos de degradación del RNA. Durante la degradación del RNA, no sólo actúan como "moléculas asesinas" eliminando especies de RNA, sino que también actúan según los requerimientos de crecimiento de la célula, adaptándose al medio. Pueden jugar papeles sumamente importantes

3.2. Regulación de la expresión génica

contribuyendo a reciclar ribonucleótidos, y también pueden llevar a cabo la vigilancia y destrucción de RNAs aberrantes que producirían proteínas perjudiciales.

Por otro lado, existen diversos mecanismos que controlan el destino final de estos mRNAs, destacando principalmente dos: la degradación del mRNA sin sentido (NMD, *nonsense-mediated decay*), que vigila la rápida degradación de mensajeros que tienen codones de terminación prematura (PTCs), y el silenciamiento de la expresión génica de una forma específica de secuencia, mediado por pequeños RNAs. El NMD es un mecanismo muy conservado que se ha encontrado en especies muy diversas como levaduras, moscas, gusanos, mamíferos y plantas. Lo más frecuente en los mensajeros eucariotas es que no se vean afectados por este mecanismo pues suelen contener un solo codón de terminación al final de la región codificante. En contraste los mRNAs mutantes tienen codones de terminación en mitad de la pauta de lectura, aguas arriba del codón de terminación normal, y en este caso son reconocidos por la maquinaria NMD, dando lugar a su desestabilización y degradación (Shyu *et al.*, 2008).

En relación con la regulación de la traducción por pequeños RNAs, la abundancia de mRNAs en el citoplasma está regulada por la estabilidad de estos mensajeros, variable que ha ganado mucha atención en los últimos tiempos debido al interés que han despertado los pequeños RNAs, capaces de silenciar mRNAs de una forma específica de secuencia. Estos pequeños RNAs suponen un importante nivel de regulación post-transcripcional. El descubrimiento del RNA de interferencia, **RNAi**, a finales de la década de los 90 provocó un renacimiento en el entendimiento de los RNAs como moléculas reguladoras. Desde entonces ha ido emergiendo un creciente número de diferentes clases de pequeños RNAs en organismos eucariotas, pudiendo dividirlos en dos grandes grupos: los que participan en la maquinaria relacionada con el RNAi y los que no. Los pequeños RNAs que participan en la ruta relacionada con el RNAi comparten varias características: 1) son escindidos por DICER a partir de un RNA largo de cadena doble (dsRNA, *double-stranded RNA*) (Bernstein *et al.*, 2001); 2) tienen una longitud de entre 20 a 30 nucleótidos; 3) tienen grupos fosfato en 5' y un grupo hidroxilo (-OH) en su extremo 3' (aunque algunas veces puede estar modificado); y 4) se encuentran asociados con unos miembros específicos de una gran familia de proteínas, las argonautas (AGO). La precisa combinación de un pequeño RNA con una determinada proteína AGO determina su función biológica. Esta asociación tiene importantes papeles como la regulación de la expresión génica, modificación de la estructura del cromosoma y protección contra elementos móviles. Conceptualmente todos los eventos regulatorios mediados por los pequeños RNAs pueden ser considerados como la culminación de diferentes pasos: la biogénesis del pequeño RNA, selec-

3. Antecedentes

ción de la hebra (desde el precursor de cadena doble, dsRNA), asociación con la proteína AGO, reconocimiento de la diana y ejecución de su función.

La biogénesis de las diferentes clases de pequeños RNAs, incluyendo los microRNAs (miRNAs) y los pequeños RNAi, requieren la acción de las proteínas de la familia de la RNasa III (Chapman y Carrington, 2007; Voinnet, 2009; Ghildiyal y Zamore, 2009). Algunas clases de pequeños RNAs, como son los RNAs que interactúan con dominios Piwi (*P-element induced wimpy testis, Drosophila*) o piRNAs, y los siRNAs (*small interfering RNAs*) secundarios de gusanos, no derivan de precursores dsRNA sino que se producen a partir de mecanismos de biogénesis independientes de las enzimas de la familia de RNasas III (Vagin *et al.*, 2006; Houwing *et al.*, 2007; Brennecke *et al.*, 2007; Pak y Fire, 2007; Sijen *et al.*, 2007).

Después de su producción, los pequeños RNAs se asocian con proteínas de la familia argonauta, que funcionan a través del núcleo del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Las proteínas argonauta pueden clasificarse en tres subgrupos según su secuencia: las subfamilias AGO, PIWI y la específica de gusanos WAGO (Yigit *et al.*, 2006; Tolia y Joshua-Tor, 2007; Hutvagner y Simard, 2008). La subfamilia de proteínas PIWI incorpora pequeños RNAs derivados de precursores de cadena simple (piRNAs) y las proteínas AGO, normalmente, se asocian con pequeños RNAs dúplex procesados por la endonucleasa RNasa III, como son los microRNAs y siRNAs (Chapman y Carrington, 2007; Ghildiyal y Zamore, 2009). Los pequeños RNAs que se asocian con las proteínas WAGO son, normalmente, los productos directos de la síntesis del RNA (Yigit *et al.*, 2006; Pak y Fire, 2007; Sijen *et al.*, 2007).

El complejo RISC maduro consiste en una hebra simple del pequeño RNA unido a una proteína argonauta. Como algunos pequeños RNAs son generados en forma de RNA dúplex, sólo una hebra (la hebra guía) es la retenida, y la otra (hebra pasajera) es descartada durante el ensamblaje del RISC (Matranga *et al.*, 2005; Miyoshi *et al.*, 2005; Rand *et al.*, 2005). La asociación de las proteínas AGO con los pequeños dúplex de RNA se genera antes de la maduración del RISC, lo que resulta importante para asegurar que en el ensamblaje del RISC se incorpora la hebra guía, estabilizada selectivamente. Los pequeños RNAs guían la maduración del RISC a través de la unión complementaria con sus dianas, lo que conduce, por lo general, a la represión de su gen diana (Brodersen y Voinnet, 2009; Bartel, 2009; Fabian *et al.*, 2010).

La principal característica que diferencia al RNAi respecto a los microRNAs consiste en que RNAi degrada moléculas de RNA que tengan secuencias completamente complementarias al siRNA mediante un corte endonucleolítico (Hannon, 2002; Dykxhoorn *et al.*, 2003), mientras que los microRNAs, que derivan de genes nativos que forma emparejamiento imperfecto con sus mRNAs diana, no provocan un corte endonucleolítico

de estos mRNAs diana (Ambros, 2004; Bartel, 2004), sino que puede actuar por diferentes mecanismos que todavía no están del todo claros. En la actualidad, los RNAi están cobrando mucha importancia en el diseño de herramientas tanto experimentales como terapéuticas.

3.3. MicroRNAs

3.3.1. Biología de los microRNAs

Los miRNAs son una familia de pequeños RNAs monocatenarios, no codificantes, que regulan post-transcripcionalmente genes codificantes de proteínas de una forma dependiente de secuencia, ya sea por inhibición de la traducción, por degradación del RNA mensajero, o por ambos mecanismos. Son RNAs de entre 20 y 25 nucleótidos, de reciente descubrimiento pero que se encuentran muy conservados a lo largo de toda la escala evolutiva (Ambros, 2003, 2004; Flynt y Lai, 2008; Bartel, 2009). Ejercen su acción reguladora mediante un emparejamiento imperfecto en el extremo 3' no transcrito (**3' UTR**, *untranslated region*) de sus mRNA diana (Shyu *et al.*, 2008), jugando papeles importantes en diversos procesos biológicos tales como el desarrollo, la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, el metabolismo y la oncogénesis (Valencia-Sanchez *et al.*, 2006).

Uno de los primeros miRNAs que se identificó y estudió fue lin4 en *Caenorhabditis elegans*, que inhibe la traducción de *LIN14* (Lee *et al.*, 1993). Por ello, en principio fueron considerados como una particularidad de los nematodos hasta que se demostró, años más tarde, que uno de los miRNAs de *C. elegans* (*let-7*) estaba presente en un elevado número de especies, incluidos los vertebrados (Pasquinelli *et al.*, 2000). De forma similar, en principio se creyó que la presencia de los miRNAs estaba limitada a organismos multicelulares, pero recientemente se han descrito en un alga unicelular, *Chlamydomonas reinhardtii* (Molnár *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007a). Así, hoy en día se conocen más de 15.000 precursores de miRNAs que dan lugar a más de 17.000 miRNAs maduros en 142 especies distintas (*miRBase, release 16.0*, <http://www.mirbase.org>). En humanos se conocen actualmente alrededor de 800 miRNAs expresados individualmente, un número comparable al de los factores de transcripción o las proteínas de unión al RNA (RBPs, *RNA binding protein*), y muchos de ellos son expresados de una forma específica de tejido o de estadio de desarrollo, contribuyendo con esto a los perfiles de expresión de proteínas específicos de un tipo celular.

Un sólo miRNA podría, potencialmente, regular cientos de genes diana en un único tipo celular (Baek *et al.*, 2008; Selbach *et al.*, 2008) y, a su vez, cada mRNA puede tener dianas para múltiples miRNAs que pueden

3. Antecedentes

interaccionar con otros ya sea de forma sinérgica o en competencia entre ellos. Los métodos computacionales de predicción de dianas sugieren que entre el 20 y el 30 % de los genes codificantes de proteínas están regulados por miRNAs (Lewis *et al.*, 2003, 2005; Rajewsky, 2006). Concretamente, en mamíferos se predice que los miRNAs controlan la actividad de, aproximadamente, el 50 % de los genes codificantes de proteínas, constituyendo los miRNAs, por tanto, otro importante nivel del circuito regulatorio de que disponen las células. Según esto, cualquier desregulación de los miRNAs podría conllevar grandes problemas regulatorios en la célula, induciendo quizá fenotipos cancerosos. De hecho, se ha demostrado que los perfiles de expresión de los miRNAs están modificados en un gran número de tipos de cáncer, y que la sobre-expresión forzada de los miRNAs podría conducir al desarrollo de tumores. Así, haciendo estudios funcionales se ha visto que los miRNAs participan en la regulación de casi todos los eventos celulares y procesos biológicos, y que los cambios en su perfil de expresión están asociados con muchas de las patologías humanas, incluidos varios cánceres y enfermedades cardiovasculares (Krol *et al.*, 2010b).

Biogénesis de los miRNAs

Se sabe que el 60 % de los genes que codifican miRNAs se expresan de forma independiente, pero el 15 % se encuentran agrupados y el 25 % en intrones de otros genes codificantes de proteínas (Bartel, 2004). El mecanismo de biosíntesis de los miRNAs está evolutivamente muy conservado e implica la actuación de una serie de enzimas endonucleolíticas para su procesamiento. En la figura 3.2 podemos observar un esquema ilustrativo del mecanismo general de biogénesis y procesamiento de los miRNAs. Inicialmente, los genes de los miRNAs son transcritos en el núcleo por la RNA polimerasa II, dando un primer producto génico que se llama miRNA primario o **pri-miRNA**, que tiene varias kilobases de longitud, es bicatenario, horquillado en un extremo y presenta otras estructuras horquilladas o desapareamientos locales de bases adicionales. Los pri-miRNAs son sustratos de dos enzimas que forman parte de la familia de la RNasa III, DROSHA y DICER, las cuales operan acompañadas con otras proteínas de unión a RNA de cadena doble, RBPs, como son DGCR8 (proteína 8 de la región crítica del gen del síndrome de DiGeorge), o TRBP (proteína receptiva a la trans-activación, también denominada TAR). Así, DROSHA forma un complejo con estas proteínas, llamado microprocesador, que ayudan a reconocer de forma específica la zona de unión dsRNA-ssRNA (RNA de hebra doble y simple) colocando la ribonucleasa en el lugar correcto para el corte. El procesamiento eficiente de los pri-miRNAs por DROSHA requiere la presencia de largas colas de RNA de hebra simple tanto en el extremo 3' como en el 5' de la molécula en horquilla. Estos motivos de RNA de hebra simple pueden variar en su composición, mientras que su

longitud es de gran importancia para que el procesamiento tenga lugar.

El complejo DROSHA corta la molécula de RNA aproximadamente a dos vueltas de hélice a partir del lazo terminal, y a una vuelta de hélice a partir de los segmentos basales (Zeng y Cullen, 2005; Han *et al.*, 2006), dando lugar a un producto de unos 70 nucleótidos llamado precursor miRNA o **pre-miRNA**, que también es bicatenario y horquillado en un extremo y se exporta al citoplasma. El transporte de los pre-miRNAs ocurre a través de los poros nucleares, que son grandes canales protéicos inmersos en la membrana nuclear (Nakielny y Dreyfuss, 1999). Este transporte está mediado por el receptor de transporte nuclear Exportin-5 (EXP5) dependiente de Ran-GTP (Yi *et al.*, 2003; Bohnsack *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004). Un modelo de transporte propuesto postula que la exportación del pre-miRNA se inicia cuando EXP5 reconoce un bucle de RNA de cadena doble de más de 14 pb con un extremo saliente en 3' seguido por una unión cooperativa del pre-miRNA y el cofactor Ran-GTP. El pre-miRNA unido a EXP5 se exporta fuera del núcleo donde la hidrólisis del GTP lleva a la liberación del pre-miRNA (Gwizdek *et al.*, 2003; Basyuk *et al.*, 2003; Zeng y Cullen, 2004; Lund *et al.*, 2004).

Algunos pre-miRNAs se producen a partir de intrones muy cortos llamados mirtrones (*mirtrons*), como resultado de un corte y empalme (*splicing*) y una desramificación, saltándose el paso del complejo DROSHA-DGCR8. En cualquier caso en el citoplasma ese pre-miRNA es cortado por la ribonucleasa tipo III, DICER, acompañada con TRBPs, y dando lugar a un dúplex miRNA/miRNA* de unos 20 pares de bases. Una de las hebras de este dúplex representa el miRNA maduro (resaltado en rojo en la figura 3.2) que será incorporado al complejo **miRISC**. En mamíferos, la proteína argonauta 2 (AGO2) tiene una importante actividad endonucleasa similar a la RNasaH, apoyando a DICER en el procesamiento por corte del brazo 3' de algunos pre-miRNAs y, en otros casos, puede formar un procesamiento intermedio adicional llamado precursor miRNA AGO2-cortado (**ac-pre-miRNA**) (Diederichs y Haber, 2007).

También en relación con el procesamiento, una de las hebras del dúplex miRNA/miRNA*, la llamada **hebra guía**, se incorpora preferentemente al complejo miRISC, mientras que la otra hebra, la llamada **hebra pasajera** (miRNA*), se libera y es degradada. Generalmente, esta hebra desechada es la que muestra menos estabilidad en cuanto a su composición en pares de bases en el extremo 5' del dúplex. No obstante, estas hebras miRNA* no siempre se descartan, pudiendo incluso ser incorporadas al complejo miRISC y ser miRNAs funcionales (Okamura *et al.*, 2009; Czech *et al.*, 2009; Chiang *et al.*, 2010; Ghildiyal *et al.*, 2010). En cualquier caso, el miRNA maduro promueve la asociación de ese gran complejo protéico, RISC, con sitios específicos de las regiones 3' UTR de sus genes diana (Flynt y Lai, 2008). La selección de las dianas de miRNAs está mediada, en general, por un emparejamiento imperfecto entre

3. Antecedentes

el miRNA y el sitio de reconocimiento del miRNA presente en el extremo 3' UTR del mRNA diana. Esta asociación **miRNA-RISC:mRNA** da lugar a la inhibición del gen diana promoviendo la degradación del mRNA y/o inhibiendo su traducción (Pillai *et al.*, 2005; Humphreys *et al.*, 2005; Petersen *et al.*, 2006; Nottrott *et al.*, 2006; Filipowicz *et al.*, 2008).

Regulación de los microRNAs

Regulación de la transcripción de los genes de miRNAs. La transcripción de los genes de los miRNAs está regulada de forma similar a la de los genes codificantes de proteínas. Ésta es muy importante ya que es específica de ciertos tejidos y/o momentos del desarrollo. El mecanismo de regulación más común consiste en el establecimiento de bucles de retroalimentación, especialmente durante la determinación del destino celular y el desarrollo. Participan en circuitos de regulación, reprimiendo a mRNAs que codifican factores implicados en la biogénesis y función del propio miRNA. De hecho, existen muchos ejemplos en la literatura de miRNAs que regulan su propia transcripción a través de bucles, simples o dobles, positivos o negativos, con factores de transcripción específicos. Por ejemplo, el factor de transcripción PITX3 y el miR-133b forman un bucle de autorregulación negativa que controla la diferenciación neuronal. PITX3 estimula la transcripción de miR-133b que, a su vez, reprime la expresión de PITX3 (Kim *et al.*, 2007). El ajuste y la puesta a punto de la expresión de los miRNAs hasta unos niveles fisiológicamente óptimos es de suma importancia ya que tienen un fuerte impacto en la precisa expresión espacio-temporal de sus genes diana.

Regulación del procesamiento de los miRNAs. El control del procesamiento de los miRNAs ha emergido como otro importante campo de estudio para definir su patrón de expresión.

Regulación de DROSHA, DICER y RBPs.

En mamíferos, DROSHA y DICER actúan generalmente acomplejadas con RBPs tales como DGCR8 y TRBP. Tanto los niveles como la actividad de estas proteínas están sujetos a regulación y afectan a la acumulación de los miRNAs. Por ejemplo, DGCR8 tiene un efecto estabilizante en DROSHA interaccionando con sus dominios, mientras que DROSHA controla los niveles de mensajero de DGCR8, induciendo su degradación (Triboulet *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2009). Así, mantener la proporción entre DROSHA y DGCR8 es muy importante ya que se ha visto que un exceso de

3.3. MicroRNAs

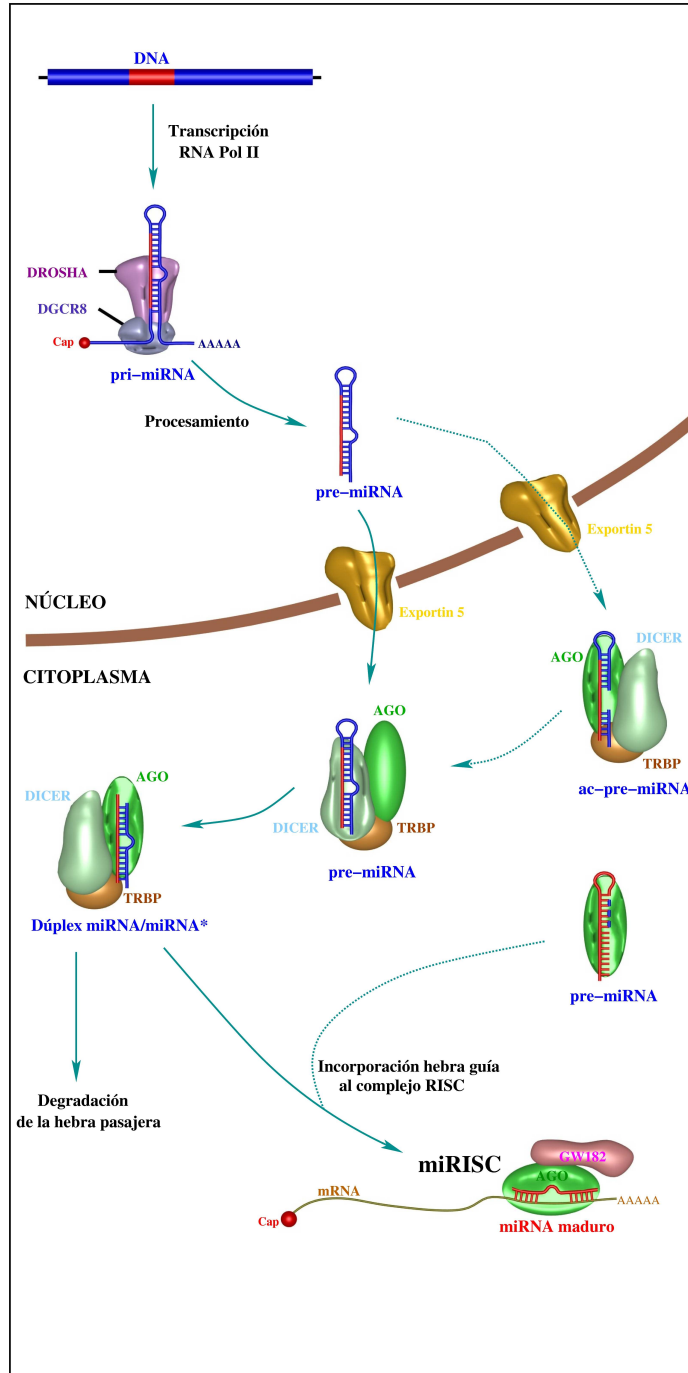


Figura 3.2: Biogénesis de los miRNAs.

3. Antecedentes

tres veces más de DGCR8 inhibe drásticamente la actividad de DROSHA *in vitro* (Gregory *et al.*, 2004).

La acumulación de DICER es dependiente de TRBP. Una disminución de TRBP da lugar a la desestabilización de DICER y por tanto a fallos en el procesamiento de los miRNAs (Chendrimada *et al.*, 2005; Paroo *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2009). TRBP se estabiliza a sí misma a través de una fosforilación de serina catalizada por proteínas quinasas como MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) y ERK (*extracelular-regulated kinase*) (Paroo *et al.*, 2009). La supervivencia y el crecimiento celulares se incrementan a través de la fosforilación de TRBP, posiblemente como consecuencia de una activación de miRNAs estimulantes del crecimiento y una disminución de let-7, un conocido supresor de la proliferación (Paroo *et al.*, 2009). En particular, let-7 tiene diana en el mensajero de DICER (Forman *et al.*, 2008), formando un bucle de retroalimentación negativa con potencial para influir ampliamente en la biogénesis de los miRNAs.

DICER es una proteína grande (aprox. 200 kDa) con múltiples dominios, que no sólo está implicada en la escisión de los pre-miRNAs sino que participa también en la incorporación del miRNA al complejo RISC (Carthew y Sontheimer, 2009). El dominio helicasa amino terminal de DICER puede tener una función autorreguladora, pues su escisión promueve una actividad catalítica de la DICER humana, respuesta similar a la adición de TRBP (Ma *et al.*, 2008). Hay evidencias que sugieren que la proteólisis puede jugar un papel en la modulación de la actividad de DICER (Zhang *et al.*, 2002; Lugli *et al.*, 2005) o incluso cambiando su especificidad hacia DNA (Nakagawa *et al.*, 2010).

La posición de corte de DROSHA y DICER determina la identidad 5' terminal (5p) o 3' terminal (3p) de los nucleótidos del miRNA (Carthew y Sontheimer, 2009). En particular, si el procesamiento de algunos de los precursores para estas enzimas no es uniforme, genera isoformas de los miRNAs con diferentes extremos terminales. La heterogeneidad en el extremo 5' es especialmente importante ya que puede tener consecuencias funcionales, como afectar a la llamada **región semilla**, que es un segmento del miRNA, de 2-8 nucleótidos, que se empareja con la diana del mensajero en su extremo 3' UTR (Bartel, 2009). Por tanto, las modificaciones en esta región pueden cambiar la identidad de sus mensajeros diana (Chiang *et al.*, 2010). Por otro lado, la estabilidad termodinámica del extremo 5' en el miRNA dúplex determina qué cadena, miRNA o miRNA*, se incorpora preferentemente al complejo RISC.

Por lo tanto, la heterogeneidad de la escisión puede afectar a la estabilidad del extremo y la posterior selección de una u otra de las cadenas. Además la identidad de los nucleótidos en el extremo 5' también puede afectar directamente a la eficiencia en la incorporación del miRNA al RISC, independientemente de la estabilidad del extremo en el dúplex

(Frank *et al.*, 2010). Por regla general, la mayoría de los genes de miRNAs producen una especie de miRNA dominante. Sin embargo, la proporción entre miRNA y miRNA* puede variar en diferentes tejidos o estadios de desarrollo, lo que probablemente depende de las propiedades específicas del pre-miRNA o del miRNA dúplex, o de la actividad de diferentes factores accesorios del procesamiento (Krol *et al.*, 2004; Ro *et al.*, 2007b; Chiang *et al.*, 2010).

El papel de las **proteínas accesorias (RBPs)** es también muy importante. Trabajos recientes han identificado bastantes proteínas que regulan el procesamiento de los miRNAs, tanto de forma positiva como negativa, bien por interacción con DROSHA o DICER o por unirse a precursores de miRNAs (Winter *et al.*, 2009). Normalmente la actividad de estos elementos reguladores está restringida a unas familias específicas de miRNAs, aunque también encontramos algunos que regulan un amplio rango de precursores de miRNAs, sugiriendo que su actividad puede afectar a la expresión de redes genéticas completas.

Un ejemplo de un elemento regulador negativo implicado en la biogénesis de miRNAs es *LIN-28*, que puede intervenir a diferentes niveles. Actúa evitando la acumulación de *let-7* maduro en células madre embrionarias y en otros progenitores celulares, a pesar de haber una alta expresión de transcritos de su precursor, *pri-let-7* (Rybak *et al.*, 2008; Viswanathan y Daley, 2010). El fallo en el procesamiento se debe a la unión de *LIN-28* al bucle terminal del *pri-let-7*, lo que interfiere en el corte por parte de DROSHA (Viswanathan y Daley, 2010). Incluso *LIN-28* se puede unir al *pri-let-7* y bloquear el procesamiento por parte de DICER. En este último caso *LIN-28* actúa induciendo poli-uridilación en el extremo 3' terminal del *pri-let-7* por atracción de TUT4, una polimerasa poliU terminal (Heo *et al.*, 2008; Hagan *et al.*, 2009; Heo *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2009; Lehrbach *et al.*, 2009). La uridilación evita el procesamiento de DICER de los precursores debido a la degradación por parte de una RNasa desconocida (Heo *et al.*, 2008). La represión mediante *LIN-28* es altamente específica y afecta sólo a miembros de la familia de *let-7* (Heo *et al.*, 2008; Viswanathan *et al.*, 2008). Sin embargo, este sistema regulador *LIN-28—let-7* está altamente conservado en la evolución y juega un papel muy importante en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madre embrionarias (ESCs, *embryonic stem cells*), y también en el desarrollo y la oncogénesis. La inhibición del *let-7* maduro por *LIN-28* es esencial para el mantenimiento y la autorrenovación de las ESCs, así como para bloquear su diferenciación. Por el contrario, durante la diferenciación de estas ESCs los niveles de *LIN-28* disminuyen y se acumula *let-7* maduro. Además *let-7* tiene funciones como supresor de tumores, ya que tiene dianas en varios oncogenes conocidos, como son MYC, KRAS y cyclin D1 (Roush y Slack, 2008). De forma que *LIN-28* se considera un oncogen ya que inhibe la maduración de *let-7*; de hecho en muchos tumores se ha

3. Antecedentes

encontrado una activación extra de LIN-28 (Viswanathan *et al.*, 2009b). Curiosamente LIN-28 tiene diana para let-7, por lo que cada uno controla el nivel del otro (Rybak *et al.*, 2008).

Las helicasas p68 y p72 se han identificado como componentes del complejo microprocesador de **DROSHA**, y estimulan el procesamiento de un tercio de los pri-miRNAs de ratón (Fukuda *et al.*, 2007). En células mutantes para p68 o p72, los niveles de pre-miRNAs, aunque no los de pri-miRNAs, se reducen significativamente como consecuencia de una unión atenuada de DROSHA en el momento de procesar el pri-miRNA (Fukuda *et al.*, 2007). Tanto p68 como p72 interactúan con un amplio rango de proteínas, posiblemente actuando como un andamio que recluta factores del complejo de DROSHA y promoviendo el procesamiento del pri-miRNA. La interacción mediante p68 del complejo DROSHA con el supresor de tumores p53 tiene un efecto estimulante en el procesamiento del *pri-mir-16-1*, *pri-mir-143* y el *pri-mir-145* en respuesta al daño en el DNA en células cancerosas (Suzuki *et al.*, 2009).

Muchas evidencias sugieren que, como en el caso del procesamiento del mRNA, el procesamiento del pri-miRNA por parte del complejo DROSHA también ocurre co-transcripcionalmente, y que la escisión de los pre-miRNAs desde los intrones puede incluso preceder a la maduración por *splicing* (Pawlicki y Steitz, 2010). Incluso el procesamiento de los pri-miRNAs ha sido también ligado a la formación de la caperuza (*capping*) en el extremo 5' terminal de los transcritos. Varios factores de *splicing* también funcionan como reguladores en el procesamiento de miRNAs, independientemente de su papel en el *splicing*. SF2/ASF se unen al *pri-mir-7* y promueve el procesamiento por DROSHA (Wu *et al.*, 2010b). Es interesante que esta interacción esté sujeta a una autorregulación por retroalimentación, ya que los mensajeros de SF2/ASF tienen dianas para miR-7 maduro (Wu *et al.*, 2010b).

La ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNP) A1 y KSRP (también conocida como KHSRP), son conocidos factores de *splicing*, y también sirven como proteínas auxiliares en la biogénesis de miRNAs, actuando algunas veces tanto a nivel de DROSHA como de DICER (Michlewski *et al.*, 2008; Trabucchi *et al.*, 2009).

Corrección del RNA de los miRNAs.

Tal como se ha demostrado para el caso de los mRNAs, los miRNAs también sufren procesos de corrección (*editing*), que altera su secuencia de nucleótidos. Las desaminasas de adenosina que actúan sobre el RNA (**ADARs**) catalizan la conversión de adenosina en inosina en segmentos de RNA de cadena doble, alterando el emparejamiento entre bases y las propiedades estructurales de los transcritos. Muchos pri-miRNAs y pre-miRNAs son diana de estas ADARs en diferentes momentos de su

procesamiento y las modificaciones pueden afectar a los cortes mediados por DROSHA y DICER, y también interferir en la exportación del pre-miRNA. Por ejemplo, la corrección selectiva inhibe el corte del miR-142 de humanos por parte de DROSHA y contribuye a su degradación por la nucleasa Tudor-SN, que tiene afinidad por fragmentos dsRNA que contienen pares de base inosina-uracilo (Scadden, 2005). Sin embargo, la corrección también puede favorecer el procesamiento por parte de DROSHA (Kawahara *et al.*, 2008). Estos efectos diferenciales en la corrección pueden ser la base de la expresión específica de tejido de algunos miRNAs. Resulta curioso que el *pri-mir-376a-2* pueda ser inhibido en *Drosophila melanogaster* incluso por una ADAR2 catalíticamente inactiva que se une al pri-miRNA e inhibe la actividad de DROSHA (Heale *et al.*, 2009). Como las ADARs interactúan con un amplio rango de pri-miRNAs, pueden influir en la acumulación de muchos miRNAs de una forma independiente de la corrección.

Por otro lado, la corrección del miRNA dentro de la región semilla puede tener un importante impacto en la especificidad por su diana (Heale *et al.*, 2009; Kawahara *et al.*, 2008). Por ejemplo, una simple conversión de una adenosina en una inosina en la región semilla en la secuencia del miR-376-5p hace que reconozca una diana en el mRNA de la sintetasa de fosforribosil-pirofosfato (PRPS1) que no existía para el miRNA no corregido. Mediante técnicas de secuenciación masiva se han identificado en cerebro de ratón, un tejido que tiene altos niveles de expresión de ADARs, 16 miRNAs maduros corregidos, 8 de ellos en la región semilla (Chiang *et al.*, 2010). Por lo tanto, los eventos de corrección pueden incrementar el número de dianas para los miRNAs.

Regulación a nivel de la función de los miRNAs. La ruta de los miRNAs también está extensamente controlada algunos pasos después de su biogénesis. Obviamente, los elementos más susceptibles de regulación son los componentes del núcleo del miRISC, tales como las proteínas AGO y GW182 (proteína que contiene numerosas repeticiones de los codones para el di-aminoácido glicina-triptófano), esenciales en el mecanismo de represión de la expresión génica mediado por miRNAs. No obstante, también existen docenas de proteínas que se encuentran implicadas en el control del efecto de los miRNAs, tanto de una forma positiva como negativa.

Regulación a nivel de las proteínas AGO.

En la mayoría de los organismos los grupos de proteínas AGO o GW182 juegan papeles importantes en la ruta de los miRNAs y presentan preferencia por grupos específicos de miRNAs. Así, estudios recientes han

3. Antecedentes

sugerido que el control de la función de un miRNA puede depender de las proteínas AGO que se seleccionen, aunque no existen evidencias similares para el caso de las proteínas GW182.

De las dos proteínas AGO de *D. melanogaster*, dAGO1 está dedicada principalmente a la ruta de los miRNAs, mientras que dAGO2, que tiene una actividad endonucleasa más potente, funciona en la ruta del RNAi. Algunos miRNAs, especialmente los originados desde horquillas con ramas casi perfectas o los que provienen de miRNAs*, son incorporados selectivamente a los complejos dAGO2 (Okamura *et al.*, 2009; Czech *et al.*, 2009; Ghildiyal *et al.*, 2010). Las consecuencias funcionales de esta selección no están todavía claras (Okamura *et al.*, 2009). Un estudio reciente ha demostrado que dAGO2 también puede actuar como represor traduccional, aunque esta inhibición se lleva a cabo por un mecanismo independiente de GW182 y distinto del utilizado por dAGO1 (Iwasaki *et al.*, 2009).

En contraste con *D. melanogaster*, las cuatro proteínas AGO de vertebrados parecen tener funciones similares en relación a los miRNAs, incluyendo AGO2, que tiene una actividad endonucleolítica por complementariedad perfecta con la diana en el RNA (Su *et al.*, 2009), sin tener preferencia por ninguna hebra específica del precursor (Azuma-Mukai *et al.*, 2008; Ender *et al.*, 2008; Hafner *et al.*, 2010). Sin embargo, hallazgos recientes apuntan a que las diferentes proteínas AGO de vertebrados podrían tener distintas funciones. Los distintos efectos de las proteínas AGO de mamíferos resultan evidentes con la observación de que AGOs individuales difieren en su capacidad para potenciar o reprimir la síntesis de proteínas cuando se encuentran unidas al mRNA. De esta forma, diferencias relativas en la abundancia de unas determinadas proteínas AGO pueden afectar a la fuerza de represión de un miRNA en un determinado tejido o célula (Wu *et al.*, 2008). Por ejemplo, la sobre-expresión individual de cada proteína AGO de una determinada familia favorece la acumulación de determinados miRNAs maduros en células HEK293 (Diederichs y Haber, 2007), lo que sugiere que la concentración de proteínas AGO en una célula es un factor determinante para la formación del miRISC. Dado que diferentes miRNAs pueden tener distinta capacidad para incorporarse al complejo miRISC, los cambios en la concentración celular de proteínas AGO pueden tener efectos, no sólo cuantitativos, sino también cualitativos en la unión de ciertos miRNAs al complejo miRISC.

Se han descrito varios mecanismos que regulan los niveles de AGO2 en las células de mamíferos, incluyendo la estabilización de AGO2 por la proteína chaperona de choque término 90 (HSP90, *heat shock protein 90*) (Tahbaz *et al.*, 2001; Johnston *et al.*, 2010), o la proteína TRIM-NHL que promueve la poliubiquitinación de AGO2 y su consecuente degradación, limitando así la capacidad del miRNA para silenciar (Rybak *et al.*, 2009).

Regulación a nivel de las proteínas GW182.

Las proteínas GW182, que interactúan con AGOs, y son requeridas para el silenciamiento mediado por miRNAs, juegan papeles muy importantes como efectores en la función represiva de miRISC, pero dado que su función ha sido reconocida recientemente, se sabe poco sobre su regulación. Existen tres proteínas GW182 en mamíferos, denominadas TNRC6A, TNRC6B y TNRC6C y una sola en *D. melanogaster* (dGW182). Las proteínas equivalentes en *C. elegans* son AIN-1 y AIN-2, que contienen repeticiones de glicina-triptófano (GW) pero carecen de otros dominios que son característicos de las proteínas GW182 de mamíferos e insectos (Eulalio *et al.*, 2009c). En mamíferos, las GW182 tienen múltiples sitios de comienzo de la transcripción, así como diferentes variantes originadas por *splicing* (Li *et al.*, 2008).

TNRC6A fue originalmente identificada como una proteína altamente fosforilada (Eystathiou *et al.*, 2002), aunque aun no se conocen las consecuencias de esta fosforilación. Los niveles de TNRC6A fluctúan durante el ciclo celular y se correlaciona con el número y el tamaño de cuerpos P (Yang *et al.*, 2004). Ya que la progresión del ciclo celular está asociada principalmente con eventos de fosforilación y desfosforilación, sería muy importante determinar si estas modificaciones de TNRC6A están ligadas al ciclo celular. La inhibición de la actividad HSP90 disminuye los niveles de TNRC6A (Johnston *et al.*, 2010), y también existen algunas evidencias de que TNRC6A está sometida a ubiquitinación (Gibbins *et al.*, 2009) y que algunas proteínas GW182 contienen dominios asociados a ubiquitina. Todas estas observaciones incrementan los interrogantes sobre la posible implicación de las proteínas modificadas en la función y estabilidad de las proteínas GW182, así como su interacción con otras proteínas.

Papel de otras proteínas.

Los componentes del núcleo de miRISC como AGO y GW182 interactúan con otros factores adicionales que son además requeridos para la función del miRNA o para su modulación. Aunque los papeles de algunos de estos factores en la represión de la traducción, la caída del mensajero o como componentes de los cuerpos P están bien documentados, el modo de acción de estas proteínas accesorias es aun desconocido. Algunos ejemplos los tenemos en las proteínas que interactúan con el miRISC y que pertenecen a la familia de las helicasas DExD/H RNA (por ejemplo, MOV10/Armitage, RHA y RCK/p54), que catalizan el desenrollamiento de los dúplex de RNA o la remodelación del RNA o de estructuras RNP (Hilbert *et al.*, 2009), actividades que son de vital importancia en el ensamblaje del miRISC y en la unión o disociación con sus mRNA diana. Por ejemplo, la RHA humana se une a AGO2, DICER y RBPs, y la Armitage de *D. melanogaster* facilita la incorporación de los pequeños RNAs al complejo RISC (Tomari *et al.*, 2004; Robb y Rana, 2007).

3. Antecedentes

Otro grupo de factores que atenúan o potencian el efecto de los miRNAs es el representado por las RBPs tales como RBM4, HuR, la proteína X frágil del retraso mental (FMRP) o DND1. Su asociación con los componentes del miRISC es, normalmente, dependiente de RNA, sugiriendo que no interactúa directamente con miRISC sino directamente con el mRNA diana.

Muchas otras proteínas que interactúan con el complejo miRISC también se encuentran implicadas en la modulación de la función del miRNA. Un cofactor imprevisto de miRISC es el receptor de importación nuclear 8 (IMP8), que se asocia a las 4 proteínas AGO humanas y se localiza en el núcleo y en los cuerpos P. Se requiere IMP8 para una eficiente unión de AGO a un amplio conjunto de mRNAs (Weinmann *et al.*, 2009); posiblemente actúa como una chaperona, facilitando la unión de miRISC a su mRNA diana.

Una de las primeras proteínas descritas que interactúa con AGO2 fue la HSP90 (Tahbaz *et al.*, 2001), que estabiliza las AGO recién sintetizadas, afecta a su localización y posiblemente a su función (Tahbaz *et al.*, 2001; Pare *et al.*, 2009; Johnston *et al.*, 2010). La inhibición de la actividad de HSP90 hace disminuir los niveles de proteína AGO y GW182 (Tahbaz *et al.*, 2001; Johnston *et al.*, 2010), dando como resultado una pérdida, microscópicamente visible, de cuerpos P en las células de mamíferos. Estas observaciones han sido recientemente complementadas con estudios *in vitro* que muestran como HSP90 facilita la incorporación de los pequeños dúplex de RNA a las proteínas AGO de mamíferos, moscas y plantas (Iwasaki *et al.*, 2010; Iki *et al.*, 2010).

Interacción entre miRISCs y RBPs.

Los efectos de los miRNAs pueden ser modulados por la unión de RBPs al mismo mRNA. Hay muchos ejemplos de RBPs que contrarrestan (DND1, HUR, apolipoproteína B) o facilitan (FMRP, PUF, HUR) la represión mediada por miRNAs. HUR es un miembro de la familia de proteínas de la visión anormal letal embrionaria (ELAV), que se transloca desde el núcleo al citoplasma en respuesta a estrés. Esto da lugar a la unión de elementos ricos en AU al extremo 3' UTR del mRNA de *CAT-1*, lo que evita la represión por miR-122 en células Huh7. El mRNA es liberado desde los cuerpos P y reclutado en polisomas para activar su traducción (Bhattacharyya *et al.*, 2006). Otras RBP, como DND1, antagonizan la represión de miR-430 respecto a los mRNAs de *NAOS1* y *TDRD7* al unirse a secuencias que se solapan con los sitios del miRNA. Puesto que DND1 se expresa en las células germinales primordiales, pero no en las somáticas, la represión de miR-430 resulta ser específica del tipo celular (Kedde *et al.*, 2007; Nolde *et al.*, 2007).

Las proteínas PUF representan las RBPs que colaboran con miRISCs. En *C. elegans*, PUF-9 actúa sinérgicamente con let-7 para regular la

represión de una diana compartida (Nolde *et al.*, 2007). Un estudio sistemático de la proteína PUF humana ha mostrado que hay sitios en los alrededores de miRNAs que están enriquecidos en elementos PUF (Galgano *et al.*, 2008). La misma RBP puede, dependiendo del mRNA o del contexto celular, prevenir o activar la represión del miRISC. Por ejemplo, a diferencia de la situación de *CAT-1/miR-122*, HUR y let-7 reprimen sinérgicamente la traducción del mRNA de *MYC* (Kim *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta que el número de diferentes RBPs y miRNAs expresados, por ejemplo en metazos, llega a varios cientos, las interacciones entre ellas y los extremos 3' UTR de los mRNAs puede constituir un mecanismo general de regulación. Así, no sólo las proteínas RBP pueden modular los efectos de miRISC, sino que también miRISC podría activar o reprimir la función de RBP, si compete por los sitios de unión, o bloquear la actividad RBP por unirse a ella.

En cuanto al efecto en la activación traduccional por miRNAs, diferentes estudios indican que los miRNAs no sólo actúan como represores si no que también pueden actuar como activadores de la traducción. Bajo condiciones de falta de nutrientes (o un general arresto del crecimiento, o en estadio G0), el complejo AGO-miRISC cambia de un papel represor de la traducción a uno activador. El cambio requiere de la proteína relacionada con el X-frágil (FXR1), un parálogo de FMRP (Vasudevan y Steitz, 2007; Vasudevan *et al.*, 2007).

Importancia de la localización intracelular. *La apropiada localización subcelular de una proteína o un RNP es esencial para su función y regulación.*

La compartimentación puede controlar el acceso a la unión de factores que actúen juntos o que temporalmente se segreguen de forma independiente al resto de ambiente celular. Se han hecho considerables esfuerzos para descifrar si los componentes del miRISC están asociados con una particular estructura celular o si la represión del miRNA puede ser regulada a este nivel. Así, en este contexto, se ha visto que los gránulos de estrés y cuerpos P pueden tener un potencial relevante en cuanto a la represión por miRNAs, refiriéndonos, en general, a ellos como cuerpos multivesiculares (MVBs).

Papel de los MVBs en la represión y secreción de miRNAs.

Recientes estudios han identificado MVBs en *D. melanogaster*, especializados en compartimentos endosomales tardíos, como orgánulos que contribuyen a la función del miRNA (Gibbings *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009). En su lumen, los MVBs acumulan vesículas, las cuales pueden

3. Antecedentes

ser llevadas a los lisosomas para su degradación o liberadas extracelularmente como exosomas. El bloqueo en la formación de los MVBs, por eliminación de factores de transporte necesarios para el complejo endosomal (ESCRT), inhibe el silenciamiento de los miRNAs, mientras que el bloqueo de la renovación de MVBs, por inactivación del gen del síndrome 4 Hermansky-Pudlak (*HSP4*), estimula la represión por parte de los miRNAs. Además, la eliminación de algunos factores ESCRT da lugar a un incremento en los niveles de proteína GW182 (Gibbings *et al.*, 2009) y a una carga incorrecta de los pequeños RNAs en el miRISC (Lee *et al.*, 2009), sugiriendo que para una eficiente formación del nuevo miRISC es necesaria una selectiva eliminación de GW182 desde el miRISC y su tránsito a MVBs. Estudios previos han descrito qué componentes del miRISC, como DICER y AGO2, se encuentran asociados con fracciones membranosas (Cikaluk *et al.*, 1999; Tahbaz *et al.*, 2001, 2004), y que las AGO2 de mamíferos fueron inicialmente asociadas con proteínas del aparato de Golgi o del retículo endoplasmático (Cikaluk *et al.*, 1999).

Compartimentación núcleo-citoplasma.

La represión por parte de los miRNAs se considera un evento citoplasmático, aunque se han encontrado considerables cantidades de AGO2 y miRNAs en el núcleo de diferentes líneas celulares de mamíferos (Meister *et al.*, 2004; Robb *et al.*, 2005; Rüdell *et al.*, 2008; Castanotto *et al.*, 2009), y las proteínas GW182, como TNRC6B, se han encontrado como transportadores entre el núcleo y el citoplasma (Till *et al.*, 2007). Actualmente no está claro si el transporte núcleo-citoplasma de los componentes del miRISC es importante para sus funciones citoplasmáticas, o si el miRISC tiene algunas dianas nucleares u otras funciones nucleares no relacionadas con los miRNAs. Hasta ahora, sólo se ha descrito en plantas que los miRNAs tengan un papel de silenciamiento transcripcional en el núcleo (Bao *et al.*, 2004; Khraiweh *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010c), aunque hay evidencias que indican que los miRNAs pueden jugar un papel similar en las células de mamíferos (Kim *et al.*, 2008).

Regulación de la degradación de los miRNAs. La regulación de los miRNAs a nivel de su biogénesis ha sido investigada en profundidad, no ocurriendo lo mismo con su degradación y renovación. En general se pensaba que los miRNAs eran moléculas altamente estables, y esto se apoyaba en diversos estudios donde la eliminación de la RNA polimerasa II o de enzimas del procesamiento de los miRNAs ponían de manifiesto que la vida media de los miRNAs, en líneas celulares u órganos como hígado o corazón, es de muchas horas o incluso días (van Rooij *et al.*, 2007; Gatfield *et al.*, 2009; Krol *et al.*, 2010a). Sin embargo, esta tasa

3.3. MicroRNAs

de renovación tan baja no es una característica general de los miRNAs, pues con frecuencia actúan en procesos transitorios de desarrollo o como activadores o atenuadores de ciertos procesos, y todo ello requiere una regulación rápida.

Se conocen varios ejemplos de renovación acelerada o regulada de los miRNAs. Por ejemplo, el miR-29b cae rápidamente en células en división y no en células en arresto mitótico (Hwang *et al.*, 2007). La caída acelerada depende de secuencias presentes en el extremo 3' de miR-29b pero no en su parólogo miR-29a. Al contrario que la mayoría de los miRNAs, la localización de miR-29b es nuclear. Esta localización está mediada por un motivo presente en su extremo 3', aunque la desestabilización no parece ser la causa de su importación al núcleo (Hwang *et al.*, 2007). Por otro lado, en diferentes tipos de neuronas encontramos una rápida y regulada caída de muchos miRNAs. En algunos casos esta caída responde a una adaptación a la oscuridad en la retina de los ratones (miR-204 y miR-211, y los miRNAs de la agrupación 183/96/182). Es sorprendente que esta rápida renovación (vida media de 1 hora) puede aplicarse a la mayoría, sino todos, los miRNAs expresados en las neuronas de la retina pero no a los que son expresados en las células de la glía. Los miRNAs miR-124, miR-128, miR-134 o miR-138 presentan una tasa similar de renovación en las neuronas de roedores diferenciadas desde las ESCs (Krol *et al.*, 2010a), en cultivos primarios de células neuronales humanas y en tejido cerebral *post-mortem* (Sethi y Lukiw, 2009). Cabe destacar que esta renovación en neuronas parece depender de su actividad, ya que el bloqueo de los potenciales de acción o de los receptores de glutamato evita la caída de los miRNAs, sugiriendo que el metabolismo activo de los miRNAs debe ser muy importante para la función neuronal (Krol *et al.*, 2010a). En especies de moluscos del género *Aplysia*, el tratamiento con serotonina disminuye rápidamente los niveles de miR-124 y miR-184 maduros, pero no de sus precursores, mediante un mecanismo dependiente de la señalización MAPK (Rajasehupathy *et al.*, 2009). Sin embargo, esta caída dependiente de la actividad no se puede aplicar a todos los miRNAs neuronales. Por ejemplo, el bloqueo de los receptores de glutamato no inhibe la renovación de miR-129 (Kocerha *et al.*, 2009; Wibrand *et al.*, 2010) o miR-132 (Krol *et al.*, 2010a) en el cerebro de roedores o cultivos neuronales, sino que, en realidad, la acelera.

La estabilidad de los miRNAs maduros puede regularse mediante la adición de residuos de adenosina o uracilo al extremo 3'. Se han identificado muchos miRNAs con este tipo de modificaciones usando técnicas de secuenciación exhaustiva. En células de hígado, la simple adición de una adenosina al extremo 3' de miR-122 por la polimerasa GLD-2 poliA protege contra la degradación exonucleolítica (Katoh *et al.*, 2009). En células humanas, la nucleotidil-transferasa Zcchc11 añade un uracilo a miR-26a, y esto elimina así su función represiva (Jones *et al.*,

3. Antecedentes

2009). En plantas, la metilación-2'-O del miRNA en el nucleótido terminal 3' es una modificación común que previene al miRNA de la uridilación y la consecuente degradación (Li *et al.*, 2005).

Recientemente se han hecho progresos en la identificación de las enzimas implicadas en la renovación de los miRNAs. La degradación de los miRNAs maduros en *A. thaliana* está mediada por una familia de exorribonucleasas, como SDN1, SDN2 y SDN3, que degradan pequeños RNAs (Ramachandran y Chen, 2008). Así, la inactivación de los genes *SND* da como resultado la estabilización de diferentes miRNAs. En *C. elegans* existe una enzima con polaridad opuesta a la de plantas, una exonucleasa 5'→3', XRN-2, que cataliza la degradación de los miRNAs maduros (Chatterjee y Grosshans, 2009). La degradación requiere que los miRNAs sean liberados del complejo miRISC para que el extremo 5' del miRNA sea accesible a la enzima. Así que la susceptibilidad del miRNA a la enzima depende de la disponibilidad de su diana, ya que la asociación del miRISC con el mRNA evita la degradación del miRNA (Chatterjee y Grosshans, 2009). Por lo tanto, en ausencia de dianas complementarias, el miRNA no es incorporado al miRISC y es degradado, haciendo que las proteínas AGO carguen otros nuevos miRNAs. En resumen, la tasa de renovación de los miRNAs es un paso importante en la regulación de su función, tal como que ocurre con los mRNAs.

Teniendo en cuenta el papel tan importante que tienen los miRNAs en el desarrollo, diferenciación celular y metabolismo, infección viral y oncogénesis deben existir sofisticados mecanismos de regulación de su biogénesis, función y catabolismo. En este sentido se han hecho grandes avances pero aún queda mucho por descubrir.

Mecanismo de acción de los miRNAs.

La función de los miRNAs está relacionada con la regulación de la expresión génica. El mecanismo de represión post-transcripcional por miRNAs es todavía una materia controvertida. Se han propuesto varias hipótesis sobre cómo actúan los miRNAs sobre sus genes diana. Una hipótesis consiste en que los miRNAs inhiben la traducción reprimiendo el inicio de la traducción. Otra hipótesis supone que actúan en un paso posterior a la iniciación de la traducción promoviendo la degradación del incipiente péptido (Jackson y Standart, 2007; Nilsen, 2007; Pillai *et al.*, 2007). Los estudios más recientes se decantan porque esta regulación ocurre por degradación de los mensajeros, ya que hay muchos estudios en los que se comprueba como los miRNAs disminuyen los niveles de RNA mensajero de sus genes diana (Guo *et al.*, 2010).

Inicialmente se propuso que *lin-4* inhibía la traducción del mRNA de *LIN-14* en *C. elegans* (Wightman *et al.*, 1993), pero los estudios

actuales sugieren que, si miRISC contiene un factor de reconocimiento de RNAs heterólogos, entonces facilitaría el reconocimiento y la inhibición específica del mRNA, a pesar de la falta de sitios de unión del miRNA (Telfer y Poethig, 1998). De hecho, hay estudios que indican que existen múltiples copias de sitios de unión de miRNAs en el extremo 3' UTR de los mRNAs de animales, y que estos miRNAs se unen mediante protuberancias y desajustes con respecto al emparejamiento de Watson-Crick (Pillai *et al.*, 2004). Así, el grado de complementariedad miRNA-mRNA es el principal determinante del mecanismo de regulación. Un alto grado de complementariedad permite la degradación, catalizada por AGO, de la secuencia diana del mRNA mediante un mecanismo de escisión del mRNA. En contraste, un desajuste central omite la degradación y facilita el mecanismo de represión de la traducción.

La mayoría de los miRNAs animales emparejan de forma imperfecta con secuencias diana en el extremo 3' UTR de los mRNAs, e inhiben la síntesis proteica por inhibición de la traducción o promueven la desadenilación del mRNA y su degradación. Para la actuación eficiente de un miRNA sobre un mRNA se requiere una región de emparejamiento de entre 2 a 8 nucleótidos de longitud, la llamada **región semilla** (Bartel, 2009). Las proteínas argonauta están directamente asociadas con los miRNAs y son componentes del núcleo del miRISC. En la mayoría de las especies existen múltiples homólogos de estas proteínas AGO: AGO1-AGO4 en mamíferos; dAGO1 y dAGO2 en moscas; ALG-1 (gen similar a AGO) y ALG-2 en *C. elegans*. Actualmente no se conocen los detalles del mecanismo de inhibición de la traducción mediado por miRNAs pero sí que difiere del mecanismo de desadenilación del mRNA (Chekulaeva y Filipowicz, 2009; Eulalio *et al.*, 2009c; Fabian *et al.*, 2010). La desadenilación del mensajero está mediada por la proteína GW182, otro de los componentes del núcleo del complejo miRISC, que interacciona aguas abajo con AGO. Así, mientras que parte del extremo amino terminal de GW182 interactúa con AGO (a través de las repeticiones de glicina-triptófano), parte del extremo carboxilo terminal interactúa con la proteína de unión a poliA citoplasmática (PABPC) y recluta las desadenilasas CCR4 y CAF1 (Eulalio *et al.*, 2009c; Fabian *et al.*, 2010). Las regiones de PABPC a las que se une GW182 también son reconocidas por otros muchos factores de transcripción, sugiriendo que estas interacciones son objeto de una sofisticada regulación (Fabian *et al.*, 2010).

Inhibición de la traducción. La traducción del mRNA requiere numerosos factores que implican el reclutamiento de las subunidades del ribosoma, que aseguran la iniciación en el codón de iniciación correcto, y una apropiada elongación y terminación. También se requiere que los

3. Antecedentes

mRNAs posean una estructura de caperuza en 5' y una cola de poliA en 3'. De hecho, los factores asociados con la caperuza en 5' y la cola de poliA en 3' interactúan entre sí: la proteína citoplasmática de unión a poliA (PABPC), se asocia a la cola poliA e interactúa con el factor eucariótico 4G de iniciación de la traducción (eIF4G), que se asocia con la caperuza a través de la interacción con la proteína de unión a la caperuza (eIF4E) (Derry *et al.*, 2006).

El modelo actual de traducción, que involucra al complejo eIF4F en la iniciación, incluye las subunidades eIF4A, eIF4E y eIF4G. El extremo 5' terminal del mRNA es reconocido por eIF4E y comienza el proceso de iniciación. El factor eIF3, también implicado en la iniciación, interactúa con eIF4G y contribuye al ensamblaje de la subunidad 40S del ribosoma en el extremo 5' del mRNA permitiendo la formación del complejo de pre-iniciación. El proceso de elongación se inicia por unión de la subunidad 60S del ribosoma al codón AUG del mRNA y al complejo de preiniciación. Los factores eIF4G y eIF3 interactúan también con la proteína PABP. La molécula de mRNA se vuelve circular como resultado de este proceso, viéndose por ello mejorada la eficiencia de la traducción. El inicio de la traducción en algunos mRNAs virales se produce a través de secuencias internas del ribosoma (IRES) (Carthew y Sontheimer, 2009).

El mecanismo exacto de inhibición de la traducción por el miRISC todavía no se conoce. No sabemos si esta represión ocurre a nivel traduccional o post-transcripcional. Sin embargo, hay datos que sugieren que los miRNAs animales interfieren con la función del complejo eIF4F y PABPC durante la traducción y/o la estabilización del mRNA.

Para comprobar si un miRNA inhibe la traducción por inhibición de la iniciación o de la elongación se usan dos tipos de análisis. En el primer caso, se usa la técnica de la centrifugación en gradiente de densidad, para determinar si los mRNAs están presentes en el complejo sistema mRNA-proteína (mRNP) (inhibición de la iniciación), o en forma de grandes polisomas (inhibición de la elongación). En el segundo caso se determina si los mRNAs inhibidos que contienen secuencias IRES son resistentes a la represión. Para probar esto algunos estudios apoyan la represión de la iniciación (Llave *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2003; Humphreys *et al.*, 2005; Carthew y Sontheimer, 2009), mientras que otros proporcionan evidencias de la inhibición post-iniciación (Seggerson *et al.*, 2002; Maroney *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2006). Sin embargo, ninguno de ambos criterios por separado son suficientes para explicar si el proceso es de represión de la iniciación o inhibición post-iniciación. Existen discrepancias que muestran que la represión puede ocurrir tanto en el paso de iniciación como en pasos más tardíos de la traducción.

Evidencias de la inhibición post-iniciación.

Los primeros estudios se hicieron en *C. elegans*, encontrándose que el miRNA lin-4 inhibe la traducción de los mensajeros de *LIN-14* y *LIN-28*, con pequeña o nula influencia en su abundancia (Olsen y Ambros, 1999; Seggerson *et al.*, 2002). Así aunque la expresión de la proteína quedó inhibida, los mRNAs de *LIN-14* y *LIN-28* se detectaron en polisomas, sugiriendo que la inhibición ocurre después de la iniciación de la traducción (Olsen y Ambros, 1999; Seggerson *et al.*, 2002), una idea que fue apoyada por algunos estudios posteriores en cultivos celulares (Pillai *et al.*, 2005; Maroney *et al.*, 2006; Nottrott *et al.*, 2006), donde se observaron los miRNAs y sus dianas asociados a polisomas.

Evidencias de la inhibición de la iniciación.

En 2006 se propuso un posible mecanismo por el que miRISC podía ejercer su acción mediante inhibición de la iniciación. Un mRNA inhibido puede asociarse con polisomas, pero cuando el proceso de iniciación es rápidamente bloqueado con hippuristanol, los ribosomas se individualizan rápidamente de una forma dependiente del miRNA. Basándose en estos resultados, se sugirió que miRISC promueve la disociación temprana de los mensajeros del ribosoma. Recientemente, se han propuesto tres modelos diferentes para explicar el mecanismo por el cual miRISC reprime el proceso de iniciación. El primero describe como miRISC compete con eIF4E para unirse al extremo 5' del mRNA, lo que conduce al fallo de la iniciación de la traducción (Thermann y Hentze, 2007; Mathonnet *et al.*, 2007). Sin embargo, algunos estudios contradicen este modelo y sugieren que GW182, o algún factor aguas abajo, podría ser el competidor de eIF4E (Eulalio *et al.*, 2008). El segundo modelo sugiere que miRISC impide que los mRNAs se circularicen, inhibiendo así la traducción (Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Giraldez *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Wakiyama *et al.*, 2007). El tercer modelo propone que miRISC puede inhibir el ensamblaje de la subunidad 60S del ribosoma al complejo de pre-iniciación 40S. En este proceso, los ribosomas 40S se unen al mensajero diana, pero la subunidad 60S falla en la unión a la subunidad 40S, resultando en una inhibición de la traducción (Chendrimada *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008).

Otro posible mecanismo de inhibición de la traducción mediada por miRNAs es que miRNA/RISC medie en la inhibición de la traducción a través de la acumulación de mRNAs diana en cuerpos P (Valencia-Sanchez *et al.*, 2006). Los cuerpos P han perdido la maquinaria de la traducción y, por lo tanto, aquellos que contienen mRNAs no pueden iniciar el proceso de traducción (Valencia-Sanchez *et al.*, 2006). La acumulación de mRNA de una manera dependiente de miRNA, sugiere que los miRNAs incrementan los ribosomas libres de mensajeros, a la vez que causan la represión de la traducción.

3. Antecedentes

Existen diferentes resultados que apoyan que los miRNAs inhiben la traducción a nivel de la iniciación. Por ejemplo, Pillai *et al.* (2005) mostraron ejemplos donde los miRNAs y sus mRNAs diana no co-sedimentan con la fracción polisomal en gradientes de sacarosa, sino que sedimentan en fracciones menos pesadas que contienen menos ribosomas o ribonucleoproteínas sin mRNAs. En estos y otros estudios, los mRNAs se traducen mediante mecanismos independientes de la caperuza (mediante secuencias IRES), no viéndose afectados por la represión por miRNAs. Lo que sugiere que los miRNAs inhiben la iniciación de la traducción que es dependiente de la caperuza (Humphreys *et al.*, 2005; Pillai *et al.*, 2005). Estudios posteriores de extractos libres de células de diversos orígenes han apoyado el papel de los miRNAs como inhibidores del inicio de la traducción (Wang *et al.*, 2006; Mathonnet *et al.*, 2007; Thermann y Hentze, 2007; Wakiyama *et al.*, 2007; Iwasaki *et al.*, 2009). Así los miRNAs inhiben a los mRNAs con caperuzas m7Gppp, pero no a los mRNAs que llevan una caperuza artificial, como Appp. Además, en extractos de células de ratón y humano, los miRNAs no silencian transcritos cuya traducción estaba mediada por secuencias IRES (Mathonnet *et al.*, 2007; Wakiyama *et al.*, 2007). De forma coherente con estos hallazgos, en extractos de células tumorales de ratón se consiguió eliminar el silenciamiento por miRNAs incrementando la concentración de eIF4F purificado (Mathonnet *et al.*, 2007). Estos y otros estudios argumentan que la maquinaria de silenciamiento de dianas con estructura de caperuza se produce interfiriendo con el complejo eIF4F. Así, todas estas evidencias sugieren que la inhibición de la traducción ocurre, predominantemente, en el paso de iniciación de la traducción.

Degradación del mRNA. Se ha mencionado anteriormente que cuando los miRNAs tienen un alto grado de complementariedad con el mRNA, la degradación de éste se ve facilitada por la actividad de escisión de la proteína AGO. El hecho de que la concentración de mRNAs se vean reducida por miRNAs, sugiere que estos son los responsables del proceso de degradación del mRNA (Bagga *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2005; Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Giraldez *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). Estudios recientes indican que no sólo AGO es responsable de la degradación del mRNA, sino que existen otros mecanismos implicados, tales como la desadenilación, la eliminación de la caperuza (*decapping*) y la digestión exonucleolítica del mRNA (Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Giraldez *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). Por tanto, la degradación del mRNA por miRNAs requiere AGO, GW182 y la maquinaria celular de desadenilación y de eliminación de la caperuza (Eulalio *et al.*, 2008). Aunque el proceso exacto por el que se selecciona alguno de éstos mecanismos se desconoce, se ha visto que el número, tipo y posición de los desajustes del dúplex miRNA-mRNA,

juegan un papel crítico en esta elección (Alemán *et al.*, 2007).

Las principales evidencias de que los miRNAs de animales pueden inducir la degradación de sus mRNAs diana viene de estudios de emparejamientos específicos mRNA-miRNA, y más concretamente, de estudios de transcriptomas que muestran una correlación inversa entre la abundancia de un miRNA y los niveles de su mRNA diana (Farh *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2005; Baek *et al.*, 2008; Selbach *et al.*, 2008; Hendrickson *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2010). Por ejemplo, si se introduce un miRNA específico en un cultivo celular, los transcritos que tiene sitios de unión complementarios al miRNA se reducen (Lim *et al.*, 2005; Baek *et al.*, 2008; Selbach *et al.*, 2008; Hendrickson *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2010). De modo inverso, cuando se elimina un miRNA de un cultivo celular, los transcritos que tienen diana para ese miRNA aumentan (Krützfeldt *et al.*, 2005; Baek *et al.*, 2008; Selbach *et al.*, 2008). Además, cuando se eliminan los componentes esenciales de la ruta de los miRNAs, como DICER, AGO o GW182 en cultivos celulares, se incrementa la abundancia de genes diana para miRNAs (Rehwinkel *et al.*, 2005, 2006; Schmitter *et al.*, 2006; Eulalio *et al.*, 2007, 2009b). Existen numerosos ejemplos en células en desarrollo y/o diferenciación que muestran perfiles de expresión inversos de miRNAs y de sus mRNAs diana (Stark *et al.*, 2005; Farh *et al.*, 2005). Por ejemplo, en el cigoto temprano del pez zebra (*Danio rerio*), un drástico incremento de la expresión del miR-430 se correlaciona con la degradación de un gran número de mRNAs maternos que contienen sitios de unión a miRNAs en sus extremos 3' UTR (Giraldez *et al.*, 2006; Mishima *et al.*, 2006). Conjuntamente, estos estudios proporcionan evidencias, en todo el genoma, de que la desestabilización de los mensajeros es un efecto generalizado de la regulación de los miRNAs.

En resumen, los requerimientos mínimos, en animales, para el silenciamiento de genes por degradación del mRNA mediado por miRNAs son:

- Proteína argonauta, AGO.
- Proteína que contiene repeticiones de trinucleótidos, GW182.
- Proteína citoplasmática de unión a poliA, PABPC.
- Componentes del principal complejo de desadenilasa, CAF1, CCR4, NOT.
- Enzima eliminadora de la caperuza (*decapping*), DCP2
- Activadores de la enzima *decapping*, RCK, como por ejemplo, DCP1, EDC4 y DDX6.

Huntzinger y Izaurralde (2011) han propuesto recientemente, en animales, un nuevo modelo de silenciamiento paso a paso (esquemático)

3. Antecedentes

en la figura 3.3) que comienza con el reconocimiento de la diana por un miRNA en un complejo con una proteína AGO. El mRNA se presenta como un bucle cerrado, que se forma por interacciones entre PABPC unido a la cola poliA en 3' y el factor de iniciación de la traducción eucariótico 4G (eIF4G) unido a la proteína de unión a la caperuza eIF4E (Derry *et al.*, 2006). Los miRNAs pueden realizar un corte endonucleolítico en las dianas que tienen una complementariedad perfecta (Yekta *et al.*, 2004), pero esto no suele suceder en células animales, donde lo más frecuente es que los miRNAs unidos a AGO reconozcan a sus mensajeros diana por un emparejamiento imperfecto en sus sitios de unión, normalmente localizados en el extremo 3' UTR de los mensajeros. AGO interactúa con GW182, que interactúa a su vez con PABPC unido a la cola de poliA del mRNA. La proteína GW182 contiene dos sitios de unión a PABPC: el motivo PAM2, que le confiere unión directa a PABPC por el dominio MLLÉ (Fabian *et al.*, 2009; Jinek *et al.*, 2010; Huntzinger *et al.*, 2010; Kozlov *et al.*, 2010), y una secuencia menos definida que comprende el segundo motivo y las regiones carboxilo terminal, que interactúa indirectamente con PABPC, a través de otras proteínas adicionales todavía desconocidas (Zekri *et al.*, 2009; Huntzinger *et al.*, 2010). El ensamblaje de este complejo sobre el mRNA dispara finalmente la desadenilación, aunque el mecanismo preciso permanece por determinar. Así, los miRNAs dirigen a sus dianas hacia la ruta celular de degradación de mRNA 5'-3' (Rehwinkel *et al.*, 2005; Giraldez *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Eulalio *et al.*, 2007, 2009b; Piao *et al.*, 2010), donde los mensajeros son desadenilados por el complejo desadenilasa CAF1-CCR4-NOT. Dependiendo del tipo celular y/o la especificidad de la diana, los mRNAs desadenilados se pueden almacenar en un estado de represn traduccional, como se observa en los extractos de células embrionarias (Wakiyama *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2010a; Fabian *et al.*, 2009; Iwasaki *et al.*, 2009). Los mRNAs desadenilados que no son almacenados continúan con el proceso de degradación donde el paso siguiente es el *decapping* por la enzima DCP2, que requiere co-factores adicionales para disponer de estabilidad y actividad plenas. Por ejemplo, en los metazoos se ha detectado DCP1, EDC4 (también conocido como GE1), PAT y la proteína RCK DEAD-box, existiendo controversia sobre si se inhibe la traducción antes de se produzca la desadenilación, o no. En cultivos de células animales, los mRNAs desadenilados se degradan rápidamente tras el *decapping* por medio del complejo citoplasmático de exonucleasas 5'-3', XRN1 (Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Eulalio *et al.*, 2007, 2009b; Piao *et al.*, 2010).

La desadenilación mediada por miRNAs se ha observado también en extractos celulares (Wakiyama *et al.*, 2007; Zdanowicz *et al.*, 2009; Iwasaki *et al.*, 2009; Fabian *et al.*, 2009). Sin embargo, mientras que en los cultivos celulares la desadenilación de los mRNAs está unida al *decapping* y a la degradación exonucleolítica 5'-3' (Bagga *et al.*, 2005; Behm-Ansmant

3.3. MicroRNAs

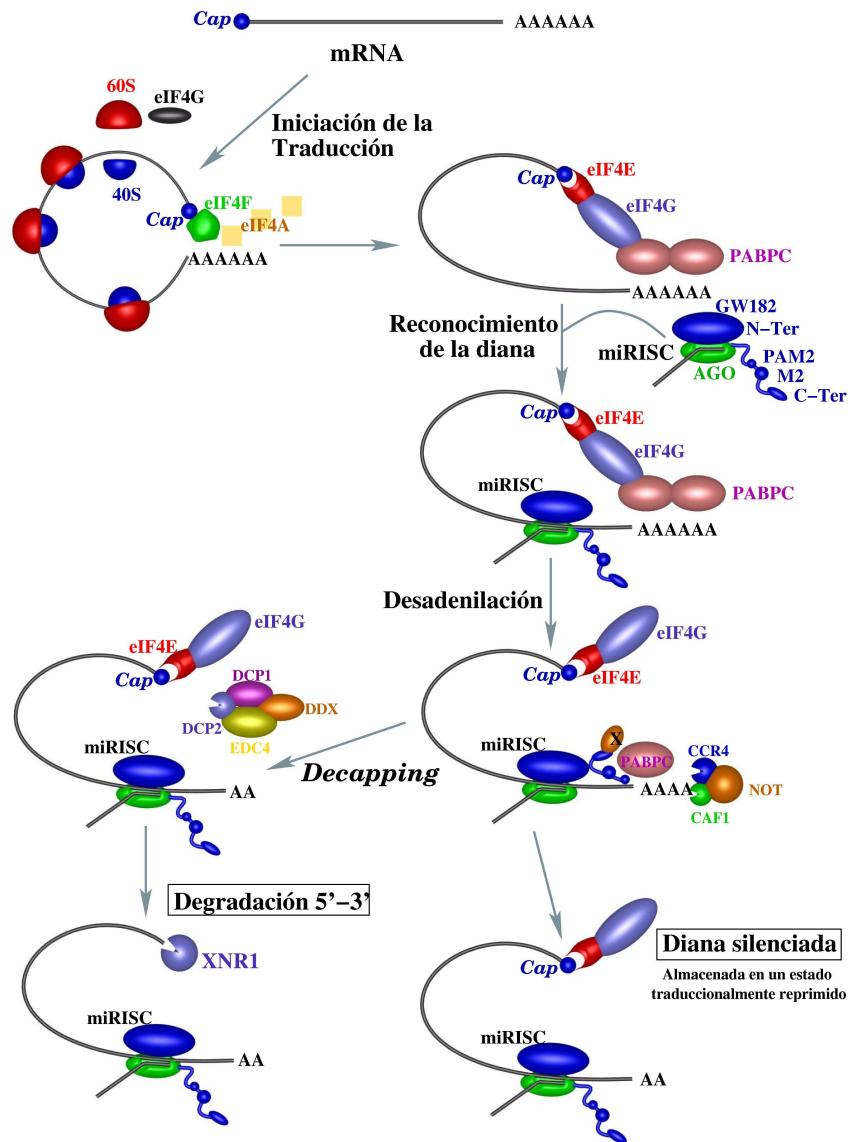


Figura 3.3: Mecanismo de acción de miRNAs propuesto por Huntzinger.

3. Antecedentes

et al., 2006; Wu *et al.*, 2006; Eulalio *et al.*, 2007, 2009b; Piao *et al.*, 2010), en los extractos los mRNAs desadenilados no son degradados, sino que permanecen desadenilados, en un estado transcripcionalmente reprimido. Estas observaciones proporcionan una nueva perspectiva a la cuestión de la inhibición de la traducción por los miRNAs. De hecho, como la desadenilación podría ser la única causa de la reducción de proteínas, se ha propuesto que los miRNAs causan primero la desadenilación en sus mRNAs diana, dejándolos incapacitados para unirse a PABPC, impidiendo que se circularicen y quedando silenciada su traducción (Wakiyama *et al.*, 2007). Sin embargo, existe un debate abierto en cuanto al orden de los eventos, porque la desadenilación se ha descrito tanto de forma previa (Iwasaki *et al.*, 2009; Wakiyama *et al.*, 2007) como posterior (Zdanowicz *et al.*, 2009; Fabian *et al.*, 2009) a la represión traduccional.

El papel que tienen los factores de degradación en la desestabilización de mRNAs mediada por miRNAs queda de manifiesto cuando la eliminación de los mismos da lugar a un aumento de mensajeros diana, y se obtiene el mismo efecto cuando se sobre-expresan las formas dominantes negativas de estos cofactores (Rehwinkel *et al.*, 2005; Ying Chu y Rana, 2006; Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Eulalio *et al.*, 2007, 2009b; Piao *et al.*, 2010). Por ejemplo, en células en las que se han eliminado los componentes del complejo CAF1-CCR4-NOT, muchos de los genes dianas de miRNAs aumentan su expresión (Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Eulalio *et al.*, 2009b). Esto apoya la idea de que la desadenilación es una consecuencia generalizada de la regulación de los miRNAs (Eulalio *et al.*, 2009b).

El papel que juega la eliminación de la caperuza es más difícil de demostrar, primero porque los factores de *decapping* son abundantes (Eulalio *et al.*, 2007), y segundo porque la eliminación de estos factores no restaura los niveles de proteína. Aunque sí es cierto que el bloqueo del *decapping* no impide la desadenilación de los mensajeros diana puesto que ésta precede al *decapping*, y estos mensajeros desadenilados no se traducen eficientemente, así que los niveles de proteína no se restauran completamente (Eulalio *et al.*, 2007). Sin embargo, el análisis del transcriptoma muestra que en células en las que se han eliminado los factores de *decapping*, los niveles de mRNAs, que tienen dianas predichas y validadas, se ven incrementados (Eulalio *et al.*, 2007).

Papel de las proteínas GW182 en el silenciamiento.

Las proteínas GW182 son esenciales para el silenciamiento mediado por miRNAs en células animales (Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Ding y Han, 2007; Eulalio *et al.*, 2008, 2009c; Rehwinkel *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007). En células en las que se han eliminado las proteínas GW182, los niveles de expresión de miRNAs o proteínas AGO no se ven afectados,

pero sí el silenciamiento mediado por miRNAs, indicando que las AGOs no pueden disparar por sí solas el silenciamiento de dianas parcialmente complementarias (Eulalio *et al.*, 2008). Así, las proteínas GW182 actúan como efectores en pasos del silenciamiento, aguas abajo de AGOs. Por lo tanto el estudio de las proteínas GW182 es de crucial importancia para comprender el mecanismo de silenciamiento en animales.

Las proteínas GW182 fueron identificadas en búsquedas genéticas realizadas en *C. elegans*, búsquedas de RNAi en *Drosophila melanogaster* y mediante purificación bioquímica de complejos AGO (Ding *et al.*, 2005; Rehwinkel *et al.*, 2005; Meister *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Jakymiw *et al.*, 2005; Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Eulalio *et al.*, 2008). Como se ha indicado anteriormente, las proteínas GW182 tienen múltiples repeticiones de glicina-triptófano (repeticiones GW) en su dominio amino-terminal, y éstas son necesarias para el silenciamiento porque le confieren capacidad de unión a las proteínas AGO (Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Till *et al.*, 2007; Eulalio *et al.*, 2009a; Lian *et al.*, 2009; Lazzaretti *et al.*, 2009). Las regiones media y carboxilo-terminal definen el dominio bipartito de silenciamiento (SD), que también es necesario para el silenciamiento (Zipprich *et al.*, 2009; Eulalio *et al.*, 2009c; Lazzaretti *et al.*, 2009; Eulalio *et al.*, 2009a; Tritschler *et al.*, 2010). Si estos dominios de silenciamiento se unen artificialmente a un mRNA y a un gen chivato, éste es silenciado (Chekulaeva *et al.*, 2009; Lazzaretti *et al.*, 2009; Zipprich *et al.*, 2009). Al igual que en ensayos para toda la longitud de las proteínas GW182, los dominios de silenciamiento inducen la unión de mRNAs, y éstos serán reprimidos traduccionalmente y degradados (Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Eulalio *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Chekulaeva *et al.*, 2009; Lazzaretti *et al.*, 2009; Eulalio *et al.*, 2009a; Zipprich *et al.*, 2009). Dado que los dominios de silenciamiento no interaccionan con AGOs, la conclusión es que estos dominios tienen actividad de silenciamiento autónoma (Eulalio *et al.*, 2009c; Lazzaretti *et al.*, 2009; Zipprich *et al.*, 2009; Eulalio *et al.*, 2009a; Tritschler *et al.*, 2010). En este contexto es importante mencionar que el dominio N-terminal de GW182 en *D. melanogaster* muestra actividad de silenciamiento, evidenciada por experimentos con genes chivatos, cuando se une a un mensajero, y puede complementar al silenciamiento de una pareja específica diana-miRNA, sugiriendo que este dominio puede inducir la formación de complejos de silenciamiento en contextos 3'UTR específicos (Chekulaeva *et al.*, 2009). Sin embargo, los dominios N-terminal de GW182 no son suficientes para silenciar la mayoría de los miRNAs probados, indicando que la actividad de silenciamiento de GW182 en *D. melanogaster* reside principalmente en el dominio de silenciamiento C-terminal.

Varios estudios han proporcionado las claves necesarias para vislumbrar la forma en que los dominios bipartitos SDs llevan a cabo el silenciamiento, revelando que estos dominios interaccionan con PABPC (Fabi-

3. Antecedentes

an *et al.*, 2009; Zekri *et al.*, 2009). Tres evidencias sugieren que esta interacción es la responsable del silenciamiento. Primero, tanto en *D. melanogaster* como en células humanas, la sobre-expresión de PABPC reprime el silenciamiento (Zekri *et al.*, 2009; Walters *et al.*, 2010). Segundo, la eliminación de PABPC en extractos de células suprime la desadenilación mediada por miRNAs (Fabian *et al.*, 2009). Y tercero, las proteínas mutantes para el dominio de interacción con PABPC quedan incapacitadas para el silenciamiento (Huntzinger *et al.*, 2010).

PABPC tiene 4 dominios N-terminal de reconocimiento de RNA (RRM1-4), una unión rica en prolina y un dominio C-terminal denominado PABC o MLLE. El MLLE reconoce motivos PAM2 (motivo 2 de interacción con PABPC), los cuales están presentes en varias proteínas implicadas en la traducción o el degradación del mRNA. El motivo PAM2 fue el primero identificado en las proteínas reguladoras de la traducción, PAIP1 y PAIP2 (proteína 1 y 2 de interacción con PABP) (Derry *et al.*, 2006; Kozlov *et al.*, 2010). Estas proteínas contienen, además, un motivo PAM1 que interacciona con los RRM de PABPC (Derry *et al.*, 2006).

Es sorprendente que las proteínas GW182 contengan dos sitios de unión a PABPC, al igual que PAIP1 y PAIP2 (Derry *et al.*, 2006; Huntzinger *et al.*, 2010). Estos sitios de unión están situados en los SDs. El primero de estos sitios de unión es un motivo PAM2 que interacciona directamente con el dominio C-terminal MLLE de PABPC (Fabian *et al.*, 2009; Huntzinger *et al.*, 2010; Jinek *et al.*, 2010; Kozlov *et al.*, 2010); el segundo es un sitio menos definido, asignado como el M2 en la región C-terminal del SDs (Zekri *et al.*, 2009; Huntzinger *et al.*, 2010) media la unión indirecta a RRM de PABPC (Huntzinger *et al.*, 2010). Sin embargo, aunque ambos, PAIP1 y PAIP2 contienen motivos PAM1 y PAM2 e interaccionan con PABPC de forma similar, afectan a la traducción de una forma opuesta: PAIP1 estimula la traducción, mientras que PAIP2 la inhibe (Derry *et al.*, 2006). Actualmente parece que está claro que las proteínas GW182 tienen más probablemente una función similar a PAIP2 e interfieren con la función de PABPC durante la traducción y/o con la estabilización del mRNA.

Sabemos que GW182 interfiere con la función de PABPC por analogía con PAIP2. Las proteínas GW182 pueden competir con eIF4G para unirse a PABPC (Fabian *et al.*, 2009; Zekri *et al.*, 2009), evitar la circularización del mRNA y, consecuentemente, inhibir la traducción. Además, un mRNA con conformación abierta queda más expuesto a las enzimas de degradación de mRNAs. Alternativamente, la interacción PABPC-GW182 podría contribuir al silenciamiento por reducir la afinidad de PABPC a la cola poliA (Derry *et al.*, 2006), lo que podría exponer a la cola de poliA a las desadenilasas e interferir indirectamente con la circularización del mRNA. Sin embargo, todavía no se conoce si GW182 puede reducir la afinidad de PABPC por la cola poliA.

Algunas proteínas de unión a PABPC no afectan a su función sino que usan a PABPC como una plataforma de unión a los mRNAs. De forma análoga, los complejos GW182-PABPC podrían proporcionar una plataforma para interacciones adicionales requeridas para el silenciamiento, como interacciones con el complejo desadenilasa CAF1-CCR4-NOT1. De hecho, Fabian *et al.* (2009) mostraron que PABPC es necesario para la desadenilación de las dianas de miRNAs *in vitro*. Además, la interacción GW182-PABPC puede contribuir al silenciamiento a través de múltiples mecanismos.

Una cuestión importante que queda abierta consiste en determinar si la traducción está inhibida antes de la desadenilación, o si hay un evento inicial de disparo que hace que la diana quede más accesible a las enzimas de degradación e interfiera simultáneamente con la traducción. Por ejemplo, aunque la idea es completamente especulativa, los miRNAs podrían promover la disociación de PABPC desde la cola poliA o los componentes de eIF4F desde la estructura de la caperuza. En tales casos, tanto la inhibición traduccional como la degradación de los mRNAs serían una consecuencia de este efecto primario, y si ocurre o no la desadenilación primero dependería de la propia tasa de desadenilación. Si se confirma esta hipótesis, resolvería la aparente dicotomía entre la inhibición de la traducción y la degradación de los mRNAs porque ambos modos de regulación serían una consecuencia común de un mismo evento inicial de activación del proceso (Huntzinger y Izaurralde, 2011).

Inhibición de la traducción vs degradación del mensajero. Como hemos visto, existen muchos indicios de que los miRNAs reprimen la traducción de sus mRNAs diana y esto dispara la degradación del mensajero, aunque no está claro, hasta el momento, cual es el mecanismo exacto por el que esto ocurre. Mientras que los niveles de mensajero se pueden analizar fácilmente, no ocurre lo mismo con los niveles de proteínas. No obstante, actualmente se han desarrollado diferentes métodos de proteómica que, en combinación con los métodos de cuantificación de mRNA, han proporcionado importantes evidencias en favor de que la degradación de los mensajeros diana es el modo de regulación predominante por miRNAs en cultivos celulares de mamíferos.

La técnica de espectrometría de masas cuantitativa permite medir el nivel de proteína modificado por la presencia de miRNAs, con respecto al nivel proteómico normal. El objetivo de este estudio es averiguar qué grado de silenciamiento es causado por la inhibición de la traducción frente a la degradación del mRNA. Para esto, se utilizaron cultivos celulares donde se transfectaron con miRNAs o se eliminaron miRNAs y entonces se midieron en paralelo los niveles de proteína y mRNA

3. Antecedentes

(Baek *et al.*, 2008; Selbach *et al.*, 2008). Con estos estudios se llegó a una importante conclusión: los miRNAs inhiben sólo modestamente la producción de proteína, reduciendo los niveles de proteína como mucho en cuatro veces.

Sin embargo, otros estudios no están de acuerdo con que la fracción de dianas es regulada sólo a nivel traduccional. Selbach *et al.* (2008) encontraron que en un momento temprano del experimento (8 horas después de la transfección con un miRNA), la mayoría de las dianas fueron reguladas sólo a nivel de proteína, pero más adelante en el tiempo (32 horas), los niveles de proteína y mensajero se correlacionaban. Baek *et al.* (2008) analizaron los niveles de proteína y mensajero en neutrófilos de ratón aislados de ratones *knockout* para el gen de miR-223 en comparación a ratones normales. En este caso, los niveles de proteína y mensajero se correlacionaron perfectamente. Por tanto, en la mayoría de los casos se observa una disminución efectiva de los niveles de mensajero, y sólo una pequeña fracción de dianas fueron inhibidas sólo a nivel traduccional, sin cambios detectables en la abundancia de mRNAs. Además, esta rara clase de dianas tiene un modesto nivel de regulación. Estudios posteriores han proporcionado fuertes evidencias de que la degradación de sus mRNAs dianas es el principal efecto del silenciamiento mediado por miRNAs en animales, apoyando también la idea de que la inhibición de la traducción ocurre principalmente en el momento de la iniciación. En uno de estos estudios, se midieron los niveles de mRNA y la tasa de traducción en células de riñón de embrión humano (HEK-293) transfectadas con miR-124 (Hendrickson *et al.*, 2009). Se identificaron 600 transcritos que, en respuesta a la transfección de miR-124, co-inmunoprecipitaban con AGOs. Comparando la abundancia de mRNA y la tasa de traducción se vio que la degradación de mRNAs representaba el 75 % de los cambios observados en la síntesis de proteína, sin tener en cuenta la magnitud de la regulación. Además, en este estudio no se encontraron evidencias de que las dianas estuvieran reguladas exclusivamente a nivel de la traducción.

Recientemente, Guo *et al.* (2010) investigaron además el efecto que tiene la inhibición de la traducción, en el silenciamiento de dianas por miRNAs, usando el perfil ribosómico. De acuerdo con lo observado en estudios anteriores, encontraron que los miRNAs provocan una caída en los niveles de mRNA, lo que explica la mayoría de la reducción en la producción de proteína y que la fracción de mRNA que no se degradó fue traducida con menos eficiencia. Estos resultados no cambiaron cuando los análisis se hicieron en un momento más temprano (12 horas) en lugar de a las 32 horas después de la transfección del miRNA, sugiriendo que si la inhibición de la traducción ocurre antes de la degradación, la desestabilización del mRNA debe ocurrir inmediatamente después. Por lo tanto, independientemente de si la desestabilización ocurre antes

o inmediatamente después del bloqueo de la traducción, la principal contribución es una reducción de los niveles de proteína.

El tema común emergente de estos estudios es que la rápida degradación del mRNA puede explicar una gran fracción de la regulación por miRNAs en cultivos de células animales, si bien aún no está claro si la degradación ocurre como una consecuencia del bloqueo inicial de la traducción. Sin embargo, en este caso, el bloqueo es más probable que ocurra en el momento de la iniciación en lugar de en estadios posteriores de la traducción.

Mecanismos de silenciamiento: nuevas perspectivas y nuevos interrogantes.

Como hemos mencionado anteriormente queda una importante cuestión sin resolver que es si la degradación de dianas ocurre como una consecuencia del bloqueo inicial de la traducción. Muchas evidencias sugieren que la desadenilación y la posterior degradación no están acopladas a una traducción activa. De hecho, la degradación de mensajeros dependiente del miRNA se ha visto incluso cuando no se produce la traducción de los mRNAs con dianas de miRNAs. Por ejemplo, los genes diana chivatos para miRNAs que eran pobremente traducidos por formar fuertes estructuras en bucle en el 5' UTR, fueron desadenilados de todos modos y degradados de una manera dependiente del miRNA (Wu *et al.*, 2006; Eulalio *et al.*, 2009b); esto indica que la degradación ocurre incluso cuando el mRNA con la diana no se traduce. Además, en los embriones de pez cebra y en extractos de células humanas, los mRNAs con dianas de miRNAs son desadenilados en lugar de adoptar una estructura defectuosa en la caperuza (*Appp-cap*) que dificulta la traducción (Mishima *et al.*, 2006; Wakiyama *et al.*, 2007). De acuerdo con esto, la desadenilación mediada por miRNAs se puede observar en ausencia de traducción (por ejemplo, en presencia de cycloheximida o hippuristanol) (Wakiyama *et al.*, 2007; Eulalio *et al.*, 2009b; Fabian *et al.*, 2009). Todos estos resultados indican que los miRNAs disparan la desadenilación y degradación independientemente del estado de traducción de sus mRNA diana.

No obstante, no está claro si el silenciamiento de dianas poliadeniladas puede ser atribuido completamente a desadenilación o si existen otros mecanismos adicionales que reprimen la producción de proteína. Por ejemplo, en algunos extractos celulares, la inhibición de la traducción precede a la desadenilación (Fabian *et al.*, 2009; Zdanowicz *et al.*, 2009), aunque otros estudios muestran evidencias de lo contrario (Wakiyama *et al.*, 2007; Beilharz *et al.*, 2009; Iwasaki *et al.*, 2009). Otros hallazgos sugieren que podría existir un mecanismo adicional de inhibición de la traducción, en el cual se sustituye la cola poliA por una histona con estructura en bucle en el mRNA o por una ribozima de auto-corte, y también

3. Antecedentes

serían reprimidos de una forma dependiente del miRNA (aunque de una manera menos eficiente que su homólogo poliladenilado) (Wu *et al.*, 2006; Eulalio *et al.*, 2008, 2009b). Esto indica que, aunque la desadenilación contribuye y consolida el silenciamiento de mRNAs poliadenilados, no es absolutamente imprescindible para el establecimiento del silenciamiento.

3.3.2. Implicación de los microRNAs en los procesos biológicos

La regulación de la expresión génica a nivel transcripcional juega un papel central en la definición del destino celular y el control de la formación de los órganos aunque, como ya se ha mencionado anteriormente, cada vez está siendo más reconocida la importancia de la regulación génica post-transcripcional. En este sentido, los miRNAs confieren un nuevo nivel de control post-transcripcional, ampliamente reconocido en plantas y animales. Los miRNAs fueron inicialmente descritos como interruptores del desarrollo, inhibiendo varios genes diana. Sin embargo, los nuevos puntos de vista con respecto a los miRNAs animales están cambiando desde la regulación de unos cuantos genes dianas a un cuadro mucho más complejo. Así, de la misma forma que un solo miRNA puede regular muchos genes (Lewis *et al.*, 2003; Brennecke *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2005; Krek *et al.*, 2005; Grün *et al.*, 2005), algunos genes evitan la regulación de los miRNAs con extremos UTR especialmente cortos con un número reducido, o prácticamente desprovistos de dianas para miRNAs (Stark *et al.*, 2005), lo que complica aún más esta entramada red de regulación génica.

La importancia biológica de la función de los miRNAs queda de manifiesto por su implicación en los perfiles específicos de mRNAs y proteínas de una célula (Stark *et al.*, 2005). Esto lo logran proporcionando redes moleculares alternativas que pueden contribuir a la abundancia de mRNAs y producción de proteínas. Con respecto a la embriogénesis, las funciones de los miRNAs están estratégicamente implicadas en el destino celular. Esto queda de manifiesto por la especificidad de tejido de muchos miRNAs, y es además apoyado por el hecho de que los genes asociados con determinados términos GO (*gene ontology*), que hacen referencia a su función, son específicos de tejido y tienen enriquecidos sus extremos 3' UTR en sitios de unión a miRNAs. Por el contrario, los genes asociados con términos GO no específicos de tejido carecen de sitios de unión complementaria a miRNAs en sus extremos 3' UTR (Zhao *et al.*, 2007b; Kawahara *et al.*, 2007; Beuvink *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007b).

El hecho de que los miRNAs tengan papeles muy importantes en los distintos procesos biológicos en mamíferos nos proporciona una herramienta clave y poderosa en la regulación génica, además de tener un gran potencial como una nueva clase de dianas terapéuticas. Los miRNAs

3.3. MicroRNAs

tienen papeles evolutivamente muy conservados en desarrollo y diversas funciones biológicas en animales. Muestran frecuentemente una complementariedad limitada con sus mRNAs diana, pero ésta es suficiente para regular diferentes procesos biológicos, reprimiendo preferentemente a sus genes diana (Kato y Slack, 2008). Los dos primeros mutantes de pérdida de función se produjeron en *C. elegans* para los miRNAs lin-4 y let-7, causando defectos en el desarrollo de las larvas (Lee *et al.*, 1993; Reinhart *et al.*, 2000). Se ha sugerido que lin-4 regula los estadios tempranos del desarrollo, mientras que let-7 juega un importante papel en los procesos tardíos de desarrollo en *C. elegans* y probablemente en algunos otros animales (Lin *et al.*, 2003; Boehm y Slack, 2005). Tenemos otro ejemplo en *D. melanogaster*, donde se sobre-expresaron dos miRNAs, bantam y miR-14, y se comprobó que bantam inducía el crecimiento e inhibía la apoptosis (Nolo *et al.*, 2006). Por otro lado, se sabe que miR-14 suprime la muerte celular y está implicado en el metabolismo de las grasas por actuar sobre la convertasa IL1-beta de *D. melanogaster*, que está aumentada en ausencia de miR-14 (Xu *et al.*, 2003).

Mediante la producción de organismos *knockout* se ha identificado el papel de muchos miRNAs en procesos de desarrollo en mamíferos. En el pez cebra se produjo un mutante para *DICER* (Wienholds *et al.*, 2003) que reveló el papel de los miembros de la familia de miR-430, que se expresan a altos niveles en el cigoto durante la neurogénesis. También se observó la expresión de miR-430 en procesos tempranos del desarrollo en ranas (Watanabe *et al.*, 2005; Giraldez *et al.*, 2005). Por otro lado, estudios recientes han mostrado que los estadios tardíos del desarrollo de ratón están controlados por miRNAs, lo que está apoyado por la regulación de genes *Hox* por parte del miR-196. Este miRNA se expresa en las extremidades posteriores, degrada su diana *Hoxa B8* e inhibe la traducción de *Hoxc8*, *Hoxd8* y *Hoxa7* (Yekta *et al.*, 2004; Hornstein *et al.*, 2005). Además, miR-196 actúa aguas arriba de *Hox B8* y Sonic hedgehog (*Shh*) en las extremidades en desarrollo (Hornstein *et al.*, 2005). El miRNA específico de músculo, miR-1, tiene dianas en la proteína 2 expresada en derivados de la cresta neural y el corazón (*HAND2*, *heart and neural crest derivatives-expressed protein 2*), lo que lleva a la degeneración del músculo y la diferenciación prematura de los cardiomiocitos (Zhao *et al.*, 2005). Por otro lado, miR-181 se expresa en los linfocitos B de la médula ósea y timo de ratón, causando un incremento en linfocitos B y regulando la diferenciación del linaje hematopoyético (Chen *et al.*, 2004). De forma similar, se ha descrito la expresión de miR-143 en tejidos grasos humanos y se ha comprobado que regula la diferenciación de la grasa incrementando los niveles de la señal extracelular regulada por kinasa-5 (*ERK5*, *extracellular signal-regulated kinase-5*) (Esau *et al.*, 2004). Además *ERK5* tiene una diana potencial para miR-143 (Lewis *et al.*, 2003), lo que demuestra la participación de

3. Antecedentes

miR-143 en la diferenciación de los adipocitos debido a la regulación de los niveles de proteína ERK5. Otro ejemplo lo encontramos en el miR-375, que se expresa en los islotes pancreáticos e inhibe la secreción de insulina inducida por glucosa a través de la regulación de su gen diana, *Myotrophin*, indicando que miR-375 es un inhibidor de la secreción de insulina estimulada por glucosa (Poy *et al.*, 2004). También se ha visto que miR-375 es expresado en niveles altos en la glándula pituitaria de los embriones de pez cebra, mostrando un papel para miR-375 en la secreción de hormonas (Wienholds *et al.*, 2005).

Basándose en estas y otras muchas evidencias se puede concluir que los miRNAs controlan procesos biológicos importantes en animales, destacando su implicación en el desarrollo embrionario y en ciertas enfermedades, principalmente en cáncer.

Evolución de la región 3' UTR y de los miRNAs

El impacto generalizado de los miRNAs animales sobre muchos genes radica en la flexibilidad del sitio de reconocimiento de su diana, donde una pequeña región semilla de 7 nucleótidos puede ejercer una potente regulación (Brennecke *et al.*, 2003; Doench y Sharp, 2004). De hecho, los niveles de muchos RNAs cambian cuando se introducen siRNAs o miRNAs en células animales (Jackson *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2005). Es de suponer que los sitios funcionales habrán ido apareciendo frecuentemente durante la evolución, y los datos sugieren que tanto los genes codificantes como los miRNAs han estado sujetos a un proceso de selección que ha conducido al perfeccionamiento de este sistema de regulación génica.

Por otro lado, existen muchos genes que podrían estar sometidos a presión selectiva para evitar la regulación mediante miRNAs. La existencia de tales genes anti-diana ha sido propuesta por varios modelos teóricos (Bartel, 2004). Estas anti-dianas están implicadas en procesos básicos y comunes a todas las células, mientras que las verdaderas dianas son las que están implicadas, principalmente, en procesos de desarrollo. Este tipo de genes con anti-dianas son co-expresados con determinados miRNAs y evitan la regulación por parte de ellos, mientras que los genes con dianas predichas presetan patrones de expresión inversos con respecto a sus miRNAs específicos. Cuando se considera un contexto determinado espacial y temporal del desarrollo, la relación de expresión entre miRNA, diana y anti-diana sugiere que los miRNAs confieren precisión a los programas de expresión de genes. Los hallazgos indican que los miRNAs han tenido un profundo impacto en la evolución de los extremos 3' UTR, lo que queda reflejado en los patrones observados de sitios de unión a miRNAs enriquecidos o anulados (Stark *et al.*, 2005).

Se ha encontrado que la selección actúa en ambos sentidos, limitando la longitud del extremo 3' UTR y eliminando específicamente los sitios

complementarios para miRNAs. Recíprocamente, la longitud del 3' UTR y la densidad de sitios incrementa con el número de sitios de unión de miRNAs. Esto sugiere que los miRNAs han tenido un profundo impacto en la evolución de la región 3' UTR. Cabe destacar que aproximadamente el 50 % de los sitios para miRNAs en 3' UTR que se encuentran conservados son complementarios a miRNAs ya conocidos (Xie *et al.*, 2005).

Los microRNAs en el desarrollo embrionario

Dado el importante papel de los miRNAs en la regulación génica, éstos también tienen papeles cruciales en el desarrollo, incluyendo su implicación en la embriogénesis temprana de los mamíferos. En este proceso, los primeros eventos de diferenciación en la embriogénesis son la segregación del trofoctodermo y la masa celular interna en el blastocisto. Estudios recientes han revelado que los perfiles de expresión de miRNAs se encuentran sometidos a cambios dinámicos durante la preimplantación del embrión, aunque existen discrepancias en estos perfiles en función de la metodología usada (Tang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Viswanathan *et al.*, 2009a). La importancia de los miRNAs en la preimplantación de los embriones está apoyada por los experimentos de *knockout* de *Dicer*. La pérdida de DICER en estos ratones supone la muerte del embrión antes de los 7.5 dpc, con una pérdida detectable de células madre (Bernstein *et al.*, 2003).

Por tanto, los miRNAs también son importantes para la diferenciación de las células madre. Las células madre mutantes para *Dicer* tienen una proliferación limitada y una deficiente diferenciación (Murchison *et al.*, 2005; Kanellopoulou *et al.*, 2005). Sin embargo, como la pérdida de DICER afecta a la generación de miRNAs y del RNAi, no está claro qué vía es la responsable del fallo en las células madre. Para averiguar el papel específico de los miRNAs en las células madre se eliminó DGCR8, proteína que ayudaba a DROSHA en el procesamiento de los miRNAs. En este caso, las células madre expresaron algunos marcadores de diferenciación, aunque los marcadores de pluripotencialidad no fueron totalmente reprimidos, confirmando el papel crucial de los miRNAs en la diferenciación de las células madre (Wang *et al.*, 2007a). Por otro lado, para evaluar la importancia funcional de los miRNAs y DICER, *Dicer* fue bloqueado condicionalmente en oocitos en crecimiento, dando lugar a defectos en la organización del huso acromático y en el alineamiento de los cromosomas en el oocito maduro (Murchison *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2007). Cuando se fecundaron oocitos mutantes para DICER con esperma normal, los cigotos resultantes fallaron en la primera división celular (Tang *et al.*, 2007). Por otra parte, la eliminación de AGO2, estabiliza a un conjunto de RNAs maternos y reduce transcritos en el cigoto de otro

3. Antecedentes

conjunto de genes, dando lugar a embriones que detienen su desarrollo en el estadio de dos células (Lykke-Andersen *et al.*, 2008). Estos datos suponen que los miRNAs y/o siRNAs del oocito son esenciales para los estadios tempranos de la embriogénesis. No obstante, son necesarios más estudios para determinar el efecto específico de los miRNAs y siRNAs.

Considerando esta destacada implicación de los miRNAs en la embriogénesis, se han llevado a cabo estudios para dilucidar la función de miRNAs concretos. Se ha encontrado un grupo de miRNAs específicamente expresados en células madre indiferenciadas, lo que implica un papel de mantenimiento de la pluripotencialidad. Por el contrario, otro conjunto de miRNAs están sobre-expresados en las células madre en diferenciación, un indicio de sus funciones como promotores de la diferenciación (Houbaviy *et al.*, 2003). Entre los miRNAs específicos de células madre, tiene particular interés el cluster miR-290. Su expresión comienza en el estadio de cuatro células y aumenta constantemente a lo largo del estadio de blastocisto, sugiriendo un papel crítico de este cluster en el desarrollo temprano (Viswanathan *et al.*, 2009a). Los embriones de ratón homocigotos para una delección del cluster miR-290 mueren tempranamente (Blakaj y Lin, 2008). Además, miR-291-3p, miR-294 y miR-295 mejoran la eficiencia en la derivación de las células madre pluripotentes inducidas por *Oct4*, *Sox2* y *Klf4*, confirmando su función en el establecimiento de la pluripotencialidad (Judson *et al.*, 2009).

También se han identificado varios miRNAs que regulan específicamente genes concretos en las células de la masa celular interna del blastocisto. Por ejemplo, miR-134 y miR-470 tienen diana para *Sox2* y *Oct4*, respectivamente. Ambos miRNAs regulan la expresión de *Nanog*, siendo de destacar el hecho de que sus sitios diana están localizados en secuencias codificantes, en lugar de en las regiones 3' no transcritas (Tay *et al.*, 2008). En las células madre de humano, miR-145 reprime la expresión de *OCT4*, *SOX2* y *KFL4* (Xu *et al.*, 2009). Todos estos miRNAs regulan de forma negativa factores de pluripotencialidad, lo que implica que estos miRNAs pueden estar involucrados en la diferenciación del trofoectodermo y la masa celular interna del blastocisto en un estadio tardío. Se ha identificado una diana específica del cluster miR-290 que reprime la expresión de *Rbl2*, un represor de la metiltransferasa, DNMT3. La pérdida de función del cluster miR-290 eleva el nivel de expresión de *Rbl2*, que a su vez reduce la expresión de DNMT3, dando lugar a una hipometilación del DNA en las células madre, y afecta al silenciamiento estable de *Oct4* después de la diferenciación (Sinkkonen *et al.*, 2008; Benetti *et al.*, 2008). Por lo tanto, el cluster miR-290 juega papeles importantes no sólo en el mantenimiento de la pluripotencialidad sino también en la diferenciación de las células madre embrionarias y probablemente en la diferenciación de la masa celular interna del blastocisto. Hasta el momento, aunque se ha identificado un grupo de miRNAs específicos del trofoectodermo, no se

ha caracterizado ninguna de sus dianas ni ningun miRNA concreto que regule un gen determinado. El conocimiento de estos miRNAs arrojará luz sobre como los miRNAs promueven la segregación del trofoectodermo y la masa celular interna del blastocisto.

miRNAs y cáncer

Los miRNAs se han mostrado relevantes en muchos procesos patológicos, incluyendo enfermedades metabólicas, cardiovasculares y cancerosas. La importancia de la alteración de los miRNAs en el cáncer radica en los recientes hallazgos que unen a los miRNAs con una red compuesta de genes supresores de tumores y oncogenes (Esquela-Kerscher y Slack, 2006). Una de las primeras evidencias de la implicación directa de los miRNAs en el cáncer fue la identificación de miR-15a y miR-16-1 en la banda cromosómica humana 13q14, que está ausente con frecuencia en la leucemia crónica linfocítica (CLL) (Calin *et al.*, 2002). Este hecho, junto con la demostración de que estos miRNAs tienen diana en el oncogen *BCL-2*, sugiere que estos miRNAs sirven como factor supresor de tumores en esta región, (Calin *et al.*, 2005). Otro hallazgo bien documentado es la supresión del oncogen *RAS* por miembros de la familia *let-7*, que están frecuentemente inhibidos en cáncer de pulmón (Johnson *et al.*, 2005). Así, se ha descrito que la reducción en la expresión de *let-7* está asociada con un acortamiento en la supervivencia post-operatoria en pacientes con cáncer de pulmón (Takamizawa *et al.*, 2004). Por otro lado, se han descrito miRNAs que están sobre-expresados en varios cánceres y que funcionan, por tanto, como oncogenes. Un ejemplo de esto es el cluster miR-17-92, que se sobre-expresa frecuentemente en linfomas y cáncer de mama. La transcripción del cluster miR-17-92 es inducida por la oncoproteína *c-MYC*, mostrando una actividad proliferativa y/o anti-apoptótica (O'Donnell *et al.*, 2005). Conjuntamente, los miRNAs desregulados en cáncer podrían funcionar como supresores o como promotores de tumores, según sus dianas sean oncogenes o genes supresores de tumores.

Varios trabajos han mostrado que la inhibición de ciertos miRNAs aparece con frecuencia asociada a los cánceres de mama, próstata y ovario (Lu *et al.*, 2005; Marton *et al.*, 2008; Ozen *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Además, una inhibición general en la biogénesis de los miRNAs por supresión de alguno de los componentes clave de la maquinaria de procesamiento de los miRNAs, tales como *DROSHA*, *DGCR8* y *DICER*, promueve la transformación celular y la tumorigénesis (Kumar *et al.*, 2009, 2007). Existen varios mecanismos que contribuyen a desregular la expresión de un miRNA en el cáncer. Además de las anomalías de los genes supresores de tumores y oncogenes, estas alteraciones podrían ser explicadas, en parte, por varios mecanismos, incluyendo deleciones

3. Antecedentes

cromosómicas, mutaciones génicas, silenciamiento epigenético, o desregulación transcripcional de los transcritos de pri-miRNAs (Croce, 2009). De hecho, algunos loci de miRNAs muestran inestabilidad genómica en células cancerosas, y también se ha descrito ampliamente que c-MYC reprime la transcripción de los genes de miRNAs (Calin *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2008). Por otro lado, en cuanto a los procesos característicos de la biogénesis de miRNAs, se sabe que la desregulación podría atribuirse a un deterioro en el procesamiento de los miRNAs, que podría explicar la inhibición, tanto de un amplio conjunto de miRNAs, como de miRNAs específicos (Michael *et al.*, 2003; Thomson *et al.*, 2006). La desregulación en la biosíntesis de los miRNAs en el cáncer está apoyada también por el recientes hallazgos de mutaciones de cambio de pauta de lectura en el gen *TRBP2*, un componente que interacciona con DICER, y que se ha observado en carcinomas hereditarios y esporádicos con inestabilidad de microsatélites (Melo *et al.*, 2009). Además, una mutación en *DICER1* se ha asociado con el blastoma pleuropulmonar (Hill *et al.*, 2009). Según esto, la expresión reducida de los factores de procesamiento de miRNAs se puede considerar como un criterio de diagnóstico del cáncer de pulmón y de ovario (Karube *et al.*, 2005; Merritt *et al.*, 2008).

En resumen, aunque la importancia de los miRNAs está creciendo rápidamente en la biología del cáncer, se sabe todavía poco sobre la importancia de su regulación a nivel de la biogénesis de los miRNAs. Todavía no se ha estudiado en profundidad la conexión entre los genes supresores de tumores y la maquinaria de biogénesis de miRNAs. En numerosos trabajos se han revelado los detalles del patrón de expresión de miRNAs desregulados en varias enfermedades malignas humanas, siendo cada vez mayor la lista de miRNAs reconocidos como supresores de tumores o como oncogenes. Además, es bastante evidente que algunos aspectos característicos de los procesos biológicos relacionados con el cáncer, incluyendo resistencia a drogas, angiogénesis tumoral, mantenimiento de la iniciación cancerosa de una célula y metástasis, se encuentran asociados con la función de los miRNAs (Yu *et al.*, 2007; Tavazoie *et al.*, 2008; Kovalchuk *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2008). Por tanto, el entendimiento de los mecanismos que controlan la expresión de los miRNAs en el cáncer y sus consecuencias funcionales puede proporcionar nuevas visiones para mejorar la clasificación, los pronósticos de predicción y el tratamiento contra el cáncer.

3.3.3. Herramientas bioinformáticas en el estudio de los microRNAs

La mayoría de los miRNAs de metazoos emparejan de forma imperfecta con sus correspondientes mRNAs diana, siendo difícil identificar cuales de ellas son biológicamente importantes. No obstante, los análisis bioinformáticos de predicción de dianas basados en la detección de la región

semilla (Bartel, 2009), junto con la conservación evolutiva de estas regiones, suponen una poderosa herramienta para identificar genes regulados por miRNAs (Lewis *et al.*, 2003; John *et al.*, 2004; Krek *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005; Miranda *et al.*, 2006; Rajewsky, 2006; Bartel, 2009; Friedman *et al.*, 2009). Sin embargo, los algoritmos utilizados frecuentemente predicen cientos o miles de genes diana para cada miRNA, muchos de los cuales no son dianas reales, y en otras ocasiones los algoritmos fallan en la predicción de dianas con verdadera significación biológica. Esto obliga al uso de métodos experimentales para identificar genes diana de microRNAs, basados en la observación de la inhibición del gen o de su proteína cuando se sobre-expresa el miRNA en cuestión, (Lim *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2007; Selbach *et al.*, 2008; Baek *et al.*, 2008; Lal *et al.*, 2009), o en la precipitación de los mensajeros junto con proteínas asociadas a los complejos miRISC (Karginov *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007a; Beitzinger *et al.*, 2007; Easow *et al.*, 2007; Hendrickson *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009). La secuenciación masiva de RNAs purificados por inmunoprecipitación con AGO, que arrastra también a los mRNAs, proporciona una forma eficiente de identificar los emparejamientos entre elementos de reconocimiento de miRNAs y mRNAs (MRE).

Por tanto, el uso de algoritmos de predicción y de métodos experimentales, genera una amplia lista de dianas candidatas para miRNAs. Sin embargo, elegir la diana más importante de estas largas listas es una complicada tarea. El estudio de la función del gen y el análisis del “interactoma” son pues necesarios para interpretar las relaciones funcionales entre los miRNAs y sus genes diana. (Lal *et al.*, 2009).

Predicción computacional de genes diana para miRNAs

Los algoritmos de predicción comúnmente más usados se basan en varios criterios que, en función de su importancia, son los siguientes:

1. Complementariedad con la región semilla del miRNA
2. Conservación evolutiva del MRE
3. Energía libre del heterodúplex miRNA-mRNA
4. Características de la secuencia del mRNA fuera del sitio de la diana

(Duursma *et al.*, 2008; Lal *et al.*, 2009; Mayr *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2007)

Los primeros algoritmos usados tales como *TargetScan* y *PicTar* (Krek *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 2009) se centran en el emparejamiento de la región semilla. El algoritmo de *TargetScan* (Lewis *et al.*, 2003, 2005; Friedman *et al.*, 2009) requiere un emparejamiento exacto de 7 bases

3. Antecedentes

o más en la región semilla, pero el de PicTar (Krek *et al.*, 2005) no, estableciendo en su lugar un límite estricto de energía libre entre los emparejamientos. Ambos mejoran las predicciones teniendo en cuenta la conservación evolutiva de las secuencias diana. (Grimson *et al.*, 2007). Los mRNAs que obtienen una puntuación mayor o múltiples predicciones de MREs suelen ser con más frecuencia las verdaderas dianas.

El algoritmo *miRanda* (John *et al.*, 2004) alinea un miRNA con su diana en el mensajero porque identifica complementariedad con las secuencias, pero permitiendo emparejamientos desajustados como G-U. Después se filtran las dianas con alta puntuación y en un segundo criterio se tiene en cuenta la energía libre de desnaturalización del heterodúplex (ΔG). Finalmente, sólo las predicciones conservadas son las seleccionadas. Así, debido a que *miRanda* no requiere un emparejamiento exacto en la región semilla se han podido predecir dianas como las de los dos sitios de *let-7* de *Caenorhabditis elegans* en el gen *LIN-41*, que contiene un desajuste G-U en la región semilla (Vella *et al.*, 2004; Betel *et al.*, 2008).

Otros algoritmos tienen en cuenta la accesibilidad de la diana (Kertesz *et al.*, 2007; Hammell *et al.*, 2008). En lugar de considerar sólo la energía libre del heterodúplex (miRNA-mRNA), estos algoritmos estiman el coste de energía necesaria para desplegar la estructura secundaria del mRNA que rodea a la región diana. El algoritmo *PITA* (Kertesz *et al.*, 2007) combina la energía libre del emparejamiento miRNA-mRNA con la medida de la $\Delta\Delta G$. El algoritmo encuentra emparejamientos semilla (permitiendo un número de emparejamientos inespecíficos), y calcula el $\Delta\Delta G$ para cada emparejamiento, independientemente de la conservación. Aunque los demás algoritmos buscan dianas en los extremos 3' UTR, *PITA* lo hace en todo el gen y puede predecir MREs fuera del 3' UTR.

El algoritmo *mirWIP* (Hammell *et al.*, 2008) está basado en las características de la secuencia de mRNAs aislados por inmunoprecipitación del complejo miRISC de *C. elegans* (Zhang *et al.*, 2007). El programa *mirWIP* puntúa las dianas según 1) los emparejamientos perfectos e imperfectos en la región semilla, 2) la accesibilidad al sitio de unión del mRNA según su estructura secundaria y 3) ΔG total, un análogo de $\Delta\Delta G$. La sensibilidad y especificidad del algoritmo *mirWIP* son altas en relación con otros algoritmos, dado el elaborado desarrollo de la base de datos de miRISC que se ha creado para ello.

El algoritmo *rna22* difiere radicalmente de otros algoritmos (Miranda *et al.*, 2006). Está relacionado con el reconocimiento de patrones compartidos de secuencias de miRNAs. La base de datos considera todas las secuencias de los miRNAs maduros e identifica estadísticamente los patrones de secuencias sobre-representadas. Los potenciales MREs son identificados como patrones complementarios. Las predicciones son hechas según el plegamiento de cada miRNA, *in silico*, en el heterodúplex

con la secuencia diana predicha e identificando los miRNAs con ΔG más bajo. El algoritmo rna22 no considera la conservación, sus predicciones no se restringen al extremo 3' UTR y se permiten ciertos emparejamientos inespecíficos. Este algoritmo ha sido usado para asignar emparejamientos en las regiones no semilla y en secuencias codificantes (CDS, *coding sequence*).

Los desarrolladores del algoritmo rna22 predijeron un índice bajo de falsos positivos. Sin embargo, rna22 no realiza muy bien los algoritmos de semilla parcial en los datos de proteómica de alto rendimiento (Baek *et al.*, 2008; Selbach *et al.*, 2008), y sólo algunas predicciones de MREs de rna22 fueron validadas en estudios de bajo rendimiento (Lal *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2009).

Varios estudios de revisión han comparado los diferentes algoritmos usando como punto de referencia las dianas para miRNAs validadas o refutadas experimentalmente (Sethupathy *et al.*, 2006; Alexiou *et al.*, 2009). Los estudios de proteómica desarrollados por TargetScan y PicTar tienen un mayor poder predictivo al estar basados en un estricto emparejamiento de la región semilla (Baek *et al.*, 2008; Selbach *et al.*, 2008; Alexiou *et al.*, 2009). En muchos estudios experimentales se ha visto que los miRNAs en los que se ha validado su diana han sido elegidos por métodos de predicción de emparejamiento de la zona semilla. Sin embargo, recientes estudios de alto rendimiento basados en la unión de las proteínas AGO a los emparejamientos miRNA-mRNA sugieren que en alrededor del 25-45% de los MREs no hay un emparejamiento perfecto de la región semilla (Chi *et al.*, 2009; Zisoulis *et al.*, 2010). Por lo tanto, la selección exclusiva de dianas con emparejamiento exacto con la semilla dejaría fuera a un buen número de dianas reales.

Todos los análisis bioinformáticos necesitan considerar variaciones en las secuencias anotadas en las bases de datos usadas para generar predicciones. El mismo algoritmo utilizado en dos bases de datos distintas (UC-SC y Ensembl) genera predicciones de dianas que se solapan en menos del 50% (Ritchie *et al.*, 2009). Las bases de datos actuales no tienen en cuenta las isoformas de los mRNAs específicas de un tipo celular. Algunos mRNAs tienen polianedilación alternativa en proliferación celular (Sandberg *et al.*, 2008), cáncer (Mayr y Bartel, 2009) y diferenciación (Ji *et al.*, 2009), generando transcritos con extremos 3' UTR únicos. En consecuencia, es importante saber si la isoforma expresada por el gen en el tipo celular estudiado contiene o no el MRE predicho por el programa.

Enfoque genético hacia la identificación de dianas para miRNAs

Para examinar el efecto de la manipulación de un gen específico se utiliza frecuentemente el estudio de mutantes (Ambros, 2004). El hallazgo

3. Antecedentes

del miRNA lin-4 y su diana en lin-14 se encontró identificando larvas de *C. elegans* con defectos genéticos, lo que dio paso al descubrimiento de los miRNAs (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993; Ambros, 2004). Otros miRNAs y unas cuantas de sus dianas fueron identificadas por rastreo de fenotipos mutantes en *C. elegans* y *D. melanogaster* (Ambros, 2004). Estas dianas fueron deducidas generalmente por sus relaciones epistáticas (Lee *et al.*, 1993; Ambros, 2004). Por tanto, las anormalidades genéticas han sido especialmente útiles para identificar la función biológica de miRNAs. Así, la sobre-expresión condicional de cada uno de los 6 miRNAs que forman el cluster miR-17-92 ha permitido demostrar el prominente papel de miR-19 en los cánceres hematológicos *in vitro* e *in vivo* (Mu *et al.*, 2009; Olive *et al.*, 2009; Mavrakis *et al.*, 2010). De hecho, los estudios bioinformáticos, de expresión génica y los análisis funcionales llevaron a identificar al gen *PTEN*, un supresor de tumores, como diana del miR-19. Otro ejemplo lo constituye el cluster miR-143-145, altamente expresado en células musculares, que fue descubierto mediante el uso de ratones transgénicos. Los ratones *knockout* no tenían defectos aparentes en el desarrollo, sugiriendo que este cluster no es esencial para el desarrollo, pero las células musculares estaban menos diferenciadas con respecto al fenotipo salvaje y eran incapaces de responder a un daño vascular. Las dianas para este cluster fueron identificadas manualmente seleccionando posibles genes candidatos a partir de las predicciones computacionales (Xin *et al.*, 2009). Así, el uso combinado de datos genéticos y computacionales, junto con métodos moleculares, supone una poderosa estrategia para dilucidar la función de miRNAs concretos (Easow *et al.*, 2007; Baek *et al.*, 2008; Zisoulis *et al.*, 2010).

Análisis de microarrays tras de la sobre-expresión o inhibición de miRNAs. El análisis mediante *microarrays* de mRNAs tras la realización de un experimento funcional con miRNAs es muy interesante ya que los miRNAs alteran los niveles de transcritos (Lim *et al.*, 2005; Selbach *et al.*, 2008; Baek *et al.*, 2008; Hendrickson *et al.*, 2009), lo que proporciona una herramienta muy útil para identificar posibles genes regulados por miRNAs. Aunque con este método no podemos distinguir las dianas directas de las indirectas, se puede analizar el efecto de la manipulación de un miRNA sobre la expresión global de los genes (Lim *et al.*, 2005; Linsley *et al.*, 2007; Lal *et al.*, 2009). Esta estrategia fue usada, por ejemplo, para identificar los cambios en mRNA después de la sobre-expresión de miR-1 en músculo, y de miR-124 en cerebro (Lim *et al.*, 2005). Así la transfección de células HeLa con miR-1 indujo a estas células a mimetizar el perfil de expresión génica propio de las células musculares, mientras que la transfección con miR-124 desplazó dicho perfil hacia el habitual en células cerebrales. Para el caso de miR-1, el 88 % de los genes inhibidos contenían un emparejamiento de 6

3.3. MicroRNAs

nucleótidos en la región semilla, y el 76% de los genes que fueron inhibidos por miR-124 tienen un emparejamiento similar (Lim *et al.*, 2005). La sobre-expresión de miRNAs también es muy útil para estudiar los efectos biológicos y sus dianas, especialmente en miRNAs relacionados con el cáncer. La sobre-expresión de let-7 disminuye la proliferación de células cancerosas en pulmón e hígado, siendo inhibidos más de 200 transcritos en ambos tipos celulares (Johnson *et al.*, 2007). Los análisis de la función de los genes inhibidos indicaron que eran genes implicados en la replicación del DNA y en diferentes etapas del ciclo celular. De manera similar, la transfección de líneas celulares de colon con miR-15a y miR-16, incrementó la proporción de células en fase G0/G1 y la mayoría de los genes inhibidos estaban relacionados con el control del ciclo celular (Linsley *et al.*, 2007). Paradójicamente, estos no presentaban emparejamientos con las regiones semilla de miR-15a o miR-16, sugiriendo que muchos de los efectos observados podrían ser indirectos.

La pérdida de función también ha sido utilizada para identificar miRNAs. Por ejemplo, la inhibición *in vivo* del miR-122, específico de hígado, activó la expresión de cientos de mRNAs (Krützfeldt *et al.*, 2005). La mayoría de las regiones 3' UTR que contenían dianas con semillas de hexanucleótidos pertenecían a genes relacionados con la biosíntesis del colesterol. En este mismo estudio se analizaron simultáneamente los cambios en la expresión de los genes después de la inhibición de miR-15 y miR-16 (Linsley *et al.*, 2007), observándose un efecto menor que en el caso de la sobre-expresión, lo que sugiere que la sobre-expresión puede ser más útil para identificar dianas que la inhibición. Sin embargo, los beneficios relativos de la sobre-expresión o inhibición dependerán del contexto biológico de que se trate. En los experimentos de sobre-expresión se corre el riesgo de inducir niveles supra-biológicos del miRNA, lo que da lugar a artefactos derivados del hecho que tales niveles saturan el complejo miRISC, impidiendo así la acción de otros miRNAs (Khan *et al.*, 2009). Por el contrario, la represión de un miRNA poco expresado es poco probable que tenga un efecto sustancial en sus genes diana y, a su vez, puede resultar muy difícil suprimir completamente un miRNA que muestre un alto nivel de expresión endógena.

Análisis proteómicos. Los análisis proteómicos también pueden permitir la identificación de dianas para miRNAs. El uso de aminoácidos marcados con isótopos radiactivos en cultivos de células (SILAC) y su posterior análisis mediante espectrometría de masas, permitió evaluar el efecto de la pérdida o ganancia de expresión de miRNAs concretos en el proteoma de dichas células (Baek *et al.*, 2008; Selbach *et al.*, 2008). En un estudio de este tipo se comparó la composición de proteínas citoplasmáticas y nucleares en neutrófilos de tipo salvaje con respecto a los de ratones

3. Antecedentes

knockout para miR-223. Los mRNAs de las proteínas que fueron sobre-expresadas en los neutrófilos de estos ratones tenían emparejamientos con la región semilla del miR-223. Los algoritmos utilizados en los análisis bioinformáticos tienen un gran poder de predicción porque requieren un emparejamiento estricto con la región semilla, pero sólo el 33 % de las dianas predichas por tales algoritmos mostraron cambios en la expresión de proteínas, indicando que estos algoritmos producen un alto índice de falsos positivos (Baek *et al.*, 2008).

En general los cambios en la expresión de mRNA están bien correlacionados con los cambios en las proteínas, pero estos estudios, tanto de expresión de mRNA como de proteómica, no pueden distinguir entre dianas directas para miRNAs y efectos indirectos causados por genes reguladores controlados directamente por los miRNAs. Los experimentos de SILAC son de larga duración, caros y poco accesibles para la mayoría de los laboratorios, además de que los actuales métodos sólo pueden resolver una fracción proteómica al mismo tiempo. Por estos motivos y puesto que los cambios en expresión de mRNAs y proteínas están altamente correlacionados, los análisis de *microarrays* y el estudio de mensajeros son los métodos más utilizados generalmente, dada su mayor simplicidad.

Identificación de miRISC-asociados a dianas de miRNAs. El complejo miRISC de mamíferos contiene el miRNA maduro y diferentes proteínas, incluidas una proteína AGO y TNRC6 (Ding y Han, 2007; Landthaler *et al.*, 2008). Diferentes estudios han identificado dianas para miRNAs por su asociación con las proteínas miRISC mediante inmunoprecipitación, normalmente manipulando un miRNA específico para identificar sus dianas (Easow *et al.*, 2007; Karginov *et al.*, 2007; Hendrickson *et al.*, 2008). Este método se ha usado más frecuentemente para describir las características generales de MREs que para identificar dianas específicas. No obstante, la inmunoprecipitación es una técnica poderosa para la identificación de verdaderas dianas para miRNAs (Karginov *et al.*, 2007; Hendrickson *et al.*, 2008), aunque tiene algunas limitaciones. Así, los miRNAs y mRNAs que son recolectados asociados con AGO1 o AGO2 pueden no ser idénticos a los encontrados en el miRISCs que contiene otras AGOs (Su *et al.*, 2009). Además el epítipo diana para AGO tiene algunos inconvenientes pues en ocasiones puede estar asociado a RNAs transferentes (Maniataki y Mourelatos, 2005) introduciendo artefactos experimentales (Easow *et al.*, 2007). La sobre-expresión de AGO incrementa, en general, la producción de miRNAs endógenos (Diederichs y Haber, 2007; Zhang *et al.*, 2009), lo que podría sesgar el perfil de interacciones miRNA-mRNA. También puede ocurrir que las proteínas AGO de los extractos celulares se asocien con mRNA después de la lisis (Karginov *et al.*, 2007), inmunoprecipitando mRNAs que no tienen verdaderas dianas. Finalmente, las AGO tienen la limitación de que identifican mRNAs en lugar de parejas

de un mRNA y un miRNA específicos, por lo que no se pueden establecer relaciones directas entre miRNA y mRNA.

Identificación de uniones miRISC-MREs. Recientemente se ha desarrollado una técnica llamada “AGO HITS-CLIP” (*high throughput sequencing by crosslinking and immunoprecipitation*), que permite identificar directamente las uniones miRNA-MREs (Chi *et al.*, 2009; Hafner *et al.*, 2010; Zisoulis *et al.*, 2010). Los ácidos nucleicos se unen mediante radiación ultravioleta (*crosslinking*) a las proteínas del miRISC y son entonces inmunoprecipitadas con anticuerpos específicos contra algún componente del miRISC. El RNA no unido es digerido para quedarse únicamente con los complejos RNA-miRISC, que son analizados mediante secuenciación de alto rendimiento para identificar las proteínas AGO asociadas al miRNA y su diana en el MREs. Con esto se consigue un menor índice de falsos positivos y de falsos negativos. Se ha comprobado que la eficiencia de la detección de dianas previamente validadas está correlacionada con los niveles de expresión del mRNA, siendo las dianas más altamente expresadas las más fáciles de identificar. De las secuencias estudiadas, un 25 % se localizaba en regiones codificantes no identificadas (CDS), y el 27 % no tenía un emparejamiento perfecto con la región semilla para los 20 miRNAs mayoritariamente expresados. Estos resultados implican que los miRNAs pueden regular muchos genes por interacciones en la región no semilla o por interacciones en CDS (Vella *et al.*, 2004; Didiano y Hobert, 2006; Duursma *et al.*, 2008; Tay *et al.*, 2008; Lal *et al.*, 2008, 2009; Shin *et al.*, 2010). Así, en un estudio HITS-CLIP realizado en *C. elegans* (Zisoulis *et al.*, 2010), se encontró un alto grado de emparejamiento entre los 3' UTR y las regiones semilla de miRNAs aislados. Sin embargo, el 37 % de las secuencias no tenían una región semilla conservada, permitiendo incluso desequilibrios como G-U. También se encontraron secuencias CDS emparejando con miRNAs pero no en la región semilla, sino en la región central del miRNA.

Un método mejorado de aislamiento de RNAs asociados a proteínas es el llamado PAR-CLIP, (*photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation*), que también se ha usado para identificar dianas para miRNAs (Hafner *et al.*, 2010). Las células son cultivadas con tiouridina fotorreactiva, que puede sustituir a la uridina durante la transcripción antes de la unión por radiación y la inmunoprecipitación. Posteriormente se analizan las uniones miRNA-proteína y mRNAs mediante secuenciación masiva. La incorporación de la tiouridina mejora sustancialmente el rendimiento del RNA, porque en la transcripción reversa la tiouridina permite transiciones T-C, lo que permite una localización más precisa del sitio de interacción MRE-miRISC. El 50 % de las uniones MREs candidatas se localizaban en CDS, mientras que el 46 % emparejaban en el 3' UTR. La identificación de los sitios diana fue testada

3. Antecedentes

mediante inhibición antisentido de los 25 miRNAs más altamente expresados. Las dianas con los emparejamientos semilla se sobre-expresaron más frecuentemente que las dianas sin emparejamiento semilla. De forma similar, los mRNAs en los que se unía el miRNA en el extremo 3' UTR se sobre-expresaron más, por inhibición del miRNA, que aquellos en los que el emparejamiento estaba en la región CDS.

Validación de verdaderos genes diana. Dado el potencial de los miRNAs para regular un amplio número de genes, resulta difícil identificar la diana clave de una larga lista de posibles genes diana generados por los métodos bioinformáticos. La identificación de dianas verdaderas para miRNAs concretos es sólo el primer paso. Para validar genes candidatos a ser regulados por un miRNA, el método clave es el estudio del efecto de la manipulación del miRNA (por sobre-expresión, inhibición o eliminación) sobre los niveles de mensajero y/o proteína, esperándose observar una relación inversa entre el producto génico y el miRNA. Se puede probar la regulación directa de un miRNA sobre la expresión de un gen realizando ensayos en los que se usan genes chivatos localizados en plásmidos específicos en los que se clona la región 3' UTR o CDS en cuestión y con los que se transfectan células que sobre-expresan el miRNA mimético. La muestra de que el extremo 3' UTR de un gen es regulado por un miRNA es un claro indicio de que el transcrito está regulado por este miRNA en su contexto nativo. Los MREs candidatos pueden ser identificados usando algoritmos basados en la región semilla o aquellos que no requieran un emparejamiento perfecto como el rna22 (Miranda *et al.*, 2006; Kertesz *et al.*, 2007). Pero la confirmación directa de la regulación de un miRNA se obtiene por mutación o delección de los residuos incluidos en el gen chivato, como control negativo, y estudiando entonces su expresión. La mayoría de los estudios directos se hacen sobre-expresando el miRNA y usando genes chivatos bajo un promotor fuerte. En el caso de los emparejamientos MREs en CDS, la validación del papel real de esta unión es más complicada porque el efecto de éste en la expresión del gen es más débil que la unión MRE en el 3' UTR. Por ello, la estrategia consiste en clonar las secuencias adyacentes al posible MRE-CDS, y el CDS en un marco de lectura abierto en un plásmido chivato apropiado (Easow *et al.*, 2007; Lal *et al.*, 2008). La presencia de codones raros aguas arriba de un MRE-CDS puede ralentizar la traducción, permitiendo a los miRNAs unirse al CDS y reprimir la expresión del gen eficazmente (Gu *et al.*, 2009), siendo necesario considerar este hecho a la hora de diseñar un sistema con genes chivatos.

3.3.4. Aplicaciones biotecnológicas del RNAi

El RNAi supone una poderosa herramienta para analizar las funciones génicas tanto en cultivos de tejidos como en sistemas *in vivo*. Dada su generalizada aplicabilidad se ha utilizado mucho para diseñar herramientas genéticas usando animales modelo como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y ratón. Además, el uso de RNAi abre la posibilidad de responder a muchos interrogantes en animales en los que las herramientas genéticas están poco desarrolladas o son inexistentes.

El rastreo genético es uno de los métodos más poderosos disponibles para obtener datos sobre cómo funcionan complejos procesos biológicos. Con los años se han hecho muchas mejoras y se han desarrollado herramientas de manipulación genética disponibles para cada organismo modelo; son las llamadas cajas de herramientas (Nagy *et al.*, 2003; Venken y Bellen, 2005; Kaletta y Hengartner, 2006). Estos poderosos enfoques y nuevas herramientas facilitan las búsquedas genéticas y la consiguiente identificación de alteraciones genéticas, así como el seguimiento necesario para analizar fenotipos mutantes. Por ejemplo, innovaciones tales como análisis de mosaicos y la expresión específica de tejido de transgenes ha permitido estudiar la función de un gen en una gran variedad de tejidos, estadios y contextos.

Poco tiempo después del descubrimiento de los RNAs de doble cadena por Fire *et al.* (1998) se empezó a inhibir la actividad de genes concretos, mediante el uso de métodos basados en el RNAi, que fueron añadidos a esas cajas de herramientas de varios organismos. Estos métodos fueron una verdadera revolución en el campo de la genómica funcional por su relativa facilidad, y más significativamente porque el RNAi, a diferencia de otros métodos de detección genética más tradicionales, proporcionaba una herramienta de reversión genética, especialmente para aquellos organismos genéticamente más complejos, como es el caso de los mamíferos. Es importante destacar que el poder de los métodos basados en el RNAi para análisis genético será plenamente efectivo cuando se complete la secuenciación del genoma de varios organismos (Adams *et al.*, 2000; Venter *et al.*, 2001; Consortium *et al.*, 2002). De hecho, la identificación de todos los genes del genoma en *C. elegans*, *Drosophila*, rata, ratón y humano ha dado lugar a la construcción de numerosas fuentes de RNAi en todo el genoma, permitiendo la detección de reversiones genéticas en cultivos de tejidos o *in vivo*. Hoy en día, los rastreos mediante RNAi en todo el genoma son posibles *in vivo* en *C. elegans*, en células de tejidos en cultivo e *in vivo* en *Drosophila*, y en líneas celulares de ratón, rata y humano.

Actualmente, el RNAi es una herramienta bien establecida para estudio de cultivos de tejidos, y después de los primeros rastreos de todo el genoma en células de *Drosophila* (Boutros *et al.*, 2004), los rastreos de alto

3. Antecedentes

rendimiento (HTS, *high-throughput screening*) mediante RNAi se hacen de rutina en *Drosophila* y en células de mamíferos, aunque los métodos de RNAi *in vivo* están todavía en desarrollo en la mayoría de los organismos .

Reactivos de RNAi para rastreo *in vivo*. Existen cuatro tipos de reactivos de RNAi usados para estudios *in vivo*: sintéticos (siRNAs), pequeños RNAs horquillados (shRNAs), pequeños microRNAs horquillados (shmiRNAs) y largos RNAs de cadena doble (dsRNAs) (Echeverri y Perrimon, 2006; Lee y Kumar, 2009).

La relativa facilidad de los métodos del RNAi en *C. elegans* ha hecho posible que éste sea un organismo modelo para el desarrollo de la tecnología de estudio de la función génica a escala del genoma entero (Sugimoto, 2004). Los dsRNAs pueden ser introducidos en el nematodo por un simple baño del animal en la solución de dsRNA, alimentando a los gusanos con bacterias que expresan estos largos dsRNAs, por inyección del dsRNA o generando animales que expresan estos horquillados transgénicos. Muchos de los rastreos del genoma entero que se hicieron hace más de diez años en *C. elegans* para buscar respuestas a una amplia variedad de preguntas biológicas del desarrollo, señalización celular, envejecimiento, regulación metabólica y enfermedades neurodegenerativas, sólo dieron unas cuantas respuestas. Más tarde, estos mismos rastreos se hicieron, con más éxito, en fenotipos salvajes o en mutantes específicos, bien por inyección o por vía alimentaria del RNAi (Kaletta y Hengartner, 2006; Boutros y Ahringer, 2008).

Por último, un tema importante en cuanto al rastreo de RNAi a gran escala, es el índice de falsos positivos y negativos asociados con el método. Los falsos positivos ocurren cuando aparece un fenotipo nuevo e inesperado tras el tratamiento con el RNAi, cuando en realidad dicho tratamiento no ha sido la causa de ese falso descubrimiento (Sönnichsen *et al.*, 2005). Los falsos negativos, por otro lado, ocurren cuando aparece variabilidad en la capacidad de inhibición génica derivada del tratamiento, debido a las técnicas de alimentación, lo que puede explicar entre el 10% y el 30% de la variabilidad observada entre rastreos, incluso cuando han sido realizados en el mismo laboratorio (Simmer *et al.*, 2003).

Aplicaciones del RNAi *in vivo* en biología del desarrollo

La aplicación del RNAi tanto en organismos modelo como en los no modelo, proporciona herramientas genéticas muy útiles para caracterizar los papeles de genes específicos en desarrollo, y a nivel evolutivo. Como los métodos de transgenización están disponibles sólo en unos cuantos

organismos, el RNAi se está centrando en el desarrollo de reactivos de RNAi, transferidos bien por alimentación o por inyección.

El RNAi se ha usado para hacer frente a cuestiones interesantes en el campo de la evo-devo (evolución de los procesos de desarrollo) en medusas, avispas, escarabajos, grillos, arañas, etc. Por ejemplo, mediante inyección de dsRNAs en las pupas de la avispa parasita *Nasonia vitripennis* (Lynch y Desplan, 2006) se han podido establecer comparaciones entre el control genético del desarrollo del eje anteroposterior de esta especie y el de *Drosophila*. Estos estudios de RNAi *in vivo* han clarificado los papeles ancestrales de los genes *BICOID* y *CAUDAL* como organizadores maestros del desarrollo, y han ayudado a dilucidar su grado de divergencia evolutiva. (Olesnick *et al.*, 2006; Brent *et al.*, 2007).

RNAi in vivo en vertebrados modelo. El RNAi puede ser administrado localmente en forma de siRNAs sintéticos o shRNAs, a través de partículas virales, o mediante transfección con plásmidos de DNA. Se han construido muchos vectores basándose en diseños de shRNA o shmiRNA para optimizar el nivel de expresión del reactivo de RNAi. Además, se han dedicado muchos esfuerzos al desarrollo de métodos de RNAi condicional que incluye enfoques irreversibles y reversibles (Sandy *et al.*, 2005; Lee y Kumar, 2009). Por ejemplo, existe un gran número de vectores basados en sistemas Cre/LoxP y FLP-FRT (recombinasas en sitio específico), que se han usado para inducir RNAi de una forma irreversible. También se han explorado sistemas basados en Tet-, Ecdysome-, LacR, HIV-1 tat- y HIV-1 LTR-, como sistemas condicionales de RNAi. Además, los vectores que se han construido para animales transgénicos se pueden insertar en el genoma aleatoriamente o bien en sitios diana para asegurar su expresión, aunque la mayoría de los estudios publicados de animales transgénicos están todavía en un estadio primario de prueba (Sandy *et al.*, 2005; Lee y Kumar, 2009). Se necesitan por tanto más estudios para evaluar los aspectos técnicos de los efectos del RNAi, tales como el nivel de inhibición en varios tipos celulares, variabilidad en el sitio de inserción, potencial silenciamiento epigenético del constructo, etc. Independientemente de estas limitaciones, se prevee que en los próximos años aparecerán interesantes aplicaciones para los métodos basados en el uso del RNAi (Lee y Kumar, 2009).

Hasta la fecha, a diferencia del ratón, el empleo del RNAi en *Xenopus* y pez cebra no ha tenido un gran impacto, debido, en parte, a la mezcla de resultados en la eficacia de algunos reactivos de RNAi, al uso prevalente de métodos bien establecidos como los oligonucleótidos morfolinis antisentido, y a la pérdida de efectividad de los métodos para la expresión génica. En *Xenopus*, parece haber funcionado bien la inyección de siRNAs o largos dsRNAs en oocitos y blastómeros tempranos (Nakano *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2002), y se ha utilizado el silenciamiento de genes

3. Antecedentes

en animales transgénicos, aunque ha resultado más difícil hacerlo en los estadios tardíos del desarrollo (Li y Rohrer, 2006). De manera similar, aunque en pez cebra se han realizado sólo unos pocos estudios de dsRNAs, shRNAs y siRNAs, éstos parecen haber sido efectivos como método de inhibición génica, pero también se han descrito ciertas anomalías morfológicas no explicadas por el momento, que podrían asociarse con el tratamiento de RNAi administrado por inyección (Wargelius *et al.*, 1999; Skromne y Prince, 2008). Aunque no sabe en qué medida, al menos en ausencia de otras tecnologías superiores, los métodos basados en el uso de RNAi llegarán probablemente a ser frecuentes en peces y *Xenopus*.

En pollo se ha utilizado con éxito la electroporación en embriones y la administración a través de retrovirus para introducir RNAs horquillados en los tejidos (Harpavat y Cepko, 2006). El desarrollo de técnicas basadas en el empleo de virus es de particular interés porque su efecto es duradero y transmisible, ya que las células infectadas liberan más virus que se esparcen a las células vecinas.

Aplicaciones médicas del uso de RNAi *in vivo*

El empleo de técnicas de RNAi ofrece más especificidad y flexibilidad que las drogas tradicionales para silenciar la expresión génica. De hecho, cualquier proteína que cause o contribuya a una enfermedad es susceptible de ser tratada mediante RNAi, mientras que sólo existen drogas específicas para algunos tratamientos. Por este motivo, el RNAi ha llegado a ser uno de los principales focos de atención para las compañías de biotecnología y farmacéuticas, que se encuentran actualmente en los estadios más tempranos del desarrollo de tratamientos basados en el uso de RNAi, principalmente utilizando siRNAs, con el fin de encontrar soluciones terapéuticas para las infecciones virales, el cáncer, la hipercolesterolemia, las enfermedades vasculares, la degeneración macular y las enfermedades neurodegenerativas (Sah, 2006).

Los puntos críticos en los tratamientos con RNAi como agente terapéutico son la vía de administración, la especificidad y estabilidad de los reactivos. La vía de administración se considera actualmente el mayor obstáculo ya que la introducción sistemática de siRNAs en los fluidos corporales puede resultar en su degradación, efectos fuera de los destinos, y detección inmune, así como reacciones imprevistas (Zimmermann *et al.*, 2006). Por ello, muchos de los esfuerzos se centran en el desarrollo de métodos para modificar un RNAi, o unirlo a un agente para su administración, que lo proteja hasta que alcance su destino terapéutico. Este tipo de administración incluye complejos lipídicos o nanopartículas que encapsulan los siRNAs o combinan moléculas de siRNAs con polímeros basados en péptidos. Existen otros avances adicionales en aplicaciones

terapéuticas que se basan en modificaciones químicas u otros enfoques que mejoren la especificidad y la potencia de los reactivos de RNAi (Perri-mon *et al.*, 2010).

3.3.5. Los microRNAs y el desarrollo gonadal

Aunque el papel de los genes codificantes de proteínas como reguladores de la expresión génica, sigue siendo investigado activamente, ha surgido un nuevo cuerpo de conocimiento que se centra en la función reguladora de la expresión génica ejercida por RNAs no codificantes. Con respecto a la determinación y diferenciación sexual en mamíferos, se sabe que dos genes implicados en el desarrollo gonadal, *Wt1* y *Foxl2* están regulados no sólo por proteínas sino también por transcritos antisentido (Gong *et al.*, 2001; Cocquet *et al.*, 2005).

Cuando se compararon los perfiles de expresión de los miRNAs entre gónadas embrionarias XX y XY en embriones de ratón 13.5 dpc (justo tras la diferenciación gonadal), se identificaron varios miRNAs que muestran un patrón de expresión sexualmente dimórfico (Takada *et al.*, 2009). Aunque aún no han quedado establecidos los perfiles de expresión de los miRNAs en las gónadas en el momento de la determinación sexual en ratón (11.5 dpc), el hecho de que a los 13.5 dpc ya se detecten diferencias entre testículos (XY) y ovarios (XX) sugiere claramente que la expresión sexualmente dimórfica de los miRNAs debe quedar ya establecida al inicio del desarrollo gonadal, y que éstos deben jugar un papel regulador importante y específico, que depende de la constitución cromosómica de la gónada. En este sentido, Papaioannou *et al.* (2009) mostraron que DICER es necesario para una correcta función y supervivencia de las células de Sertoli en la gónada adulta. Los ratones *knockout* condicionales para *Dicer* (DICER *-/-*) en células de Sertoli son indistinguibles de los normales en el momento del nacimiento, pero las células de Sertoli de esos mutantes muestran una disminución importante en los niveles de expresión de numerosos marcadores sertolianos, tales como (*Sox9*, *Amh*, *Sox8*, *Fgf9* y *Dhh*) y un fallo espermatogénico de severidad creciente con la edad, muy probablemente relacionado con el proceso de eliminación de células madre espermatogoniales (SSCs) que se observa en estos ratones, que también muestran un aumento en el número de células apoptóticas. Utilizando la misma línea Cre pero con un alelo DICER diferente, Kim *et al.* (2010) describieron también un fallo espermatogénico severo, apoptosis masiva de células de Sertoli y de células germinales y un decremento de la transcripción de los principales reguladores del desarrollo testicular y la espermatogénesis.

Por otra parte, tal como se ha indicado anteriormente, la activación del gen *SOX9* es clave para disparar el desarrollo testicular en la gónada

3. Antecedentes

embrionaria. No obstante, este gen también está implicado en el control del desarrollo de muchos otros órganos y tejidos como los huesos, los cartílagos, la notocorda, el páncreas, y el sistema nervioso, entre otros. En este último caso, se ha demostrado que su expresión en cerebro de ratón está regulada por un miRNA: miR-124 (Cheng *et al.*, 2009). Ese hecho abre la posibilidad de que una función reguladora similar pueda tener lugar también durante el desarrollo gónadal.

Aunque los datos disponibles actualmente son todavía escasos, sin embargo sugieren en su conjunto que los genes reponsables de controlar la organogénesis gonadal podrían estar regulados post-transcripcionalmente por miRNAs, dado que son necesarios para mantener la fertilidad. Por tanto, se abre un nuevo campo de investigación que promete dar respuesta a algunos de los importantes interrogantes que aún no han encontrado respuesta en la determinación genética del sexo, más de veinte años después del descubrimiento del gen *SRY*. Iniciar la investigación en este campo es el objetivo general del presente estudio.

4. Material y Métodos

Contenidos

4.1. Material Analizado	99
4.2. Métodos	100
4.2.1. Obtención y sexado del material	100
4.2.2. Microarray para microRNAs	103
4.2.3. Cultivos celulares y Transfecciones	109
4.2.4. Métodos de análisis molecular	116
4.2.5. Métodos inmunológicos	136
4.3. μiRNAM (MicroRNA Mining)	137
4.3.1. Base de datos	138
4.3.2. Obtención de las listas de miRNAs y sus potenciales dianas	139
4.3.3. Obtención de términos GO	139
4.3.4. Obtención de las descripciones asociadas con los transcritos	139
4.3.5. Interfaz web de consultas	140
4.4. Preparación de soluciones y medios	144

4.1. Material Analizado

En el presente estudio se ha utilizado el ratón como especie modelo entre los mamíferos. Concretamente se han utilizado ratones de la cepa Swiss en los estadios embrionarios entre 11.5 y 13.5 dpc. Se realizaron cruces en los que se verificó la cópula mediante la visualización de un tapón vaginal, y se consideró un tiempo de gestación de 0.5 dpc en el momento de la observación; a partir de entonces se contaron 11 o 13 días según el caso.

4. Material y Métodos

4.2. Métodos

4.2.1. Obtención y sexado del material

Dissección de embriones

Las hembras preñadas en estadios de 11.5 y 13.5 dpc fueron sacrificadas, y los embriones disecados para obtener sus gónadas.

En función del experimento en el que se utilizara dicho material, las gónadas fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido, fijadas para inclusión o disgregadas para establecer cultivos celulares primarios.

Sexado de embriones

En aquellos estadios en los que las gónadas se encontraban suficientemente diferenciadas, el sexado de los embriones se llevó a cabo mediante la inspección visual de las mismas. Sin embargo, para la determinación del sexo genético de los embriones que, por su escaso tiempo de desarrollo, no pudieron ser sexados en función de las características morfológicas de sus gónadas, se realizaron técnicas de tipo histológico y molecular para determinar su sexo genético.

Método histológico de determinación del sexo. Se realizaron preparaciones de cromatina sexual de células amnióticas de los embriones, utilizando un método desarrollado en nuestro laboratorio (Jiménez *et al.*, 2000). Esta técnica, cuyo protocolo se muestra a continuación, permite teñir el corpúsculo de Barr, que corresponde a uno de los dos cromosomas X inactivado en las células del amnios de los embriones hembra.

- Aislar el amnios del embrión.
- Introducirlo en una mezcla de fijador metanol:ácido acético (3:1).
- Transcurrido al menos 1 minuto, transferir la muestra a un microtubo que contenga una gota de ácido acético al 60 % y agitar suavemente hasta disgregar el tejido.
- Después de 1 minuto como máximo, extender la suspensión celular resultante sobre un portaobjetos colocado sobre una placa termostática estabilizada a 60°C.
- Expeler y volver a recoger la gota de suspensión celular sucesivamente en diferentes zonas del portaobjetos, utilizando una micropipeta y apoyando la punta inclinada sobre el portaobjetos.

4.2. Métodos

- Proceder a la tinción de la preparación con azul de toluidina al 1 %, colocar un cubreobjetos, presionar con un papel de filtro y observar inmediatamente al microscopio. La observación se realizó al menos por dos personas de forma independiente, considerándose válidos los casos en que hubo coincidencia entre ambas determinaciones. En los casos dudosos, que fueron muy pocos en la práctica, se procedió al uso de un método molecular para el sexado.

Método molecular de determinación del sexo. Se realizó la amplificación por PCR de los genes *Zfy* (específico de macho) y *Miogenina*, presente en ambos sexos en una reacción de PCR múltiple con los dos genes sobre muestras de tejido embrionario. Los productos de amplificación de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. La observación de una sola banda corresponde al sexo femenino, ya que indica que únicamente se ha producido la amplificación del fragmento del gen de la *Miogenina*. La aparición de dos bandas es indicativa del sexo masculino, ya que corresponden a la amplificación ambos fragmentos (*Zfy* + *Miogenina*). de esta forma, la banda correspondiente a la *Miogenina* constituye un control de la reacción. su ausencia indicaría una reacción fallida, mientras que su presencia indicaría que la reacción de amplificación se ha producido correctamente. Solo las muestras que presentan la banda de la *Miogenina* pueden ser por tanto evaluadas para la presencia o no de la banda de *Zfy*, específica de macho.

Protocolo abreviado de purificación de DNA para el sexado de embriones de ratón:

- Obtener la cola del embrión y sumergirla en 100 μ l de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 % SDS).
- Añadir 5 μ l de Proteinasa K y dejarlos toda la noche a 50°C.
- Añadir 100 mM de NaCl y 2.5 volúmenes de etanol al 100 %.
- Centrifugar 5 minutos a 13 000 rpm, a temperatura ambiente.
- Descartar el sobrenadante.
- Añadir 200 μ l de etanol al 75 %.
- Centrifugar 5 minutos a 13 000 rpm, a temperatura ambiente.
- Descartar el sobrenadante y secar el sedimento en una estufa a 50°C durante 10 minutos.
- Resuspender en 100 μ l de tampón TE.

4. Material y Métodos

- Agitar con vortex y dejarlo a 37°C durante 1 hora.

Protocolo de amplificación:

- Los oligonucleótidos utilizados para el sexado están recogidos en el cuadro 4.1.

<i>Zfy</i>	F: 5' -TTACGTCCATCGTGGACAGCAT-3'
	R: 5' -CCTATTGCATGGACAGCAGCTTATG-3'
<i>Mio</i>	F: 5' -TTACGTCCATCGTGGACAGCAT-3'
	R: 5' -TGGGCTGGGTGTTAGCCTTATG-3'

Cuadro 4.1: Cebadores utilizados para el sexado de embriones de ratón.

- Condiciones de la reacción:

Reactivo	Volumen
10× Tampón Taq polymerase	2.5 μ l
25 mM MgCl ₂	1.5 μ l
25 mM dNTP	0.2 μ l
DMSO	1.25 μ l
OMIA (500 ng/ μ l)	0.5 μ l
OMIB (500 ng/ μ l)	0.5 μ l
ZFY (500 ng/ μ l)	0.5 μ l
YNLS (500 ng/ μ l)	0.5 μ l
H ₂ O	16.45 μ l
DNA	1.0 μ l
Taq polymerase	0.1 μ l
Volumen total	25 μ l

- Programa del termociclador:

94°C	3 min
94°C	45 seg
60°C (35ciclos)	1 min
72°C	45 seg
72°C	5 min
4°C	∞

4.2.2. Microarray para microRNAs

Se extrajo RNA total de gónadas embrionarias de machos y hembras de ratón en estadios de gestación de 11.5 y 13.5 dpc, usando el kit *miRNeasy Mini Kit* de Qiagen, y se enviaron las cuatro muestras de RNA a la empresa Exiqon, *miRNA Profiling Service*, donde se realizó la hibridación y la lectura, usando un *microarray* para microRNAs de ratón. Las 4 muestras de RNA utilizadas en este experimento de *microarray* fueron obtenidas a partir de cuatro grupos de gónadas extraídas de embriones que fueron sexados individualmente por duplicado, usando los dos métodos descritos anteriormente, con objeto de asegurar que ninguno de ellos fuese sexado erróneamente. En todos los casos se observó identidad entre el sexo determinado con cada uno de los métodos usado, lo que garantizó que todos los embriones fueron sexados correctamente.

Extracción de RNA y Control de calidad

El protocolo seguido fue el proporcionado por el fabricante del kit *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen #217004).

La extracción de RNA mediante este kit está basada en la lisis de las muestras con fenol-guanidina y la purificación mediante membranas de sílica. El reactivo de lisis, QIAzol, incluido en el kit, es una solución monobásica de fenol e isotiocinato de guanidina, diseñado para facilitar la lisis de los tejidos, inhibir las RNAsas y eliminar la mayor parte del DNA celular y las proteínas del lisado orgánico.

Las muestras de células o tejidos fueron homogenizadas con el reactivo de lisis QIAzol. Tras la adición de cloroformo, el homogenado fué separado por centrifugación en sus fases acuosa y orgánica. El RNA permanecía en la fase superior, la acuosa, mientras que el DNA se quedaba en la interfase, y las proteínas pasaban a la fase orgánica, quedando algunas en la interfase. Se recogió la fase acuosa y se le añadió etanol, lo que permite unas condiciones apropiadas de unión de moléculas de RNA de tamaños desde 18 nucleótidos. La muestra se colocó entonces en una columna y se centrifugó, quedando el RNA total unido a la membrana mientras que el fenol y otros contaminantes fueron eliminados eficientemente. Este método permite eluir en agua un RNA de alta calidad y libre de nucleasas. Este kit también permite, en caso de que fuera necesario, enriquecer la muestra en microRNAs y otros RNAs pequeños de menos de 200 nucleótidos.

Procedimiento:

- Determinar la cantidad de tejido y añadir el correspondiente volumen del reactivo de lisis. Usar un máximo de 100 mg de tejido en 700 μ l de QIAzol.

4. Material y Métodos

- Homogenizar inmediatamente, mediante un pistilo o un homogenizador mecánico según el tipo de tejido.
- Incubar el homogenado 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 140 μl de cloroformo y agitar vigorosamente durante 15 segundos.
- Incubar nuevamente el homogenado 3 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 4°C a 12 000 g durante 15 minutos.
- Recoger la fase acuosa en un tubo nuevo. Añadir 1.5 volúmenes de etanol 100 % y mezclar vigorosamente mediante vortex.
- Pipetear hasta 700 μl de la muestra en una de las columnas proporcionadas por el kit y con un tubo de recolección de 2 ml.
- Centrifugar a temperatura ambiente a 8 000 g durante 15 segundos.
- Repetir el paso anterior con el resto de muestra que quede, descartando el filtrado.
- Añadir 700 μl del tampón RWT (proporcionado en el kit) a la columna y centrifugar a 8 000 g durante 15 segundos para lavar la columna, descartando el filtrado.
- Pipetear 500 μl de tampón RPE (proporcionado en el kit) en la columna. Centrifugar a 8 000 g durante 15 segundos para lavar la columna, descartando el filtrado.
- Añadir otros 500 μl de tampón RPE en la columna. Centrifugar a 8 000 g durante 2 minutos para secar la membrana de la columna.
- Opcionalmente, centrifugar de nuevo la columna en vacío en una microcentrífuga a 12 000 g durante 1 minuto.
- Poner la columna en un tubo nuevo de 1.5 ml para recoger el RNA. Añadir 30-50 μl de agua libre de nucleasas directamente en la membrana y centrifugar a 8 000 g durante 1 minuto para eluir el RNA.
- Si la cantidad de RNA esperada es mayor de 30 μg , repetir el paso anterior con un segundo volumen de 30-50 μl de agua libre de nucleasas. Eluyéndolo en el mismo tubo.

La integridad y calidad de las muestras de RNA fueron analizadas mediante varios procedimientos:

1. La concentración de las muestras y la estimación de la contaminación por fenoles y/o proteínas se realizó mediante la relaciones de absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm medidas en un *nanodrop*®, respectivamente.
2. La integridad del RNA se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% para la detección de las dos bandas de RNA ribosómico, 28s y 18s, así como los RNAs pequeños, entre los que están incluidos los miRNAs, así como otros RNAs de pequeño tamaño, como los RNAs transferentes.
3. Ambos controles fueron repetidos por la empresa Exiqon mediante otra técnica, un electroforegrama en un instrumento *Bioanalyser 2100* (Agilent Technologies), donde midieron tanto la calidad como la concentración de las muestras.

Marcaje e hibridaciones

Las muestras de microRNAs fueron marcadas usando un kit de marcaje Hy3/Hy5 de Exiqon. Las cuatro muestras (macho de 11.5 dpc, hembra de 11.5 dpc, macho de 13.5 dpc y hembra de 13.5 dpc) fueron marcadas con Hy3 e hibridadas por duplicado con una mezcla de las cuatro muestras marcadas con Hy5, que se usó como referencia común. Por su mayor sensibilidad y especificidad, se optó por la utilización de *microarrays* de LNA. La empresa Exiqon realizó las hibridaciones en una estación de hibridación TECAN HS400/800. Los portas del *microarray miRCURY LNA* fueron escaneados usando un sistema de escáner de *microarray* de Agilent, G2565BA (con una resolución de 10 μ m; Agilent Technologies). Las muestras marcadas se desnaturalizaron y se hibridaron durante 16 h a 56°C, tras lo cual se realizaron varios lavados para eliminar las uniones inespecíficas de las sondas, y se procedió a su escaneado. Todos estos procedimientos de marcaje e hibridación fueron realizados por la empresa Exiqon mediante los kits comercializados por esta misma empresa.

Calidad de las preparaciones del array usando puntos de control

Estos experimentos de hibridación cuentan con sistemas de control basados en el uso de varios RNAs de referencia (*spike-in* que se añaden en puntos preestablecidos del *microarray*). Las reacciones de marcaje Hy3 y Hy5, hibridaciones y el funcionamiento del experimento del *array* fueron evaluados abarcando todo el rango de señal de las reacciones de marcaje. Una alta concentración de ambos canales, Hy3 y Hy5, indicaba que tanto el marcaje como la hibridación se hicieron con éxito. Cada punto de control tenía 32 réplicas en las sondas de captura.

4. Material y Métodos

Obtención de datos y análisis.

Los *arrays* fueron escaneados con un equipamiento altamente sensible en un ambiente libre de ozono para reducir al mínimo la variación entre sucesivas mediciones. Los análisis de la imagen del *microarray* se llevaron a cabo mediante el software *ImaGene 7.0* (BioDiscovery, Inc., USA). Antes de proceder con la normalización de los datos se llevo a cabo una evaluación de la calidad de la técnica basada en los resultados de los puntos de control, etiquetado de los puntos, intensidad de la señal de ruido de fondo (*background*) y distribución de la intensidad de la señal.

Normalización de los datos. La normalización de los datos se realiza mediante la aplicación del algoritmo de regresión *Global Lowess* habiendo previamente sustraído la señal de fondo (*background*) con objeto de eliminar las contribuciones no biológicas a la señal. El proceso de normalización minimiza las diferencias de intensidad dentro de cada porta que pudieran ser debidas a variaciones locales en el resultado de la hibridación o el revelado o a las diferencias de intensidad de fluorescencia de distintos fluorocromos.

En este experimento, la cuantificación de la señal, con corrección de fondo *Normexp* con valor de compensación 10 (Ritchie *et al.*, 2007), fue normalizada por el “Exiqon miRNA Profiling Service”, usando el método “global Lowess” (*LOcally WEighted Scatterplot Smoothing*).

El efecto de la normalización se muestra en las figuras (4.1 y 4.2). Se observan las diferencias entre las emisiones de los dos fluorocromos y la desviación de los datos y que, tras la normalización, los gráficos de distribución de puntos de ambos fluorocromos son similares y más simétricos (Figura 4.1). La representación *box-plot* de las \log_2 ratios muestra también el efecto positivo de la normalización cuando se comparan unas muestras con otras, de forma que la media es 0 en todas las muestras y prácticamente todos los puntos se encuentran en el rango [-2,2].

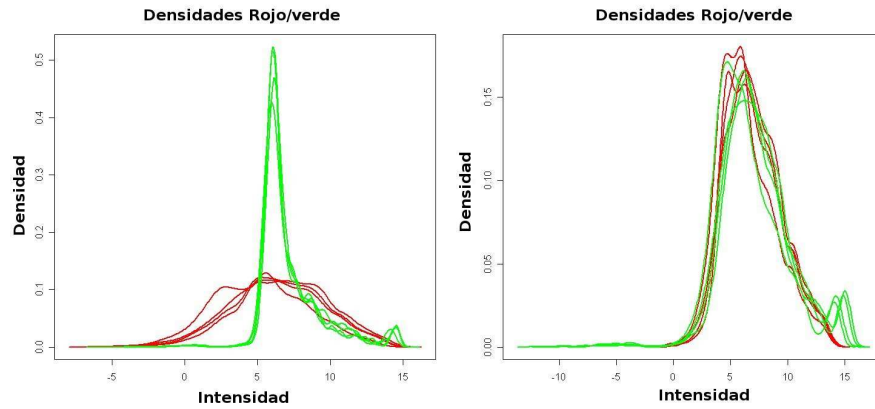


Figura 4.1: Microarrays: distribución de densidad de puntos: Los gráficos representan las densidades de puntos (eje Y) que muestran diferentes intensidades (eje X) en los *microarrays* correspondientes a las cuatro muestras analizadas. (Hy3: verde; Hy5: rojo). Se observa la diferente distribución y asimetría que muestran los datos antes de la normalización (izquierda), y la similitud y aumento de la simetría en todas las curvas después de la normalización (derecha)

4. Material y Métodos

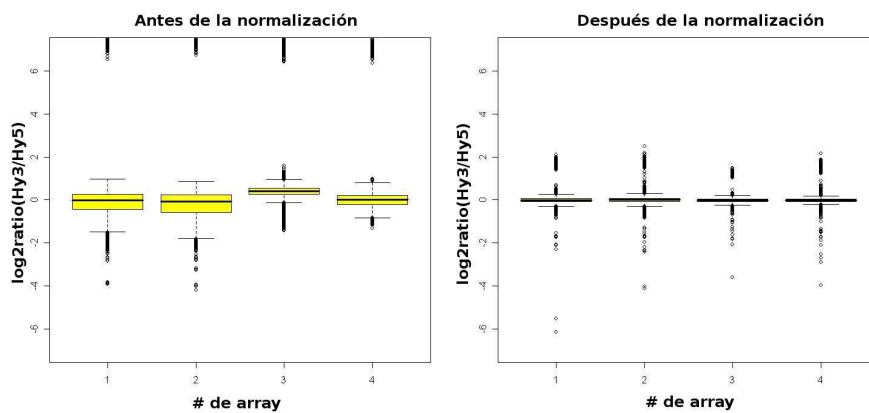


Figura 4.2: box-plot de las \log_2 ratios de las medianas: Representación *box-plot* de las señales de ambas sondas de captura en cada una de las cuatro muestras analizadas, antes (izquierda) y después (derecha) de la normalización. El *box-plot* muestra que la mayoría de las señales tienen valores similares en ambos canales (rojo y verde) ya que las \log_2 ratios de las medianas de las señales son próximas a 0. La línea dentro de cada caja indica el valor de la media. La caja señala los límites del percentil 25 (abajo) y 75 (arriba) las líneas horizontales a ambos lados de las cajas señalan los percentiles 5 (abajo) y 95 (arriba) Las señales que caen fuera de estos percentiles se representan como puntos individuales. Los puntos que se escapan de la mediana son los que indican expresión diferencial.

Validación de los datos del *microarray* de microRNAs

La validación de los datos del *microarray* se realizó en nuestro laboratorio mediante RT-PCR en tiempo real, para diferentes microRNAs seleccionados del total de los resultados obtenidos en el *array*. Para ello, usamos kits de amplificación específicos para cada microRNA, *Exiqon miRCURY LNA microRNA System*. Las reacciones se hicieron en un termociclador Chromo4 de BioRad, según el protocolo aconsejado en los kits de Exiqon, que será detallado más adelante. Se utilizó un test estadístico de regresión lineal para comparar las distribuciones de los valores obtenidos en el *microarray* con respecto a los valores de RT-Q-PCR.

4.2.3. Cultivos celulares y Transfecciones

Cultivos celulares primarios

Se realizaron disecciones de gónadas y de extremidades, según el caso, de embriones de ratón de 11.5 o 13.5 dpc, y se obtuvieron las células para su cultivo mediante disgregación, usando dos procedimientos distintos:

- **Disgregación mecánica.** Se agruparon gónadas del mismo sexo, en aproximadamente 50 μ l de medio y se disgregaron en un eppendorf de 1.5 ml con un pistilo apropiado para ese tubo (pistilos de un solo uso, VWR). Después se añadió más medio hasta alcanzar un volumen apropiado al cultivo que se iba a realizar en cada caso.
- **Disgregación enzimática.** Se agruparon gónadas del mismo sexo, o pequeños trozos de las extremidades, en una microplaca con 2 ml de solución de Hank y se trocearon en 3 ó 4 fragmentos. Posteriormente se añadieron 2 μ l de una solución de colagenasa A a 250 mg/ml (Sigma-Aldrich #C2674), y se incubaron durante 20 minutos a 37°C, agitando la placa cada 5 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron 2 ml de medio de cultivo DMEM para inactivar la enzima y se completó la disgregación del tejido mediante succión y expulsión de los fragmentos, usando una pipeta serológica de 10 ml. Cuando el tejido se hubo disgregado completamente se centrifugaron las células a 1 200 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en un volumen de medio apropiado según el cultivo que se fuese a realizar.

En cualquier caso, las células se incubaron a 37°C en una atmósfera estéril con 5 % de CO₂.

4. Material y Métodos

Procedimiento de subcultivo

- Los cultivos se resemebraron cuando se encontraban en estado subconfluyente (ocupando aproximadamente el 80 % de la superficie del cultivo). Para ello se utilizó el siguiente protocolo:
- Dar dos lavados con solución de Hank's para eliminar los restos de medio.
- Añadir tripsina-EDTA al 1× diluida en solución de Hank's (tripsina-EDTA 10×, Sigma-Aldrich T4174) en la menor cantidad posible con la que se consiga cubrir las células.
- Incubar hasta que las células se despeguen, observándolas en el microscopio invertido, pero no dejándolas más de 10 minutos.
- Una vez despegadas añadir medio de cultivo para inactivar la enzima.
- Dividir las células en 2 ó 3 frascos de cultivo estériles.

Congelación de los cultivos celulares

- Una vez tripsinizadas las células, resuspender en su medio de cultivo y centrifugar durante 5 minutos a 1 200 rpm.
- Resuspender las células en suero bovino fetal con DMSO al 5 % en ambiente estéril.
- Transferir las células a viales de congelación debidamente marcados. Congelar de forma gradual hasta -80°C. Posteriormente, transferir a un contenedor de nitrógeno líquido.

Descongelación de las células preservadas en nitrógeno líquido

La manipulación de los tubos debe realizarse con cuidado ya que ocasionalmente el tubo puede explotar con el aumento de temperatura.

- Poner el tubo a temperatura ambiente durante 1 minuto y transferirlo a un baño de agua a 37°C durante 1 ó 2 minutos, hasta que se descongele. No sumergir el tubo completamente.
- Limpiar el exterior del tubo con alcohol antes de abrirlo.

- Transferir todo el contenido a otro tubo estéril con el medio apropiado previamente calentado a 37°C. Centrifugar durante 5 minutos a 1 200 rpm.
- Resuspender las células en el volumen apropiado de medio de cultivo e incubar en tufa de CO₂.

Transfecciones de células eucarióticas

Transfecciones con lipofectamina 2000 La lipofectamina 2000 (*Lipofectamine 2000 Transfection Reagent, Invitrogen, #11668-027*) es un agente de transfección basado en una formulación de lípidos catiónicos que ofrece una alta eficiencia de transfección y altos niveles de expresión de proteínas en un amplio rango de líneas celulares. Los complejos formados, ácidos nucleicos-lipofectamina se pueden agregar directamente al medio de cultivo de las células en presencia o en ausencia de suero.

Procedimiento para transfectar células en placas de cultivo de 24 pocillos:

- Un día antes de la transfección, se sembraron las células en 500 μ l de medio sin antibióticos, de forma que en el momento de la transfección estaban entre el 30-50 % de confluencia. Una baja confluencia en el momento de transfección permite un intervalo de tiempo mayor entre el momento de la transfección y la realización del experimento, minimizando además la pérdida de viabilidad celular debida a sobrecrecimiento. A continuación se aplicó el siguiente protocolo:
- Preparar los complejos de transfección, para cada muestra, de la siguiente forma:
 - Diluir 100 pmol de sonda o 1 μ g de plásmido en 50 μ l de Opti-MEM I *Reduced Serum Medium* (Gibco #31985) sin suero. Mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
 - Diluir 1 μ l de lipofectamina 2000 en 50 μ l de Opti-MEM I. Mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
 - Mezclar ambas diluciones e incubarlas a temperatura ambiente durante 20 minutos, permitiendo la formación de los complejos.
- Añadir gota a gota 100 μ l de los complejos de transfección a las células en el medio de cultivo.

4. Material y Métodos

- Incubar las células a 37°C en un incubador de CO₂ al 5 % durante 24-96 horas dependiendo del tipo de experimento. Se puede cambiar el medio 6 horas después de la transfección.

Transfecciones realizadas utilizando el instrumento “Nucleofector” Para este tipo de transfecciones se utilizó el *Nucleofector II basic Device* (Lonza) de una sola cubeta, y como agente de transfección se usó el kit de Lonza: *Amaya Mouse ES Cell Nucleofector Kit*, (#VPH-1001).

Procedimiento:

- Tras la disgregación enzimática de los tejidos, centrifugar las células a 1 200 rpm durante 5 minutos.
- Resuspender las células en 100 μ l de la solución de nucleofección del kit y depositarlas en las cubetas estériles apropiadas para el aparato y proporcionadas por el kit.
- Introducir la cubeta en la máquina de nucleofección y elegir el programa de transfección correspondiente al kit, el A-033 en nuestro caso, y pulsar “OK” para que se realice la transfección.
- Recoger las células ya transfectadas con una pipeta pasteur de plástico estéril, también proporcionada por el kit, y sembrarlas en medio DMEM con antibióticos y suplementado al 10 % con suero bovino fetal.
- A las 4 horas se puede comprobar la eficiencia de la transfección y cambiar el medio, dejando el cultivo entre 24-96 horas, dependiendo del tipo de experimento.

Inhibición o sobre-expresión de microRNAs

Para realizar estos experimentos, se transfectaron los cultivos celulares primarios de gónadas o condrocitos con sondas LNA de inhibición para microRNAs, que antagonizan la acción un miRNA específico, llamándose comúnmente *antagomirs*, proporcionados por la empresa Exiqon. Los *antagomirs* utilizados están contenidos en el cuadro 4.2.

miRNA inhibido	secuencia	cc	modificación	Núm. Cat.
mmu-miR-124	5' -GGCATTACCCGCGTGCCTTA-3'	25 μ M	5'-Fite	139452-04
mmu-miR-144	5' -AGTACATCATCTATACTGTA-3'	25 μ M	5'-56-FAM	139464-04

Cuadro 4.2: Antagomirs utilizados para la inhibición de miRNAs.

4.2. Métodos

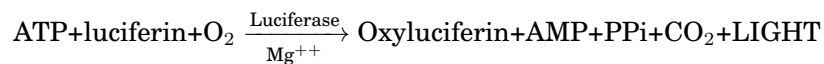
Por otro lado, en los experimentos de sobre-expresión se transfectaron los cultivos celulares con plásmidos que llevan incorporada la secuencia del precursor del miRNA en cuestión y un gen chivato (GFP, *green fluorescent protein*), reactivos que fueron suministrados por la empresa GeneCopoeia. Los miRNAs que sobre-expresan estos plásmidos están indicados en el cuadro 4.3.

miRNA sobre-expresado	secuencia miRNA maduro	Núm. Cat.
mmu-miR-124-2	5' -UAAGGCACGCGGUGAAUGCC-3'	MmiR3282-MR04
mmu-miR-144	5' -UACAGUAUAGAUGAUGUACU-3'	MmiR3436-MR04
<i>scrambled</i>		CmiR0001-MR04

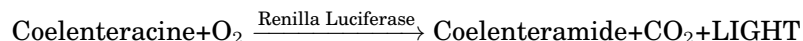
Cuadro 4.3: Plásmidos utilizados para la sobre-expresión de miRNAs.

Ensayos de luciferasa

El sistema de gen chivato de la luciferasa se considera ideal para estudiar tanto la actividad de los promotores como la función reguladora post-transcripcional de las regiones UTR 3'. Se trata de una enzima monomérica citoplasmática de un peso molecular aproximado de 61 kDa que cataliza la oxidación de la *luciferina* y emite luz alrededor de los 560 nm (de Wet *et al.*, 1985), catalizando las siguientes reacciones:



La intensidad de la emisión de la luz es directamente proporcional a la cantidad de luciferasa y la luminiscencia generada se puede medir en un luminómetro. En estos experimentos se utiliza también otra luciferasa, la de renilla (*Renilla reniformis*, un tipo de cnidario conocido también como pensamiento de mar). La proteína tiene 36 kDa y también es monomérica. Su expresión no requiere procesamiento post-transcripcional, funcionando como gen chivato activo inmediatamente después de la traducción. Puesto que la luz emitida en estos experimentos por la luciferasa de renilla es constante, se utiliza para normalizar las lecturas obtenidas con la luciferasa de luciérnaga, evitando así el error derivado de las variaciones entre el número de células presentes en distintos pocillos. La luciferasa de renilla oxida la *coelenteracina* y emite luz alrededor de los 480 nm (Matthews *et al.*, 1977), catalizando la siguiente reacción:



El kit de GeneCopoeia que hemos utilizado está diseñado para optimizar las diferencias en cuanto a estructura enzimática y sustrato, de

4. Material y Métodos

Vector	Núm. Cat.
pEZX-MTO1 - 3' UTR de RSPO1	MmiT037931-MT01
pEZX-MTO1 - Control	CmiT000001-MT01
PLuc - 3' UTR Sox9	Lab. Dr. Lovell-Badge

Cuadro 4.4: Vectores de expresión de extremos 3' UTR de genes codificantes.

manera que permite la medida de la luciferasa de los dos sistemas, luciérnaga y renilla, de una forma secuencial y simple. La solución de trabajo I, combinada con el sustrato I, tiene todos los componentes necesarios para la lisis celular y además el sustrato y los estabilizadores para la reacción de la luciferasa de la luciérnaga en una sola solución. A continuación un segundo sustrato (II) apaga la luciferasa de la luciérnaga y, simultáneamente, excita la luminiscencia de la luciferasa de renilla, que es medida en segundo lugar en cada pocillo.

Vectores utilizados: Se utilizaron clones de expresión de secuencias diana 3' UTR para microRNAs que se encuentran recogidos en el cuadro 4.4.

Estos vectores usan el gen chivato de la luciferasa de la luciérnaga bajo el control del promotor SV40 y el gen calibrador de la luciferasa de la renilla bajo el control del promotor CMV. La expresión de la luciferasa de la luciérnaga está regulada por la unión del microRNA a su secuencia diana en el extremo 3' UTR, y la actividad luciferasa es cuantificada en un ensayo colorimétrico.

Por otro lado se usaron los vectores de expresión de los miRNAs mmu-miR-144 y mmu-miR-124, también de GeneCopoeia, descritos anteriormente.

Los constructos génicos para la expresión de precursores de miRNAs incluyen el promotor de CMV, que activa la transcripción del precursor en bucle del miRNA en cuestión (150 nucleótidos, aproximadamente). Este precursor del miRNA es entonces procesado generando el miRNA maduro. El gen chivato, eGFP (*green fluorescent protein*), es co-expresado junto con el precursor del miRNA. Este vector de expresión también tiene un marcador de selección para su clonación, el gen de la resistencia a ampicilina.

Procedimiento de los ensayos de luciferasa:

La línea celular elegida fue HEK293 (*human embryonic kidney*), suministrada por la unidad de Cultivos de Tejidos y Células del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Las células fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con 10 % de suero

4.2. Métodos

bovino fetal, con subcultivos cada dos días tras la disgregación de la monocapa mediante un pretratamiento con EDTA-tripsina 1×.

Durante el experimento de transfección las células se cultivaron en placas de cultivo de 24 pocillos (Corning Incorporated). Como agente de transfección se utilizó Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y las medidas de luciferasa se hicieron en placas blancas de tapa transparente de 96 pocillos (Nunc). El procedimiento fue el siguiente:

- Un día antes de la transfección se agregaron a cada pocillo, 10^4 células en 1 ml de medio DMEM suplementado con 10 % de suero bovino fetal y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5 % de CO_2 durante 24 h, hasta que alcanzaron una confluencia del 70-90 %.
- Entonces se les cambio el medio de cultivo, por $500\ \mu\text{l}$ de medio fresco y se agregó a cada pocillo $100\ \mu\text{l}$ de la reacción de transfección.
- Las reacciones se prepararon por separado, utilizando $1\ \mu\text{g}$ de plásmido en $50\ \mu\text{l}$ de medio OptiMEM, y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- El reactivo de transfección se preparó con $50\ \mu\text{l}$ de medio OptiMEM y $1.5\ \mu\text{l}$ del agente de transfección para cada pocillo y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Después de esta primera incubación, se añadieron $51.5\ \mu\text{l}$ del tubo con el agente de transfección a cada tubo que contenía los plásmidos y se incubaron nuevamente a temperatura ambiente, durante 20 minutos para permitir la formación del complejo.
- Cada una de las reacciones de transfección se agregaron, gota a gota, al pocillo correspondiente de la placa y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5 % de CO_2 durante 18 h. Transcurrido ese tiempo se comprobó la eficiencia de transfección mediante la visualización de la fluorescencia GFP en un microscopio de fluorescencia (Nikon).
- Se cambio el medio por otro fresco y se incubaron las células durante 24 horas más antes de realizar la medida de las luciferasas.

Medición de la actividad luciferasa:

- Descongelar a temperatura ambiente las soluciones y los sustratos, y preparar las soluciones de trabajo. La solución de trabajo I lleva el tampón de lisis y el sustrato para la luciferasa de la luciérnaga. La solución de trabajo II lleva el reactivo que apaga la luciferasa de la luciérnaga y el sustrato para la luciferasa de la renilla.

4. Material y Métodos

- Diluir el sustrato I 1:1000 en un volumen apropiado de solución I.
- Preparar la solución II de igual modo, diluyendo el sustrato II 1:1000 en la solución II.
- Retirar el medio de las placas y añadir 100 μ l la solución de trabajo I que lisa las células.
- Recoger con una pipeta el lisado y depositarlo en la placa de 96 pocillos.
- Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y medir la luminiscencia de luciérnaga.
- Añadir 100 μ l de la solución de trabajo II a cada pocillo que contiene 100 μ l de la solución I.
- Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y medir la luminiscencia de renila.

Las mediciones de luminiscencia se hicieron con un luminómetro *Tecan's Infinite M 200 multimode reader*.

4.2.4. Métodos de análisis molecular

Extracción de RNA total

Para esta técnica se ha utilizado el reactivo "Quiazol Lysis Reagent" (QIAGEN, Valencia, #79306) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante, con algunas modificaciones:

- Esterilizar el material que se va a usar para homogeneizar con NaOH 0.5 M durante 10 minutos y lavarlo con H₂O DEPC.
- Sacar la muestra del contenedor de N₂ líquido. Actuar con rapidez para evitar degradación.
- Transferir el material a un tubo libre de RNAsa y añadir rápidamente 1 ml de "Quiazol Lysis Reagent". El volumen de "Quiazol Lysis Reagent" no debe exceder el 10 % del volumen de la muestra.
- Homogeneizar hasta una total disrupción del tejido, centrifugar y pasar por una aguja de insulina repetidas veces. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente para que se disocien las nucleoproteínas.
- Añadir 200 μ l de Cloroformo. Aplicar e incubar 2-3 minutos a temperatura ambiente.

4.2. Métodos

- Centrifugar a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. Separar la fase acuosa cuidadosamente para no contaminar con proteínas de la interfase.
- Añadir 0.5 ml de Isopropanol y 1 μ l de Glicógeno (*carrier* para precipitar muestras pequeñas). Vortex e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12000 g durante 10 minutos a 4°C. Eliminar la fase acuosa sin provocar disrupción en el sedimento.
- Añadir 1 ml de etanol 75 % preparado con H₂O libre de nucleasas.
- Centrifugar a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. Eliminar todo el etanol posible con una pipeta sin remover el sedimento.
- Secar al aire durante 10 minutos.
- Resuspender mediante suave pipeteo en un volumen apropiado de H₂O libre de nucleasas e incubar durante 10 minutos 60°C aplicando vortex cada 3 minutos.
- Medir la concentración en un instrumento Nanodrop o similar.
- Realizar una electroforesis en gel agarosa al 1 %, cargando aproximadamente 0.5 μ g de RNA y comprobar que existen dos bandas de ribosómico, cuya observación es un indicador de que el RNA no se encuentra degradado.

RT-Q-PCR de genes codificantes

Tratamiento con DNasa Mediante este tratamiento se elimina cualquier traza de DNA genómico que haya podido contaminar la muestra de RNA total durante su extracción. La reacción se llevó a cabo utilizando “DNase I Amplification Grade” (Invitrogen, Carlsbad, USA #18068-015) según el protocolo proporcionado por el fabricante:

- Mezclar lo siguiente:
 - RNA: 8 μ l
 - 10 \times DNase I Reaction Buffer: 1 μ l
 - DNase I: 1 μ l
- Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 1 μ l de 25 mM EDTA. Incubar durante 10 minutos a 65 °C.
- Proceder inmediatamente con la reacción de transcripción inversa o almacenar a -20 °C hasta su uso.

4. Material y Métodos

Reacción de transcripción inversa Para llevar a cabo esta reacción se utilizó el kit “SuperScript First-Strand Syntesis System” (Invitrogen #18064022)

- Mezclar lo siguiente:
 - Cebadores aleatorios (*Random primers*) (50 ng/ μ l): 1 μ l
 - RNA: 10 μ l
 - dNTP Mix (10 mM cada uno): 1 μ l
- Incubar durante 5 minutos a 65 °C y enfriar en hielo.
- Añadir a la mezcla lo siguiente:
 - 5× *First-Strand Buffer*: 4 μ l
 - 0.1 M DTT: 2 μ l
 - RNaseOut: 1 μ l
- Incubar durante 2 minutos 25 °C.
- Añadir 1 μ l de SuperScript II RT y mezclar pipeteando.
- Incubar durante 10 minutos a 25 °C.
- Incubar durante 50 minutos a 42 °C.
- Inactivar la reacción incubando durante 15 minutos a 70 °C.
- Almacenar a -20 °C hasta su uso.

Diseño de cebadores para RT-Q-PCR La elección de los cebadores se llevó a cabo introduciendo la secuencia del gen que se deseaba amplificar en el programa “eprimer3”, un interfaz del programa “primer3” del Instituto Whitehead. En la medida de lo posible, se intentó elegir cebadores que se encontraran en diferentes exones del gen, para evitar así que hubiera amplificación a partir del DNA genómico que, eventualmente, pudiera estar contaminando la muestra. La síntesis de los cebadores fue llevada a cabo por la empresa Biomers.net. Los cebadores utilizados están recogidos en el cuadro 4.5.

4.2. Métodos

Gen amplificado	Cebadores
<i>Gapdh</i>	F: GGCATTGCTCTCAATGACAA R: TGTGAGGGAGATGCTCAGTG
<i>Sox9</i>	F: CGGAGGAAGTCGGTGAAGA R: GTCGGTTTTGGGAGTGGTG
<i>Rspo1</i>	F: AAGAGACCCGCAAGTGTACC R: GATGTGAGTGGCCCTGTTGT

Cuadro 4.5: Cebadores utilizados en la RT-Q-PCR para Genes Codificantes

H

Reactivo	Volumen
Sensimix 2×	5 μ l
<i>Forward primer</i> (10 pmol/ μ l)	0.2 μ l
<i>Reverse primer</i> (10 pmol/ μ l)	0.2 μ l
cDNA	4 μ l
H ₂ O libre de nucleasas	0.6 μ l

PCR cuantitativa en tiempo real (RT-Q-PCR) Tras la síntesis de cDNA, se realizó la cuantificación de diversos genes utilizando un termociclador *Chromo 4 Real-Time PCR Detection System* (BIO-RAD, USA) utilizando SensiMix dt kit (Quantace, Reino Unido #QT605-02).

- Condiciones de la reacción:
- Programa del termociclador:

La identidad de los fragmentos amplificados se comprobó mediante secuenciación, curva de desnaturalización y electroforesis en gel de

H

95°C	10 min
95 °C	15 seg
60 °C (40 ciclos)	15 seg
72 °C	15 seg
Lectura de placa	
72 °C	5 min
Curva de fusión desde 72 °C \Rightarrow 94 °C con lectura de 1 °C cada 1 segundo	
4°C	∞

4. Material y Métodos

agarosa 1.5 %. La eficiencia de la amplificación para cada pareja de cebadores se comprobó mediante la elaboración de una curva estándar con diluciones seriadas de cDNA. El valor de la eficiencia de amplificación (E) se calculó utilizando el valor de pendiente de la curva estándar (m) según la siguiente ecuación:

$$\Delta E = 1 - 10^{-1/m}$$

El tanto por ciento de eficiencia se calculó según la siguiente fórmula:

$$\%Eficiencia = (E - 1) \times 100$$

Sólo se utilizaron cebadores con una eficiencia de amplificación 90 %-105 %.

Los niveles de expresión de los genes se calcularon mediante el método ΔCT , utilizando como gen de referencia, *Gapdh*. Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la expresión relativa de cada gen con respecto al gen de referencia, donde el término “reference” se refiere a la *Gapdh* y “target” al gen objetivo de estudio:

$$\Delta CT = 2^{CT_{(reference)} - CT_{(target)}}$$

Los valores obtenidos se estandarizaron dividiéndolos entre el menor valor de expresión dentro de las diferentes muestras.

Electroforesis en gel de agarosa La electroforesis en gel de agarosa se realizó mediante el sistema estándar de electroforesis sumergida en gel (Sharp *et al.*, 1973). Los fragmentos de DNA se separaron en función de su tamaño utilizando geles de agarosa al 1.5 % en tampón TAE aplicando una corriente de 5 V/cm.

Secuenciación de DNA La secuenciación de DNA se llevó a cabo utilizando “Big DYE Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems, USA #4337454). La reacción llevada a cabo fue la siguiente:

- Mezclar los siguientes componentes:
 - Primers específicos (3.2 μM): 1 μl
 - Premix: 3 μl
 - Tampón 5 \times : 2 ó 4 μl

H

94°C	3 min
96 °C	10 seg
50 °C (25 ciclos)	20 seg
60 °C	4 min
4°C	∞

- DNA: 100 ng de producto de PCR
- H₂O ultrapura: hasta un volumen final de 10 ó 20 μ l
- Realizar una amplificación lineal en un termociclador según el siguiente programa:
- Purificación con acetato sódico y etanol:
 - A 20 μ l de la reacción de secuenciación, añadir 80 μ l de la siguiente mezcla y agitar en un vortex:
 - Etanol 95 %: 62.5 μ l
 - 3 M NaAc pH 4.6: 3 μ l
 - H₂O ultrapura: 14.5 μ l
 - Incubar 15 minutos a temperatura ambiente
 - Centrifugar 30 minutos a 14 000 rpm a 4 °C. Eliminar sobrenadante.
 - Añadir 250 μ l de etanol 70 % a -20 °C. Centrifugar 20 minutos a 14 000 rpm a 4 °C.
 - Eliminar todo el etanol para que no interfiera con reacciones posteriores.
 - Secar el precipitado a 37 °C durante 15 minutos o hasta que se seque completamente.
 - Se puede almacenar a -20 °C hasta un año.
- Añadir 20 μ l de formamida y resuspender.
- Cargar la muestra en el secuenciador.

RT-Q-PCR para microRNAs

Se usaron tres tipos de kits comerciales para amplificar los diferentes microRNAs.

4. Material y Métodos

Para la validación del *microarray* se usaron kits comerciales de amplificación específicos para cada microRNA, de la empresa *Exiqon miRCURY LNA microRNA System*. Un ácido nucléico bloqueado, “LNA” (*Locked Nucleic Acid*), es un ácido nucléico restringido en el cual el anillo de la ribosa está “bloqueado” con un puente de metileno entre el segundo átomo de oxígeno (2'-O) y el cuarto átomo de carbono (4'-C). La incorporación de LNA en una de las hebras del dúplex incrementa la temperatura de desnaturalización de la molécula en 2-8°C por cada monómero de LNA.

Para amplificar un microRNA específico se utilizó un conjunto de dos cebadores específicos, suministrados igualmente por la empresa *Exiqon (miRCURY LNA microRNA primer set)*, uno para la reacción de retro-transcripción y otro para la reacción de amplificación. La amplificación se lleva a cabo según el método que se observa en la figura 4.3. En las amplificaciones para validar el *microarray* se utilizaron varios miRNAs escogidos del total de los obtenidos, y un control de referencia, que en este caso fue el RNA nuclear pequeño no codificante, U6. Los miRNAs utilizados quedan recogidos en el cuadro 4.6

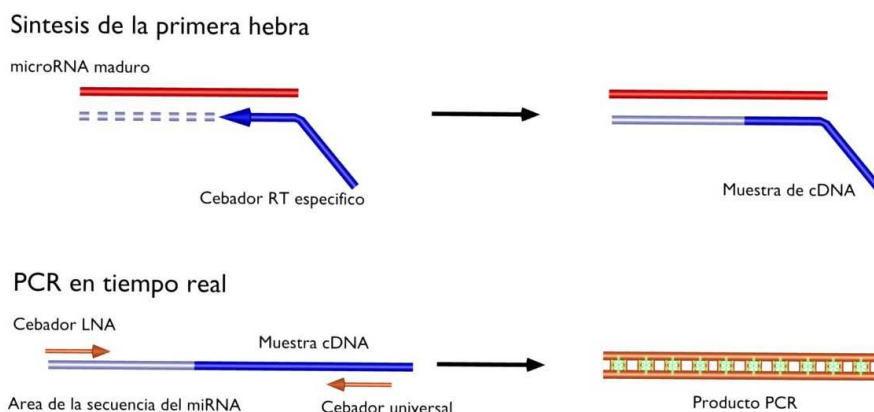


Figura 4.3: RT-Q-PCR miRNAs, *Exiqon miRCURY LNA microRNA System*.

En el primer paso, un cebador reverso específico para un determinado miRNA da lugar a la síntesis de la primera hebra de cDNA específico para ese miRNA, usando una transcriptasa inversa. En el segundo paso, el cDNA sirve como molde para la amplificación por PCR, usando un cebador de LNA específico y un cebador universal. La cuantificación se realiza mediante *SYBR Green*, representados por asteriscos verdes.

4.2. Métodos

miRNA amplificado	Cebadores utilizados	Núm. Cat.
mmu-snRNA-U6	snRNA-U6	201510
mmu-miR-103	hsa-miR-103	202023
mmu-miR-135a	hsa-miR-135a	202033
mmu-miR-96	hsa-miR-96	202103
mmu-miR-126-5p	hsa-miR-126	202141
mmu-miR-183	hsa-miR-183	202166
mmu-miR-193	hsa-miR-193a-3p	202172
mmu-miR-202-5p	mmu-miR-202-5p	202180
mmu-miR-182	mmu-miR-182	202760

Cuadro 4.6: Cebadores utilizados para la RT-Q-PCR de miRNAs en la validación del *microarray*

4. Material y Métodos

Síntesis de la primera hebra de cDNA Se realizó usando el kit miRCURY First-strand cDNA synthesis kit (Exiqon #201100), el cebador específico para cada miRNA y el cebador control, suministrados igualmente por la empresa Exiqon (miRCURY LNA microRNA primer set).

Procedimiento:

- Diluir la muestra de RNA hasta una concentración de 1-10 ng en 4.5 μl de agua libre de nucleasas.
- Preparar la reacción mezclando los siguientes componentes:
 - Tampón 5 \times de la reacción: 2 μl
 - Cebador miR-específico o control-específico: 2 μl
 - dNTP mix (10 mM): 0.5 μl
 - RNase inhibidor (20 U/ μl): 0.5 μl
 - Reverse transcriptase (40 U/ μl): 0.5 μl
- Mezclar los 4.5 μl del RNA con los 5.5 μl de la reacción, teniendo un volumen final de reacción de 10 μl .
- Poner los tubos en el termociclador con el siguiente programa:
 - 50°C \Rightarrow 30 min.
 - 85°C \Rightarrow 10 min.
- El cDNA resultante puede amplificarse inmediatamente, guardarse a 4°C por cortos períodos de tiempo o almacenarlo a -20°C.

Amplificación por PCR en tiempo real Se utilizó el kit miRCURY LNA SYBR Green master mix (Exiqon #201000).

Procedimiento:

- Diluir el cDNA 1:10 en agua libre de nucleasas en un volumen total de 4 μl para cada reacción.
- Preparar la reacción mezclando los siguientes componentes:
 - SYBR Green master mix 2 \times : 10 μl
 - Cebador LNA PCR miR-específico o control-específico: 1 μl
 - Cebador PCR universal: 1 μl
 - H₂O: 4 μl
- Mezclar los 4 μl de la dilución del cDNA con los 16 μl de la reacción, teniendo un volumen final de 20 μl .
- Poner los tubos en el termociclador con el siguiente programa:

H

95°C	10 min
95 °C	10 seg
60 °C (40 ciclos)	20 seg
72 °C	15 seg
Lectura de placa	
Curva de fusión desde 72 °C ⇒ 94 °C con lectura de 1 °C cada 1 segundo	
4°C	∞

miRNA amplificado	Cebadores Q-PCR	Núm. Cat.
mmu-miR-144	hsa-miR-144	#204754
snRNA-U6	hsa,mmu U6 snRNA	#203907

Cuadro 4.7: Cebadores utilizados en la RT-Q-PCR para el miR-144.

Amplificación de miR-144 Para la amplificación del mmu-miR-144 se utilizaron los kits de última generación de Exiqon, *miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR*. Estos kits incorporan una serie de ventajas:

- La reacción de retro-transcripción es universal, proporcionando muestra de cDNA para amplificar todos los microRNAs. De esta forma se ahorra muestra, reduce las variaciones técnicas y ahorra tiempo en el laboratorio.
- La reacción de PCR se realiza con ambos cebadores, reverso y directo, específicos para el microRNA que queremos amplificar y optimizados con LNA, lo que proporciona más sensibilidad, menos ruido de fondo y una cuantificación más precisa, ya que permite una buena discriminación entre secuencias de miRNAs muy parecidas.

En la figura 4.4 podemos observar un esquema de este nuevo método de amplificación, y el cuadro 4.7 recoge los cebadores utilizados.

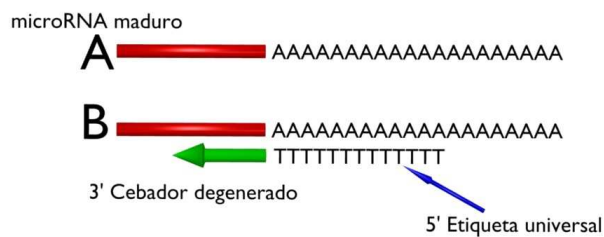
Síntesis de la primera hebra de cDNA Se realizó usando el kit *Universal cDNA synthesis kit* (Exiqon #203300).

Procedimiento:

- Diluir la muestra de RNA a una concentración de 5 ng/ μ l y cargar 4 μ l, pudiendo utilizar hasta 200 ng en total en la reacción de retrotranscripción para algunos miRNAs expresados débilmente.

4. Material y Métodos

Síntesis de cDNA



PCR en tiempo real

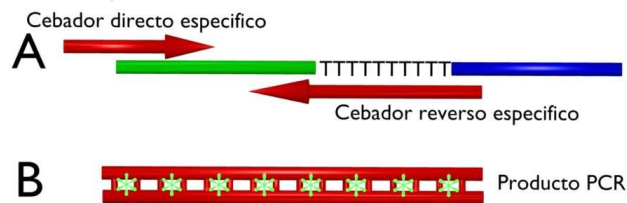


Figura 4.4: RT-Q-PCR miRNAS, miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR. En el primer paso, se añade una cola de poliA al miRNA maduro y se sintetiza el cDNA usando un cebador poliT con un anclaje degenerado en 3' y una etiqueta en 5'. En un segundo paso, la muestra de cDNA es amplificada usando cebadores de LNA específicos para un determinado miRNA. La cuantificación se realiza mediante SYBR Green, representado por asteriscos verdes.

4.2. Métodos

- Preparar la reacción mezclando los siguientes componentes:
 - Tampón 5× de la reacción: 4 μ l
 - Agua libre de nucleasas: 10 μ l
 - Enzima: 2 μ l
- Mezclar los 4 μ l del RNA con los 16 μ l de la reacción, teniendo un volumen final de reacción de 20 μ l.
- Poner los tubos en el termociclador con el siguiente programa:
 - 42°C \Rightarrow 60 min.
 - 95°C \Rightarrow 5 min.
- El cDNA resultante puede amplificarse inmediatamente, guardarse a 4°C por cortos períodos de tiempo o almacenarlo a -20°C.

Amplificación por PCR en tiempo real Se utilizó el kit *SYBR Green master mix, Universal RT* (Exiqon #203450).

Procedimiento:

- Diluir el cDNA 1:80 en agua libre de nucleasas en un volumen total de 8 μ l para cada reacción.
- Preparar la reacción mezclando los siguientes componentes:
 - *SYBR Green* master mix 2×: 10 μ l
 - PCR primer mix: 2 μ l
- Mezclar los 8 μ l de la dilución del cDNA con los 12 μ l de la reacción, teniendo un volumen final de 20 μ l.
- Poner los tubos en el termociclador con el siguiente programa:

Amplificación de miR-124 En el caso de la validación del miR-124, la empresa Exiqon no disponía de kits específicos para la amplificación de dicho miRNA, así que se utilizaron los kits de *Applied Biosystems*, según los protocolos del proveedor. Estos kits también usan cebadores específicos para amplificar cada miRNA, tanto en la reacción de transcripción inversa como en la de amplificación por PCR, con la diferencia de que los cebadores para la PCR llevan incorporada una sonda TaqMan con el fluorocromo FAM, en lugar de *SYBR Green*. El método de amplificación está esquematizado en la figura 4.5, y los cebadores utilizados están recogidos en el cuadro 4.8

4. Material y Métodos

H

95°C	10	min
95 °C	10	seg
60 °C (40 ciclos)	1	min
Lectura de placa		
Curva de fusión ⇒ 94 °C		
con lectura de 1 °C cada 1 segundo		
4°C	∞	

Síntesis de cDNA en bucle

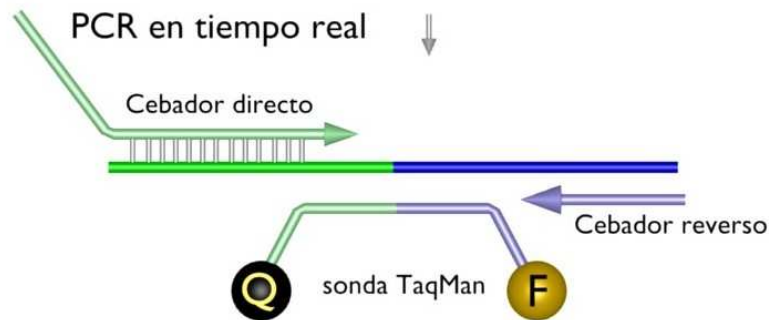
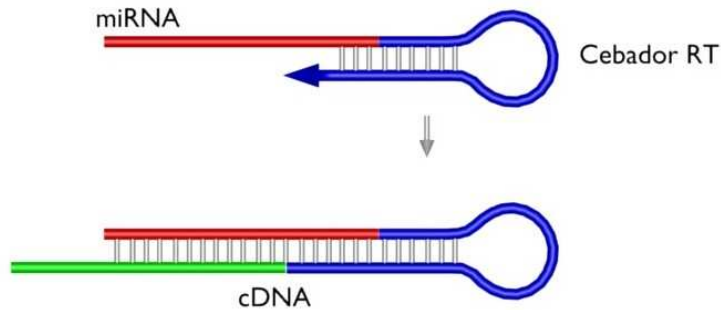


Figura 4.5: RT-Q-PCR, TaqMan microRNA assays En el primer paso, un cebador en bucle específico para un determinado miRNA da lugar a la síntesis de la primera hebra de cDNA específico para ese miRNA, usando una transcriptasa inversa. En el segundo paso, el cDNA sirve como molde para una amplificación por PCR, usando un cebador directo específico del miRNA, un cebador directo universal y una sonda TaqMan convencional pero específica del miRNA en cuestión.

4.2. Métodos

miRNA amplificado	Cebadores	Num. Cat.
mmu-miR-124	5× RT primer	#1093
	20× real time primer	#1093
snRNA-U6	5× RT primer	#1182
	20× real time primer	#1182

Cuadro 4.8: Cebadores utilizados en la RT-Q-PCR para miR-124.

Síntesis de la primera hebra de cDNA Se utilizó el kit específico *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* de *Applied Biosystems*, (#PN 4366597).

Procedimiento

- Diluir 1-10 ng de la muestra de RNA en 5 μl de agua libre de nucleasas.
- Preparar la reacción mezclando los siguientes componentes:
 - Tampón 10× de la reacción: 1.5 μl
 - Cebador miR-específico o control-específico (5×): 3 μl
 - dNTP mix (100 mM): 0.15 μl
 - Inhibidor de RNasa (20 U/ μl): 0.19 μl
 - Enzima *Multiscribe RT* (50 U/ μl): 1 μl
- Mezclar los 5 μl del RNA con los 12 μl de la reacción, obteniendo un volumen final de reacción de 15 μl .
- Incubar los tubos en hielo durante 5 minutos.
- Poner los tubos en el termociclador con el siguiente programa:
 - 16°C \Rightarrow 30 min
 - 42°C \Rightarrow 30 min
 - 85°C \Rightarrow 5 min
 - 4°C \Rightarrow ∞
- El cDNA resultante puede amplificarse inmediatamente, guardarse a 4°C por cortos períodos de tiempo o almacenarlo a -20°C.

Tras la síntesis del cDNA, se realizó la cuantificación de diversos genes utilizando un termociclador *Chromo 4 Real-Time PCR Detection System* (BIO-RAD, USA) utilizando el kit de *SensiMix sin SYBR Green* (Quantace, Reino Unido #BIO-91002). Para llevar a cabo la reacción, se mezclaron los siguientes componentes:

4. Material y Métodos

H

95°C	10 min
95 °C	15 seg
60 °C (40 ciclos)	15 seg
Lectura de la placa	
72°C	5 min
Curva de fusión desde 72 °C ⇒ 94 °C con lectura de 1 °C cada 1 segundo	
4°C	∞

- *Sensimix* 2×: 5 μ l
- Cebador directo (20×): 0.5 μ l
- Cebador inverso (20×): 0.5 μ l
- cDNA: 4 μ l
- H₂O libre de nucleasas: 0.6 μ l

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Para la detección de los tres tipos de precursores de miR-124 se diseñaron parejas de cebadores específicos. La secuencia de estos cebadores no corresponde en varios de ellos con las secuencias originales de los precursores en toda su longitud. El pequeño tamaño de estos precursores deja poco margen a la hora de seleccionar parejas de cebadores compatibles por lo que el diseño de los mismos ha procurado mantener un tramo en 3' con secuencias complementarias a los precursores, mientras que la secuencia en 5' ha sido manipulada en algunos de ellos para garantizar la compatibilidad de los cebadores, una temperatura de hibridación suficientemente alta, y manteniendo además la especificidad de los mismos. Los cebadores utilizados están recogidos en el cuadro 4.9. Se utilizó cDNA sintetizado con *Ramdon primers* a partir de RNA total y el protocolo de amplificación fue el mismo que para genes codificantes de proteínas, a excepción de la temperatura de fusión que fue de 57 °C para las tres parejas de cebadores.

Hibridación *in situ* de microRNAs sobre criosecciones

Las hibridaciones *in situ* se realizaron con sondas de oligonucleótidos LNA suministradas por la empresa Exiqon (Cuadro 4.10). Las modificaciones de LNA hacen que sean sondas altamente específicas y mucho más sensibles. Dichas sondas fueron diseñadas a partir de las secuencias anotadas en la base de datos de miRBase.

4.2. Métodos

Gen	Cebadores
<i>mmu-mir-124-1</i>	F: GCCTCTCTCTCCGTGT R: CCATTCTTGGCATTCA
<i>mmu-mir-124-2</i>	F: AGAGACTCTGCTCTCCGTGT R: CTCCGCTCTTGGCATTCA
<i>mmu-mir-124-3</i>	F: GGCTGCGTGTTACACAG R: ATCCCGCGTGCCTTA

Cuadro 4.9: Cebadores para la amplificación de los tres precursores de miR-124

miRNA detectado	Sonda utilizada 5'-3' LNA	Modificación	CC	Núm. Cat.
mmu-miR-124	CTTGGCATTACCGCGTGCCTTA	5'-DIG	25 μ M	33007-01
mmu-miR-144	AGTACATCATCTATACTGTA	5'-DIG	25 μ M	38516-01

Cuadro 4.10: Sondas utilizadas en la hibridación *in situ*

4. Material y Métodos

Procedimiento

- Utilizar preparaciones de piezas cortadas en el mismo día o bien que se hayan almacenado a -80°C .
- Secar las preparaciones al aire durante 20 minutos al menos, pero no más de 3 horas.
- Post-fijar con formaldehído al 4 % en PBS 1 \times durante 10 minutos a 4°C .
- Dar 3 lavados de 5 minutos con PBS 1 \times .
- Acetilar durante 10 minutos:
 - 2.33 ml de trietanolamina.
 - 500 μl de acético anhidro.
 - completar con agua destilada hasta 200 ml.
- Dar 3 lavados de 5 minutos con PBS 1 \times .
- Añadir 0.33 μl de sonda (25 μM) por cada 100 μl de tampón de hibridación.
 - 50 % formamida desionizada
 - NaCl 0.3 M
 - Tris-HCl 20 mM, pH 8
 - EDTA 5 mM
 - NaPO₄ 10 mM, pH 8 (93.2 ml Na₂HPO₄ 1M + 6.8 ml NaH₂PO₄ 1M)
 - Sulfato de dextrano 10 %
 - Solución de *Denhardt* 1 \times
 - tRNA de levadura 0.5 mg/ml
 - Almacenar en alícuotas a -80°C
- Calentar el tampón de hibridación con la sonda a 65°C durante 5 minutos para linealizar la sonda y enfriar en hielo durante 1 minuto.
- Añadir 100 μl de la mezcla de hibridación a cada muestra, extender y cubrir con un rectángulo de *Parafilm* recortado con el tamaño de un portaobjetos.
- Incubar las preparaciones toda la noche a una temperatura entre 20 y 22°C menos que la temperatura de desnaturalización de la sonda, utilizando para la incubación una cámara húmeda que contenga 50 % formamida y 1 \times SSC.

4.2. Métodos

- Lavar las preparaciones en 5×SSC a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Dar dos lavados de 30 minutos a la temperatura de incubación con 50 % formamida, 0.1 % de Tween-20 y 1×SSC.
- Lavar con 20×SSC a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Lavar con PBS 1× a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Incubar las preparaciones con solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente:
 - 0.5 % leche en polvo
 - 10 % suero de cabra inactivado por calor (inactivación a 70°C durante 30 minutos).
 - 0.1 % tween-20.
 - PBS 1×
- Incubar durante 2-3 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-DIG marcado con fosfatasa alcalina (dilución 1:1000 - Roche #11093274910) preincubado 1 hora en solución de bloqueo.
- Dar dos lavados de 20 minutos con PBT (PBS 1× con Tween20 0,1 %) a temperatura ambiente.
- Lavar 10 minutos a temperatura ambiente con NTMT a pH 9.5:
 - NaCl 5 M
 - Tris 2 M ph 9.5
 - MgCl 1 M
 - Tween-20 0.1 %
- Incubar a temperatura ambiente con 200 μ l de la solución de sustrato:
 - 1.5 ml de BM Purple AP Substrate, precipitating (Roche #11442074001)
 - 1.5 μ l de Tween-20
 - 15 μ l de levamisole 200 mM
- Incubar durante varios días cambiando el sustrato 1 o 2 veces al día hasta que la intensidad de tinción sea la deseada. Parar la reacción con la solución de *stop* (PBS pH 5.5, EDTA 1mM)
- Montar las preparaciones en glicerol al 50 %.
- Observar las preparaciones en un microscopio de campo claro.

4. Material y Métodos

Amplificación de plásmidos

Preparación de bacterias competentes. Las bacterias a las que se les introdujo el vector pertenecían a la cepa XL1-Blue MRF de *Escherichia coli*. La cepa se preparo de la siguiente manera:

- Sembrar una placa de medio mínimo M9 con bacterias XL1-Blue MRF' procedentes de un stock glicerolado. Incubar toda la noche a 37 °C.
- Aislar una colonia y transferirla a un tubo que contenga 5 ml de medio LB líquido. Incubar toda la noche a 37 °C con agitación.
- Añadir 400 μ l del cultivo anterior a 40 ml de medio LB líquido. Incubar a 37 °C con agitación.
- Medir la DO a 540 nm periódicamente hasta que alcance un valor comprendido entre 0.4 y 0.6.
- Dejar enfriar el cultivo en hielo. Centrifugar a 4000 rpm y a 4 °C durante 10 minutos.
- Resuspender el precipitado formado en 20 ml de una solución estéril y fría de CaCl₂ 50 mM.
- Incubar durante 30 minutos en hielo.
- Centrifugar a 4000 rpm y a 4 °C durante 10 minutos.
- Resuspender el precipitado en 4 ml de la solución CaCl₂ 50 mM.
- Incubar en hielo durante varias horas antes de usar las bacterias.
- Las bacterias competentes pueden almacenarse en glicerol (solución estéril de glicerol 15 % en CaCl₂ 50mM) a -70 °C por un máximo de 6 meses.

Transformación de bacterias competentes.

- Descongelar una alícuota de células competentes (unos 50 μ l) en hielo, unos 5-7 minutos.
- Añadir 5 μ l de la reacción de ligado (guardar el resto a -20 °C). Pipetear suavemente.
- Mantener en hielo durante unos 25 minutos y volcar suavemente de forma periódica.

- Aplicar un choque de calor 42 °C durante 45 segundos.
- Incubar 2 minutos en hielo.
- Añadir de 0.5-1.0 ml de medio LB (sin antibiótico) e incubar durante 1 hora a 37 °C en agitación.
- Centrifugar 5 000 rpm 5 min, descartar el sobrenadante conservando unos 50-100 μ l y resuspender el sedimento.
- Sembrar en placas de medio LB sólido con ampicilina, IPTG y X-Gal.
- Incubar toda la noche a 37 °C.

Obtención de DNA plasmídico. Se inocularon colonias individuales de bacterias transformadas en tubos con 3 ml de medio LB con ampicilina y el cultivo se incubó a 37 °C con agitación durante toda la noche.

Para la obtención del plásmido se realizaron minipreparaciones utilizando el kit “QIAprep spin miniprep kit” (QIAGEN, Germany, #27104) siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante con ligeras modificaciones:

- Centrifugar el cultivo a 8 000 g durante 5 minutos a 4 °C.
- Desechar el sobrenadante y añadir 250 μ l de tampón P1 (que contenga RNAsa A). Resuspender agitando en un vortex.
- Añadir 250 μ l de tampón P2 y mezclar invirtiendo el tubo 4-6 veces. Dejar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 350 μ l de tampón P3 y mezclar invirtiendo el tubo 4-6 veces. Mantener el tubo durante 15 minutos en hielo.
- Centrifugar el lisado durante 20 minutos a 17 900 g a 4 °C.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo que contenga 700 μ l de isopropanol, mezclar suavemente e incubar a -20 °C durante 1-2 horas.
- Centrifugar a 17 900 g durante 25 minutos.
- Desechar el sobrenadante y lavar el precipitado con etanol 70 %.
- Centrifugar a 17 900 g durante 10 minutos. Retirar todo el etanol porque puede interferir en reacciones posteriores.
- Dejar secar el precipitado al aire durante 2-3 horas a temperatura ambiente o durante 15-20 minutos a 37 °C.

4. Material y Métodos

- Resuspender el plásmido en 40 μ l de buffer TE o H₂O libre de nucleasas.
- Medir absorbancia a 260 nm para analizar el rendimiento.
- Almacenar a -20 °C hasta su uso.

4.2.5. Métodos inmunológicos

Inclusión para realizar criosecciones

- Fijar las gónadas en MEMFA durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Dar 2 lavados de 5 minutos en PBS 1×.
- Introducir las gónadas en Sacarosa al 30 % en PBS 1× durante toda la noche, a temperatura ambiente y en agitación.
- Introducir las gónadas en el molde apropiado con *O.C.T compound* (*optimal cutting temperature*), medio de inclusión para criosecciones, (Tissue-Tek, Sakura, #4583).
- Dar dos cambios de *O.C.T compound*.
- Orientar la gónada en la posición deseada para la obtención de los cortes.
- Congelar inmediatamente el molde.
- Almacenar a -80°C.

Los cortes de las piezas se realizaron con el criostato del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, obteniendo cortes de 7 μ m de grosor, sobre porta-objetos con polilisina (VWR #631-0107) y almacenados a -80°C hasta su uso.

Inmunofluorescencia indirecta sobre células cultivadas

Esta técnica permite estudiar el patrón de expresión de diversos genes detectando la presencia o ausencia de las proteínas que codifican mediante el uso de anticuerpos específicos. La señal se obtiene gracias a un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo que se une al anticuerpo primario. La preparaciones se visualizaron en un microscopio de fluorescencia y las fotografías se tomaron utilizando una cámara digital Olympus DP70 instalada en un microscopio Olympus BX41.

4.3. μ iRNAM (MicroRNA Mining)

Anticuerpo	Marca	Núm. Cat.
Anti-SOX9	Santa Cruz	sc-20095
Alexa 555 Anti-Rabbit	Invitrogen	A-21429

Cuadro 4.11: Anticuerpos utilizados en la detección de proteínas.

- Fijar las células con MEMFA o PFA durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Dar 2 lavados con PBS 1× de 10 minutos a temperatura ambiente, en agitación.
- Continuar con el protocolo de inmunofluorescencia o dejar a 4°C en PBS 1×, no más de un par de días.
- Aplicar 2 lavados con PBT de 10 minutos cada uno.
- Bloquear con BSA al 10% en PBT en cámara húmeda durante 1 hora.
- Añadir una dilución del anticuerpo primario en BSA al 1% en PBT e incubar a 4 °C toda la noche en cámara húmeda.
- Lavar 3 veces en PBT dejando las células 20 minutos en cada uno.
- Añadir una dilución de anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo en BSA al 1% en PBT e incubar 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad en cámara húmeda.
- Realizar dos lavados de PBT en oscuridad de 30 minutos cada uno.
- Montar en DAPI-Vectashield y observar al microscopio de fluorescencia.

Los anticuerpos utilizados los encontramos en el cuadro 4.11

4.3. μ iRNAM (MicroRNA Mining)

Para asegurar el verdadero significado biológico de los microRNAs expresados de forma diferencial en las gónadas en desarrollo, que habíamos identificado en nuestro experimento de *microarray*, buscamos posibles dianas en genes implicados en la determinación del sexo o el desarrollo gonadal, para los miRNAs que consideramos más interesantes según nuestros datos del *microarray*. Los datos de los microRNAs fueron

4. Material y Métodos

obtenidos de *miRbase* (<http://www.mirbase.org/>), las descripciones de los genes de *Ensembl* (<http://www.Ensembl.org>), y los resultados fueron filtrados según los términos "GO", que definen las funciones con las que cada gen está asociado obtenidas en *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org/>). Estos datos son analizados mediante scripts desarrollados en el lenguaje de programación Perl (<http://www.perl.org>) desarrollados por el Dr. Burgos para este propósito. Actualmente se está desarrollando un interfaz gráfico para dar acceso público a esta herramienta informática. Los gráficos y el análisis estadístico fueron hechos con el programa *gnu-R* (<http://www.r-project.org/>).

Los diferentes algoritmos que identifican potenciales dianas de miRNAs en los mRNA tienen una elevada proporción de falsos positivos. El principal criterio de selección para la identificación de dianas con potencial biológico real ha sido principalmente su conservación evolutiva. No obstante, para la identificación de estas dianas a partir de nuestros datos de *miroarray* hemos desarrollado un algoritmo de aplicación general, que no solo se puede aplicar a nuestros datos, sino que permite la identificación de genes potencialmente regulados por miRNAs que puedan intervenir en cualquier proceso biológico de interés. El algoritmo se fundamenta en que un mismo miRNA puede regular la traducción de múltiples genes, y si varios genes que deban expresarse de forma coordinada en un determinado proceso biológico comparten diana para un mismo miRNA, es probable que esa diana tenga un potencial biológico real.

Para la aplicación de este algoritmo se han implementado una base de datos *postgresql* y una serie de *scripts* escritos en diversos lenguajes, cada uno de los cuales realiza una tarea específica que se describirá a continuación. Los scripts y la base de datos corren en sistema operativo Linux Debian de la distribución estable, con un servidor web *Apache2* para dar servicio a una interfaz web que maneja las consultas, y un servidor de bases de datos *postgresql*.

4.3.1. Base de datos

La base de datos contiene una serie de tablas con la información necesaria para identificar los miRNAs de una especie en particular, sus dianas potenciales en mRNAs de genes codificantes y los términos GO (*Gene Ontology*) asociados con estos genes. La información contenida en estas tablas se obtiene combinando datos procedentes de diversas bases de datos: 1) *miRBase*, de donde se extraen las listas de miRNAs y sus potenciales dianas; 2) *Ensembl*, de donde se extraen las descripciones de los genes y los términos GO asociados con ellos, y 3) *Gene Ontology*, de donde se obtienen las descripciones de dichos términos GO.

4.3.2. Otención de las listas de miRNAs y sus potenciales dianas

Un script escrito en lenguaje perl conecta con el servidor ftp de *miRbase* y comprueba de forma automática la versión publicada en ese momento. Si la versión es posterior a la que hay instalada en nuestra base de datos descarga los archivos de todas las especies publicadas, añadiendo aquellas especies que hayan podido incorporarse a *miRbase* desde la última actualización. Estos archivos consisten en volcados comprimidos de texto plano de sus bases de datos mySQL. Solo en el caso en que el *script* detecte que son de una nueva versión, descarga los archivos, los descomprime, extrae la información relevante y actualiza nuestra base de datos local. Con objeto de mantener la base de datos actualizada, el script se ejecuta periódicamente desde el *cron* del sistema, que permite ejecutar comandos a intervalos regulares.

4.3.3. Obtención de términos GO

La obtención de los términos GO de cada gen representado en la base de datos requiere una doble consulta, a *Ensembl* para conseguir la lista de identificadores de términos GO asociados con cada gen, y a *Gene Ontology* para conseguir sus descripciones. La API (*Application Programme Interface*) Perl de *Ensembl* permite realizar consultas remotas de sus bases de datos desde *scripts* escritos en perl, pero esta facilidad no está disponible en la base de datos de *Gene Ontology*. Para solventar este problema, se descarga un archivo con el volcado de datos de toda la base de términos GO. Este archivo se encuentra en un formato propio de *Gene Ontology*, el formato “obo”. Nuestro script encargado de la obtención de estos datos es capaz de leer directamente el archivo obo y extraer de él las descripciones de los términos GO. El script obtiene la lista de términos asociados a cada gen a través de consultas a *Ensembl*, e introduce estos datos en la base de datos local, junto con las descripciones obtenidas del archivo “obo”.

4.3.4. Obtención de las descripciones asociadas con los transcritos

Otro script obtiene esta información mediante consultas directas a *Ensembl* utilizando los números de acceso de cada transcrito extraídos de los datos de *mirBase*. Las descripciones de cada transcrito son introducidas en las tablas de nuestra base de datos local.

4. Material y Métodos

4.3.5. Interfaz web de consultas

El trabajo conjunto de los scripts anteriormente mencionados construye y mantiene actualizada una base de datos local en la que se pueden realizar consultas. Para facilitar la realización de estas consultas, se ha desarrollado un *interfaz web* escrito en HTML y PHP5, accesible en <http://mirnam.ugr.es> donde se encuentra la última versión considerada estable, y <http://mirnam.ugr.es/mirnamdev> donde se realizan las pruebas durante el desarrollo. Como servidor web se utiliza *Apache2*. La página principal ofrece la posibilidad de crear una nueva consulta o de volver a acceder a una previa introduciendo el número de consulta que se facilita cada vez que se envía una nueva (Figura 4.6).



Figura 4.6: *μiRNAM*, consultas. Página inicial de *μiRNAM*. Permite pulsar el botón *New query* para iniciar una nueva consulta o recuperar una consulta previa.

En la página para realizar una nueva consulta se indica el número de consulta asignado y los tres pasos que hay que seguir para construirla que son (Figura 4.7):

1. Elegir una especie.
2. Añadir miRNAs y términos GO a la consulta
3. Suministrar un correo electrónico y enviar la consulta

La especie se puede elegir entre todas las que haya publicadas en *miRbase* y el nombre de la especie elegida aparecerá en el título del apartado.

El aspecto más importante es la selección de miRNAs y términos GO. El interfaz ofrece varias posibilidades para la elección de los que se han de incluir en la consulta. Se pueden realizar búsquedas de miRNAs con dianas presentes en un determinado gen de interés, y términos GO

4.3. μ iRNAM (MicroRNA Mining)

Your query ID is: 242. Please record for future access

1. Choose a species (None selected)

2. Add miRNAs and GO terms to your query

3. Send your query

e-mail is mandatory: A report with the results of your query will be sent to your e-mail.

e-mail:

Data in this site are obtained from [miRbase](#), [Ensembl](#) and [the Gene Ontology](#)

Contact [Miguel Burgos](#), Dpto. de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada

Figura 4.7: μ iRNAM. Consulta nueva. Nueva consulta en μ iRNAM. Se especifican los tres pasos a seguir para la realización de una consulta

4. Material y Métodos

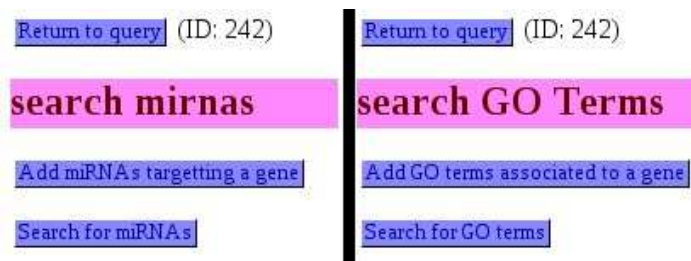


Figura 4.8: μ iRNAM. Inclusión de miRNAs y términos GO. Formularios correspondientes a la páginas de búsqueda de miRNAs y de términos GO para su inclusión en las consultas

también asociados con algún gen de interés, o bien realizar búsquedas directas de cualquiera de estos datos (Figura 4.8).

Para la búsqueda de miRNAs con dianas en algún gen de interés, el interfaz permite buscar a su vez el gen por su nombre (*external name*), por la ID del transcrito, o por una o varias palabras clave que puedan encontrarse en su descripción (Figura 4.9).

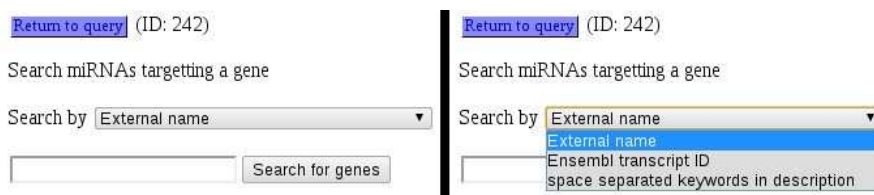


Figura 4.9: μ iRNAM. miRNAs con dianas en un gen de interés. Formulario para la búsqueda de genes utilizando su nombre, ID de transcrito o palabras clave.

Tras la consulta de genes aparece una tabla con todos los transcritos que cumplan la condición de búsqueda. Si alguno de los genes presenta varios transcritos posibles por maduraciones alternativas de su mRNA o por tener inicios alternativos de transcripción, cada transcrito aparece de forma independiente con su propio número de identificación (Figura 4.10). Se puede elegir entonces el transcrito deseado y ver la lista de dianas de miRNAs presentes en el mismo (Figura 4.11)

La búsqueda de términos GO relacionados con un gen de interés se realiza exactamente de la misma forma. La búsqueda directa de miRNAs puede hacerse introduciendo parte del nombre, y la búsqueda directa de términos GO puede hacerse por la ID del término o por palabras claves contenidas en su descripción.

4.3. μ iRNAM (MicroRNA Mining)

	gene	transcript ID	description
<input type="radio"/>	Dmrt1	ENSMUST00000025755	doublesex and mab-3 related transcription factor 1 [Source:MarkerSymbol;Acc:MGI:1354733]
<input type="radio"/>	Dmrt1	ENSMUST00000087525	doublesex and mab-3 related transcription factor 1 [Source:MarkerSymbol;Acc:MGI:1354733]

Search miRNA targets in selected gene

Figura 4.10: μ iRNAM. Listado de transcritos. Formulario para la selección de los transcritos de interés en los que se deseen buscar las dianas de miRNAs.

	miRNA	Nº of targets
<input type="checkbox"/>	bta-miR-545	1
<input type="checkbox"/>	hsa-miR-508-5p	1
<input type="checkbox"/>	hsa-miR-562	1
<input type="checkbox"/>	mmu-miR-881	1

Add selected miRNAs to the query

Figura 4.11: μ iRNAM. dianas miRNA presentes en un gen de interés. Formulario para la selección de miRNAs a incluir en una consulta en función del gen en que están presentes.

4. Material y Métodos

Es posible eliminar y añadir cuantos miRNAs y términos GO se deseen en la consulta y una vez completado el diseño de la misma es necesario facilitar una dirección de correo electrónico (paso 3) al que se enviará un informe en formato PDF que contendrá la lista de genes que tengan dianas para alguno de los miRNA y que estén asociados a la vez con alguno de los términos GO que se hayan seleccionado.

4.4. Preparación de soluciones y medios

Preparación de medio DMEM suplementado al 10% con suero bovino fetal

Se preparó a partir de medio suministrado en polvo por Sigma-Aldrich, *Dulbecco's modified eagle's medium nutrient mixture F-12 Ham* con L-Glutamina y 15 mM de HEPES, sin bicarbonato sódico. Instrucciones de preparación:

- Medir el 90 % del volumen total de agua, a una temperatura comprendida entre 15-20°C.
- Verter el contenido completo del frasco de medio (15.6 g/L) en el agua y agitar ligeramente hasta que se disuelva.
- Añadir 1.2 g de bicarbonato sódico por cada litro de volumen final. Agitar hasta su completa disolución.
- Ajustar el pH del medio entre 0.1-0.3 unidades de pH por debajo del pH deseado, utilizando HCl 1 N o NaOH 1 N.
- Añadir agua hasta completar el volumen final.
- Esterilizar inmediatamente por filtración, usando una membrana con un tamaño de poro de 0.22 μm .
- Dispensar asépticamente el medio en envases estériles.
- Añadir antibióticos contra procariotas como ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) y tetraciclina (15 $\mu\text{g/ml}$), 1 μl por cada ml de medio.

Preparación de solución de Hank (*Hank's balanced salt solution, HBSS*)

- Medir el 90 % del volumen total de agua, a una temperatura comprendida entre 15-20°C.
- Verter el contenido completo del envase (9.5 g/L) en el agua y agitar ligeramente hasta que se disuelva.

4.4. Preparación de soluciones y medios

- Añadir 0.35 g de bicarbonato sódico por cada litro de volumen final. Agitar hasta su completa disolución.
- Ajustar el pH del medio entre 0.1-0.3 unidades de pH por debajo del pH deseado, utilizando HCl 1 N o NaOH 1 N.
- Añadir agua hasta completar el volumen final.
- Esterilizar inmediatamente por filtración, usando una membrana con un tamaño de poro de 0.22 μm .
- Dispensar asépticamente el medio en envases estériles.

Solución de Denhardt 100 \times Añadir los siguientes componentes:

- 10 g de Ficoll 400
- 10 g de Polyvinylpyrrolidone
- 10 g de BSA
- Completar con agua hasta 500 ml. Y ajustar el pH entre 6.8-7.2

PBS 10 \times Para un volumen de 1 l:

- Disolver los siguientes componentes en 800 ml de H₂O destilada:
 - NaCl: 80 g
 - KCl: 2 g
 - Na₂HPO₄: 14.4 g
 - KH₂PO₄: 2.4 g
- Ajustar pH a 7.4.
- Añadir H₂O hasta 1 l y autoclavar.

Tampón de extracción Esta solución se compone de :

- Tris-HCl 10 mM pH 7.5
- NaCl 10 mM
- EDTA 2 mM.

Solución de proteinasa K

- Disolver 100 mg de proteinasa K liofilizada en 10 ml de H₂O ultrapura estéril.

4. Material y Métodos

- Alicuotar y guardar a -20 °C.

Tampón de lisis la solución se compone de:

- Tris-HCl 10 mM pH 7.5
- NaCl 10 mM
- EDTA 2 mM
- SDS 5 %

Medio LB Para 1 l de medio:

- Mezclar los siguientes componentes:
 - Bacto-triptona: 10 g
 - Extracto de levadura: 5 g
 - NaCl: 10 g
 - H₂O destilada: 950 ml
- Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5N y completar hasta un volumen final de 1l.
- Autoclavar.
- Dejar enfriar y añadir 1 ml de una solución de ampicilina de 100 mg/ml cuando la temperatura baje a unos 50 °C.

Medio LB sólido

- Añadir 15 g de agar a 1 l de medio LB líquido.
- Autoclavar.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente hasta que alcance una temperatura de unos 50 °C.
- Si se requieren antibióticos, añadir 1 ml de una solución de ampicilina de 100 mg/ml.
- Repartir en placas de Petri.

20×SSC Para 100 ml:

4.4. Preparación de soluciones y medios

- Añadir los siguientes componentes a 80 ml de H₂O DEPC:
 - Cloruro sódico: 17.53 g
 - Citrato sódico: 8.82 g
- Ajustar pH a 7.0 con HCl.
- Ajustar volumen a 100 ml.
- Autoclavar y guardar a temperatura ambiente.

5 M Cloruro sódico Para preparar 250 ml:

- Disolver 73.125 g en H₂O DEPC y ajustar volumen a 250 ml.
- Autoclavar y almacenar a temperatura ambiente.

1 M Tris-HCl pH 7.5 Para preparar 200 ml:

- Pesar 24.228 g de Tris base y disolverlos en 180 ml de H₂O DEPC.
- Ajustar al pH deseado con HCl. Puesto que la adición de HCl genera calor, esperar a que la solución se enfríe a temperatura ambiente y volver a ajustar el pH (en las soluciones de Tris, el pH se afecta por la temperatura de la misma).
- Añadir H₂O DEPC hasta un volumen de 200 ml.

2 M Tris-HCl pH 9.5 Para preparar 200 ml:

- Pesar 48.456 g de Tris base y disolverlos en 180 ml de H₂O DEPC.
- Ajustar al pH deseado con HCl. Puesto que la adición de HCl genera calor, esperar a que la solución se enfríe a temperatura ambiente y volver a ajustar el pH (en las soluciones de Tris, el pH se afecta por la temperatura de la misma).
- Añadir H₂O DEPC hasta un volumen de 200 ml.

0.5 M EDTA pH 8.0 Para un volumen de 100 ml:

- Añadir 18.612 g de EDTA (sal disódica) a 80 ml de H₂O DEPC .
- Ajustar pH a 8.0 con 10 N NaOH
- Ajustar volumen a 100 ml.
- Autoclavar y almacenar a temperatura ambiente.

4. Material y Métodos

1 M Cloruro de magnesio Disolver 50.82 g de cloruro de magnesio en 220 ml de H₂O y ajustar volumen.

NTMT pH 9.5 Para preparar 1 l:

- Añadir los siguientes componentes:
 - 5 M NaCl: 20 ml
 - 2 M Tris-HCl pH 9.5: 50 ml
 - 1 M MgCl₂: 50 ml
- Ajustar pH a 9.5
- Añadir 2 ml de Tween 20 (50 %).
- Ajustar volumen a 1 000 ml.

TE

- Tris 10 mM pH 8
- EDTA 1 mM

MOPS 10×

- MOPS 0.2 M
- Acetato sódico 50 mM
- EDTA 5 mM
- Ajustar el pH a 7 con NaOH 1 M

MEMFA Para preparar 100 ml

- Tampón Mops 10×: 10 ml
- Formaldehído 37 %: 10 ml
- H₂O: 80 ml

5. Resultados

Contenidos

5.1. Microarray	150
5.1.1. Análisis de los resultados del microarray	150
5.1.2. Validación Microarray	160
5.2. Minería de datos: μiRNAM	166
5.2.1. Criterios de búsquedas de dianas con el programa μ iRNAM	166
5.2.2. Resultados de la salida del programa μ iRNAM	167
5.2.3. Descripción de las dianas resultantes	173
5.2.4. Localización genómica y posible regulación de los principales miRNAs identificados	177
5.3. <i>mmu-miR-124</i>	180
5.3.1. Localización genómica y posible regulación de <i>mmu-mir-124</i>	180
5.3.2. Expresión diferencial de miR-124 entre estadios y sexo	184
5.3.3. Validación funcional de la diana de miR-124 en la región 3'UTR de <i>Sox9</i>	187
5.3.4. Inhibición de miR-124 <i>in vitro</i> en células gonadales embrionarias XX de 13.5 dpc	187
5.3.5. Efectos de la expresión ectópica de miR-124 en células gonadales embrionarias XY de 13.5 dpc y en condrocitos cultivados <i>in vitro</i>	191
5.3.6. Sobre-expresión de miR-124 <i>in vitro</i> en células gonadales XY de 11.5 dpc	195
5.4. <i>mmu-miR-144</i>	203
5.4.1. Localización genómica y posible regulación de <i>mmu-mir-144</i>	203
5.4.2. Expresión diferencial de miR-144 entre estadios y sexo	204
5.4.3. Validación de la diana de <i>Rspo1</i> para miR-144	204
5.4.4. Inhibición de miR-144 <i>in vitro</i> en células gonadales XY de 13.5 dpc	207
5.4.5. Sobre-expresión de miR-144 en células gonadales XX de 13.5 dpc cultivadas <i>in vitro</i>	212

5. Resultados

5.1. Microarray

5.1.1. Análisis de los resultados del microarray

Calidad e identidad de las muestras de RNA utilizadas en el *microarray*

Tal como se indicó en la sección de Material y Métodos, la utilización de muestras de RNA de la mayor calidad y de identidad asegurada, era de suma importancia para garantizar resultados fiables en el experimento de *microarray*. Para la extracción de RNA las gónadas de individuos de diferentes camadas se agruparon según su sexo y estadio (Cuadro 5.1). Dado que la morfología de la gónada en 11.5 dpc no permite la identificación del sexo, se utilizaron para ello técnicas histológicas y moleculares: realización de preparaciones para la visualización del corpúsculo de Barr y de PCRs dúplex para los genes *Miogenina* y *Zfy*, según los protocolos descritos anteriormente. En la figura 5.1 podemos observar muestras de macho, donde se visualizan dos bandas (carriles 1,2,4, 7-12, 14, 16 y 21), así como muestras de hembra, donde sólo se observa una banda (carriles 3, 5, 6, 13, 15 y 17-20).

Muestra	Núm. gónadas utilizadas
11.5 dpc Macho	31
11.5 dpc Hembra	24
13.5 dpc Macho	19
13.5 dpc Hembra	18

Cuadro 5.1: Número de gónadas utilizadas en la extracción del RNA para la hibridación con el *microarray*.

Para el control de calidad del RNA extraído se midió su concentración y niveles de contaminación (Cuadro 5.2) y se comprobó su integridad mediante electroforesis (Figura 5.2), de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. Estos análisis demostraron la alta calidad de las muestras de RNA y su adecuación para la realización del experimento de *microarray*.

Tras ser enviadas a la empresa Exiqon, sus técnicos también realizaron un control de calidad e integridad del RNA mediante electroforegrama en un *Bioanalyser 2100* (Agilent Technologies). Con estos análisis se comprobó que las muestras no se habían deteriorado en el envío.

5.1. Microarray

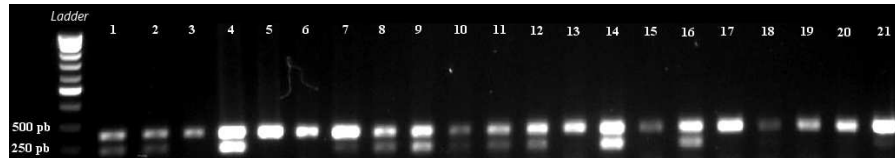


Figura 5.1: Gel de agarosa de una PCR dúplex para la identificación del sexo de las muestras del *microarray*. En el primer carril observamos el patrón de pesos moleculares (*ladder*) y en los siguientes 21 carriles se muestra el resultado de las PCRs dúplex para sexar 21 individuos. La banda de *Zfy* tiene alrededor de 250 pb y la banda de *Miogenina* es algo inferior a 500 pb.

	Concentración ng/ μ l	abs. $\frac{260}{280}$	abs. $\frac{260}{230}$
13.5 macho	210	2.38	5.17
13.5 hembra	131	1.73	1.94
11.5 macho	152	2.21	1.59
11.5 hembra	114	1.70	1.29

Cuadro 5.2: Concentraciones de las muestras de RNA utilizadas para el *microarray*. La concentración de las muestras se expresa en ng/ μ l, Las relaciones de densidades ópticas $\frac{260}{280}$ son indicativas del grado de contaminación por fenoles, y la de $\frac{260}{230}$ por proteínas.

5. Resultados

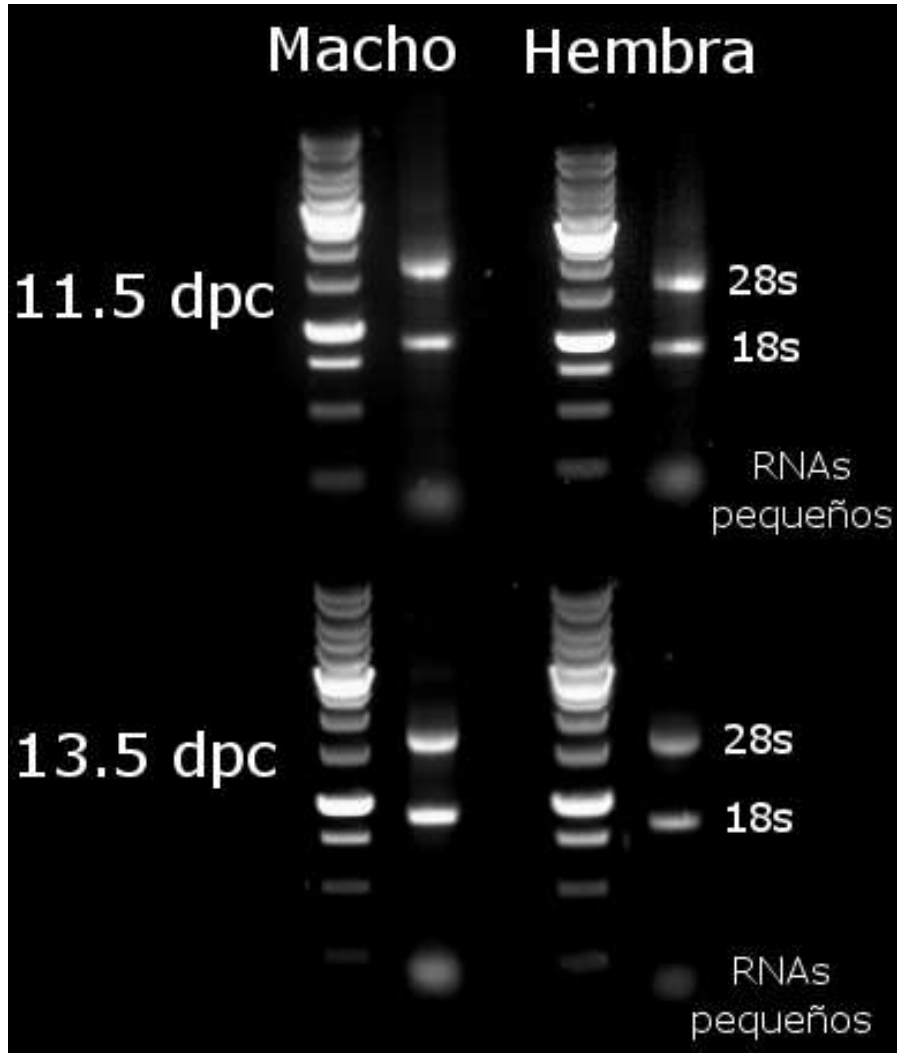


Figura 5.2: Gel de agarosa del RNA de las muestras utilizadas para el *microarray*. Bandas de RNA ribosómico (28s y 18s) y RNAs pequeños para las 4 muestras utilizadas en el *microarray* (11.5 macho, 11.5 hembra, 13.5 macho y 13.5 hembra).

5.1. Microarray

En las figuras 5.3 y 5.4 se observan los resultados del electroforegrama para las cuatro muestras. En ellos observamos claramente definidos los picos de los RNAs ribosómicos 18s y 28s, también vemos los RNAs pequeños y un RNA control que se añade a la electroforesis para seguir la posición del frente. El número RIN (*RNA integrity number*) es el índice de calidad de las muestras, con un valor máximo de 10. No es recomendable la utilización de una muestra con RIN <7. Todas nuestras muestras obtuvieron valores RIN >9.

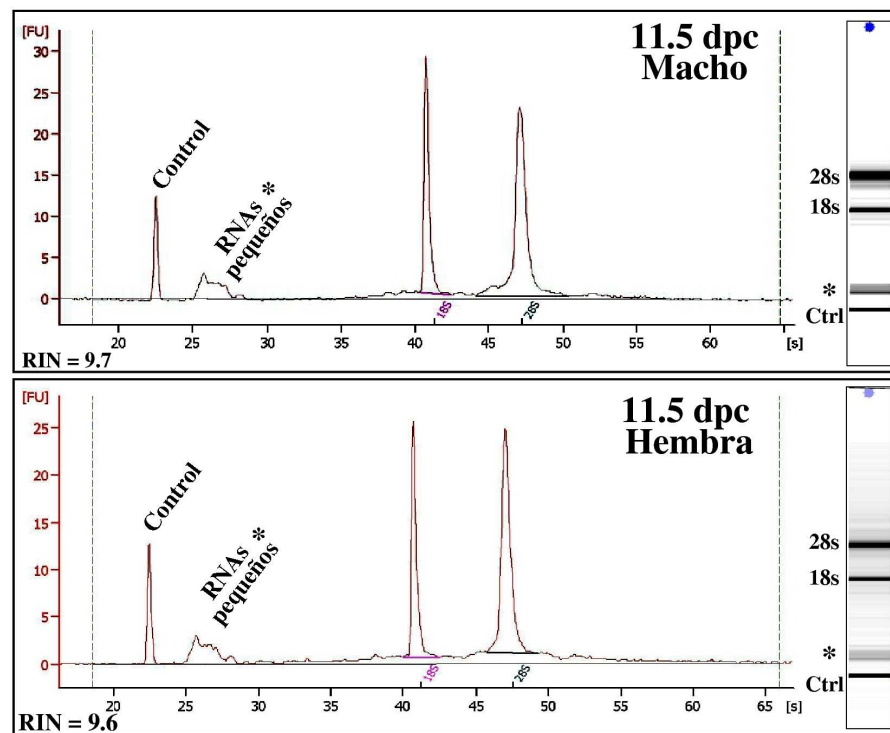


Figura 5.3: Electroforegramas de las muestras de 11.5 dpc utilizadas en el *microarray*. A la izquierda de cada recuadro se muestra el electroforegrama y a la derecha se representa una electroforesis virtual de la muestra. Se señalan los RNAs 28s, 18s, RNAs pequeños (marcados con un asterisco) y el RNA control (Ctrl).

5. Resultados

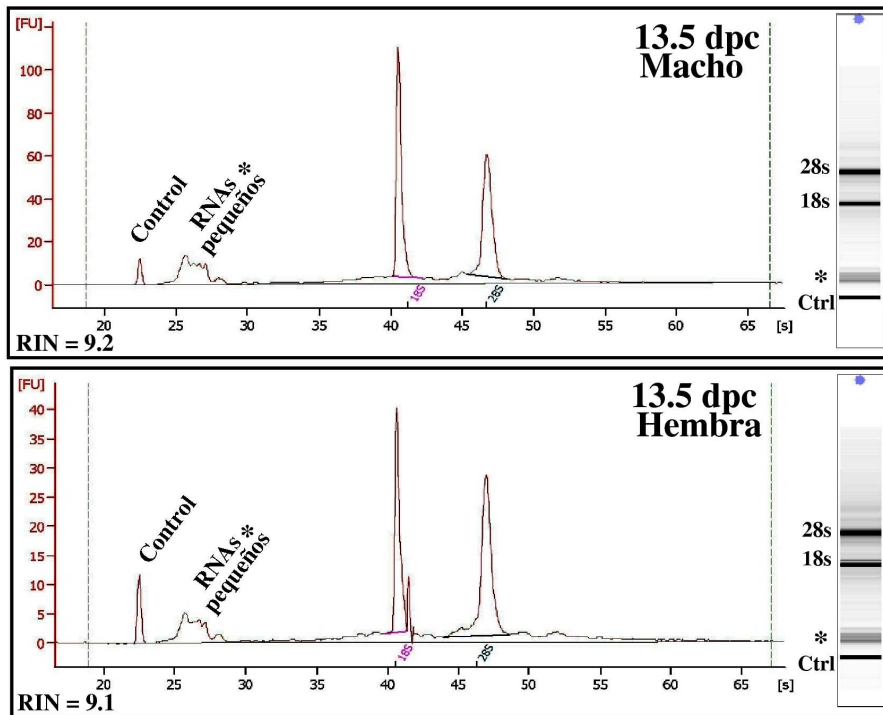


Figura 5.4: Electroforegramas de las muestras de 13.5 dpc utilizadas en el *microarray*. Como en la figura anterior, a la izquierda de cada recuadro se muestra el electroforegrama y a la derecha se representa una electroforesis virtual de la muestra. Se señalan los RNAs 28s, 18s, RNAs pequeños (marcados con un asterisco) y el RNA control (Ctrl).

Análisis de los resultados del *microarray*

Los resultados obtenidos en el *microarray* han sido resumidos e ilustrados en un mapa de agrupamiento jerárquico denominado *heatmap*, donde se muestran dos agrupaciones, una de miRNAs y otra de muestras (Figura 5.5). Cada fila representa un miRNA y cada columna representa una muestra. El árbol de agrupamiento de miRNAs se muestra a la izquierda, y el de muestras aparece en la parte superior. La escala de colores mostrada en la parte inferior de la figura 5.5 ilustra el nivel relativo de expresión de un miRNA a través de todas las muestras: el color rojo representa un nivel de expresión por encima de la media, y el color azul representa un nivel de expresión por debajo de la media.

El agrupamiento se basa en el cálculo de la ratio $\log_2\left(\frac{Hy^3}{Hy^5}\right)$ de las señales de ambos fluorocromos, normalizada restando la media de expresión de las cuatro muestras y dividiendo los valores por la desviación estándar (Eisen *et al.*, 1998) y utilizando la distancia “euclidiana” para su representación. Las ratios normalizadas para las cuatro hibridaciones quedan recogidas en el cuadro 5.3. Los valores representan las medianas de las señales de las réplicas de cada miRNA presentes en los *microarrays*. El criterio de selección de miRNAs de los que se considera que muestran una suficiente expresión diferencial se basa en el grado de divergencia de las medianas en cada muestra estimado a través de la desviación estándar. Se consideraron aquellos miRNAs con desviaciones estándar superiores a 0.50. Con este criterio, de un total de 757 miRNAs analizados, 71 pasaron el criterio de selección, y solamente éstos están incluidos en el *heatmap*.

Los datos compilados de los *microarrays* han sido enviados a ArrayExpress con un número de acceso: E-MEXP-2252. El nombre de experimento que consta en la base de datos es: *Expresion of miRNAs in mouse embryo gonad during the critical period of sex determination*; con una fecha especificada de publicación del 14 de mayo de 2012.

Mediana de las señales de cada sonda					
miRNA	11.5M	11.5H	13.5M	13.5H	SD
202-5p	0.14	0.12	0.24	0.66	1.65
770-3p	0.22	0.23	1.29	1.09	1.39
871	0.25	0.25	0.87	1.41	1.28
135a	0.69	0.81	0.22	1.42	1.12
184	0.38	0.39	1.98	0.68	1.12
465a-3p	0.33	0.35	0.93	1.42	1.05
322	1.08	1.37	0.28	0.76	1.02
741	0.39	0.34	0.73	1.52	0.99
675-5p	0.36	0.35	1.12	1.13	0.97

5. Resultados

Mediana de las señales de cada sonda					
miRNA	11.5M	11.5H	13.5M	13.5H	SD
503	2.05	1.99	0.62	0.70	0.93
880	0.49	0.42	0.99	1.66	0.93
let-7i	0.44	0.43	1.34	1.05	0.92
10a	1.48	1.63	0.43	0.72	0.92
743a	0.41	0.39	0.79	1.48	0.91
471	0.41	0.41	0.85	1.42	0.88
let-7i	0.44	0.42	1.34	1.26	0.85
714	0.55	0.45	1.17	1.37	0.79
let-7d	0.49	0.50	1.21	1.10	0.79
21*	0.41	0.43	1.02	1.09	0.76
202-3p	0.53	0.53	1.58	0.93	0.76
455	0.50	0.48	1.47	0.79	0.75
455*	0.85	0.85	2.46	0.97	0.74
465c-5p	0.55	0.43	1.09	1.20	0.73
124	0.75	0.77	0.66	1.97	0.73
301b	2.06	1.98	0.82	0.88	0.72
let-7g	0.69	0.66	1.13	1.10	0.71
let-7f	0.60	0.54	0.99	1.05	0.71
let-7d	0.50	0.47	1.37	1.11	0.71
let-7a	0.49	0.52	1.29	1.04	0.70
710	0.58	0.53	1.30	1.25	0.70
183*	0.48	0.50	1.07	1.17	0.69
30c-2*	0.51	0.46	1.12	1.10	0.69
881	0.61	0.53	0.97	1.50	0.69
200b	1.37	2.04	0.68	0.97	0.67
672	0.58	0.54	0.97	1.44	0.66
711	0.66	0.63	1.53	1.28	0.66
196b	1.59	1.65	0.63	1.08	0.65
196a	1.51	1.67	0.64	0.89	0.65
369-5p	1.07	1.23	0.48	0.69	0.62
130b	1.75	1.90	0.78	1.02	0.62
878-3p	0.74	0.75	0.98	1.85	0.62
290-3p	0.57	0.56	1.12	1.23	0.61
144	0.66	0.55	1.46	0.77	0.61
let-7c	0.54	0.52	0.98	1.19	0.60
96	0.54	0.58	0.85	1.34	0.60
742	0.53	0.55	0.89	1.25	0.59
410	1.42	1.54	0.68	0.80	0.59
470	0.53	0.58	1.10	1.12	0.58
129-5p	0.57	0.56	1.05	1.21	0.58
let-7a	0.46	0.52	0.90	1.05	0.58
20b	1.16	1.34	0.54	0.91	0.58

5.1. Microarray

Mediana de las señales de cada sonda					
miRNA	11.5M	11.5H	13.5M	13.5H	SD
193	0.71	0.69	1.62	1.02	0.58
let7-b	0.54	0.57	1.06	1.16	0.57
20a*	1.84	1.76	1.07	0.82	0.57
138	0.88	0.85	0.68	1.21	0.56
126-5p	0.89	0.93	0.43	0.93	0.55
342-3p	1.51	1.37	0.73	0.78	0.54
668	1.30	1.07	1.00	0.55	0.54
483*	2.38	2.53	1.18	1.50	0.53
409-5p	1.38	1.34	0.72	0.73	0.53
183	0.66	0.64	0.99	1.38	0.53
182	0.66	0.61	0.92	1.35	0.52
380-3p	1.58	1.40	0.86	0.75	0.52
369-3p	1.39	1.23	0.69	0.72	0.52
103	1.08	1.22	0.56	1.09	0.51
21	1.14	1.31	0.58	0.95	0.51
382	1.37	1.27	0.77	0.68	0.50
200a	1.19	1.82	0.82	0.94	0.50
301a	1.71	1.69	0.88	0.99	0.50
34b-5p	0.88	0.68	1.44	1.30	0.50
433	1.32	1.43	0.73	0.79	0.50

Cuadro 5.3: Mediana de las señales de las réplicas de cada sonda para los miRNAs con expresión diferencial. Datos normalizados de las señales de los 71 miRNAs que mostraron desviaciones estándar entre muestras superiores a 0.50, según el criterio de selección (Columna SD). (M) macho; (H) hembra para los estadios 11.5 y 13.5 dpc.

5. Resultados

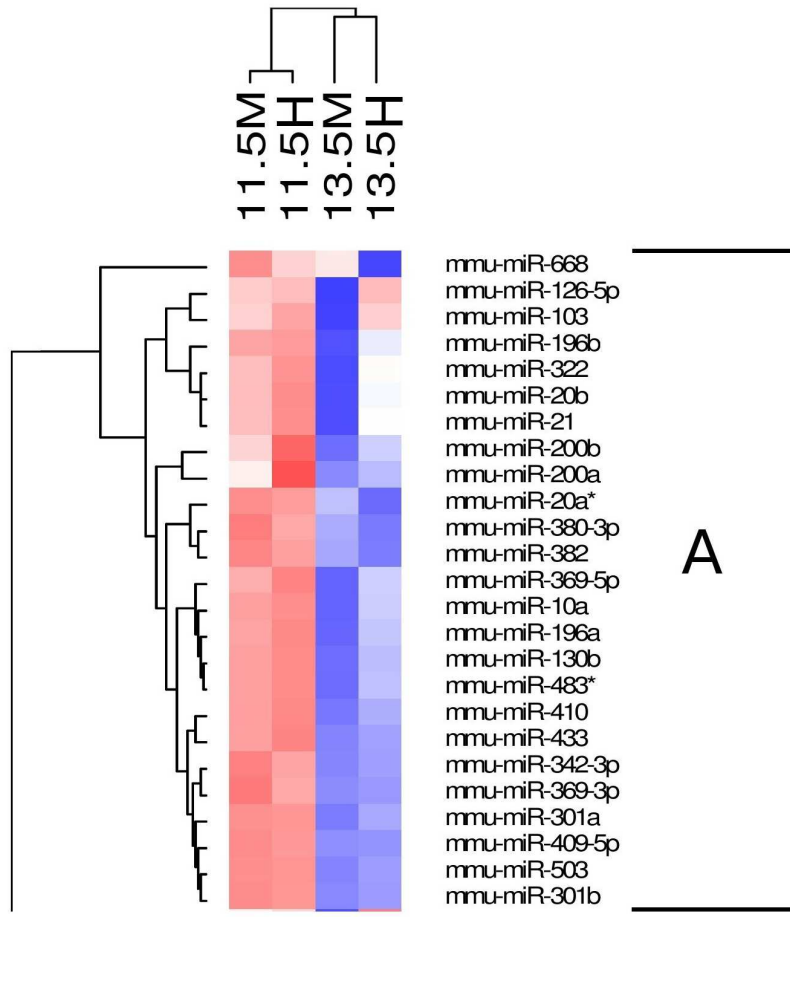
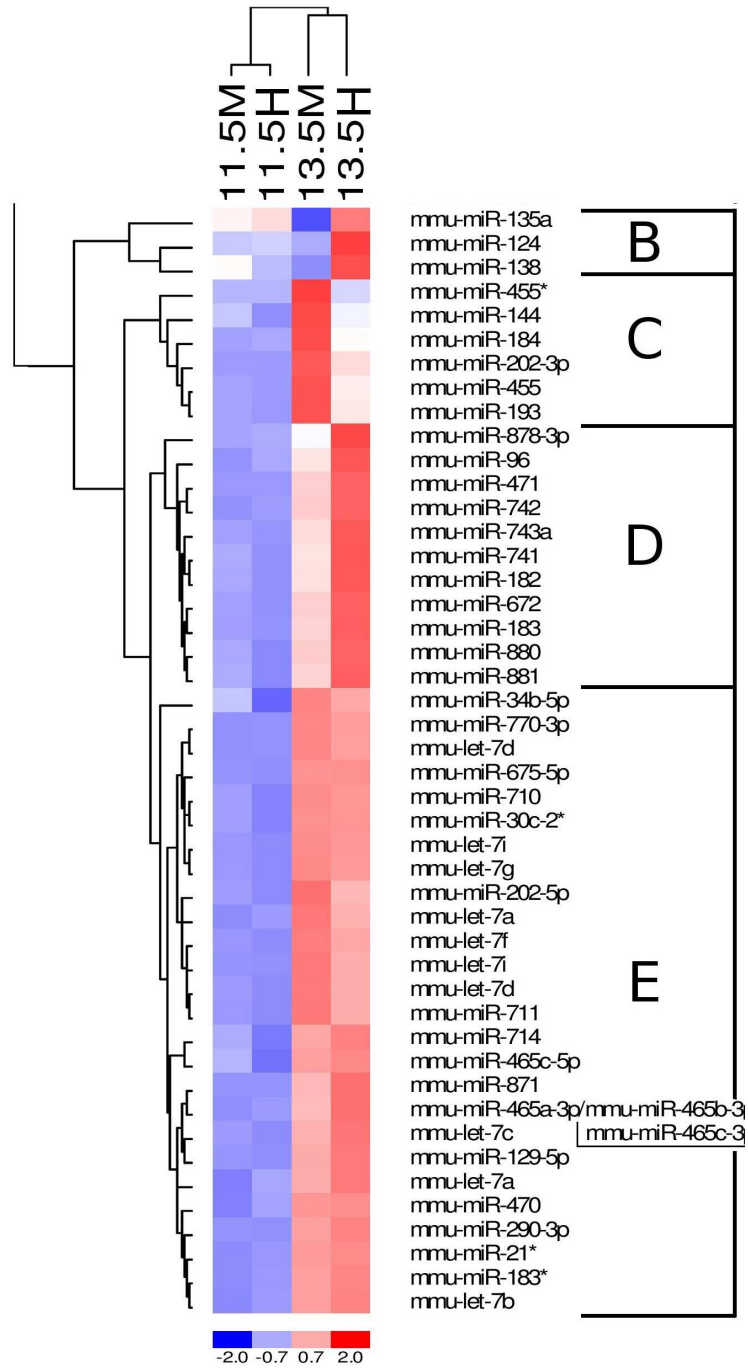


Figura 5.5: Diagrama heatmap del microarray del perfil de expresión de miRNAs en gónadas embrionarias. Se distinguen dos agrupaciones jerárquicas de genes y de muestras con 5 grupos distintos de miRNAs (A-E). El grupo A y E incluye miRNAs que muestran una inhibición (A) o activación (E) no específica de sexo, durante la transición entre los estadios de desarrollo 11.5 y 13.5 dpc; estos genes probablemente no estén implicados en la determinación sexual. El grupo B contiene 3 miRNAs fuertemente activados en ovarios de 13.5 dpc, pudiendo tener un posible papel en el desarrollo ovárico. En el grupo C se incluyen 6 miRNAs fuertemente activados en testículos de 13.5 dpc pero no en ovarios, con un posible papel en el desarrollo testicular. El grupo D contiene 11 miRNAs fuertemente activados en ovario de 13.5 dpc pero no testículo, pudiendo tener igualmente un papel en el desarrollo ovárico.

5.1. Microarray



5. Resultados

Heatmap

En el *heatmap* (Figura 5.5) podemos ver los 71 miRNAs que mostraron expresión diferencial entre sexos o entre estadios de desarrollo. Podemos identificar 5 grupos de genes de miRNAs, etiquetados en la figura 5.5 de la A a la E. Los grupos A y E corresponden a aquellos miRNAs que son reprimidos (grupo A) o activados (E) durante la transición entre los dos estadios de desarrollo estudiados (11.5 y 13.5 dpc). Según este patrón de expresión, estos miRNAs probablemente no estén implicados en la diferenciación gonadal, mostrando menos interés para nuestro estudio. Por el contrario, los 20 miRNAs incluidos en los grupos B-D muestran diferencias de expresión específicas de sexo en 13.5 pero no en 11.5, por lo que podrían ser buenos candidatos como reguladores de genes implicados en la determinación del sexo. El grupo B incluye 3 miRNAs que están fuertemente activados en ovarios de 13.5 dpc y reprimidos en testículos de 13.5 dpc, sugiriendo un potencial papel en el desarrollo ovárico. El grupo C contiene 6 miRNAs que están fuertemente activados en testículos de 13.5 pero no en ovarios del mismo estadio, sugiriendo un potencial papel en el desarrollo testicular. Por último, el grupo D incluye 11 miRNAs que están fuertemente activados en ovarios de 13.5 pero no en testículos del mismo estadio, así que de igual manera que el grupo B, podrían estar implicados en el desarrollo ovárico.

5.1.2. Validación Microarray

Los datos del experimento del perfil de expresión de miRNAs mediante hibridación en un *microarray* han sido validados por RT-PCR en tiempo real (RT-Q-PCR). Se validaron los niveles de expresión de un total de 8 miRNAs seleccionados (Cuadro 5.4). Hemos escogido miRNAs de los 5 grupos de expresión diferencial en los que hemos dividido los resultados del *microarray*, teniendo por tanto una muestra representativa del total de todos los grupos incluidos en el *heatmap*. Dicha validación se hizo comparando los niveles de expresión obtenidos mediante RT-Q-PCR con los niveles del *array*. En general, los valores se correlacionaron significativamente entre el *array* y la RT-Q-PCR según un análisis estadístico de regresión lineal.

Los resultados de estos análisis quedan representados en las figuras 5.6-5.13, donde los datos normalizados se representan como la media \pm s.e.m. (error estándar de la media) de al menos tres experimentos independientes. El análisis de regresión indica la ausencia de diferencias significativas en la distribución de la variación entre los dos experimentos ($R^2=0.97$, $P=0.0128$). Debemos puntualizar que aunque los análisis de expresión para los miRNAs *mmu-mir-126-5p* (Fig. 5.8) y *mmu-mir-103*

5.1. Microarray

H

Diferencias entre estadios		Activados en hembra 13.5		Activados en macho 13.5	
miRNA	Grupo	miRNA	Grupo	miRNA	Grupo
miR-103	A	miR-135a	B		
miR-126	A	miR-96	D	miR-193	C
		miR-183	D	miR-202-5p	E
		miR-182	D		

Cuadro 5.4: Mirnas seleccionados para la validación del *microarray*

(Fig. 5.6) del grupo A muestran diferencias de expresión mayores entre estadios de desarrollo que entre sexos en 13.5 dpc, debe tenerse en cuenta que también existen diferencias entre sexos en este estadio. Por ello, incluimos estos miRNAs en el conjunto de los validados por RT-Q-PCR. Nuestros resultados confirman que ambos miRNAs están significativamente más expresados en gónadas de hembra en 13.5 dpc, sugiriendo un potencial papel en el desarrollo ovárico.

5. Resultados

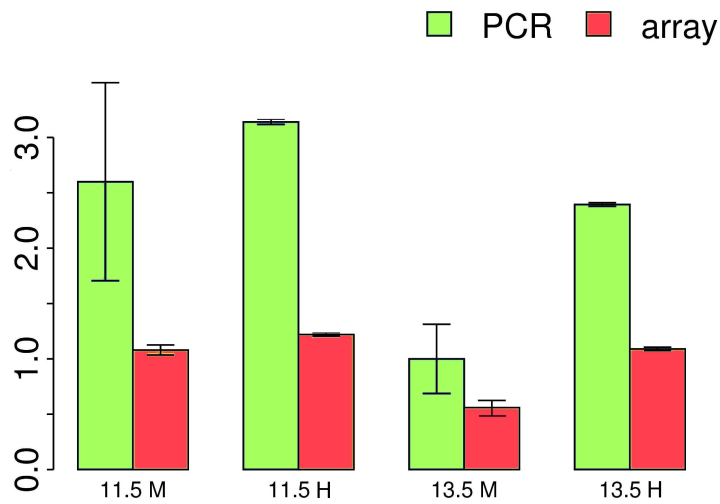


Figura 5.6: RT-Q-PCR para *mmu-mir-103* para validar el *microarray*. En rojo se representan los datos de expresión normalizados del *array* (extraídos del cuadro 5.3) frente a los datos normalizados de los niveles de expresión del miRNA obtenidos mediante RT-Q-PCR, en verde, para cada muestra, de macho (M) o hembra (H) de 11.5 o 13.5 dpc. Los datos se representan como la media \pm s.e.m. de al menos 3 experimentos independientes.

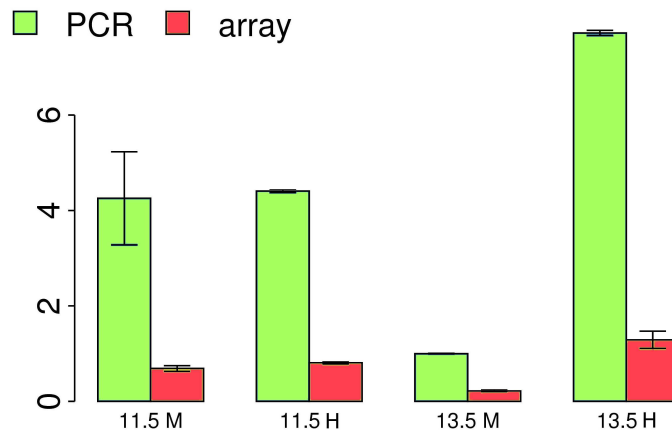


Figura 5.7: RT-Q-PCR para *mmu-mir-135a* para validar el *microarray*. Los datos se han representado como en la figura 5.6.

5.1. Microarray

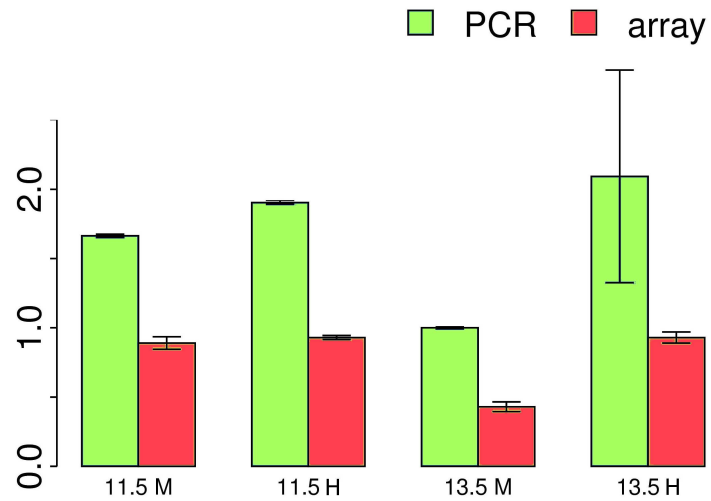


Figura 5.8: RT-Q-PCR para *mmu-mir-126* para validar el *microarray*. Los datos se han representado como en la figura 5.6.

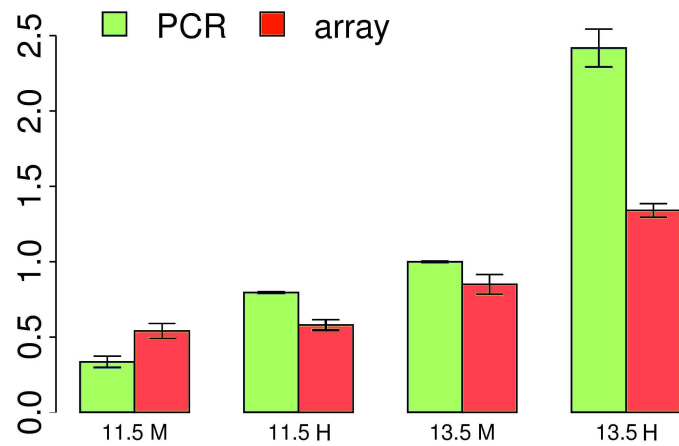


Figura 5.9: RT-Q-PCR para *mmu-mir-96* para validar el *microarray*. Los datos se han representado como en la figura 5.6.

5. Resultados

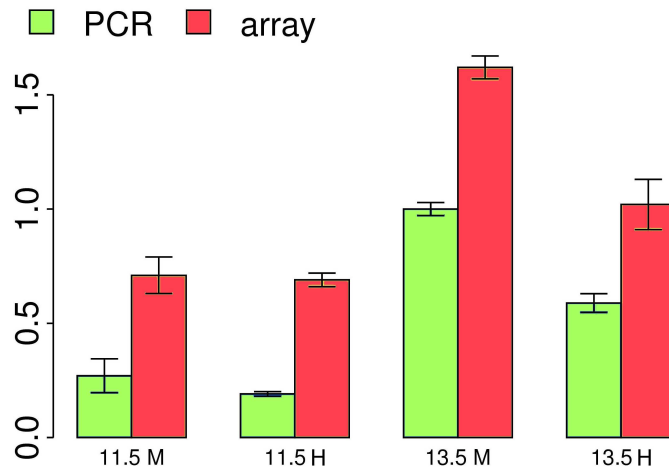


Figura 5.10: RT-Q-PCR para *mmu-mir-193* para validar el *microarray*. Los datos se han representado como en la figura 5.6.

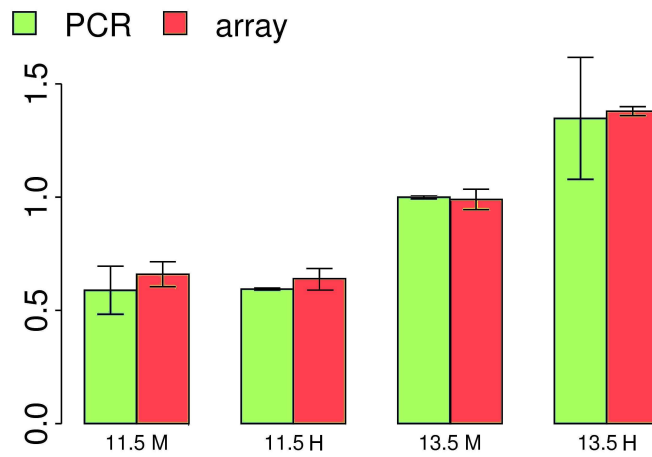


Figura 5.11: RT-Q-PCR para *mmu-mir-183* para validar el *microarray*. Los datos se han representado como en la figura 5.6.

5.1. Microarray

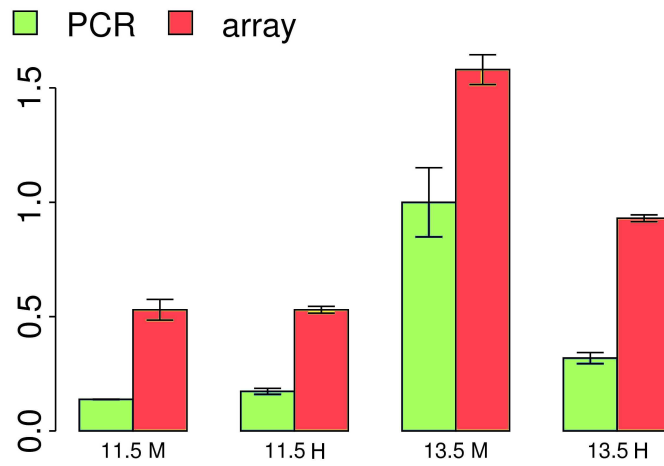


Figura 5.12: RT-Q-PCR para *mmu-mir-202* para validar el *microarray*. Los datos se han representado como en la figura 5.6.

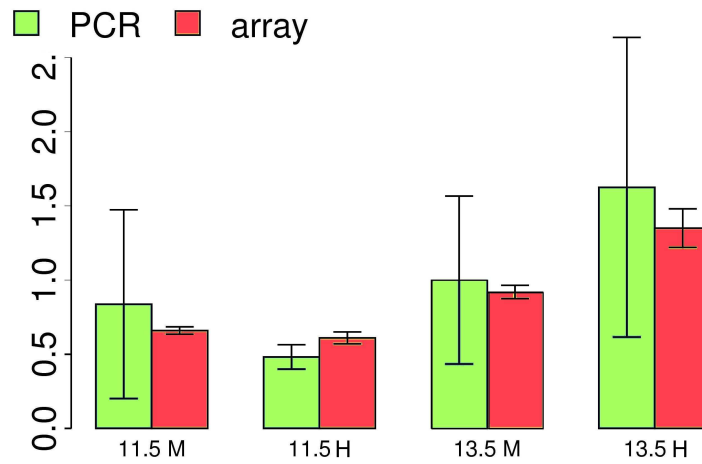


Figura 5.13: RT-Q-PCR para *mmu-mir-182* para validar el *microarray*. Los datos se han representado como en la figura 5.6.

5. Resultados

5.2. Minería de datos: μ iRNAM

5.2.1. Criterios de búsquedas de dianas con el programa μ iRNAM

A fin de encontrar posibles genes candidatos a ser regulados por alguno de los miRNAs resultantes de nuestro *microarray* hemos realizado búsquedas selectivas con el programa μ iRNAM, diseñado para este propósito.

De los 71 miRNAs identificados en el *microarray*, hemos seleccionado 22 por su mayor relevancia, dada su expresión diferencial de sexo en 13.5 dpc, que mayoritariamente pertenecen a los grupos B, C y D del *heatmap* (Figura 5.5). Los hemos clasificado en grupos según se encuentren activados en ovario o testículo. El cuadro 5.5 muestra los miRNAs que hemos utilizado para realizar las búsquedas.

Activados en		
Ovario 13.5	Testículo 13.5	Otros
miR-135a	miR-144	miR-668
miR-124	miR-184	miR-126-5p
miR-138	miR-202-3p	miR-103
miR-878-3p	miR-455*	
miR-96	miR-193	
miR-471		
miR-742		
miR-743a		
miR-741		
miR-182		
miR-672		
miR-183		
miR-880		
miR-881		

Cuadro 5.5: miRNAs seleccionados para realizar las búsquedas en el programa μ iRNAM

En el grupo “Otros” se incluyen tres microRNAs que pertenecen al grupo A del *heatmap*, correspondiente a miRNAs que son reprimidos en la transición del estadio 11.5 dpc a 13.5 dpc. Sin embargo, los hemos considerado de interés porque muestran expresión diferencial de sexo en 13.5, concretamente miR-126-5p y miR-103 son reprimidos en macho de 13.5 pero no en hembra, y por el contrario, miR-668 es reprimido en

5.2. Minería de datos: μ iRNAM

ovario de 13.5 pero no en testículo, pudiendo tener algún papel en la determinación del sexo.

Por otro lado, para filtrar los resultados hemos escogido diferentes términos GO relacionados con el proceso de la determinación sexual o defintorios de los genes maestros de la diferenciación gonadal, aunque algunos de estos términos no produjeron ningún resultado. Finalmente han sido 11 términos GO los que nos han proporcionado información sobre dianas relevantes. Dichos términos GO están incluidos en el cuadro 5.6.

Clasificación del término	ID
Gonad development	0008406
Sex differentiation	0007548
Male sex determination	0030238
Male sex differentiation	0046661
Male gonad development	0008584
Androgen receptor signaling pathway	0030521
Male somatic sex determination	0019102
Wnt receptor signaling pathway	0016055
Female gonad development	0008585
Germ cell development	0007281
Male germ-line sex determination	0019100

Cuadro 5.6: Términos GO seleccionados para realizar las búsquedas en el programa μ iRNAM

5.2.2. Resultados de la salida del programa μ iRNAM

Los resultados de las búsquedas los hemos resumido en 11 cuadros, en función de cada término GO, con el fin de hacer más comprensible la interpretación de las posibles dianas encontradas. A continuación podemos ver cada uno de esos 11 cuadros, donde sólo mostramos los miRNAs que obtuvieron resultados en cada caso, aunque en todos los casos las búsquedas se hicieron con los 22 miRNAs.

5. Resultados

Gonad development. GO:0008406		
	miRNA	Genes
miRNAs activados en ovario 13.5	miR-124	<i>Hmgcr</i>
	miR-96	<i>Hmgcr, Nr0b1</i>
	miR-741	<i>Nr0b1</i>
Otros	miR-103	<i>Mkks, Osr1</i>

Cuadro 5.7

Sex differentiation. GO:0007548		
	miRNA	Genes
miRNAs activados en ovario 13.5	miR-135a	<i>Dmrt2</i>
	miR-124	<i>Ide, Dmrt1, Tcf21, Ar, Dmrt2</i>
	miR-878-3p	<i>Ar, Sry</i>
	miR-471	<i>Ar</i>
	miR-182	<i>Dmrt3</i>
	miR-672	<i>Cyp17a1, Dmrt3</i>
	miR-881	<i>Sry</i>
	testículo 13.5	miR-455*
miR-144		<i>Dmrt3</i>
miR-202-3p		<i>Cyp17a1, Ar</i>
Otros	miR-668	<i>Tcf21, Dmrt1</i>
	miR-126-5p	<i>Ide, Dmrta1</i>
	miR-103	<i>Cdkl2</i>

Cuadro 5.8

5.2. Minería de datos: μ iRNAM

Male sex determination. GO:0030238			
	miRNA	Genes	
miRNAs activados en	ovario 13.5	miR-878-3p	<i>Sry</i>
		miR-96	<i>Nr0b1</i>
		miR-743a	<i>Insr</i>
		miR-741	<i>Nr0b1</i>
		miR-881	<i>Sry</i>
	testículo 13.5	miR-184	<i>Insr</i>
		miR-202-3p	<i>Igf1r</i>

Cuadro 5.9

Male sex differentiation. GO:0046661		
	miRNA	Genes
miRNAs activados en		
ovario 13.5	miR-742	<i>Fkbp4</i>

Cuadro 5.10

Male gonad development. GO:0008584			
	miRNA	Genes	
miRNAs activados en	ovario 13.5	miR-124	<i>Sox9, Sox8, Dmrt1, Ar</i>
		miR-138	<i>Fanca, Insl3</i>
		miR-878-3p	<i>Ar</i>
		miR-471	<i>Ar</i>
		miR-182	<i>Fanca</i>
	miR-672	<i>Fanca</i>	
Otros	miR-668	<i>Dmrt1</i>	

Cuadro 5.11

5. Resultados

Androgen receptor signaling pathway. GO:0030521			
	miRNA	Genes	
miRNAs activados en	ovario 13.5	miR-124	<i>Brca1, Ar</i>
		miR-138	<i>Fhl2, Ppap2a</i>
		miR-878-3p	<i>Ar, Nrip1</i>
		miR-471	<i>Thrap5, Ar, Cdk7</i>
		miR-742	<i>Thrap4, Pparbp</i>
		miR-743a	<i>Fhl2</i>
		miR-741	<i>Brca1, Nrip1</i>
		miR-182	<i>Pparbp, Ppargc1a</i>
		miR-672	<i>Ppargc1a, Nrip1, Grip1</i>
		miR-183	<i>Fhl2</i>
		miR-880	<i>Daxx</i>
		miR-881	<i>Tmepai</i>
		testículo 13.5	miR-455*
miR-144	<i>Rb1, Thrap6, Pias2</i>		
miR-184	<i>Thrap4, Sfrp5, Thrap4</i>		
miR-202-3p	<i>Nrip1, Ppargc1a, Thrap6, Ar</i>		
miR-193	<i>Thrap4</i>		
Otros	miR-668	<i>Thrap4, Tmepai</i>	
	miR-126-5p	<i>Cdk7</i>	
	miR-103	<i>Fhl2, Ccne1</i>	

Cuadro 5.12

Male somatic sex determination. GO:0019102			
	miRNA	Genes	
miRNAs activados en	ovario 13.5	miR-124	<i>Ar</i>
		miR-878-3p	<i>Ar</i>
		miR-471	<i>Ar</i>
		miR-880	<i>Ar</i>
	testículo 13.5	miR-455*	<i>Ar</i>
		miR-202-3p	<i>Ar</i>

Cuadro 5.13

5.2. Minería de datos: μ iRNAM

		Wnt receptor signaling pathway. GO:0016055	
		miRNA	Genes
miRNAs activados en	ovario 13.5	miR-135a	<i>Wnt6, Csnk2b, Tle1</i>
		miR-124	<i>Sfrp5, Axin1</i>
		miR-138	<i>Aes, Wnt6, Klhl12, Wnt16, Wnt5b, Lrp6, Kremen1, Axin1, Csnk1e</i>
		miR-878-3p	<i>Lrrfip2, Axin2, Tle4</i>
		miR-96	<i>Ldb1, Tax1bp3, Bcl9</i>
		miR-471	<i>Sfrp4, Slc9a3r1, Dkk4, Brd7, Tle2</i>
		miR-742	<i>Wnt9a, Sfrp2, Dkk4, Fzd5, Mitf</i>
		miR-743a	<i>Wnt10a, Ctnnb1, Pygo1</i>
		miR-741	<i>Wnt1, Axin2, Fzd9</i>
		miR-182	<i>Wnt7a, Bcl9, Porcn, Tle</i>
	miR-672	<i>Bcl9, Lef1, Dkk4, Cpz</i>	
	miR-183	<i>Lrp6, Fzd9, Hbp1</i>	
	miR-880	<i>Bcl9, Macf1</i>	
	miR-881	<i>Lef1, Dkk4, Brd7, Wnt16</i>	
	testículo 13.5	miR-455*	<i>Sostdc1, Zbtb33</i>
		miR-144	<i>Wif1, Rspo1, Apc</i>
		miR-184	<i>Wnt9a, Dact1, Tcf7l2, Wnt10b, Wnt16</i>
		miR-202-3p	<i>Mitf, Apc, Tcf7</i>
		miR-455	<i>Kremen2, Fzd1, Fzd5</i>
	miR-193	<i>Fbxw2, Wnt16, Dkk4, Tle2</i>	
Otros	miR-668	<i>Wnt8b</i>	
	miR-126-5p	<i>Tcf3, Axin1, Porcn</i>	
	miR-103	<i>Wnt3a, Csnk1g2, Dvl1</i>	

Cuadro 5.14

5. Resultados

Female gonad development. GO:0008585		
	miRNA	Genes
miRNAs activados en ovario 13.5	miR-138	<i>Fanca</i>
	miR-878-3p	<i>Fst</i>
	miR-741	<i>Fshr</i>
	miR-182	<i>Fanca</i>
	miR-672	<i>Fanca</i>
miRNAs activados en testículo 13.5	miR-144	<i>Fst</i>
	miR-184	<i>Fst</i>
Otros	miR-103	<i>Fshr</i>

Cuadro 5.15

Germ cell development. GO:0007281		
	miRNA	Genes
miRNAs activados en ovario 13.5	miR-135a	<i>Mov10l1</i>
	miR-124	<i>Cugbp1, Bax, Brca1, Kitl</i>
	miR-96	<i>Hils, Dnd1, Porcn, Hbp1, Frap1</i>
	miR-742	<i>Frap1, Dnd1</i>
	miR-743a	<i>Bax, Dnd1</i>
	miR-741	<i>Bax</i>
	miR-672	<i>Acr1, Frap1</i>
	miR-183	<i>Rps6kb1</i>
	miR-880	<i>Mov10l1, Fance</i>
	miRNAs activados en testículo 13.5	miR-144
miR-184		<i>Kitl, Tial1</i>
miR-455		<i>Mov10l1, Bax</i>
miR-193		<i>Wt1</i>
Otros	miR-668	<i>Fance</i>
	miR-103	<i>Akt1, Fance</i>

Cuadro 5.16

5.2. Minería de datos: μ iRNAM

Male germ-line sex determination. GO:0019100		
miRNA	Genes	
miR-124	<i>Sox9</i>	

miRNAs activados en ovario 13.5

Cuadro 5.17

5.2.3. Descripción de las dianas resultantes

En el cuadro 5.18 podemos ver todas las dianas recogidas en la salida del programa μ iRNAM, ordenadas alfabéticamente, con la descripción del gen y el número de identificación (ID) que proporciona la base de datos *Ensembl*.

Gen	Descripción	ID
<i>Acr1</i>	activin A receptor, type 1	87911
<i>Aes</i>	amino-terminal enhancer of split	95806
<i>Akt1</i>	thymoma viral proto-oncogene 1	87986
<i>Apc</i>	adenomatosis polyposis coli	88039
<i>Ar</i>	androgen receptor	88064
<i>Axin1</i>	axin 1	1096327
<i>Axin2</i>	axin2	1270862
<i>Bax</i>	bcl2-associated x protein	99702
<i>Bcl9</i>	b-cell cll/lymphoma 9	1924828
<i>Brca1</i>	breast cancer 1	104537
<i>Brd7</i>	bromodomain containing 7	1349766
<i>ccne1</i>	cyclin e1	88316
<i>Cdk7</i>	cyclin-dependent kinase 7	102956
<i>Cdkl2</i>	cyclin-dependent kinase-like 2	1858227
<i>Cpz</i>	carboxypeptidase z	88487
<i>Csnk1e</i>	casein kinase 1, epsilon	1351660
<i>Csnk1g2</i>	casein kinase 1, gamma 2	1920014
<i>Csnk2b</i>	casein kinase 2, beta polypeptide	88548
<i>Ctnnb1</i>	catenin (cadherin associated protein), beta 1	88276
<i>Cugbp1</i>	cug triplet repeat, rna binding protein 1	1342295
<i>Cxcr4</i>	chemokine (c-x-c motif) receptor 4	109563
<i>Cyp17a1</i>	cytochrome p450, family 17, subfamily a, polypeptide 1	88586

5. Resultados

Gen	Descripción	ID
<i>Dact1</i>	dapper homolog 1, antagonist of beta-catenin (xenopus)	1891740
<i>Daxx</i>	fas death domain-associated protein	1197015
<i>Dazl</i>	deleted in azoospermia-like	1342328
<i>Dkk4</i>	dickkopf homolog 4 (xenopus laevis)	2385299
<i>Dact1</i>	dapper homolog 1, antagonist of beta-catenin (xenopus)	1891740
<i>Dmrta1</i>	doublesex and mab-3 related transcription factor like family a1	2653627
<i>Dmrt1</i>	doublesex and mab-3 related transcription factor 1	1354733
<i>Dmrt2</i>	doublesex and mab-3 related transcription factor 2	1330307
<i>Dmrt3</i>	doublesex and mab-3 related transcription factor 3	2449470
<i>Dnd1</i>	dead end homolog 1 (zebrafish)	2447763
<i>Dvl1</i>	dishevelled, dsh homolog 1 (drosophila)	94941
<i>Fanca</i>	fanconi anemia, complementation group a	1341823
<i>Fancc</i>	fanconi anemia, complementation group c	95480
<i>Fbxw2</i>	f-box and wd-40 domain protein 2	1353435
<i>Fhl2</i>	four and a half lim domains 2	1338762
<i>Fkbp4</i>	fk506 binding protein 4	95543
<i>Frap1</i>	fk506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1	1928394
<i>Fshr</i>	follicle stimulating hormone receptor	95583
<i>Fst</i>	follistatin	95586
<i>Fzd1</i>	frizzled homolog 1 (drosophila)	1196625
<i>Fzd5</i>	frizzled homolog 5 (drosophila)	108571
<i>Fzd9</i>	frizzled homolog 9 (drosophila)	1313278
<i>Grip1</i>	glutamate receptor interacting protein 1	1921303
<i>hbp1</i>	high mobility group box transcription factor 1	894659
<i>Hils</i>	histone h1-like protein in spermatids 1	2136691
<i>Hmgcr</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase	96159
<i>Ide</i>	insulin degrading enzyme	96412
<i>igf1r</i>	insulin-like growth factor i receptor	96433
<i>Insl3</i>	janus kinase 3	99928
<i>Insr</i>	insulin receptor	96575
<i>Kitl</i>	kit ligand	96974
<i>Klhl12</i>	kelch-like 12 (drosophila)	2385619
<i>Kremen1</i>	kringle containing transmembrane protein 1	1933988

5.2. Minería de datos: μ iRNAM

Gen	Descripción	ID
<i>Lef1</i>	lymphoid enhancer binding factor 1	96770
<i>Ldb1</i>	lim domain binding 1	894762
<i>Lrrfip2</i>	leucine rich repeat (in flii) interacting protein 2	1918518
<i>Lrp6</i>	low density lipoprotein receptor-related protein 6	1298218
<i>Macf1</i>	microtubule-actin crosslinking factor 1	108559
<i>Mitf</i>	microphthalmia-associated transcription factor	104554
<i>Mkks</i>	mckusick-kaufman syndrome protein	1891836
<i>Mov10l1</i>	moloney leukemia virus 10-like 1	1891384
<i>Nr0b1</i>	nuclear receptor subfamily 0, group b, member 1	1352460
<i>Nrip1</i>	nuclear receptor interacting protein 1	1315213
<i>Osr1</i>	odd-skipped related 1 (drosophila)	1344424
<i>Pias2</i>	protein inhibitor of activated stat 2	1096566
<i>Porc</i>	porcupine homolog (drosophila)	1890212
<i>Ppap2a</i>	phosphatidic acid phosphatase 2a	108412
<i>Pparbp</i>	peroxisome proliferator activated receptor binding protein	1100846
<i>Ppargc1a</i>	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha	1342774
<i>Pygo1</i>	pygopus 1	1919385
<i>Rb1</i>	retinoblastoma 1	97874
<i>Rps6kb1</i>	ribosomal protein s6 kinase, polypeptide 1	1270849
<i>Rspo1</i>	r-spondin homolog (xenopus laevis)	2183426
<i>Sfrp2</i>	secreted frizzled-related protein 2	108078
<i>Sfrp4</i>	secreted frizzled-related sequence protein 4	892010
<i>Sfrp5</i>	secreted frizzled-related sequence protein 5	1860298
<i>Slc9a3r1</i>	solute carrier family 9	1349482
<i>Sostdc1</i>	sclerostin domain containing 1	1913292
<i>Sox8</i>	sry-box containing gene 8	98370
<i>Sox9</i>	sry-box containing gene 9	98371
<i>Sry</i>	sex determining region of chr y	98660
<i>Tax1bp3</i>	tax1 (human t-cell leukemia virus type i) binding protein 3	1923531
<i>Tcf21</i>	transcription factor 21	1202715
<i>Tcf3</i>	transcription factor 3	1202876
<i>Tcf7</i>	transcription factor 7-like 2, t-cell specific, hmg-box	1202879
<i>Tcf7l2</i>	transcription factor 7-like 2, t-cell specific, hmg-box	1202879

5. Resultados

Gen	Descripción	ID
<i>Thrap4</i>	thyroid hormone receptor associated protein 4	1344385
<i>Thrap5</i>	thyroid hormone receptor associated protein 5	2158394
<i>Thrap6</i>	thyroid hormone receptor associated protein 6	1917040
<i>Tial1</i>	tia1 cytotoxic granule-associated rna binding protein-like 1	107913
<i>Tle1</i>	transducin-like enhancer of split 1, homolog of drosophila e(spl)	104636
<i>Tle2</i>	transducin-like enhancer of split 2, homolog of drosophila e(spl)	104635
<i>Tle4</i>	transducin-like enhancer of split 4, homolog of drosophila e(spl)	104633
<i>Tmepai</i>	transmembrane, prostate androgen induced rna	1929600
<i>Wif1</i>	wnt inhibitory factor 1	1344332
<i>Wnt1</i>	wingless-related mmtv integration site 1	98953
<i>Wnt10a</i>	wingless related mmtv integration site 10a	108071
<i>Wnt10b</i>	wingless related mmtv integration site 10b	108061
<i>Wnt16</i>	wingless-related mmtv integration site 16	2136018
<i>Wnt5b</i>	wingless-related mmtv integration site 5b	98959
<i>Wnt6</i>	wingless-related mmtv integration site 6	98960
<i>Wnt7a</i>	wingless-related mmtv integration site 7a	98961
<i>Wnt9a</i>	wingless-type mmtv integration site 9a	2446084
<i>Wt1</i>	wilms tumor homolog	98968
<i>Zbtb33</i>	zinc finger and btb domain containing 33	1927290

Cuadro 5.18: Breve descripción de los genes resultantes de las búsquedas del programa μ iRNAM.

Por tanto, hemos identificado un total de 106 genes que podrían estar regulados por uno o más de los 22 miRNAs seleccionados a partir de nuestros datos de *microarrays* y se han resaltado en negrita aquellos genes que sabemos que tienen una implicación directa en la determinación y/o diferenciación del sexo y que, por tanto, serían los primeros que requieren un estudio más detallado. De entre todos ellos, podemos destacar los 11 siguientes: *Ar*, *Dmrt1*, *Sox9*, *Sox8*, *Sry*, *Nr0b1*, *Cyp17a1*, *Fhl2*, *Fshr*, *Fst* y *Rspo1*.

5.2.4. Localización genómica y posible regulación de los principales miRNAs identificados

Otro aspecto interesante a estudiar es la regulación que pueden tener estos miRNAs. Los datos actuales sugieren que la expresión de los miRNAs está controlada principalmente a nivel transcripcional. Para indagar en este aspecto, hemos realizado una serie de análisis bioinformáticos en busca de regiones con potencial función reguladora, cercanas al extremo 5' de estos genes. Así, por un lado se han realizado búsquedas en la base de datos *Ensembl* para hallar la localización genómica de los 22 miRNAs de interés. Además se ha utilizado una herramienta bioinformática de predicción de factores de transcripción que se unen a secuencias de DNA dadas. Seleccionamos aquellas secuencias que encontramos con potencial regulador, aguas arriba de los genes de los miRNAs, y las introducimos en el programa bioinformático **TESS** (*Transcription Element Search System*). Los resultados han revelado que una proporción de estos 22 miRNAs, concretamente 9, están localizados de manera independiente en el genoma y los 13 restantes se encuentran formando agrupaciones, comúnmente denominados *clusters*.

Cabe destacar un *cluster* encontrado en el cromosoma X donde se encuentran 7 miRNAs activados en ovario de 13.5 dpc, según nuestros datos. Si nos fijamos en este cluster (Figura 5.14 extraída de la página Ensembl) aparecen dos agrupaciones de miRNAs, una a la derecha y otra a la izquierda, separadas por diferentes secuencias reguladoras (señaladas en la figura con un asterisco). Es interesante destacar que nuestros 7 miRNAs que forman parte de ese *cluster* se sitúan todos a la izquierda de estas secuencias reguladoras (miRNAs destacados con marcos de esquinas cuadradas). A la derecha de estas secuencias reguladoras encontramos otros 3 miRNAs que se encuentran diferencialmente expresados entre estadios pero no entre sexos (miRNAs con marcos de esquinas redondas) y que tienen diferentes secuencias reguladoras en 5' (destacadas con asteriscos). Teniendo en cuenta esto, analizamos con el programa TESS ambas regiones, encontrando numerosos factores de transcripción, la mayoría de ellos de tipo general, ampliamente conocidos, como por ejemplo CTCF (*CCCTC-binding factor, zinc finger protein*), una proteína de unión a dedos zinc que actúa como represor de la transcripción (Dunn y Davie, 2003). Sin embargo, cabe destacar el factor de transcripción SMAD1 (*SMAD family member 1*) que es una proteína que funciona como modulador transcripcional en el ovario (revisión de Kaivo-oja *et al.*, 2006), y que podría ser el encargado de regular la expresión de estos miRNAs, aunque también encontramos en ambas regiones otros factores de transcripción, típicamente activadores de la ruta testicular, como son SRY o AR. Si bien como se observa en esta figura ambas regiones además de tener diferentes secuencias reguladoras tienen un sitio de comienzo de la transcripción diferente,

5. Resultados

señalado con una flecha en la figura 5.14.

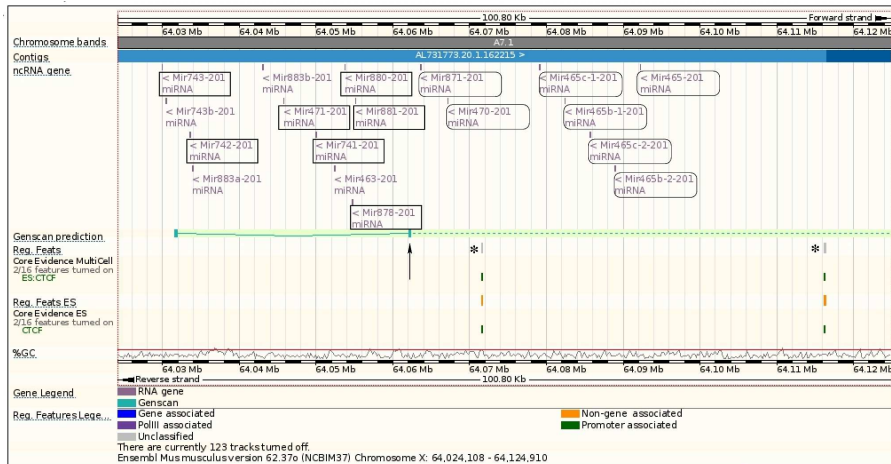


Figura 5.14: Localización genómica de varios miRNAs en el cromosoma

X. Los miRNAs específicamente activados en ovario de 13.5 dpc están señalados con una caja, encontrándose a la izquierda de las secuencias reguladoras en verde y gris, señaladas con un asterisco. La flecha señala a un posible sitio de inicio de la transcripción. Los miRNAs a la derecha de esta región están englobados en recuadros redondeados y no presentan diferencias de expresión entre sexos.

Hemos encontrado otro *cluster* que alberga bastantes miRNAs situado en el cromosoma 12 (Figura 5.15). En este caso, sólo miR-668 está entre los 22 miRNAs de mayor interés de nuestro *microarray*, aunque encontramos otros 7 miRNAs que pertenecen al grupo de los 71 miRNAs identificados que tenían expresión diferencial en la transición de un estadio a otro. Concretamente, se trata de los miRNAs miR-770, miR-380, miR-382, miR-369, miR-410, miR-433, y miR-409. En la figura están remarcados con cajas, a excepción de miR-770 y miR-433 ya que se salían de la captura de pantalla del *Ensembl*. Destacando que algunos miRNAs, miR-668 entre ellos, se encuentran situados en un lincRNA (*Large intergenic non-coding RNA*). Igualmente, realizamos búsquedas con el programa TESS de las posibles secuencias reguladoras de este cluster y encontramos factores de transcripción generales como CTCF, nuevamente. Por otro lado, encontramos elementos como TCF2L1 (*transcription factor CP2-like 1*) o Esrrb (*estrogen-related receptor beta*), que son factores de transcripción clave en las células madre embrionarias e intervienen en la ruta de señalización canónica, junto con Oct4, y en la ruta de señalización Wnt (van den Berg *et al.*, 2010).

No cabe duda de que, a la vista de estos resultados, la nueva informa-

5.2. Minería de datos: μ iRNAM

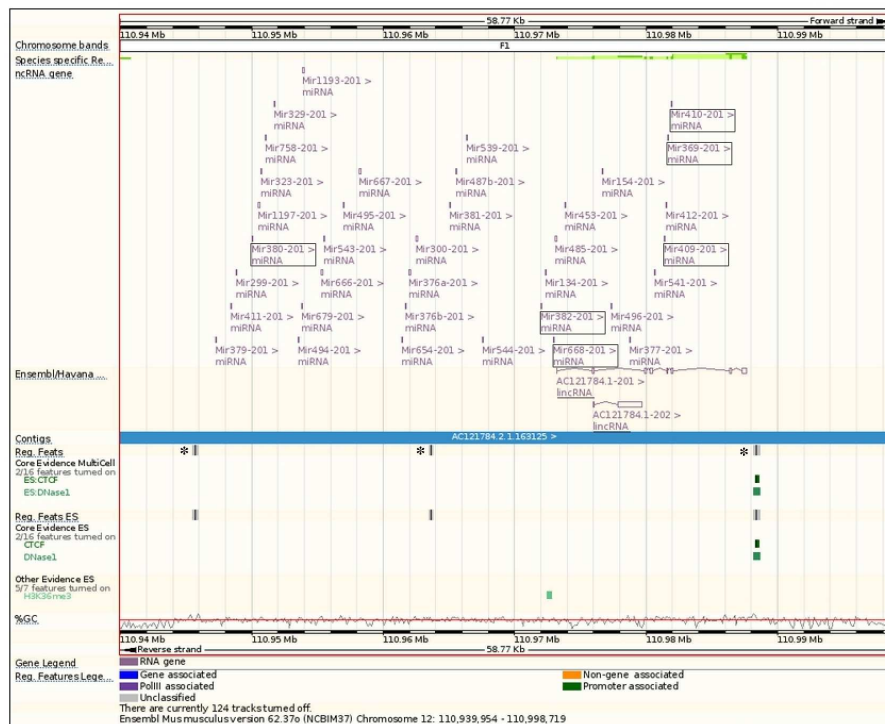


Figura 5.15: Localización genómica de varios miRNAs en el cromosoma 12. Los miRNAs que estaban entre los resultados de *microarrays* están señalados con una caja, encontrándose 3 regiones de secuencias reguladoras, en verde y gris, señaladas con un asterisco. Dos lincRNAs aparecen subrayados.

5. Resultados

ción proporcionada por el *microarray* que hemos realizado va a suponer una fuente perdurable de futuras investigaciones, ya que hemos indentificado numerosas parejas de miRNAs y genes que merecen abordar un estudio más profundo de su posible implicación en la determinación del sexo. Puesto que todo el trabajo de investigación que podría iniciarse a partir de estos datos superaría con mucho la extensión de una tesis doctoral, nosotros nos hemos centrado en analizar dos miRNAs de particular interés, uno implicado en la ruta ovárica, *mmu-mir-124*, y otro implicado en la ruta testicular, *mmu-mir-144*, desde un punto de vista funcional. Dado su patrón de expresión y los genes en los que tiene dianas potenciales, miR-124 podría contribuir al mantenimiento de bajos niveles de expresión de genes típicamente testiculares, como son *Ar*, *Dmrt1*, *Sox8* o *Sox9* durante el desarrollo del ovario de ratón. Por otra parte, la expresión diferencial de miR-144 en el testículo de 13.5 dpc, sugiere que este miRNA podría contribuir a mantener bajos niveles de expresión de genes propios de la ruta ovárica, tales como *Fst* o *Rspo1*. El objetivo del resto de este trabajo ha consistido precisamente en intentar contrastar estas dos hipótesis.

5.3. *mmu-miR-124*

Según los criterios utilizados en el programa μ iRNAM se identificó *mmu-mir-124* como un buen candidato a estar implicado en el desarrollo ovárico ya que diferentes genes implicados en la determinación del sexo comparten dianas potenciales para este miRNA en sus extremos 3' UTR. Entre ellos se encuentra *Sox9*, uno de los principales genes implicados en la determinación testicular, en la mayoría de los vertebrados. Además, miR-124 está incluido en el grupo B de los identificados en el *microarray* (miRNA expresado diferencialmente en ovario de 13.5 dpc), lo que sugiere claramente que puede jugar un papel importante en los estadios tempranos del desarrollo ovárico, y por tanto merece un estudio más detallado.

5.3.1. Localización genómica y posible regulación de *mmu-mir-124*

Existen 3 secuencias de precursores horquillados de miR-124 que dan lugar a la misma secuencia madura: *mmu-mir-124-1*, *mmu-mir-124-2* y *mmu-mir-124-3*, que se localizan respectivamente en los cromosomas 14, 3 y 2 de ratón. Conaco *et al.* (2006) describieron la presencia de lugares de reconocimiento funcionales RE1 del represor transcripcional REST (RE1-Silencing Transcription factor) en la proximidades de los tres genes *mmu-mir-124*. Concretamente a -22.2 Kb en el caso de *mmu-mir-124-1*, a -3.5 Kb de *mmu-mir-124-2* y a +501pb de *mmu-mir-124-3*.

5.3. *mmu-miR-124*

Hemos realizado búsquedas del entorno genómico de estos tres genes en la base de datos de *Ensembl* con objeto de observar la posición que ocupan en el genoma y su entorno, habiendo detectado la presencia de regiones con características reguladoras en las proximidades de los tres genes. En estas secuencias hemos realizado una búsqueda de posibles secuencias de reconocimiento de otros factores de transcripción, distintos de REST, que pudieran también influir en la expresión de miR-124. Para ello hemos utilizado la herramienta bioinformática TESS, <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess> (Schug, 2003). En cada uno de los tres genes destacamos a continuación las secuencias de reconocimiento más relevantes por la especial posición que los factores de transcripción que las reconocen ocupan en el proceso de diferenciación sexual.

- *mmu-mir-124-1* En la figura 5.16 Los resultados obtenidos con TESS muestran un elevado número de potenciales secuencias de reconocimiento de factores de transcripción generales, aunque cabe destacar la presencia de siete secuencias de reconocimiento de SF1, un gen que implicado en la formación del primordio gonadal en ambos sexos, y en la posterior diferenciación testicular y la esteroidogénesis en gónadas XY (ver Sekido y Lovell-Badge, 2008, para una revisión), cinco de AR, y dos de WT1.

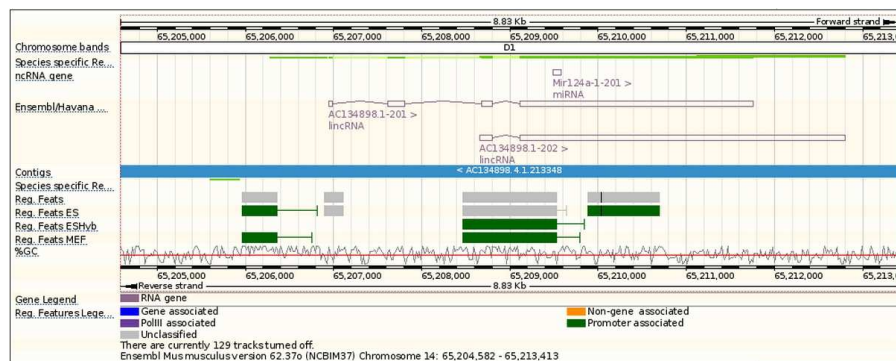


Figura 5.16: Posición del gen *mmu-mir-124-1* en el genoma de *Mus musculus*. Se encuentra en una región intergénica del cromosoma 14, coincidiendo con un exón que comparten dos LincRNAs (*Large intergenic non-coding RNA*). En verde y gris se observan las secuencias reguladoras potenciales localizadas aguas arriba del gen, anotado como Mir124a-1-201.

- *mmu-mir-124-2* En la figura 5.17 podemos ver el entorno genético de la segunda variante precursora de este miRNA, e igualmente se observan secuencias potencialmente reguladoras aguas arriba del gen. Estas secuencias fueron también analizadas con el programa

5. Resultados

TESS, destacando entre las secuencias de reconocimiento de factores de transcripción las correspondientes a dos secuencias de SF1, y tres de AR.

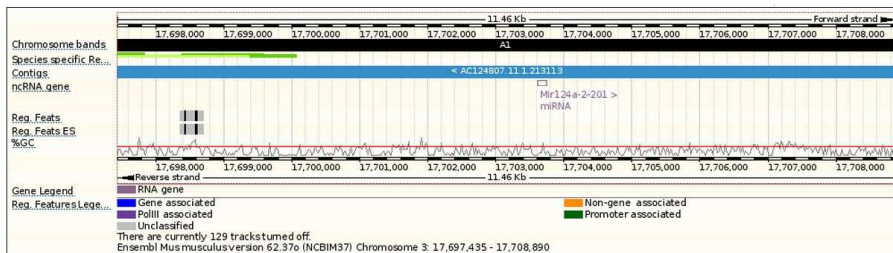


Figura 5.17: Posición del gen *mmu-mir-124-2* en el genoma de *Mus musculus*, se encuentra en una región intergénica del cromosoma 3. En gris se observan las secuencias reguladoras potenciales. Las líneas negras dentro de ellas corresponden a lugares de unión de factores de transcripción verificados y, en este caso, corresponden a las secuencias de unión del represor transcripcional CTCF, también conocido como *11-zinc finger protein*.

- *mmu-mir-124-3* Esta situado en el cromosoma 2. Este precursor fue el primero en encontrarse y originalmente se conoció como *mmu-mir-124a*. En la figura 5.18 podemos observar su posición en el genoma así como sus secuencias reguladoras potenciales aguas arriba del gen. El análisis de estas secuencias con el programa TESS mostró 8 lugares de unión de SF1, 3 de AR y 5 de WT1.

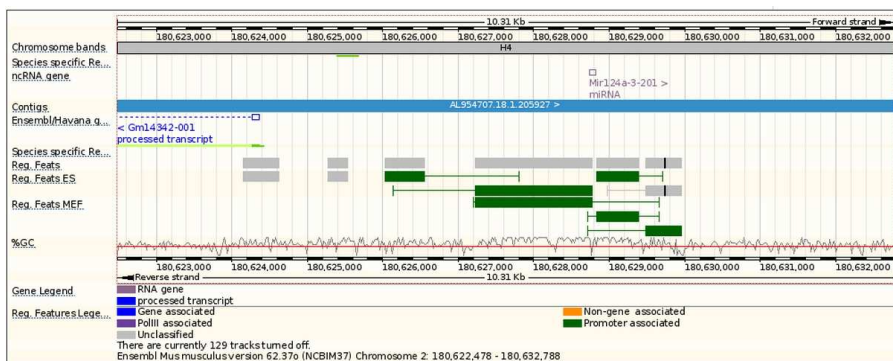


Figura 5.18: Posición del gen *mmu-mir-124-3* en el genoma de *Mus musculus*, se encuentra en una región intergénica del cromosoma 2. En gris se observan las secuencias reguladoras potenciales aguas arriba del gen.

5.3. *mmu-miR-124*

Cada gen de este miRNA produce un pre-miRNA distinto ya que se encuentra en un entorno genético distinto, aunque los tres dan lugar a la misma secuencia madura. En la figura 5.19 podemos observar los 3 bucles de los diferentes pre-miRNAs de miR-124.

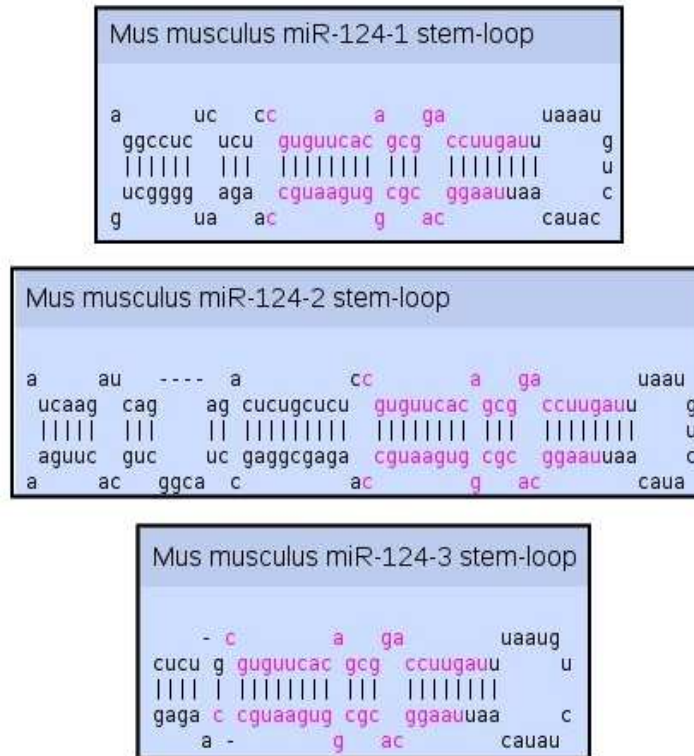


Figura 5.19: Bucle de los precursores *mmu-mir-124-1,2 y 3*.

Todos ellos están estrechamente relacionados con sus homólogos humanos y la secuencia madura es idéntica para los tres precursores.

miR-124 maduro 5' UAAGGCACGCGGUGAAUGCC 3'

Con objeto de identificar cuál o cuáles de estos tres genes se expresan en el ovario en desarrollo, hemos analizado mediante PCR la presencia de cada uno de los precursores de miR-124 con cDNA de ovario de 13.5 dpc. Los resultados de esta amplificación han puesto de manifiesto que los 3 pre-miRNAs se transcriben en la gónada embrionaria femenina, pero no

5. Resultados

a niveles detectables en la masculina (Figura 5.20), corroborando así los resultados del *microarray* y la validación de la expresión diferencial de este miRNA mediante RT-Q-PCR, haciéndolos extensivos a los tres genes *mmu-mir-124*.

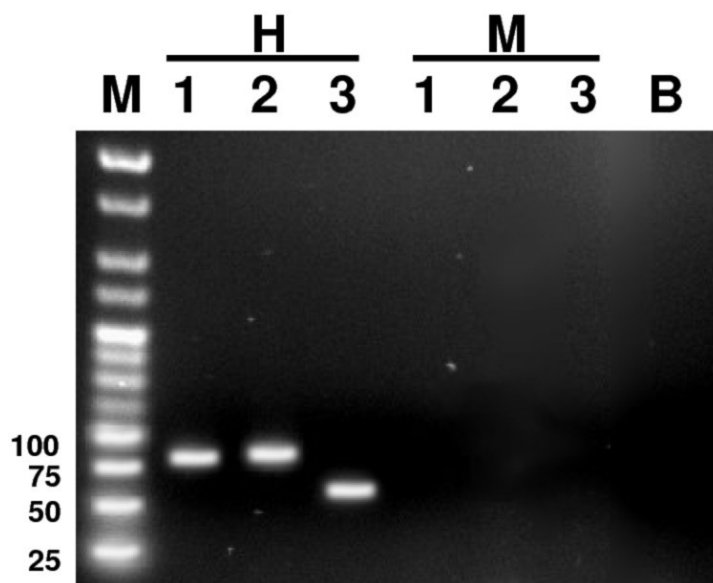


Figura 5.20: Amplificación de los precursores de miR-124 en gónadas de 13.5 dpc. Los números 1, 2 y 3 corresponden con la pareja de cebadores específica para amplificación de los precursores *mmu-mir-124-1*, *mmu-mir-124-2* y *mmu-mir-124-3* respectivamente, para las muestras de ovario (H) y testículo (M).

5.3.2. Expresión diferencial de miR-124 entre estadios y sexo

Con el fin de confirmar los datos de expresión de miR-124 recogidos en nuestro *microarray*, hicimos análisis de retro-transcripción y PCR en tiempo real, e hibridación *in situ* en gónadas embrionarias de ratones macho y hembra de 11.5 y 13.5 dpc. La cuantificación de la expresión por RT-Q-PCR confirmó que miR-124 se activa en el ovario pero no en el testículo durante el período crítico de la diferenciación gonadal embrionaria de ratón, entre 11.5 y 13.5 dpc, tal como podemos observar en la figura 5.21, donde vemos que los datos de RT-Q-PCR se correlacionan de forma significativa con los del *microarray*. Por tanto, miR-124 se encuentra activado específicamente en la gónada femenina de 13.5 dpc.

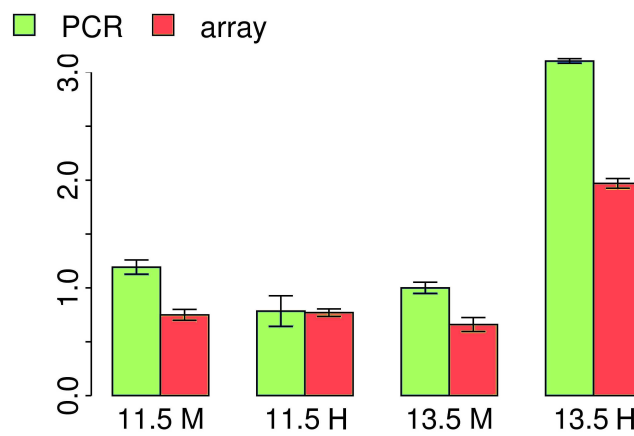


Figura 5.21: RT-Q-PCR para miR-124 en gónadas embrionarias de 11.5 y 13.5 dpc. En verde observamos la representación de la RT-Q-PCR para miR-124 en testículos (**M**) y ovarios (**H**) de 11.5 y 13.5 dpc frente a los datos de expresión relativos del *microarray* para este miRNA, representados en rojo. El análisis de regresión demuestra la ausencia de diferencias significativas en la distribución de la variación entre los dos experimentos ($R^2=0.98$, $P=0.0176$). Los datos normalizados se representan como la media \pm s.e.m. de al menos tres experimentos independientes.

5. Resultados

De forma similar la hibridación *in situ* utilizando una sonda específica para miR-124 (Figura 5.22) confirmó la expresión específica de hembra para este miRNA, y mostró que dicha expresión se produce principalmente en la región cortical de la gónada en 13.5 dpc. La región medular mostraba un nivel similar de marcaje al del mesonefros adyacente o al de la gónada masculina en 13.5 dpc.

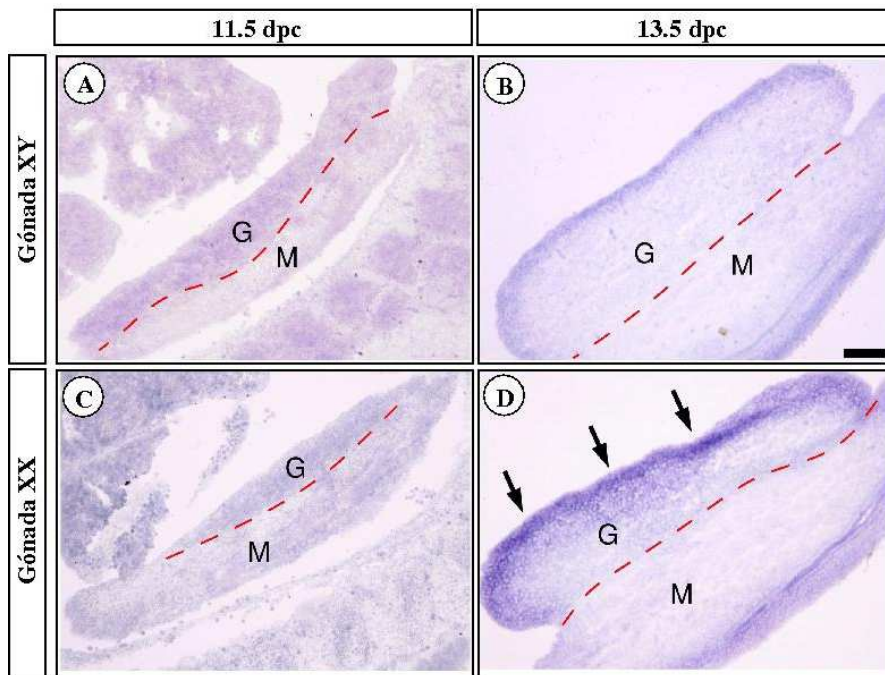


Figura 5.22: Hibridación *in situ* para miR-124 en gónadas embrionarias de 11.5 y 13.5 dpc. La señal de hibridación, violácea, es claramente más intensa en la región cortical de la gónada XX en 13.5 dpc (D) que en el resto de muestras (A-C). Las líneas discontinuas marcan la frontera entre mesonefros (M) y gónada (G). La barra de escala representa 100 μm .

5.3.3. Validación funcional de la diana de miR-124 en la región 3'UTR de *Sox9*

Cheng *et al.* (2009) ya demostraron que *Sox9* tenía una diana biológica funcional para *mmu-mir-124* mediante un ensayo de luciferasa. No obstante, nosotros hemos repetido el experimento con nuestro plásmido de sobre-expresión del miRNA, con el fin de confirmar la capacidad de dicho plásmido para inhibir la expresión uniéndose al extremo 3'UTR de *Sox9 in vitro*. Como se puede observar en la figura 5.23 existe una fuerte inhibición de la luciferasa-*Sox9*-3'UTR por parte del miRNA *mmu-mir-124*. Por tanto, nuestros resultados coinciden con los de Cheng y colaboradores, corroborando la existencia de una diana funcional para miR-124 en el extremo 3'UTR del gen *Sox9* de ratón y demuestran que el plásmido utilizado tiene capacidad real para regular a *Sox9 in vitro*.

5.3.4. Inhibición de miR-124 *in vitro* en células gonadales embrionarias XX de 13.5 dpc

Una vez confirmado que la región 3' UTR de *Sox9* tiene una secuencia diana para *mmu-mir-124*, hipotetizamos que miR-124 podría ser responsable del mantenimiento inactivo de *Sox9* en la gónada femenina durante el período de diferenciación sexual entre 11.5 y 13.5 dpc. Para testar esta hipótesis, nosotros transfectamos células gonadales embrionarias de 13.5 dpc con una sonda específica para silenciar miR-124, llamada *antagomir*, que antagoniza la acción del *mmu-mir-124*. El experimento completo de inhibición se repitió un total de cinco veces. El efecto de inhibición esperado en el nivel de expresión de miR-124 en las células transfectadas con el *antagomir* fue confirmado por RT-Q-PCR. Tal y cómo podemos observar en la figura 5.24 se produjo una reducción significativa del nivel de expresión de este miRNA con respecto a las células control, no transfectadas o transfectadas con otro *antagomir* que antagoniza la acción de un miRNA no presente en tales células, como es el caso de miR-144, que se expresa muy débilmente en ovarios de 13.5 dpc, según los resultados de nuestro *microarray*.

Una vez confirmada la alteración de la expresión de miR-124, medimos qué efecto tiene éste sobre su gen diana, *Sox9*. Observando este efecto tanto a nivel de mensajero como de proteína. Los niveles de mRNA de *Sox9* fueron determinados por RT-Q-PCR, y los resultados de este experimento están representados en la figura 5.25. Se muestra un incremento significativo del mRNA de *Sox9* en células gonadales XX transfectadas con el *antagomir* de miR-124, pero no en las células no tratadas XX, ni en las que fueron transfectadas con el *antagomir* control. Estos resultados indican que la anulación del miR-124 evita la represión de *Sox9* por parte de éste en células de ovario de 13.5 dpc.

5. Resultados

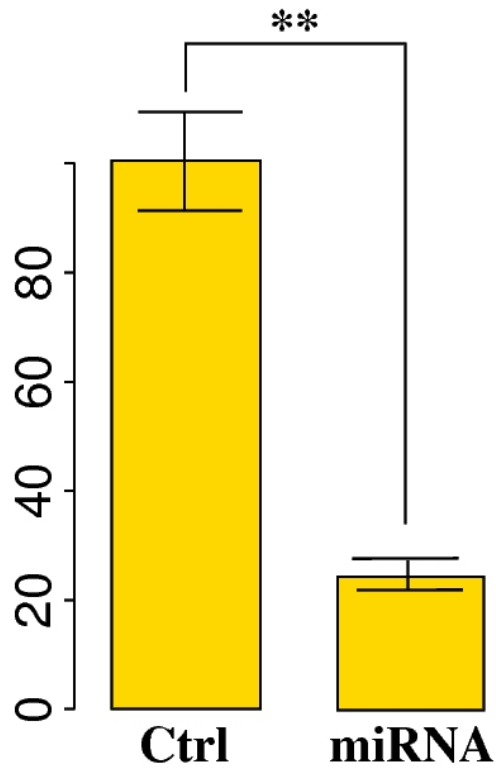


Figura 5.23: Ensayo de luciferasa para la diana miR-124 en 3'UTR de Sox9. La medida normalizada de la luciferasa de luciérnaga en células HEK293 disminuyó significativamente en aquellos cultivos que habían sido co-transfectados con el plásmido de expresión de la luciferasa que incluye el extremo 3' UTR de *Sox9* y con el plásmido de sobre-expresión de *mmu-mir-124* (**miRNA**), con respecto a las células control (**Ctrl**), que sólo fueron transfectadas con el primer plásmido ($P < 0.001$ para una t-Student). Los datos normalizados se representan como la media \pm s.e.m. de dos experimentos independientes.

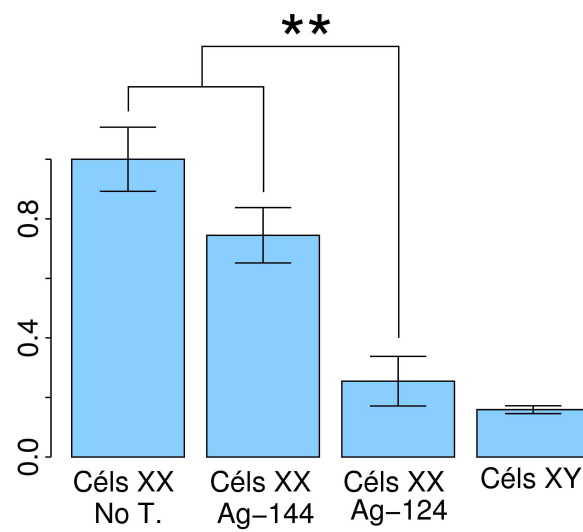


Figura 5.24: Amplificación de miR-124 por RT-Q-PCR tras el experimento de inhibición de la expresión de miR-124 en células gonadales XX Se confirmó la inhibición de la expresión de miR-124 en las células gonadales XX de 13.5 dpc transfectadas con el *antagomir* (**Ag-124**), en comparación con aquellas células no transfectadas (**No T.**) o transfectadas con el *antagomir* control (**Ag-144**). Los niveles de miR-124 disminuyeron a valores similares a los observados en células XY, con una bajada estadísticamente significativa (t-Student, $P < 0.01$). Los datos normalizados se representan como la media \pm s.e.m. de 5 experimentos independientes.

5. Resultados

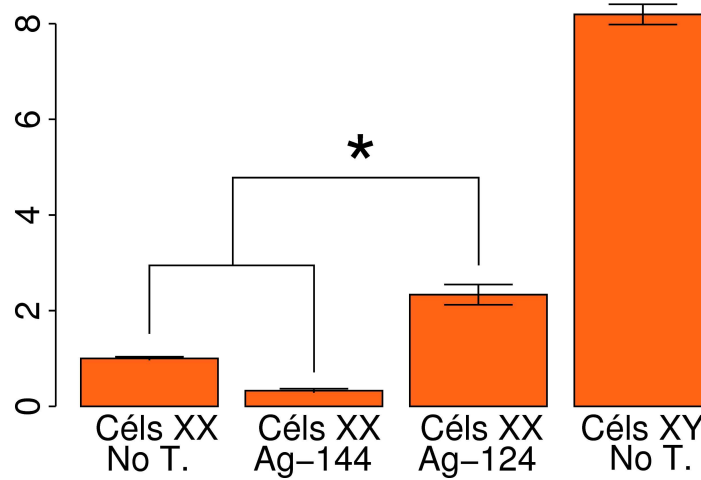


Figura 5.25: RT-Q-PCR para *Sox9* tras el experimento de inhibición de la expresión de miR-124 en células gonadales. Se confirmó el aumento de la expresión de *Sox9* en las células XX transfectadas con el *antagomir* (**Ag-124**), en comparación con las células no transfectadas (**No T.**) o las transfectadas con el *antagomir* control (**Ag-144**). Los niveles de *Sox9* aumentaron, significativamente, según un test estadístico de t-Student, con un valor $P < 0.01$, aunque no alcanzaron valores tan altos como los observados en células XY. Los datos normalizados se representan como la media \pm s.e.m. de 5 experimentos independientes.

Por otro lado, como se observa en la figura 5.26, los análisis de inmunofluorescencia revelaron que la proteína SOX9 estaba ausente en el núcleo de las células gonadales embrionarias XX no tratadas (**No T.**), y en las células XX transfectadas con el *antagomir* control (**Ag-144**). En contraste, la proteína SOX9 fue producida de forma ectópica en las células gonadales XX transfectadas con el *antagomir* específico para miR-124, así como en células gonadales XY, que expresan *Sox9* en condiciones normales.

5.3.5. Efectos de la expresión ectópica de miR-124 en células gonadales embrionarias XY de 13.5 dpc y en condrocitos cultivados *in vitro*

Según los resultados anteriores, sería de esperar que la sobre-expresión de miR-124 indujera la inhibición de *Sox9* en las células en las que se expresa de forma natural. Para contrastar esta hipótesis, transfectamos cultivos celulares de condrocitos y de células gonadales XY (ambos tipos celulares expresan *Sox9* de forma natural) con un vector de expresión para el precursor de este miRNA, que contiene el gen de ratón *mmu-mir-124-2* (provocando así una expresión ectópica del miRNA), o con otro vector, que sirvió como control negativo, ya que contiene la secuencia alterada de este miRNA, *scrambled*. El experimento completo de sobre-expresión se repitió un total de seis veces. Los niveles de expresión de miR-124 aparecieron considerablemente incrementados en las células transfectadas con el vector de expresión, tal y como demostró el correspondiente análisis realizado mediante RT-Q-PCR (Figura 5.27).

Igual que observamos en los experimentos de inhibición, una vez comprobado el aumento de la expresión ectópica del miRNA, se investigó su efecto en la expresión del gen diana, *Sox9*, que fue medida tanto a nivel de mensajero como de proteína. Los niveles de mRNA de *Sox9* se determinaron nuevamente por RT-Q-PCR, tal como muestra la figura 5.28. Podemos observar como la transfección con el vector de expresión para miR-124 redujo significativamente los niveles de expresión de *Sox9* en condrocitos, pero no en células gonadales XY, cuando se comparan con las células sin tratar o con las transfectadas con el plásmido control (*scrambled*). Estos datos indican que la expresión ectópica de miR-124 altera los niveles del mRNA de *Sox9* en condrocitos pero no en células de testículo de 13.5 dpc.

Con objeto de investigar el efecto de este experimento a nivel de proteína SOX9, se realizó un análisis de inmunofluorescencia y un recuento para calcular qué proporción de las células transfectadas contenían además proteína SOX9.

5. Resultados

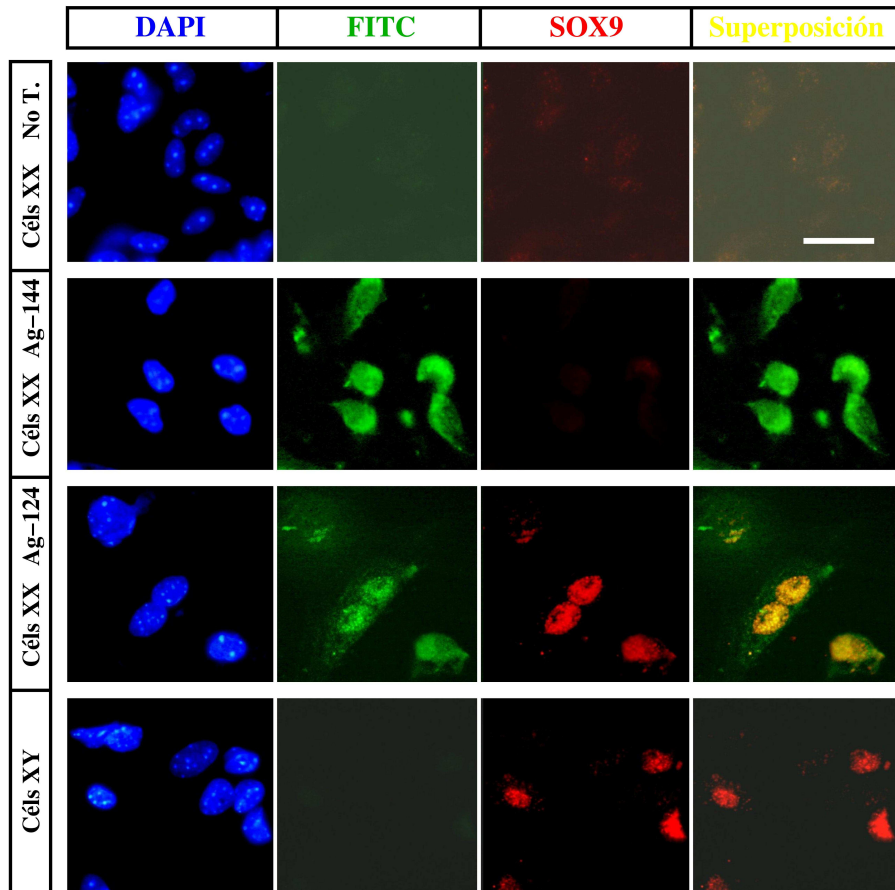


Figura 5.26: Detección de SOX9 mediante inmunofluorescencia en células gonadales transfectadas con el *antagomir* para miR-124. No se detectó proteína SOX9 en células XX no transfectadas (No T) o en las tratadas con el *antagomir control* (Ag-144) pero sí se detectó proteína SOX9 (fluorescencia roja) en las células transfectadas con el *antagomir* específico de 124 (Ag-124) o en las células XY. En azul se aprecian los núcleos teñidos con DAPI, en verde el fluorocromo Fitc acoplado al *antagomir* (lo que permite distinguir las células transfectadas), en rojo la proteína SOX9 y en amarillo la superposición de los canales rojo y verde. La barra de escala representa 10 μm .

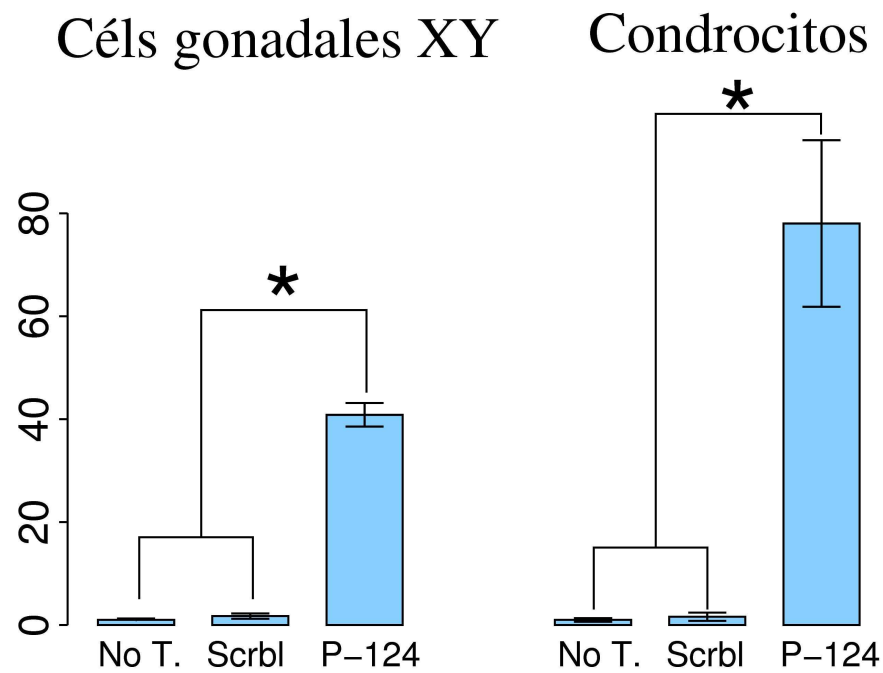


Figura 5.27: RT-Q-PCR para miR-124 tras el experimento de sobre-expresión de miR-124 en células gonadales XY de 13.5 dpc y en condrocitos. Los niveles de expresión de *mmu-mir-124* aumentaron significativamente en las células transfectadas con el plásmido de sobre-expresión (P-124), con respecto a las células no transfectadas (No T.) o las transfectadas con el plásmido control (Scrbl), tanto en células gonadales XY como en condrocitos ($P < 0.01$ para una t-Student). Los datos normalizados se representan como la media \pm s.e.m. de 6 experimentos independientes.

5. Resultados

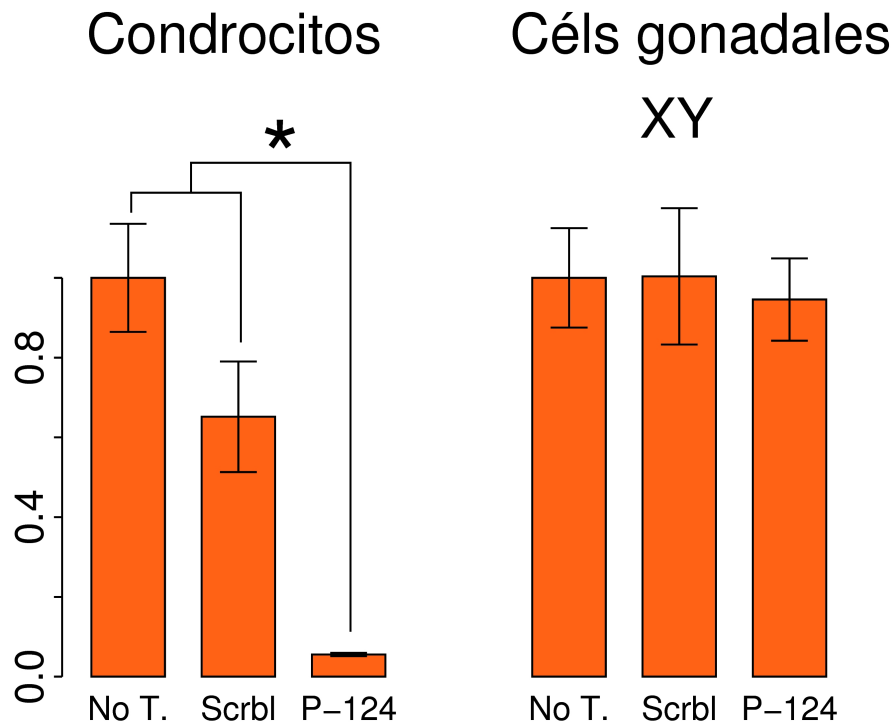


Figura 5.28: Efecto de la expresión ectópica de miR-124 en los niveles de mRNA de *Sox9* en células gonadales XY de 13. dpc y en condrocitos. Tras medir los niveles de mRNA de *Sox9* mediante RT-Q-PCR, no se encontraron diferencias en las células gonadales XY transfectadas con el plásmido de sobre-expresión (**P-124**), con respecto a las células no transfectadas (**No T.**) o las transfectadas con el plásmido control (**Scrbl**). Sin embargo, sí se observó una reducción significativa en los niveles de RNA mensajero de *Sox9* en las células de condrocitos transfectadas con el mismo plásmido de sobre-expresión para miR-124 ($P < 0.01$ para una t-Student). Los datos normalizados se representan como la media \pm s.e.m. de 6 experimentos independientes.

Los estudios de inmunofluorescencia mostraron el mismo efecto que la RT-Q-PCR sobre las células XY (Figura 5.29), de forma que los niveles de SOX9 fueron igualmente altos en ambas muestras transfectadas, así como en las muestras no tratadas. En condrocitos, sin embargo, sí se produce una inhibición de la expresión de SOX9, ya que entre las células transfectadas, que presentan fluorescencia verde, se reduce considerablemente la proporción de aquellas que expresan SOX9, que presentan fluorescencia roja (Figura 5.30). Los resultados de este estudio están recogidos en la figura 5.31.

5.3.6. Sobre-expresión de miR-124 *in vitro* en células gonadales XY de 11.5 dpc

Dado que la expresión de SOX9 es muy robusta en testículos de embriones en 13.5 dpc, repetimos el experimento de sobre-expresión usando células gonadales XY de 11.5 dpc, donde la transcripción de SOX9 está recién iniciada. Sin embargo, los resultados similares, confirmando que la sobre-expresión de miR-124 no es suficiente para afectar a la expresión de SOX9 en células gonadales XY, a pesar de comprobar que las transfecciones habían tenido efecto en el aumento de la expresión de miR-124 en las células embrionarias XY de 11.5 dpc, como se puede observar en la figura ???. Este experimento de sobre-expresión en 11.5 dpc se repitió un total de tres veces.

También medimos mediante RT-Q-PCR e inmunofluorescencia el efecto sobre el gen *Sox9*, tanto a nivel de RNA mensajero como de proteína. Los niveles de RNA mensajero no se vieron alterados después de la transfección, como se puede observar en la figura 5.33, donde se mantienen niveles constantes en todas las muestras, aunque se hayan sometido a diferentes tratamientos de transfección. Dejando de manifiesto que la expresión de *Sox9* es muy fuerte desde su comienzo, y la sobre-expresión de este miRNA no es suficiente para disminuir estos niveles.

Se hicieron nuevamente recuentos celulares para determinar el porcentaje de células transfectadas que tenían proteína SOX9 (figura 5.34). Los resultados indican que el número de células transfectadas positivas para la proteína SOX9 es similar en ambas muestras, tanto las transfectadas con el plásmido de sobre-expresión como con el plásmido control, lo que concuerda con los niveles de mensajero medidos anteriormente. Estos recuentos se hicieron con imágenes de inmunofluorescencia como las que quedan recogidas en la figura 5.35.

5. Resultados

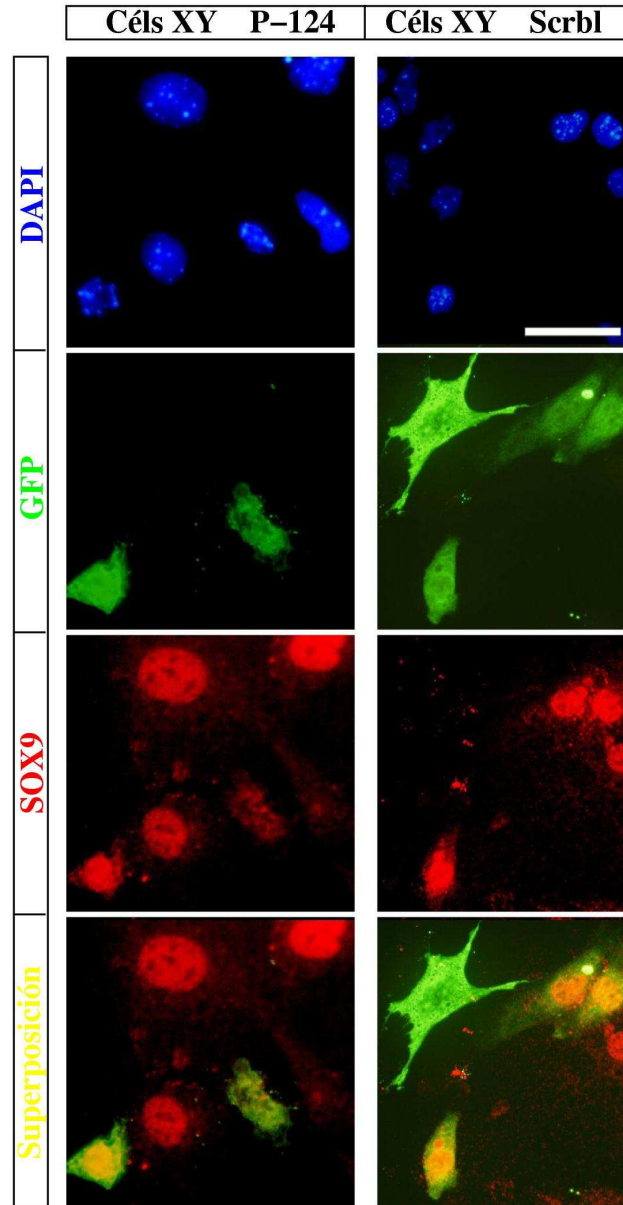


Figura 5.29: Detección de SOX9 mediante inmunofluorescencia en células gonadales XY de 13.5 dpc transfectadas con el vector de expresión *mmu-mir-124-2*. En azul se observan los núcleos teñidos con DAPI, en verde vemos la señal GFP del plásmido, en rojo se detecta la proteína SOX9 y en amarillo la superposición de los canales rojo y verde, donde vemos que las células expresan SOX9 a pesar de estar transfectadas con el plásmido de sobre-expresión para miR-124. La barra de escala representa 10 μm .

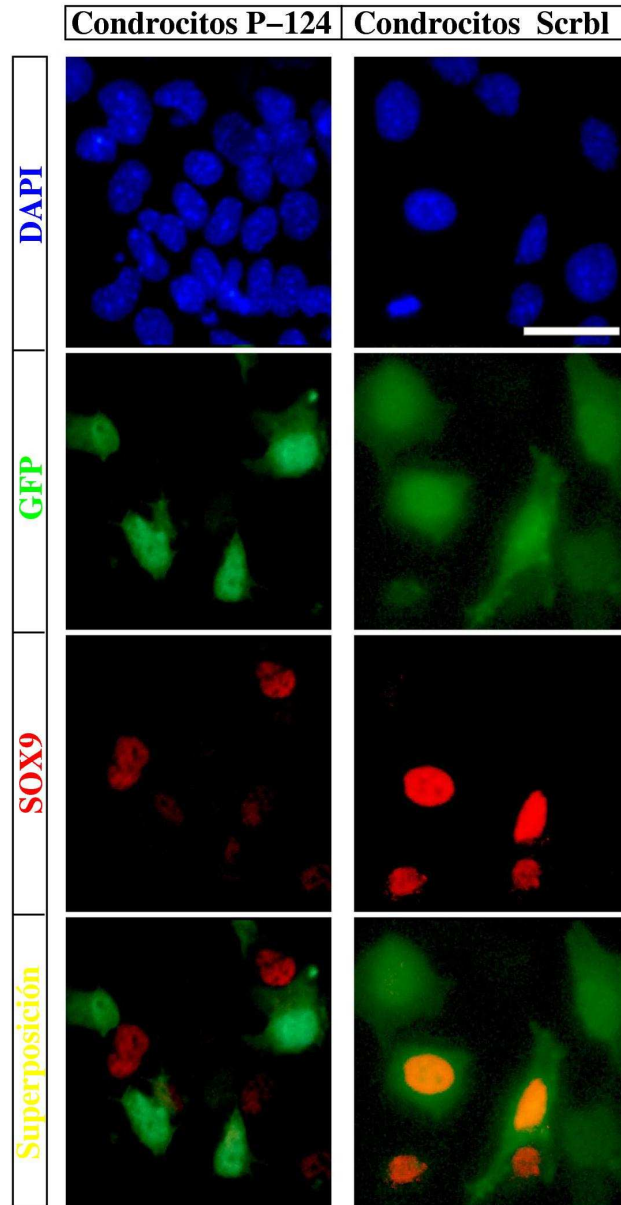


Figura 5.30: Detección de SOX9 mediante inmunofluorescencia en condrocitos transfectadas con el vector de expresión *mmu-mir-124-2*. En la superposición de canales, señal amarilla, vemos que en las células que fueron transfectadas, señal verde (GFP), no se detecta expresión de SOX9, señal roja, indicando que el plásmido de sobre-expresión para miR-124 reduce los niveles de SOX9. La barra de escala representa 10 μm .

5. Resultados

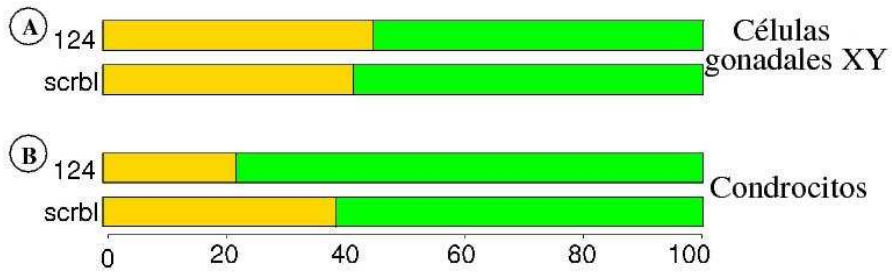


Figura 5.31: Porcentaje de células gonadales XY de 13.5 dpc y condrocitos transfectados que expresan SOX9. La figura muestra el total de células transfectadas, detectadas por la señal verde fluorescente de la proteína GFP, y de ese total se muestra en amarillo el porcentaje de células que expresaban SOX9, detectada mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-Sox9, para las dos muestras y para los dos tipos de plásmido, el control (**Scrbl**) y el plásmido de sobre-expresión (**P-124**).

Céls gonadales XY

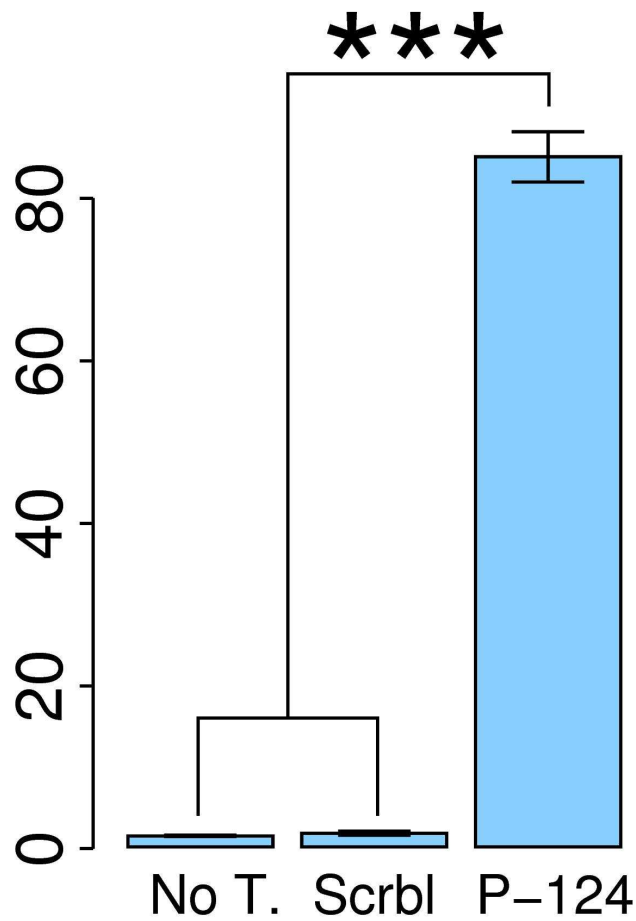


Figura 5.32: RT-Q-PCR para miR-124 tras el experimento de sobre-expresión de miR-124 en células gonadales XY de 11.5 dpc. Los niveles de expresión de miR-124 ponen de manifiesto el aumento significativo en las células transfectadas con el plásmido de sobre-expresión (**P-124**), con respecto a las no transfectadas (**No T.**) o aquellas transfectadas con el plásmido control (**Scrbl**), con un $P < 0.0001$ para una t-Student. Los datos normalizados se representan como la media \pm s.e.m. de 3 experimentos independientes.

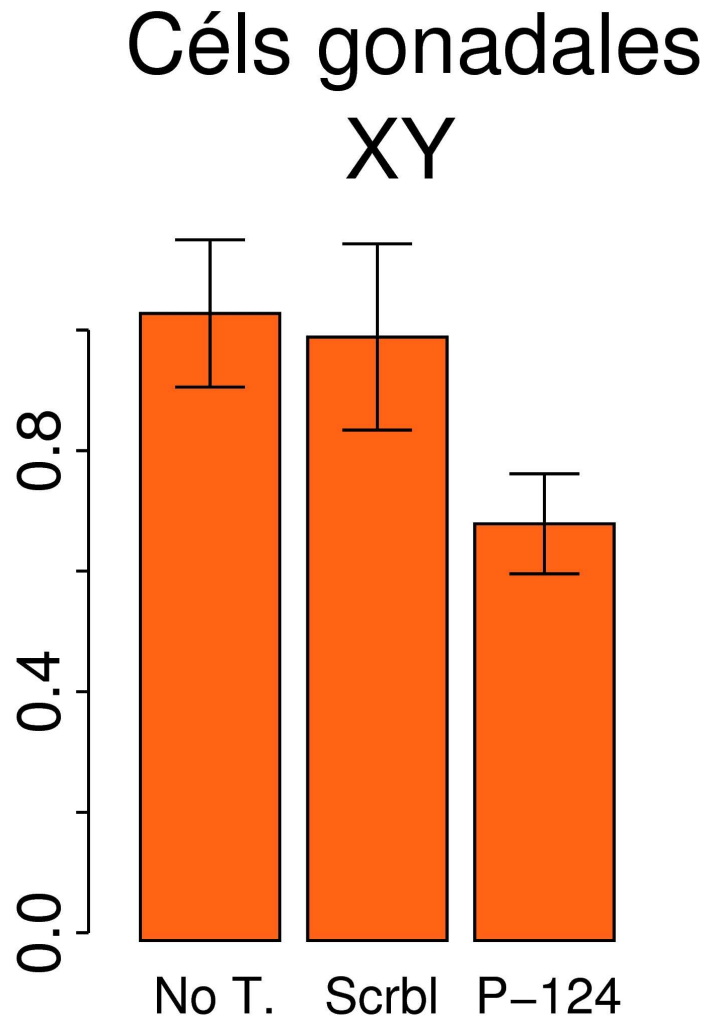


Figura 5.33: RT-Q-PCR para *Sox9* tras el experimento de sobre-expresión de miR-124 en células gonadales XY de 11.5 dpc. La transfección con el vector de sobre-expresión para miR-124 no tuvo un efecto significativo en la disminución del RNA mensajero de *Sox9* en células gonadales XY (**P-124**) cuando se comparan con las células sin tratar (**No T.**) o las transfectadas con el plásmido control (**Scrbl**). Los datos normalizados se representan como la media \pm s.e.m. de 3 experimentos independientes.

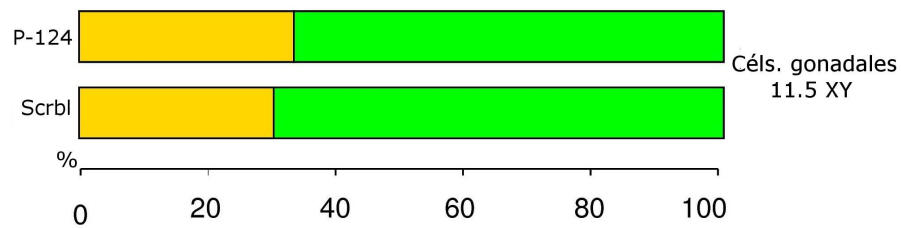


Figura 5.34: Porcentaje de células transfectadas SOX9+ en células gonadales XY de 11.5 dpc. Las barras representan el total de células transfectadas. La porción amarilla representa la fracción de células transfectadas que expresan SOX9. Se observa que esta fracción es similar en ambos tratamientos: las células transfectadas con el plásmido de sobre-expresión (**P-124**) y aquellas que fueron transfectadas con el plásmido control (**Scrbl**). Estos resultados indican que, en células XY en 11.5 dpc, la sobre-expresión de miR-124 no tiene un efecto significativo sobre la expresión de la proteína SOX9.

5. Resultados

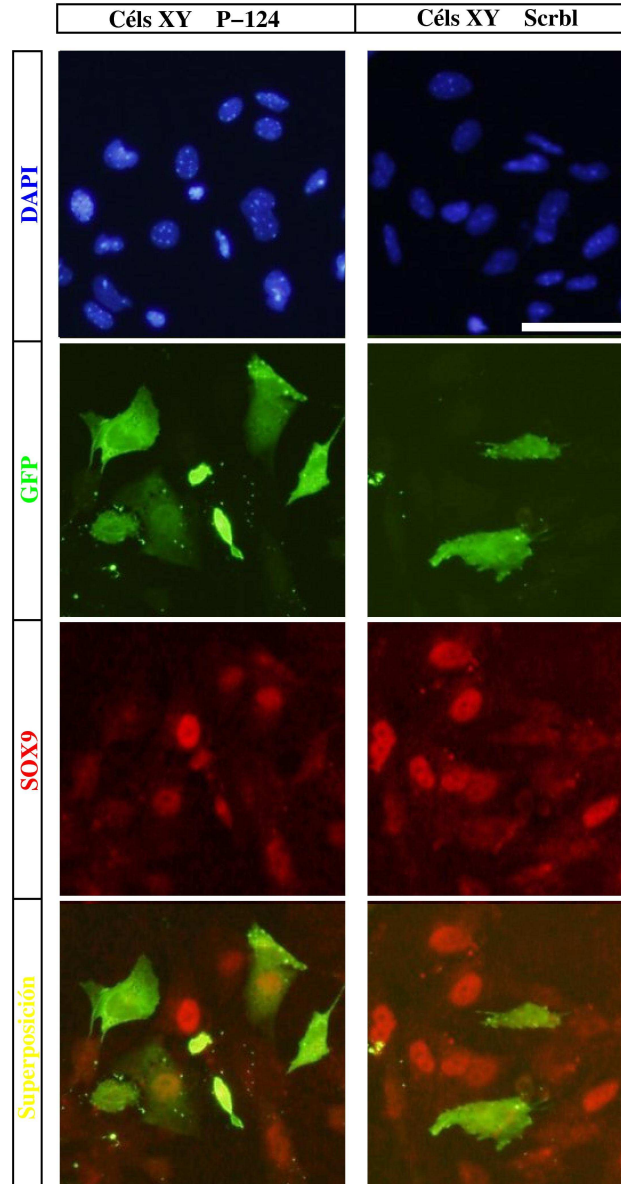


Figura 5.35: Detección de SOX9 mediante inmunofluorescencia en células gonadales XY de 11.5 dpc transfectadas con el vector de expresión *mmu-mir-124-2*. En azul se aprecian los núcleos teñidos con DAPI, en verde la señal GFP del plásmido, en rojo la proteína SOX9, y en amarillo se observa la superposición de los canales rojo y verde. La barra de escala representa 10 μm .

5.4. *mmu-miR-144*

5.4.1. Localización genómica y posible regulación de *mmu-mir-144*

En el caso de miR-144 sólo existe una secuencia precursora en el genoma de ratón. Tal y como se observa en la figura 5.36 (extraída de la base de datos de *Ensembl*), este miRNA se encuentra formando un *cluster* con miR-451, y aguas arriba de ambos genes existen secuencias potencialmente reguladoras. Como en el caso de los genes de *mmu-mir-124*, las consultas en *Ensembl* revelaron la presencia de una región hipersensible a la DNasa con potencial capacidad reguladora cerca del extremo 5' del gen de *mmu-mir-144* (región gris en la figura 5.36). De hecho, Zhang *et al.* (2010) han comprobado que GATA4 activa el promotor de este *cluster* en cardiomiocitos. Nosotros, además, hemos realizado consultas con el programa TESS en busca de otras posibles secuencias reguladoras. Es de destacar que este análisis con TESS reveló la presencia de un presunto sitio de unión del factor de transcripción SRY en esta región.

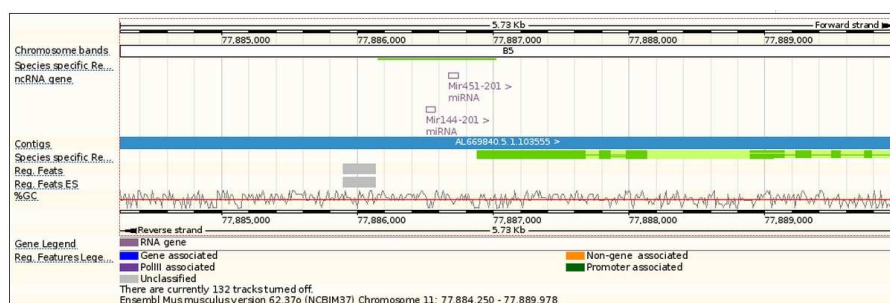


Figura 5.36: Posición del gen *mmu-mir-144* en el genoma de *Mus musculus*, que se encuentra en una región intergénica del cromosoma 11 formando un cluster con *mmu-mir-451*. Aguas arriba de estos genes, en gris, se observan secuencias con potencial regulador.

En la figura 5.37 se observa el precursor horquillado para el gen *mmu-mir-144* y, a continuación, la secuencia madura del miRNA, que se encuentra ampliamente conservada entre especies, como ocurre con la mayoría de miRNAs.

La secuencia madura de *mmu-mir-144* mostrada aquí representa la forma comúnmente más clonada en muchos estudios realizados a gran escala (Landgraf *et al.*, 2007).

5. Resultados

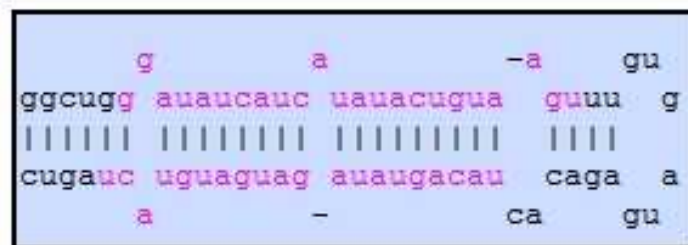


Figura 5.37: Bucle del precursor de *mmu-mir-144*.

miR-144 maduro 5' UACAGUAUAGAUGAUGUACU 3'

5.4.2. Expresión diferencial de miR-144 entre estadios y sexo

Con el fin de confirmar los datos de expresión recogidos en nuestro *microarray* para miR-144, hicimos análisis de RT-PCR en tiempo real e hibridación *in situ* en gónadas embrionarias de ratón. La cuantificación de la expresión por RT-Q-PCR confirmó que miR-144 se activa en testículo pero no en ovario durante el período crítico de la diferenciación gonadal embrionaria de ratón, entre 11.5 y 13.5 dpc. Esto se puede observar en la figura 5.38, donde vemos como los datos de RT-Q-PCR se correlacionan de forma significativa con los del *microarray*.

De forma similar, la hibridación *in situ* con una sonda específica para miR-144 confirmó que este miRNA se expresa específicamente en machos (Figura 5.39), principalmente en la región cortical de la gónada XY en 13.5 dpc. La región medular mostró un nivel similar de marcaje al del mesonefros adyacente o al de la gónada femenina en 13.5 dpc.

5.4.3. Validación de la diana de *Rspo1* para miR-144

Para demostrar si es realmente funcional la diana predicha de *Rspo1* para miR-144, realizamos un ensayo de luciferasa similar al descrito para *Sox9* y *miR-124*. Utilizamos un plásmido de sobre-expresión de miR-144 con el fin de confirmar la capacidad de éste miRNA para inhibir la expresión de *Rspo1 in vitro*. Como se puede observar en la figura 5.40, se produjo una inhibición significativa de *Rspo1* por parte de *mmu-mir-144*, lo que corrobora la existencia de una diana para miR-144 en el extremo

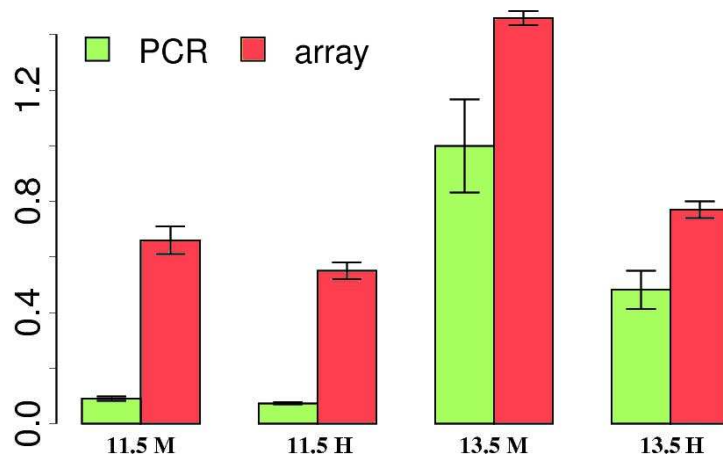


Figura 5.38: Cuantificación por RT-Q-PCR de la expresión de *miR-124* en gónadas embrionarias de 11.5 y 13.5 dpc En verde se representan los resultados de la RT-Q-PCR para *miR-144* en testículos (**M**) y ovarios (**H**) de 11.5 y 13.5 dpc, frente a los datos de expresión relativos del *microarray* para este *miRNA*, en rojo. El análisis de regresión indica la ausencia de diferencias significativas en la distribución de la variación entre los dos experimentos ($R^2=0.96$, $P=0.037$). Por tanto *miR-144* es activado específicamente en la gónada masculina de 13.5 dpc.

5. Resultados

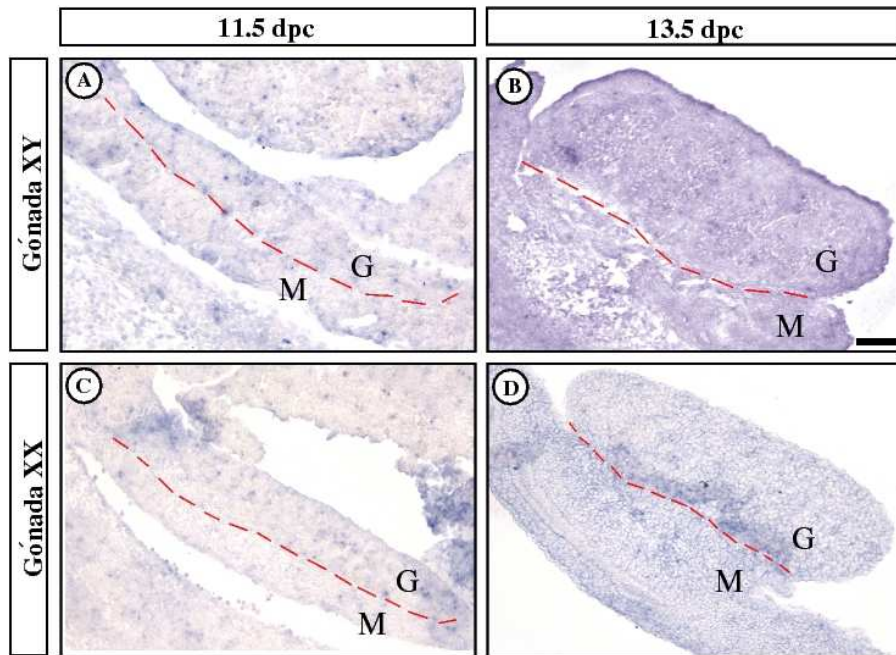


Figura 5.39: Hibridación *in situ* para miR-144 en gónadas embrionarias de 11.5 y 13.5 dpc. La señal de hibridación, violácea, es claramente más alta en la región cortical de la gónada XY (B) en 13.5 dpc que en el resto de muestras (A, C y D). Las líneas discontinuas marcan la frontera entre mesonefros (M) y gónada (G). La barra negra de la escala representa 100 μ m.

3' UTR del gen *Rspo1*. Sin embargo, esta inhibición no es tan aguda como la que ocurría en el caso de *Sox9* y *miR-124*. Como se observa en la figura 5.41, aunque la eficacia de transfección es alta, no alcanza sin embargo el 100 %. Los recuentos arrojan una eficacia aproximada del 65 %, para cada plásmido, por lo que la proporción de células co-transfectadas con los dos plásmidos sería 0.65². Teniendo en cuenta este hecho, sólo se podría observar el efecto de bajada del nivel de luciferasa en esta proporción de células, pero probablemente no en el total, por lo que las diferencias de expresión corregidas serían mayores que las observadas con los datos totales sin corregir. No obstante, estas diferencias ya son estadísticamente significativas en los datos sin corregir, por lo que la corrección únicamente podría aumentar las mismas.

5.4.4. Inhibición de miR-144 *in vitro* en células gonadales XY de 13.5 dpc

De forma similar al caso de *Sox9*, una vez confirmado que la región 3' UTR de *Rspo1* tiene una secuencia diana funcional para el miRNA *mmu-mir-144*, se puede hipotetizar que miR-144 reduce los niveles de *Rspo1* en la gónada masculina durante el período de diferenciación sexual entre 11.5 y 13.5 dpc. Para contrastar esta hipótesis, transfectamos células gonadales embrionarias de 13.5 dpc con un *antagomir* para silenciar específicamente la acción de *mmu-mir-144*. El experimento de inhibición completo se repitió un total de cinco veces. El efecto de inhibición esperado en el nivel de expresión de miR-144 en las células transfectadas con el *antagomir* fue confirmado por RT-Q-PCR. Tal y como podemos observar en la figura 5.42 se produjo una reducción significativa en el nivel de expresión de este miRNA con respecto a las células control, no transfectadas o transfectadas con otro *antagomir*, Ag-124 en este caso.

La expresión de miR-144 se analizó en células gonadales XY de 13.5 dpc, confirmando la inhibición de la expresión de miR-144 en las células transfectadas con el *antagomir* **Ag-144**, en comparación con las células no transfectadas (**No T.**), o las transfectadas con el *antagomir* control **Ag-124**. Los niveles de miR-144 disminuyeron significativamente (según un test estadístico de t-Student, con un valor $P < 0.01$). Los datos normalizados se representan como la media \pm s.e.m. de 5 experimentos independientes.

Una vez confirmada la inhibición ectópica de miR-144 en las células embrionarias XY, analizamos el efecto sobre su gen diana, *Rspo1* mediante RT-Q-PCR. En la figura 5.43 se representan los niveles relativos de mRNA de *Rspo1*, donde se observa un cierto aumento del mensajero *Rspo1* en células gonadales XY transfectadas con el *antagomir* para miR-144, con respecto a aquellas no transfectadas; sin embargo, este aumento

5. Resultados

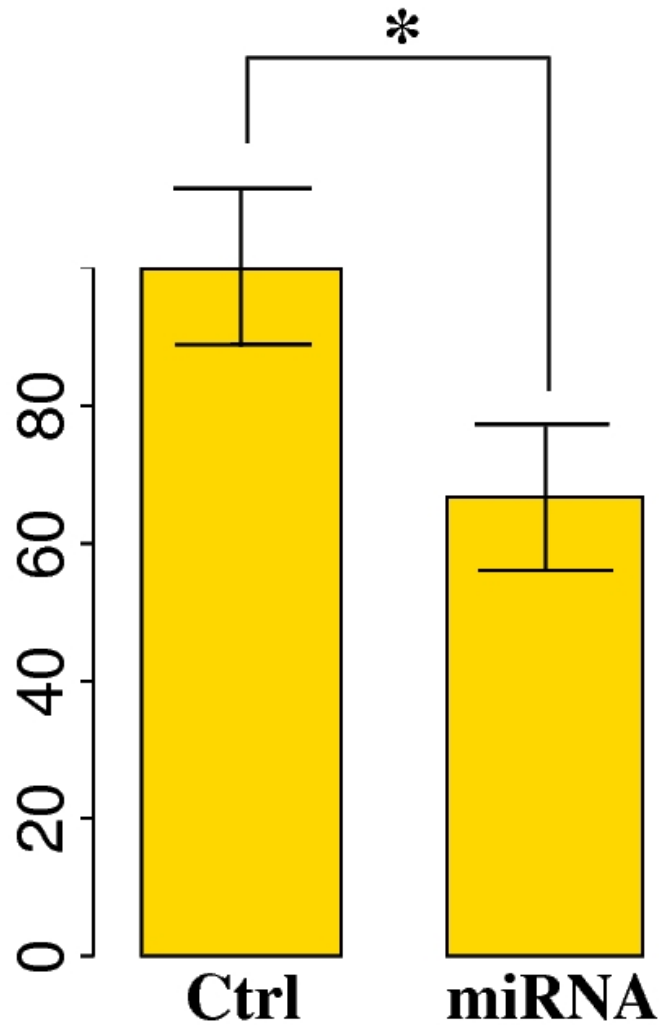


Figura 5.40: Ensayo de luciferasa para corroborar la diana de miR-144 de *Rspo1*. La medida normalizada de la luciferasa de la luciérnaga en células HEK293 disminuyó significativamente en aquellas que habían sido co-transfectadas con el plásmido de expresión que contenía el extremo 3' UTR de *Rspo1* aguas arriba del gen de la luciferasa de luciérnaga y con el plásmido de sobre-expresión de *mmu-mir-144* (**mirna**), con respecto a las células control (**Ctrl**), que sólo fueron transfectadas con el primer plásmido ($P < 0.01$ para una t-Student). Los datos normalizados se representan como la media \pm s.e.m. de 3 experimentos independientes.

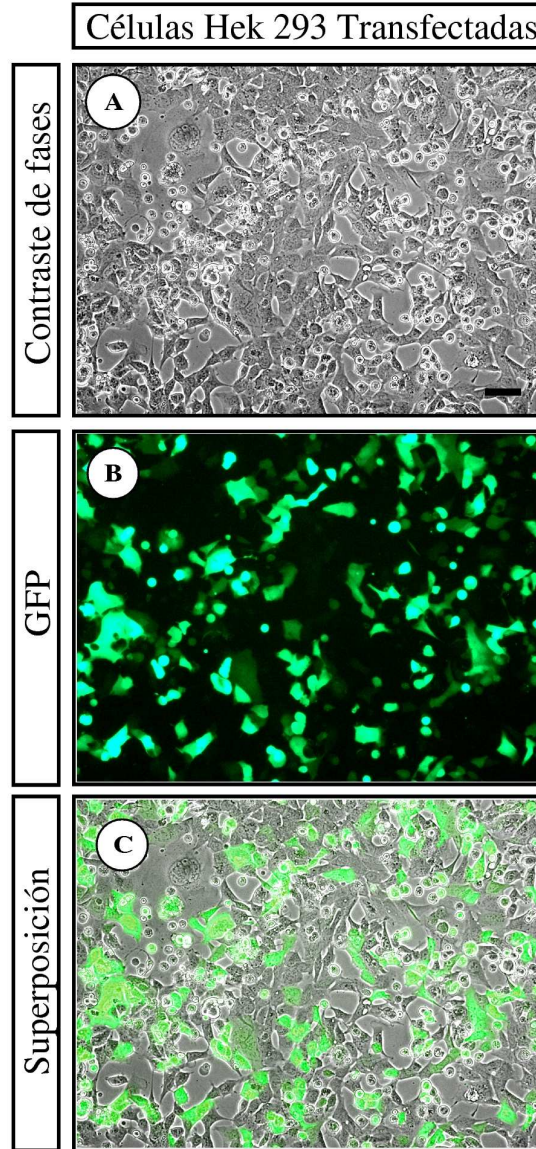


Figura 5.41: Eficacia de transfección evidenciada por la fluorescencia de la proteína GFP *in vivo*. En la imagen A podemos observar las células *in vivo* en contraste de fases. En la imagen B sólo vemos aquellas que se han transfectado y están expresando la proteína fluorescente GFP. La imagen C muestra una superposición de A y B donde se puede hacer un recuento del porcentaje de células transfectadas que, en este caso, es aproximadamente del 65%. La barra representa 10 μ m.

5. Resultados

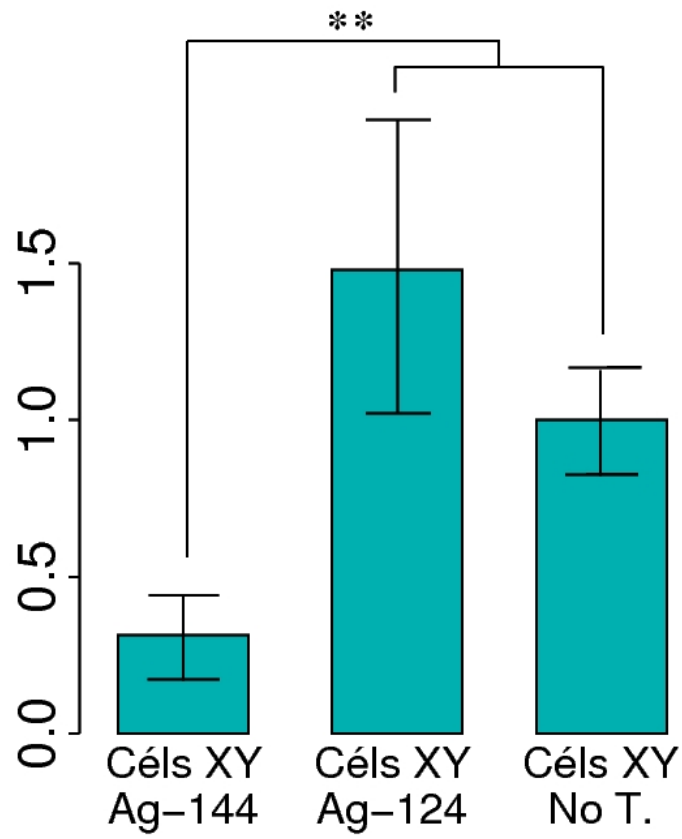


Figura 5.42: Cuantificación por RT-Q-PCR de la expresión de miR-144 tras el experimento de inhibición con Ag-144.

no es significativo según un test de t-Student. Además, los niveles de mRNA de las células control (transfectadas con el Ag-124) son similares a los de las células problema, con lo que no podemos asegurar que este efecto sea atribuible a la inhibición por parte de miR-144.

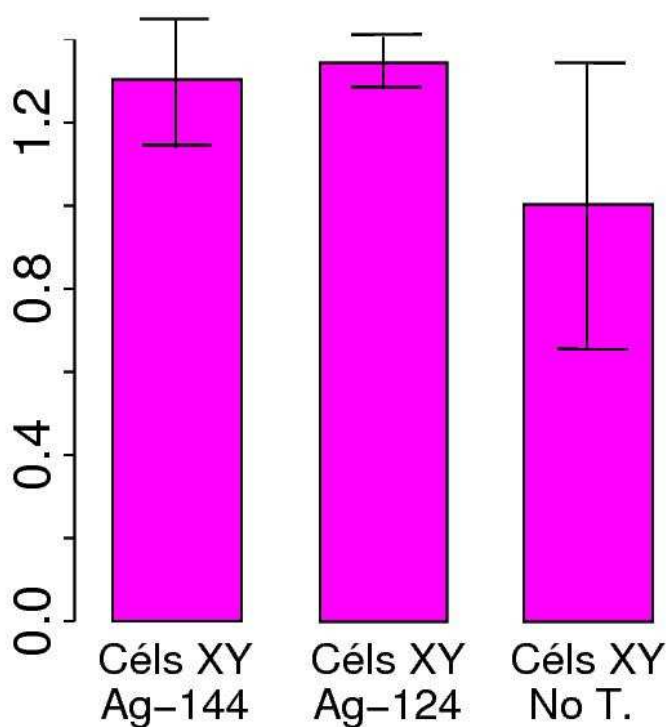


Figura 5.43: Cuantificación por RT-Q-PCR de la expresión de *Rspo1* tras el experimento de inhibición de miR-144 en células gonadales XY de 13.5 dpv. Se observa una tendencia hacia el aumento de la expresión de *Rspo1* en las células XY transfectadas con el *antagomir* (**Ag-144**), en comparación con las células no transfectadas (**No T.**); sin embargo, este aumento no es estadísticamente significativo según una t-Student. Además, se detectaron niveles similares en las células transfectadas con el *antagomir* control (**Ag-144**). Los datos normalizados se representan como la media \pm s.e.m. de 5 experimentos independientes.

5. Resultados

5.4.5. Sobre-expresión de miR-144 en células gonadales XX de 13.5 dpc cultivadas *in vitro*

Transfectamos células gonadales embrionarias XX de 13.5 dpc con un vector de sobre-expresión de miR-144, con objeto de comprobar su posible efecto sobre la expresión natural de *Rspo1* en este estadio y sexo. El experimento se repitió igualmente un total de 5 veces. Como se observa en la figura 5.44 los niveles de miR-144 aumentaron significativamente en las células transfectadas con el plásmido de sobre-expresión, que es el mismo plásmido con el que habíamos testado *in vitro* una diana en el extremo 3' UTR de *Rspo1*. Por lo tanto, era de esperar una bajada en la expresión de *Rspo1 in vivo*.

El análisis mediante RT-Q-PCR del efecto de la sobre-expresión de miR-144 en los niveles de mRNA de *Rspo1* mostró que estos no se vieron afectados (Figura 5.45) tras el experimento, lo que sugiere que la expresión de este miRNA, por sí solo, no es suficiente para disminuir significativamente los niveles de *Rspo1 in vivo*.

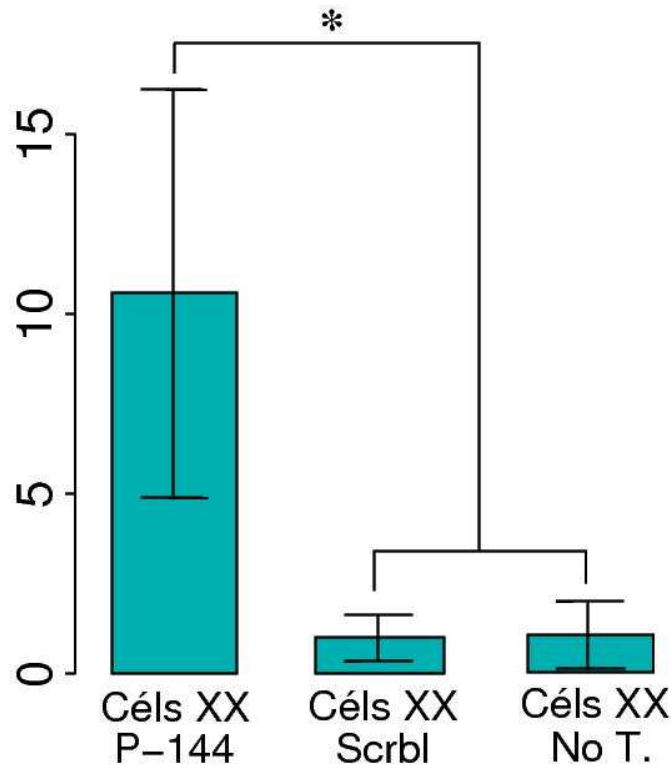


Figura 5.44: Cuantificación por RT-Q-PCR de la expresión de miR-144 tras el experimento de sobre-expresión de miR-144 en células gonadales XX de 13.5 dpc. Se observa un aumento significativo en los niveles de expresión de miR-144 en las células XX transfectadas con el plásmido de sobre-expresión (**P-144**) con respecto a las células no transfectadas (**No T.**) o las transfectadas con el plásmido control (**Scrbl**), según una t-Student, $P < 0,01$. Los datos normalizados se representan como la media \pm s.e.m. de 5 experimentos independientes.

5. Resultados

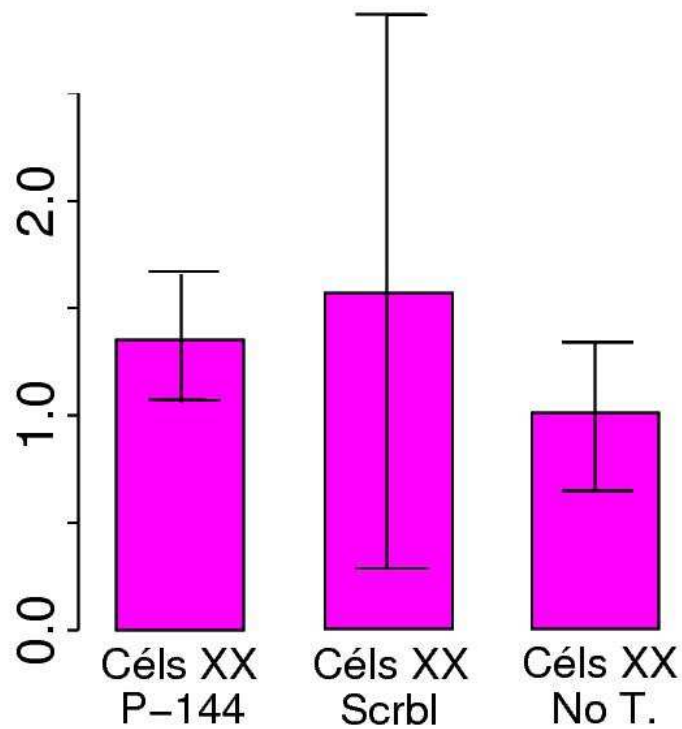


Figura 5.45: Cuantificación por RT-Q-PCR de los niveles de mRNA de *Rspo1* tras el experimento de sobre-expresión de miR-144 en células gonadales XX de 13.5 dpc. La transfección con el vector de expresión para miR-144 no produjo una bajada significativa en los niveles de *Rspo1* en las muestras tratadas con el plásmido (P-144) con respecto a las no tratadas (No T.) o las tratadas con el plásmido control (Scrbl), según una t-Student. Los datos normalizados se representan como la media \pm s.e.m. de 5 experimentos independientes.

6. Discusión

Contenidos

6.1. Microarray	215
6.2. μiRNAM	220
6.3. miR-124	229
6.4. miR-144	234

6.1. Microarray

-Los miRNAs juegan papeles centrales el proceso de diferenciación gonadal

A pesar del descubrimiento del gen determinante de testículo, *SRY*, hace más de 20 años (Gubbay *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990b), los aspectos críticos de las bases genéticas de la determinación del sexo permanecen sin resolver. Aunque actualmente se conocen muchos genes implicados en este proceso, todavía quedan interrogantes por resolver, especialmente en cuanto a su regulación, haciendo difícil descifrar la entramada red de regulación génica que controla el desarrollo gonadal temprano. Desde el momento en que se supo que los miRNAs están implicados en procesos de desarrollo (Ambros, 2004), tomó cuerpo la idea de que también éstos podrían tener algún papel en la determinación del sexo. De hecho, varios estudios recientes han descrito la existencia de algunos miRNAs con expresión sexual diferencial (Takada *et al.*, 2009), mostrando, por ejemplo, que DICER es necesario para el mantenimiento del fenotipo y la función de las células de Sertoli en los machos (Papaioannou *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010), así como para el desarrollo del tracto reproductivo en hembras (Hong *et al.*, 2008; Nagaraja *et al.*, 2008; Gonzalez y Behringer, 2009; Pastorelli *et al.*, 2009). Estos datos indican claramente que este tipo de regulación post-transcripcional gobernada por miRNAs puede operar en el caso del desarrollo y la diferenciación gonadal en mamíferos.

La identificación de miRNAs específicos de tejido es el primer paso hacia el conocimiento de sus funciones biológicas, incluyendo tanto la regulación de la diferenciación de tejido, como el mantenimiento de la

6. Discusión

identidad de dicho tejido. Haciendo uso de la tecnología de *microarray* para miRNAs, nosotros hemos identificado 22 miRNAs que muestran expresión sexualmente dimórfica y un patrón de expresión dependiente del estadio de desarrollo en las gónadas durante el período crítico de la determinación sexual. El criterio de elección de los estadios 11.5 y 13.5 dpc para la búsqueda de miRNAs se estableció para abarcar la ventana temporal de la determinación y diferenciación sexual en ratón, ya que en 11.5 dpc la gónada está indiferenciada en ambos sexos, en 12.5 dpc se produce la diferenciación y en 13.5 dpc ya tenemos totalmente establecido un desarrollo ovárico o testicular. Por tanto, la comparación de los patrones de expresión de miRNAs entre 11.5 y 13.5 dpc, y entre machos y hembras, nos permite ver realmente qué miRNAs intervienen en este proceso. No existen precedentes de este tipo, ya que 13.5 dpc es el estadio más temprano en el que se ha estudiado la expresión de miRNAs en la gónadas en desarrollo (Takada *et al.*, 2009). Por tanto, ningún trabajo previo había abordado el estudio de la determinación sexual desde esta perspectiva. Así, los estudios basados en la producción de animales *knockout* condicionales que tenían DICER inactivado utilizaron la recombinasa Cre bajo el control del promotor de la AMH que, como se expresa a partir de 14.5 dpc, no permite estudiar el periodo de determinación sexual, que ocurre antes, entre 11.5 y 13.5 dpc (Papaioannou *et al.*, 2009). Los embriones de ratones *knockout* no condicionales tampoco son útiles para este propósito pues mueren a los 7.5 dpc, lo que demuestra que los miRNAs son esenciales para el desarrollo del embrión, en líneas generales (Bernstein *et al.*, 2003).

En nuestros estudios de perfil de expresión, un alto número de miRNAs (71 de un total de 757) mostraron expresión diferencial en gónadas embrionarias cuando se comparó entre sexos o entre estadios de desarrollo (11.5 y 13.5 dpc), indicando que los miRNAs pueden jugar múltiples papeles en el desarrollo gonadal, tanto antes como después de la diferenciación sexual. Sabemos que los genes responsables de la determinación del sexo se expresan en las células somáticas de la línea sustentacular (Albrecht y Eicher, 2001), y que una porción de estos 71 miRNAs pueden expresarse en otros tipos celulares (endoteliales, precursores de la línea esteroideogénica y células germinales) y no tendrán implicación en los procesos de determinación del sexo. Por ejemplo, Hayashi *et al.* (2008) estudió el perfil de expresión de algunos miRNAs en las PGCs de embriones desde 9.5 dpc hasta 13.5 dpc y cuatro de miRNAs identificados por nosotros, miR-103, miR-183, miR-20 y miR-290, coinciden con los de su estudio, por lo que en principio estos miRNAs probablemente tengan funciones no relacionadas con la determinación del sexo, que podrían ser comunes para ambos sexos. Sin embargo, 22 miRNAs del total de los 71 expresados diferencialmente en nuestro *microarray* mostraron ser activados o inhibidos durante el período crítico

6.1. Microarray

de desarrollo sexual de una forma específica de sexo, indicando por tanto que podrían participar en la regulación de alguno de los genes implicados en la determinación del sexo.

Usando un método basado en la amplificación de miRNAs clonados (mRAP), Takada *et al.* (2006, 2009) describieron el perfil de expresión de algunos miRNAs, mostrando un patrón dependiente del sexo en gónadas de ratón de 13.5 dpc. No obstante, los resultados de ese estudio muestran cierta controversia cuando se comparan con otros realizados con posterioridad. Por ejemplo, describen una elevada expresión diferencial de miR-29 en PGCs de hembra con respecto a macho de 13.5 dpc usando la técnica de Northern blotting, mientras que en el estudio de Hayashi *et al.* (2008) basado en el uso de RT-Q-PCR no se detectaron diferencias de expresión entre sexos en las PGCs de este estadio. Nuestro estudio de *microarrays* confirma los resultados de Hayashi *et al.* (2008) ya que tampoco detectamos estas diferencias de expresión de miR-29 entre sexos. De manera similar, en el caso de miR-124 los resultados de Takada *et al.* (2009) contradicen los nuestros, ya que muestran más expresión de este miRNA en el macho en 13.5 dpc que en la hembra, al contrario de lo que muestra nuestro *microarray*. Nuestros resultados respecto a la expresión de miR-124 tienen mayor credibilidad puesto que han sido validados por otros dos métodos diferentes, RT-Q-PCR e hibridación *in situ*, mientras que Takada y col. no validaron sus resultados sobre miR-124 con ninguna otra técnica. Los autores atribuyeron sus discrepancias con Hayashi a la utilización de diferentes cepas de ratones o a la metodología. En nuestra opinión, es probablemente la metodología y no las posibles diferencias entre estirpes de ratón, la que puede estar causando esta discrepancia de datos, ya que los miRNAs se encuentran ampliamente conservados desde insectos hasta vertebrados (Grün *et al.*, 2005), por lo que no es de esperar encontrar diferencias tan significativas entre distintas cepas de la misma especie.

Como se observa en el cuadro 6.1, actualizado de la revisión de McFarlane y Wilhelm (2009), en el momento de escribir esta memoria existían unos 35 trabajos publicados sobre la expresión y/o la función de miRNAs en el desarrollo sexual de mamíferos, 18 de los cuales se ha realizado en ratón. En general, observamos que existen más resultados relativos al desarrollo ovárico que al testicular y además se ha avanzado más en el conocimiento de los estadios de desarrollo post-natales que en embrionarios. Por tanto, es evidente la necesidad de llevar a cabo un estudio de los estadios más tempranos del desarrollo, que investigue la expresión de miRNAs en la gónada, antes y después del momento crítico de la determinación sexual, como el que hemos realizado en nuestro laboratorio. En el mencionado cuadro 6.1 podemos comprobar que ninguno de los estudios existentes lo ha hecho anteriormente.

6. Discusión

	Célula o Tejido	Referencia
Línea germinal	Células germinales primordiales	Hayashi <i>et al.</i> (2008)
	Espermatogonias	Ro <i>et al.</i> (2007b); Marcon <i>et al.</i> (2008); Papaioannou <i>et al.</i> (2009)
	Espermatocitos	Ro <i>et al.</i> (2007b); Marcon <i>et al.</i> (2008)
	Espermátidas redondas	Ro <i>et al.</i> (2007b); Marcon <i>et al.</i> (2008)
	Espermátidas alargadas	Ro <i>et al.</i> (2007b)
	Espermatozoide maduro	Ostermeier <i>et al.</i> (2005); Amanai <i>et al.</i> (2006); Ro <i>et al.</i> (2007b)
	Núcleo espermático	Yan <i>et al.</i> (2008)
Macho	Oocitos inmaduros	Tang <i>et al.</i> (2007)
	Oocitos maduros	Tang <i>et al.</i> (2007); Murchison <i>et al.</i> (2007)
	Testículos post-natales. Ratón	Lagos-Quintana <i>et al.</i> (2003); Yu <i>et al.</i> (2005); Takada <i>et al.</i> (2006); Ro <i>et al.</i> (2007b); Yan <i>et al.</i> (2008); Mishima <i>et al.</i> (2008); Papaioannou <i>et al.</i> (2009); Buchold <i>et al.</i> (2010)
	Testículos post-natales. Humano	Liu <i>et al.</i> (2004); Baskerville y Bartel (2005); Shingara <i>et al.</i> (2005); Landgraf <i>et al.</i> (2007); Yan <i>et al.</i> (2009)
	Testículos post-natales. Chimpancé	Yan <i>et al.</i> (2009)
	Prostata. Humano	Baskerville y Bartel (2005); Shingara <i>et al.</i> (2005); Landgraf <i>et al.</i> (2007)
	Epidídimo. Humano	Landgraf <i>et al.</i> (2007)
Órganos reproductivos post-natales	Ovario. Humano	Liu <i>et al.</i> (2004); Baskerville y Bartel (2005); Shingara <i>et al.</i> (2005)
	Ovario. Ratón	Lagos-Quintana <i>et al.</i> (2003); Takada <i>et al.</i> (2006); Ro <i>et al.</i> (2007b); Choi <i>et al.</i> (2007); Mishima <i>et al.</i> (2008); Creighton <i>et al.</i> (2010)
	Células de la granulosa	Fiedler <i>et al.</i> (2008)
	Útero. Ratón	Takada <i>et al.</i> (2006); Ro <i>et al.</i> (2007b); Chakrabarty <i>et al.</i> (2007); Hu <i>et al.</i> (2008)
	Útero. Humano	Baskerville y Bartel (2005); Shingara <i>et al.</i> (2005); Hong <i>et al.</i> (2008)
	Endometrio. Humano	Pan <i>et al.</i> (2007); Teague <i>et al.</i> (2009)
	Miometrio. Humano	Marsh <i>et al.</i> (2008)
	Cervix. Humano	Baskerville y Bartel (2005); Shingara <i>et al.</i> (2005)
	Placenta. Humano	Liu <i>et al.</i> (2004); Baskerville y Bartel (2005); Shingara <i>et al.</i> (2005); Landgraf <i>et al.</i> (2007); ming Zhu <i>et al.</i> (2009)
	Placenta. Ratón	Takada <i>et al.</i> (2006)
	Membrana corioamniótica. Humano	Montenegro <i>et al.</i> (2007)
	Células cordón umbilical. Humano	Poliseno <i>et al.</i> (2006)
	Glándula mamaria. Humano	Liu <i>et al.</i> (2004); Baskerville y Bartel (2005); Shingara <i>et al.</i> (2005); Landgraf <i>et al.</i> (2007)
	Glándula mamaria. Ratón	Wang y Li (2007); Sdassi <i>et al.</i> (2009)
	Céls. epiteliales mamarias progenitoras	Gu <i>et al.</i> (2007)
Glándula mamaria. Bovino	Babak <i>et al.</i> (2004)	

Cuadro 6.1: Trabajos publicados sobre miRNAs durante el desarrollo sexual en mamíferos.

En conclusión, a la vista de los patrones de expresión demostrados para diversos miRNAs en las gónadas en desarrollo, tanto en nuestro estudio como en otros realizados anteriormente (Takada *et al.*, 2006; Ro *et al.*, 2007a; Mishima *et al.*, 2008; Buchold *et al.*, 2010), se deduce claramente que estos elementos reguladores deben estar implicados en los procesos de determinación y diferenciación sexual de los mamíferos. Sin embargo, ningún estudio había mostrado hasta ahora a qué nivel

6.1. Microarray

participan los miRNAs en el control genético de estos procesos. El análisis bioinformático realizado por nosotros ha mostrado que diversos miRNAs podrían modular la expresión de genes clave del determinismo genético del sexo, tales como SOX9 y RSPO1 y que otros como SRY podrían controlar a alguno de esos miRNAs. Además, los estudios funcionales que hemos realizado han demostrado de forma experimental algunas de esas funciones. Por tanto, este trabajo ha permitido identificar y colocar algunas de las piezas clave que faltaban en el puzzle de regulación génica que controla la determinación de sexo en mamíferos, demostrando así que los miRNAs no sólo participan en este proceso sino que lo hacen desempeñando papeles cruciales en el mismo.

-Existe un mayor número de miRNAs implicados en el desarrollo ovárico que en el desarrollo testicular

Es interesante señalar que entre los 22 miRNAs que hemos identificado con un papel potencial en la diferenciación gonadal, sólo 6 de ellos (grupo C en la figura 5.5) mostraron un patrón de expresión consistente con un papel en el desarrollo testicular, mientras que los 16 miRNAs restantes probablemente están implicados en el desarrollo ovárico, según su patrón de expresión. En consecuencia, de entre los 11 genes que hemos seleccionado como posibles candidatos a estar regulados por alguno de estos miRNAs, 8 de ellos son genes conocidos de la ruta testicular y sólo 3 pertenecen a la ruta ovárica. Considerando que los miRNAs actúan como reguladores negativos de la traducción de mRNAs, este desequilibrio podría tener algún significado biológico. Este hecho podría verse como una evidencia indirecta de que el número de genes pro-testículo que deben ser reprimidos durante el desarrollo ovárico es mayor que el de genes pro-ovario que deben mantenerse reprimidos durante del desarrollo testicular. Si observamos los otros trabajos que comparan perfiles de expresión de miRNAs entre gónadas de machos y hembras, como el de Takada *et al.* (2009) en embriones o el de Mishima *et al.* (2008) en individuos adultos, siempre aparece un mayor número de miRNAs expresados en ovario que en testículo, coincidiendo en este sentido con nuestros resultados. Esto refuerza nuestra hipótesis de que posiblemente los miRNAs tienen un papel más importante en el desarrollo ovárico que en el testicular porque es más necesario reprimir los genes pro-testículo en el ovario que a la inversa. Se ha demostrado que los genes pro-testículo deben mantenerse reprimidos en el ovario de forma permanente, pues basta la activación de alguno de ellos para que se produzca la transdiferenciación de diversos tipos celulares, convirtiendo en un testículo lo que era un ovario adulto. Por tanto, parte de esa labor represora de los genes pro-testículo en el ovario podría estar ejercida por miRNAs.

6. Discusión

6.2. μ iRNAM

- μ iRNAM es una nueva herramienta bioinformática para la identificación de miRNAs biológicamente relevantes

La mayoría de algoritmos usados con este propósito buscan dianas para miRNAs basados en diferentes criterios pero siempre relacionados con el emparejamiento entre el mRNA y la región semilla del miRNA, con lo cual se obtienen listas muy largas de posibles dianas para miRNAs. Con esta nueva aplicación nosotros pretendemos filtrar ese gran volumen de datos para reducir el número de dianas seleccionadas, aumentando la probabilidad de que éstas tengan significado biológico real. Para ello, sacamos partido de la existencia de otra base de datos bioinformáticos, la base "Gene Ontology", que asocia cada gen con uno o más terminos, demoninados GO, relativos a sus funciones biológicas conocidas. Teniendo esto en cuenta, la premisa del nuevo algoritmo es que si un miRNA tiene dianas en varios genes implicados en un mismo proceso biológico, y que por tanto comparten los mismos términos GO, es más probable que ese miRNA esté regulando realmente uno o varios de esos genes.

El uso de esta nueva herramienta bioinformática tiene varias ventajas. Elimina falsos positivos y simplifica la tarea de selección de miRNAs con función biológica relevante, y además su uso puede aplicarse a cualquier contexto biológico en el que se desee rastrear dianas para miRNAs, pues el filtro se establece en función de los términos GO, de los miRNAs o de los genes diana que interese en cada caso. Por otra parte, la introducción de más especies en las bases de datos del programa hace que no sólo sea útil en estudios realizados en ratón sino en cualquier otra especie cuyo genoma ya esté secuenciado.

El análisis de los resultados de expresión diferencial de nuestro *microarray* que hemos realizado con el programa μ iRNAM ha permitido la identificación de varios genes genes que podrían ser posibles dianas de miRNAs con expresión diferencial específica de sexo en ratón, lo que nos ha proporcionado un amplio abanico de posibilidades en la investigación de papel de los miRNAs en la regulación de los genes de la determinación sexual en mamíferos. El volumen de datos interesantes logrados en este análisis bioinformático es tal que daría lugar a varios años de trabajo de laboratorio, necesario para investigar el alcance real de las numerosas hipótesis de regulación génica planteadas con los mismos. Estos estudios podrían despejar muchas de las incógnitas que aún quedan por resolver en el campo del determinismo genético del sexo en mamíferos. A continuación se relacionan algunas de las hipótesis más significativas que hemos podido elaborar con esos nuevos datos bioinformáticos.

-Identificación de genes potencialmente regulados por miRNAs

De un total de 106 genes seleccionados de las búsquedas realizadas con el programa μ iRNAM, nos hemos centrado en once de ellos para discutir su posible regulación por uno o más de los 22 miRNAs identificados en nuestro experimento de *microarrays*. Hemos seleccionado estos once porque sabemos que tienen una implicación directa conocida en la determinación y/o diferenciación del sexo y los hemos clasificado en dos grupos, en función de si intervienen en la ruta de diferenciación masculina o en la femenina.

Genes de la ruta masculina

Ar, Androgen receptor. Los términos GO asociados a este gen son: *sex differentiation, male gonad development, androgen receptor signaling pathway, male somatic sex determination*. Como se puede deducir de esto, se trata de un gen implicado en la ruta de diferenciación masculina. El receptor de andrógenos, *Ar*, pertenece a la superfamilia de receptores nucleares de hormonas esteroideas, principalmente la testosterona. En presencia de testosterona, la interacción entre la hormona y la proteína AR induce la translocación de ésta al núcleo y promueve la expresión de genes tan importantes en el desarrollo masculino como son *Sry* o *Dax1* (Kallio *et al.*, 1995; Yuan *et al.*, 2001). En torno a los 13 dpc, las células de Leydig de embriones de ratón producen testosterona, lo que promueve la expresión de *Ar* en células intersticiales y el subsecuente desarrollo de los conductos de Wolff, precursores del tracto reproductor masculino (revisado por Patrão *et al.*, 2009). Teniendo esto en cuenta, resultan de interés los miRNAs que tienen diana en *Ar* y que se encuentran sobre-expresados en ovario, donde no debería activarse dicho gen. Así, como observamos en los cuadros 5.8, 5.11, 5.12 y 5.13, hemos identificado tres miRNAs candidatos a regular la expresión de *Ar* en ovario, miR-124, miR-878-3p y miR-471. También podemos observar dos miRNAs expresados diferencialmente en testículo, que podrían tener diana en *Ar*: miR-455* y miR-202-3p. Sin embargo, estos miRNAs tienen menos probabilidad de contener dianas funcionales ya que corresponden con la versión minoritaria del miRNA, siendo miR-455* la hebra menos estable termodinámicamente del precursor de *pre-miR-455* y, por tanto, tiende a eliminarse del dúplex. Algo similar ocurre con la hebra 3p de *pre-miR-202*, ya que la hebra que más frecuentemente se muestra funcional es la 5p. Esto, junto con el hecho de que ambos miRNAs podrían co-expresarse con su presunta diana, resta crédito a esta hipótesis, siendo mucho más probable que sean *mmu-miR-124* y/o *mmu-miR-471* los que puedan ejercer alguna eventual regulación post-transcripcional de *Ar*. En consecuencia, serían estos miRNAs los principales candidatos para un estudio más profundo a bordar en un futuro.

6. Discusión

Dmrt1, Doublesex and mab-3 related transcription factor 1. El gen *Dmrt1* pertenece a la familia de genes *Dmrt*, que codifica factores de transcripción implicados en procesos de determinación sexual y desarrollo gonadal en vertebrados e invertebrados (Zarkower, 2001; Volff *et al.*, 2003). Los términos GO que encontramos asociados a este gen son: *sex differentiation* y *male gonad development*. La expresión de *Dmrt1* en ratón comienza a detectarse a partir de 10.5 dpc en la gónada indiferenciada de ambos sexos. En torno a 12.5 dpc, comienza a desaparecer en ovarios y aumenta en las células germinales premeióticas y en las de Sertoli del testículo, donde se mantiene a unos niveles altos hasta alcanzar la edad adulta (Raymond *et al.*, 1999, 2000; De Grandi *et al.*, 2000). Por lo tanto, se trata de otro gen implicado en la ruta masculina y tiene una diana para un miRNA expresado diferencialmente en ovario, miR-124, tal como podemos ver en los cuadros 5.8 y 5.11. En esos mismos cuadros vemos que miR-668 podría tener otra posible diana en *Dmrt1*. Sin embargo, este miRNA está incluido en el grupo de los que reducen su expresión entre 11.5 y 13.5 dpc, y en el *heatmap* del *microarray* (Figura 5.5), se observa que dicha expresión cae mucho más en hembra que en macho, lo que *a priori* descartaría una diana funcional para este miRNA en la región 3' UTR de *Dmrt1*.

Sox9, sry-box containing gene 9. Como ya se ha mencionado, *Sox9* es uno de los genes maestros de la determinación sexual de mamíferos y otros vertebrados, ya que induce la diferenciación de las células de Sertoli, que son las encargadas de dirigir la organogénesis testicular. Los términos GO asociados a este gen son: *male germ-line sex determination* y *male gonad development*. Recordemos que en el testículo de ratón el gen *Sry* disparaba la expresión de *Sox9* alrededor de 11.5 dpc, y ésta se mantenía hasta la vida adulta. Por el contrario, en la hembra encontramos una expresión baja de *Sox9* en ese mismo estadio, pero cae drásticamente a partir de entonces, coincidiendo con la subida en el macho (Sekido y Lovell-Badge, 2008). La causa de ese descenso en la expresión de *Sox9* en la gónada femenina permanecía desconocido hasta ahora. Los análisis bioinformáticos que hemos realizado han puesto de manifiesto que miR-124, expresado diferencialmente en ovario de 13.5 dpc, tiene una diana potencial en *Sox9*, como se puede observar en los cuadros 5.11 y 5.17, lo que convierte a este miRNA en un buen candidato como posible inhibidor de *Sox9* en la hembra. Dada la trascendencia del papel de *Sox9* en la determinación sexual de mamíferos, este ha sido uno de los genes cuya regulación por miRNAs se ha investigado más profundamente en este trabajo.

Sox8, sry-box containing gene 8. El gen *Sox8* pertenece al grupo E de

genes *Sox*, junto con *Sox9* y *Sox10*. Recientemente se ha descubierto su implicación en la determinación sexual, viendo que es necesario para el desarrollo testicular y la fertilidad del macho (O'Bryan *et al.*, 2008). El término GO asociado a este gen es: *male gonad development*. Su expresión comienza en testículo en 12.5 dpc y se mantiene hasta después del nacimiento. SOX8, junto con SOX9, activan el promotor de *Amh* de forma que estos dos genes *Sox* tiene efectos redundantes en el desarrollo testicular tras la determinación del sexo (Barrionuevo *et al.*, 2009). Al igual que *Sox9*, *Sox8* posee una diana para miR-124, expresado diferencialmente en ovario de 13.5 dpc (Cuadro 5.11). Puesto que tiene funciones similares a las de *Sox9*, la represión de *Sox8* durante el desarrollo ovárico debería ser igualmente importante, por lo que merecería la pena abordar futuros estudios funcionales para investigar su posible regulación por parte de miR-124.

Resulta evidente, a la vista de estos datos, que *mmu-miR-124* es un claro candidato como regulador de la ruta femenina, ya que se encuentra sobre-expresado en la gónada XX en el momento clave de la diferenciación gonadal y posee dianas en varios de los principales genes de la ruta masculina, tales como *Sox9*, *Sox8*, *Dmrt1* y *AR*, cuya inhibición es necesaria para el desarrollo ovárico.

Sry, sex determining region of chromosome Y. *Sry* es el gen determinante de testículo (Sinclair *et al.*, 1990b) y sus términos GO asociados son: *sex differentiation* y *male sex determination*. Ya que es un gen de suma importancia en el desarrollo testicular, es de esperar que no existan miRNAs que lo inhiban en testículo, y dado que su expresión es tan importante, no sería extraño que la selección natural haya favorecido la ausencia de dianas para miRNAs. Efectivamente, ese es el caso, ya que en nuestros análisis bioinformáticos sólo hemos encontrado dos miRNAs que podrían tener una diana en este gen, miR-878-3p y miR-881, tal como se observa en los cuadros 5.8 y 5.9. Sin embargo, estos miRNAs se expresan en ovario, donde generalmente no está presente este gen. Por tanto, si estas dianas son realmente funcionales, podrían servir para la inactivación de *Sry* en otros tejidos de los machos y al expresión de estos miRNAs podría servir para regular otros genes. También cabe la posibilidad de que estas dos dianas representen falsos positivos o bien que sean vestigios evolutivos. Puesto que *Sry* es una adquisición evolutiva muy reciente de los mamíferos (Foster *et al.*, 1992), es posible que sus extremos 3' UTR estén aún conservados y sean similares a los de otros genes *Sox* que ancestralmente estuvieran siendo inhibidos en el ovario por tratarse de genes pro-testiculares.

Nr0b1, nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1. El gen *Nr0b1*,

6. Discusión

más conocido como *Dax1* (*DSS-AHC critical region on the X chromosome, gene 1*), está implicado en la ruta de diferenciación testicular y, por tanto, los términos GO que encontramos asociados a este gen son: *gonad development* y *male sex determination*. Se ha propuesto que tendría un importante papel en el desarrollo gonadal, cooperando con la proteína SF1 en la activación de genes de la ruta masculina (Park *et al.*, 2005). Su función es dependiente de la dosis génica ya que tanto las subidas como las bajadas de sus niveles de expresión producen anomalías testiculares (Ludbrook y Harley, 2004). Necesita, por tanto, una precisa regulación de sus niveles de expresión. En ratón, *Dax1* se expresa en el primordio gonadal de ambos sexos justo después de que lo haga *Sf1*. En la gónada XY, esta expresión se ve incrementada en células de Sertoli en 12.5 dpc, disminuyendo poco después pero aumentando en células intersticiales entre 13.5 y 17.5 dpc. En gónadas XX, la expresión de *Dax1* aumenta en torno a 12.5 dpc pero después de 14.5 dpc comienza a disminuir (Ikeda *et al.*, 2001). Nosotros hemos detectado dos posibles miRNAs, expresados diferencialmente en ovario de 13.5 dpc, miR-96 y miR-741, según se refleja en los cuadros 5.7 y 5.9, que podrían tener una diana potencial en la región 3' UTR de *Dax1*. Puesto que no está clara la función actual de este gen en el proceso de desarrollo testicular, cualquier hipótesis sobre su posible regulación por miRNAs sería especulativa por el momento.

Cyp17a1, cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1. Se trata de un gen implicado en la biosíntesis de testosterona, hormona que como ya sabemos es crítica para el correcto desarrollo masculino. El término GO que encontramos asociado a este gen es: *sex differentiation*. El producto de este gen es una enzima que interviene, junto con otras tres, en la biosíntesis de testosterona, a partir de colesterol, en las células de Leydig, formando el complejo P450ssc (*cholesterol side-chain cleavage enzyme*), (ver Payne y Youngblood, 1995). Hemos encontrado un miRNA que podría tener una diana funcional en el mensajero de este gen, miR-672, que se expresa diferencialmente en ovario de 13.5 dpc, (Cuadro 5.8), por lo que podría regular a este gen en la gónada femenina. Por otro lado encontramos una posible diana para miR-202-3p, expresado en testículo, pero como hemos mencionado anteriormente, la funcionalidad biológica de este miRNA es menos probable ya que se trata de la versión minoritaria del mismo.

Fhl2, four and a half LIM domains 2. *Fhl2* es un miembro de la familia de co-activadores transcripcionales LIM, y contiene cuatro dominios y medio del tipo LIM. Los dominios LIM son ricos en cisteína e histidina y están compuestos por dos dedos zinc repetidos en tan-

dem (Morgan y Madgwick, 1996; Genini *et al.*, 1997). FHL2 actúa como co-activador de varios factores de transcripción, incluyendo AR (Kahl *et al.*, 2006) y β -catenina (Wei *et al.*, 2003) y WT1 (Du *et al.*, 2002). Consecuentemente el término GO que encontramos asociado a este gen es: *androgen receptor signaling*. Es de destacar que hemos encontrado cuatro posibles miRNAs que pueden regular este gen, y todos ellos se expresan de forma diferencial en ovario de ratón de 13.5 dpc; éstos son: miR-138, miR-743a, miR-183 y miR-103 (Cuadro 5.12). Previsiblemente, la regulación de este gen probablemente sea muy importante ya que funciona como co-activador de importantes factores de transcripción de la determinación del sexo y una regulación desajustada del mismo podría tener graves consecuencias en el desarrollo gonadal. Por tanto, es razonable hipotetizar que uno o más miRNAs pudieran regular la expresión de *Fhl2* durante el desarrollo ovárico.

Genes de la ruta femenina

Fshr, follicle stimulating hormone receptor. El gen *Fshr* codifica el receptor de la FSH (hormona estimulante de folículos) y se expresa tanto en células de Sertoli como en células foliculares. La hormona FSH está implicada en la maduración de los folículos en el ovario, y en la de los túbulos seminíferos y la espermatogénesis en el testículo (Simoni *et al.*, 1997). El término GO asociado a este gen es: *female gonad development*. Según nuestras búsquedas se han encontrado dos miRNAs que podrían regular este gen, miR-741 y miR-103, como se puede observar en el cuadro 5.15. miR-471 es un miRNA expresado mayoritariamente en ovario de 13.5 dpc, y miR-103 está en el grupo “otros” cuya expresión se inhiben en testículo entre 11.5 y 13.5 dpc mientras se mantiene activado en ovario la hembra. Se trata por tanto de un caso ambiguo por lo que no se puede atribuir directamente a esos miRNAs un papel en la regulación de la expresión de este gen, pues aparentemente ambos se expresan en el mismo órgano. Sin embargo, hay que tener en cuenta el procedimiento experimental del *microarray*, que se realizó con RNA extraído de gónadas completas, lo que implica la mezcla de todos los tipos celulares. Como hemos indicado, el gen *Fshr* se expresa en un tipo celular concreto, en el que puede que no esten presentes estos miRNAs, y sin embargo es posible que sí se necesite su presencia en otro tipo celular donde no deba expresarse dicho gen. En este caso y debido a que las interacciones son muy complejas, no se puede establecer una hipótesis simple sobre la regulación de este gen.

Fst, follistatin. El gen de la follistatina (*Fst*) codifica una proteína de unión a activina que regula el eje hipotálamo-pituitaria-gónada y

6. Discusión

promueve la supervivencia de las células germinales en la corteza ovárica. Se expresa principalmente en las células somáticas de ovario a partir de 11.5 dpc, alcanzando un pico en 12.5 dpc y disminuyendo a partir de 14.5 dpc (Yao *et al.*, 2004; Menke y Page, 2002). También se ha detectado expresión en las células de la granulosa (foliculares), y su activación se encuentra aguas abajo en la ruta ovárica de señalización de *Wnt4* (Matzuk *et al.*, 1995; Vainio *et al.*, 1999). De acuerdo con este papel, el término GO asociado a este gen es: *female gonad development*. Según nuestros resultados hemos encontrado dos posibles miRNAs que pueden regular este gen, miR-144 y miR-184, (Cuadro 5.15), ambos sobre-expresados significativamente en testículo de 13.5 dpc, lo que apunta a que este gen podría mantenerse inhibido en el macho por la acción de uno de estos miRNAs o por ambos. También hemos encontrado una diana para miR-878-3p, que se expresa más en ovario, aunque como hemos comentado anteriormente, es probable que esta versión 3p del miRNA no tenga una diana biológicamente funcional, o que el miRNA y su diana no se estén co-expresando en el mismo tipo celular.

Rspo1, R-spondin homolog (Xenopus laevis). Como se mencionó en la introducción de esta memoria, el gen *Rspo1* es uno de los genes maestros de la ruta ovárica, actuando como activador de la ruta de señalización canónica de β -CAT en ovario. Por tanto, el término GO que encontramos asociado a este gen es: *wnt receptor signaling pathway*. En nuestros resultados de búsqueda selectiva de dianas hemos encontrado un miRNA que potencialmente podría regular la expresión de *Rspo1* en testículo. Se trata de miR-144 tal como muestra el cuadro 5.14. Este miRNA se activa diferencialmente en testículo entre 11.5 y 13.5 dpc. Según estos datos, igual que sugerimos que *mmu-miR-124* podría ser uno de los reguladores clave de la ruta ovárica, *mmu-miR-144*, por sus dianas en *Rspo1* y en *Fst*, podría tener un papel crucial en el inicio de la ruta testicular, reprimiendo estos dos importantes genes pro-ováricos.

-Los miRNAs agrupados en cluster muestran una regulación transcripcional coordinada

Muchos genes de miRNAs están localizados de forma aislada y dispersos por el genoma, pero existe también una proporción de ellos que se encuentran formando agrupaciones (*clusters*) de manera que su transcripción puede llevarse a cabo a modo de un largo transcrito común regulado por un único promotor u otras secuencias reguladoras (Rodríguez *et al.*, 2004). Buena parte de los miRNAs identificados en nuestro estudio se organizan de este modo. Un claro ejemplo es el *cluster* localizado en la banda

A7.1 del brazo largo del cromosoma X de ratón, donde se sitúan 7 de los miRNAs expresados diferencialmente en ovario 13.5 dpc (Figura 5.14). Este *cluster* está dividido en dos regiones bajo el control de dos secuencias reguladoras diferentes, así como dos sitios alternativos de inicio de la transcripción. Todos los miRNAs situados en la región izquierda se expresan diferencialmente en ovario de 13.5 dpc, mientras que en la región derecha encontramos 3 miRNAs que cambian su patrón de expresión entre 11.5 y 13.5 dpc, pero lo hacen de una forma independiente del sexo. El nivel de expresión ligeramente mayor observado en ovario no es estadísticamente significativo, según los datos de nuestro *microarrays*. miR-465 posee tres genes diferentes, a, b y c, localizados en la región del *cluster*. Además, los genes b y c están repetidos, por lo que en total existen 5 copias de este miRNA en el mismo *cluster*. Teniendo en cuenta las diferencias de expresión de las dos regiones del *cluster*, podemos postular que una de las dos regiones reguladoras es específica de sexo y la otra no, al menos en el momento de la determinación sexual. Además, los miRNAs con expresión específica de ovario de este *cluster* identificados en nuestros *microarrays*, poseen dianas en genes conocidos de la ruta testicular.

Es de destacar que Song *et al.* (2009) demostraron que estos 10 miRNAs se expresan más en testículo que en ovario adulto. Estos autores exponen resultados acerca de los miRNAs que se encuentran en el cromosoma X y demuestran que un alto porcentaje de ellos escapan a la inactivación meiótica de los cromosomas sexuales (MSCI, *meiotic sex chromosome inactivation*). Una de las explicaciones que proponen para este escape de la MSCI es que podrían estar implicados en el propio proceso de inactivación y que jueguen, por tanto, un importante papel en la espermatogénesis.

Los diferentes patrones de expresión de los miRNAs identificados en nuestro trabajo y localizados en el *cluster* del cromosoma X, la organización genómica de este *cluster*, dividido en dos regiones con diferente control transcripcional y los diferentes patrones de expresión durante la diferenciación sexual y durante la meiosis, nos permiten postular la existencia de diferentes combinaciones de factores de transcripción que puedan modular la expresión de este *cluster* en diferentes situaciones. El análisis de las zonas con potencial regulador nos ha permitido localizar los lugares de reconocimiento de multitud de factores de transcripción en estas regiones, desde factores activadores de la ruta testicular como SRY y AR, o factores promotores de la ruta femenina como ER y SMAD3, hasta represores transcripcionales como CTCF, lo que nos proporciona una idea aproximada de la complejidad que probablemente implique la regulación de la expresión de los genes de los miRNAs.

Según la hipótesis que proponemos, durante la diferenciación sexual, ambas regiones reguladoras promoverían la transcripción de los genes

6. Discusión

situados aguas abajo de las mismas. La región reguladora situada a la derecha promovería la transcripción en 13.5 de una forma independiente de sexo de los genes de miRNAs de la zona derecha del *cluster* (señalados con marcos de esquinas redondas en la Figura 5.14), tales como *mmu-mir-465*, mencionado anteriormente. La región reguladora de la izquierda activaría la transcripción de una forma específica de sexo, haciendolo más intensamente en ovario que en testículo y controlando los genes de miRNAs de la parte izquierda del *cluster* (señalados con marcos de esquinas cuadradas en la Figura 5.14). Es interesante hacer notar que los miRNAs miR-470 y miR-871 se encuentran localizados aguas abajo de la región reguladora de la izquierda, pero su expresión no parece estar controlada por ésta, ya que según nuestros datos, no muestran expresión diferencial específica de sexo. Esto implicaría que el punto de inicio de la transcripción de la región reguladora de la izquierda se encontraría aguas abajo de estos dos miRNAs. Esta suposición viene apoyada por el hecho de que las predicciones de transcritos realizadas por GenScan y recogidas en Ensembl muestran dos posibles transcritos en esta región, uno de los cuales comienza precisamente aguas abajo de estos dos miRNAs. La porción izquierda del *cluster*, transcrita a partir de la región reguladora izquierda, sería la responsable de la mayor expresión en ovario de todos los demás miRNAs del mismo, que hemos identificado en nuestro estudio.

Entre las posibles dianas que hemos localizado para estos 10 miRNAs se encuentran genes de la ruta masculina y genes situados en los cromosomas sexuales, como son: *Ar*, *Dax1*, *Sry*, *Zfy* y *Zfx*. El sitio y el momento de su expresión, su distribución, y sus potenciales genes diana son, por tanto, compatibles con un papel relevante de estos miRNAs, tanto durante la diferenciación sexual, inhibiendo genes de la ruta masculina en el desarrollo ovárico, como durante el proceso de inactivación meiótica de los cromosomas sexuales en espermatoцитos. Por otra parte, este podría ser un claro ejemplo de regulación concertada de un grupo de genes de miRNAs que tienen funciones en un mismo proceso biológico, resuelto mediante la agrupación de dichos genes y su control transcripcional dirigido por elementos reguladores comunes, tal como se ha descrito en otros casos ya mencionados (Yuan *et al.*, 2009).

Otro grupo de miRNAs, un total de 8, identificados en nuestro estudio se encuentran en un *cluster* localizado en el cromosoma 12, aunque sólo uno de ellos muestra expresión diferencial de sexo, mientras que el resto solo muestran diferencias de expresión entre 11.5 y 13.5 dpc (Figura 5.15). Este patrón de expresión no descarta un papel durante el desarrollo gonadal, aunque sí en la diferenciación sexual. Esto concuerda con los resultados de las búsquedas de posibles factores de transcripción asociados a las zonas reguladoras próximas, en los que no se encontró ninguna secuencia de reconocimiento de factores que se supieran implicados en la diferenciación sexual, aunque sí en procesos comunes para ambos sexos,

como son TCF2L1 (*transcription factor CP2-like 1*) o Esrrb (*estrogen-related receptor beta*), que son factores de transcripción clave en las células madre embrionarias e intervienen en la ruta de señalización canónica, junto con *Oct4*, y en la ruta de señalización *Wnt* ((van den Berg *et al.*, 2010)). Una peculiaridad de este *cluster* es que varios miRNAs, incluido miR-668, se encuentran situados en el interior de transcritos de lincRNAs (*Large intergenic non-coding RNA*). Se sabe que los lincRNAs intervienen en procesos de remodelación de la cromatina (ver revisión de (Tsai *et al.*, 2010)) y, aunque también se ha descrito la implicación de los miRNAs en la remodelación de la cromatina (Gonzalez *et al.*, 2008), los que están incluidos en lincRNAs de este *cluster* presentan dianas en los extremos 3'UTR de varios genes, incluido alguno tan importante para la diferenciación sexual como *Dmrt1*, por lo que no podemos descartar su papel en la regulación de traducción de estos genes. Estaríamos por tanto ante una secuencia con una doble función dependiendo de la forma en que se procese. Si se transcribe el lincRNA, puede intervenir en la reestructuración de la cromatina, y si es procesado de manera que se liberan los miRNAs que van incluidos en su secuencia, podría controlar la traducción de diversos genes. El poco conocimiento que se tiene en la actualidad sobre las funciones de los lincRNA hace que esta particularidad del *cluster* del cromosoma 12 merezca ser analizada con mayor profundidad en el futuro.

6.3. miR-124

-Indicios del posible papel de miR-124 durante el desarrollo ovárico

Varios hechos sugieren que miR-124 podría tener un importante papel durante el desarrollo ovárico. En primer lugar, miR-124 se expresa diferencialmente en células XX pero no XY durante la transición desde el estadio 11.5 dpc al 13.5 dpc, que es el período crítico de la diferenciación sexual en mamíferos. Este hecho fué descubierto inicialmente en nuestro experimento de *microarray* de miRNAs y corroborado mediante validación por RT-Q-PCR de los datos del *microarray*. Hemos demostrado además la presencia de los 3 precursores para este miRNA en el ovario de 13.5 dpc. y es de destacar que nuestros estudios de hibridación *in situ* mostraron que miR-124 está presente principalmente en la región cortical de la gónada femenina de 13.5 dpc, que es la porción a partir de la cual se desarrolla el tejido ovárico (Jiménez, 2009). En segundo lugar, miR-124 tiene dianas en la región del extremo 3' UTR de cuatro de los genes maestros en la ruta de desarrollo testicular tanto en humanos como en ratón, *Sox9*, *Sox8*, *Ar* y *Dmrt1*, genes que como sabemos tienen un papel clave en la determinación del sexo. En tercer lugar, los ensayos de luciferasa con un plásmido que sobre-expresa *mmu-mir-124* han demostrado su capacidad para unirse al extremo 3' UTR del gen *Sox9* y reprimir su ex-

6. Discusión

presión post-transcripcionalmente, confirmando que la diana de *Sox9* es funcional. Por último, Cheng *et al.* (2009) mostraron que miR-124 regula la neurogénesis adulta en ratón reprimiendo la producción de SOX9 en la zona subventricular del cerebro. Estos autores demostraron que *Sox9* es de hecho una diana fisiológica de miR-124, aumentando las posibilidades de que este miRNA pudiera actuar también en la gónada. Por tanto, estos hallazgos permiten hipotetizar que el principal papel de miR-124 en el ovario podría ser inhibir la producción de proteína SOX9, anulando así su acción pro-testicular.

-miR-124 reprime activamente el gen Sox9 en el ovario embrionario de 13.5 dpc

Hemos probado esta hipótesis mediante experimentos funcionales de inhibición y sobre-expresión en cultivos primarios de células gonadales. La transfección con un *antagomir* específico para miR-124 indujo la producción ectópica de la proteína SOX9 en células gonadales XX, así como un incremento significativo en los niveles de mensajero de *Sox9*, mostrando que este miRNA reprime activamente *Sox9* en células gonadales femeninas. Sin embargo, los niveles de expresión incrementados de *Sox9* en células XX transfectadas con el *antagomir* son más bajos que los observados en células gonadales XY, indicando que la activación de *Sox9* mediada por SRY es necesaria para alcanzar el nivel de expresión del macho.

Sox9 es activado probablemente por SF1 tanto en gónadas XY como XX antes de la diferenciación sexual (Sekido *et al.*, 2004b). En el momento de la determinación del sexo, *Sox9* es inhibido en la gónada XX y reactivado en la gónada XY por la acción sinérgica combinada de SRY y SF1 sobre el intesificador específico de testículo para *Sox9* (TESCO) (Sekido y Lovell-Badge, 2008). La expresión de *Sox9* se mantiene entonces en el testículo en desarrollo a pesar del hecho de que la expresión de *Sry* en el testículo de ratón es transitoria. Varios mecanismos redundantes contribuyen al mantenimiento de la expresión de *Sox9*. Uno de estos es la acción autorreguladora de la proteína SOX9, que, como SRY, puede actuar de forma sinérgica con SF1 para activar TESCO (Sekido y Lovell-Badge, 2008). También encontramos, un bucle de retroalimentación positivo que se establece entre *Sox9* y *Sf1* (Shen y Ingraham, 2002) y entre *Sox9* y *Fgf9* (Kim *et al.*, 2006b), que mantiene la expresión de estos genes a altos niveles. Finalmente, SOX9 activa a la Prostaglandin sintetasa D (*Ptgds*), la cual produce, Prostaglandin D2 (PGD₂), mediando la importación de SOX9 al núcleo y permitiendo de esta forma todas las interacciones moleculares previas (ver las revisiones Sekido y Lovell-Badge, 2009; Sekido, 2010).

Dado que las células gonadales XX carecen de *Sry*, nosotros propusimos que la activación de la transcripción de *Sox9* en estas células mediante la inhibición de miR-124 es una consecuencia secundaria de la producción ectópica inducida de la proteína SOX9, que podría activar uno o

más de los bucles de retroalimentación positivos mencionados anteriormente. Estos datos sugieren que el silenciamiento completo de miR-124 en las gónadas de embriones XX podría tener la capacidad potencial de inducir reversión sexual de hembra a macho *in vivo*.

-La sobre-expresión ectópica de miR-124 reduce los niveles de Sox9 en condrocitos pero no en células gonadales XY

Nosotros hemos mostrado que la sobre-expresión de miR-124 induce represión de la proteína SOX9 en condrocitos pero no en células de Sertoli, dos tipos celulares en los que *Sox9* se expresa de forma natural. De forma similar Cheng *et al.* (2009) mostraron evidencias de que la expresión de *Sox9* podría verse reducida en neuronas de la zona subventricular del cerebro mediante una sobre-expresión inducida de miR-124 (Cheng *et al.*, 2009). Nuestros hallazgos indican que la sobre-expresión ectópica de miR-124 es un mecanismo de represión suficientemente fuerte para reducir la expresión de *Sox9* en condrocitos pero no en células de Sertoli, incluso cuando los niveles ectópicos de expresión de miR-124 alcanzan valores mucho más altos que los observados en células gonadales XX, donde este miRNA se expresa de forma endógena. El hecho de que los resultados obtenidos en células gonadales XY en 13.5 dpc fueran similares a los obtenidos en 11.5 dpc, indica que la expresión de *Sox9* es ya muy robusta en 11.5 dpc en los testículos de ratón en desarrollo, donde la activación está recién iniciada. Estos hallazgos sugieren que los distintos mecanismos de regulación que controlan la expresión de *Sox9* en condrocitos y en células pre-Sertoli determinan las diferentes respuestas en los experimentos de sobre-expresión.

En condrocitos, la expresión de *Sox9* está regulada principalmente por factores como BMP (proteína morfogenética de hueso) y TGF β (factor de crecimiento transformante beta), y también se sospecha que está implicado un intensificador específico de la condrogénesis (ver la revisión de Kawakami *et al.*, 2006). Se ha encontrado un bucle de retroalimentación negativo, aunque un reciente estudio de las dianas potenciales de *Sox9* en condrocitos encontraron varias que podrían intensificar su propia transcripción (do Oh *et al.*, 2010). Además, nuestros hallazgos de sobre-expresión de miR-124 resultan en una disminución significativa tanto en los niveles de mensajero como de proteína, sugiriendo que también existe algún mecanismo regulatorio en condrocitos, aunque los bucles de retroalimentación entre *Sfl* y *Sox9* no son posibles, ya que estos genes no se expresan en estas células. Sin embargo, la expresión de *Sox9* en condrocitos necesita ser inhibida para permitir la formación del hueso (Hattori *et al.*, 2010), lo que podría implicar que esta regulación de retroalimentación positiva por parte del propio *Sox9* es menos robusta que la que tiene lugar en las células de Sertoli, donde se mantienen altos niveles de *Sox9* a lo largo de toda la vida. En general, existen datos que

6. Discusión

muestran que se han seleccionado diferentes mecanismos redundantes de regulación que aseguran una alta expresión de *Sox9* en las células de Sertoli, incluyendo una baja, pero no nula, actividad de los genes *mmu-mir-124*, aunque esta condición parece ser innecesaria para estas células. De hecho, los datos proporcionados por Mishima *et al.* (2008) sobre las diferencias en el perfil de expresión de miRNAs entre ovario y testículo adulto de ratón muestran una alta expresión de miR-124 en testículo, por lo que este miRNA muestra co-expresión con su propia diana, *Sox9*. Este hecho apoya nuestros resultados de que, una vez iniciada, la expresión de *Sox9* es tan robusta que no se puede inhibir por un sólo miRNA. Por tanto, estaríamos ante un ejemplo de un gen cuya expresión se preserva contra la represión mediada por miRNAs en un tipo celular específico. La intensa expresión de miR-124 en testículo adulto podría por tanto obedecer a otra función reguladora no relacionada con *Sox9*.

Por último, conviene recordar aquí que miR-124 tiene también otras dianas para otros genes importantes en la diferenciación sexual, como *Dmrt1*, *Ar* y *Sox8*. Por su mayor importancia en el desarrollo testicular, hemos comenzado estudiando a fondo la posible relación funcional entre miR-124 y *Sox9*, pero en un futuro próximo abordaremos también el análisis de estos otros genes, y de la posible función reguladora de miR-124 en testículo adulto, donde se expresa intensamente (Mishima *et al.* (2008)).

Nosotros describimos aquí la primera evidencia de que un miRNA en particular, miR-124 juega un papel clave en los pasos tempranos del desarrollo ovárico. Hemos demostrado que la inhibición de miR-124 en células gonadales XX lleva a la activación de *Sox9*, indicando que este miRNA, al menos en parte, es responsable de la bajada de expresión de *Sox9* en la gónada femenina. Dos conjuntos de evidencias indican claramente que *Sox9* debe ser reprimido en la gónada femenina con el fin de evitar la reversión sexual de hembra a macho. Se sabe que las gónadas XX que expresan *Sox9* se desarrollan como testículos (Bishop *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001), y que *Sox9* es inhibido en la gónada femenina en el momento de la determinación del sexo, justo cuando ocurre la activación en la gónada masculina (Kent *et al.*, 1996b; da Silva *et al.*, 1996). Por otra parte, se ha demostrado que *Wnt4* juega un papel anti-testículo en la gónada femenina, ya que las gónadas de ratones XX con mutaciones nulas para este gen activan transitoriamente *Sox9* y *Fgf9* y se masculinizan, aunque no llega a observarse una reversión sexual completa. Estos datos indican que debe existir un elemento regulador adicional que promueva el desarrollo ovárico o que muestre un efecto anti-testicular (ver la revisión de DiNapoli y Capel, 2008). Nosotros mostramos que miR-124 es probablemente ese elemento que refuerza la ruta de desarrollo ovárico, reprimiendo el gen *Sox9* en la gónada de ratón XX en el momento crítico de la determinación sexual. Estudios futuros sobre

el papel de otros miRNAs identificados en este estudio pueden desvelar cuales desempeñan algún papel en el desarrollo gonadal, lo que permitirá probablemente el descubrimiento de nuevas piezas del complejo puzzle de genes que controlan la determinación sexual en mamíferos.

-Regulación de la expresión de mmu-mir-124

Es conocido el papel represor que el factor REST (*RE1-Silencing Transcripción Factor*) ejerce sobre *mmu-mir-124* en el sistema nervioso (Conaco *et al.*, 2006). Para la búsqueda de indicios que nos pudiesen indicar la posibilidad de que REST actuase durante el período crítico de la determinación sexual, hemos realizado consultas en la base de datos GEO (*Gene Expression Omnibus*). En los datos mostrados del experimento titulado: “*Gonadal somatic cells during the critical period of sex determination: time course*” (Record GDS1724) de Beverdam y Koopman (Beverdam y Koopman, 2006), se puede observar un incremento de expresión de REST en testículos de 11.5 dpc, que no se produce en hembras. Este patrón de expresión es coherente con los resultados de nuestro experimento de *microarrays*, que muestran que *mmu-mir-124* se expresa en gónadas embrionarias de hembras de 13.5 dpc pero no en machos del mismo estadio, y con el hecho de que *mmu-mir-124* inhibe la traducción de SOX9 en ovario embrionario, tal como hemos demostrado en este trabajo.

El análisis de las regiones con potencial regulador cerca del extremo 5' de los tres genes *mmu-mir-124* mediante la herramienta bioinformática TESS dio como resultados posibles sitios de unión de SF1, WT1 y AR, entre otros. En cuanto a SF1, sabemos que es un factor de transcripción que se expresa en las gónadas XX y XY y que está implicado en la formación del primordio gonadal en ambos sexos, en la posterior diferenciación testicular y la esteroidogénesis en gónadas XY (ver Sekido y Lovell-Badge, 2008). Con respecto a WT1, conviene recordar que es un factor de transcripción que se expresa en la gónada en ambos sexos, desde su estado indiferenciado hasta la vida adulta (Armstrong *et al.*, 1993; Rackley *et al.*, 1993), por lo que es posible que ambos factores de transcripción actúen conjuntamente para activar la expresión de *mmu-mir-124* en el inicio del desarrollo gonadal.

Si REST se uniese de forma eficiente a la región promotora de *mmu-mir-124*, provocaría una reducción de los niveles de miR-124 y el subsiguiente incremento de los niveles de proteína SOX9 y de su mRNA. Teniendo en cuenta el perfil de expresión específico de sexo de REST en el momento crítico de la diferenciación gonadal y la presencia de sitios de unión de REST en la región promotora de *mmu-mir-124*, es posible que REST inhiba la expresión de este *mmu-mir-124* en la gónada, lo que permitiría explicar por qué no se expresa en células pre-Sertoli a pesar de que éstas contienen los factores la transcripción potencialmente

6. Discusión

necesarios para ello. Por otro lado, si efectivamente SF1 y/o WT1 activan *mmu-mir-124*, éstos podría entonces competir con REST por el control de la expresión de este miRNA. Así, la expresión de SF1 en las gónadas de las hembras 11.5 dpc, donde no competiría con REST, permitiendo la expresión de *mmu-mir-124*, de forma que éste podría inhibir la producción de proteína SOX9, cuya presencia aquí sería contraproducente. Esto daría respuesta a la actual incógnita de por qué *Sox9* se inactiva en la gónada femenina. Experimentos futuros permitirán dilucidar el mecanismo de regulación de la expresión de miR-124.

En relación con AR, su posible papel regulador en este proceso es menos probable, ya que su expresión comienza en 14.5 dpc en los machos, después por tanto de que miR-124 ya se haya activado en la hembra. Sin embargo, los estudios de expresión de miRNAs realizados en gónadas adultas de Mishima *et al.* (2008) detectan miR-124 en testículo adulto, donde también se encuentra AR. Además de modificar un factor de transcripción de podría activar miR-124, el gen *Ar* tiene también una diana potencial para este mismo miRNA en su extremo 3' UTR. Por tanto, podría ocurrir que miR-124 regule su propia transcripción mediante un bucle autorregulación negativa, en el que AR promueve la transcripción de miR-124 que, a su vez, reprime la expresión de *Ar*, de forma similar a como miR-133b y PITX3 regulan su expresión en el control de la diferenciación neuronal (Kim *et al.*, 2007). Se sabe también que es el propio andrógeno el que regula la expresión del receptor AR, aunque el mecanismo molecular subyacente no está claro. No obstante, el hecho de que la desregulación de este sistema esté asociada con la inducción de cáncer de próstata o de mama (Yeap *et al.*, 1999), indica que la regulación de *Ar* debe ser muy estricta, siendo posible que ciertos miRNAs puedan estar implicados en la misma.

6.4. miR-144

-Posible papel de miR-144 en el desarrollo testicular

Los resultados validados de nuestro experimento de *microarrays*, que muestran la activación de miR-144 en testículo de 13.5 dpc, junto con el hecho de que este miRNA tiene una diana potencial en genes clave de la ruta femenina como *Rspo1* o *Fst*, justificaba la realización de un estudio más profundo a cerca de su posible implicación en el desarrollo testicular, reprimiendo genes pro-ováricos. En concreto, nos hemos centrado en *Rspo1* ya que es el gen maestro de la ruta femenina de desarrollo gonadal (revisado por DiNapoli y Capel, 2008), aunque estudios posteriores permitirán investigar la posible relación entre miR-144 y *Fst*. No obstante, puesto que los resultados de los ensayos de luciferasa

confirmaron que *Rspo1* posee una diana funcional para miR-144, el resto de nuestra investigación actual se ha centrado en comprobar si esa diana es biológicamente activa en cultivos primarios de células gonadales XX y XY.

La expresión de *Rspo1* en la gónada comienza a bajos niveles en embriones de ambos sexos a los 10.5 dpc. Dos días después, dicha expresión aumenta fuertemente en hembra mientras que en el macho se mantiene a niveles bajos (Smith *et al.*, 2008). De acuerdo con nuestros resultados, nosotros sugerimos que miR-144 contribuye a mantener baja la expresión de *Rspo1* en el macho, pero probablemente en colaboración con otros factores, puesto que no observamos un efecto directo significativo entre la inhibición de miR-144 y la activación de *Rspo1* en la gónada masculina. Parece, por tanto, que la inhibición exclusiva de miR-144 no es suficiente para aumentar significativamente la expresión de *Rspo1*, pero cabe también la posibilidad de que sus posibles factores de activación no estén presentes en testículo, lo que no permitiría detectar un gran aumento en su expresión. Esta situación contrasta claramente con la mostrada en este mismo trabajo para miR-124 en la gónada femenina. En este caso *Sox9* se autorregula positivamente, de forma que el ligero aumento de los niveles de mensajero derivados de la eliminación del miRNA, permite detectar un efecto significativo de su expresión en el experimento. Otra explicación alternativa podría ser que, a pesar de que *Rspo1* tiene una diana potencial de miR-144, este miRNA no intervenga en su regulación. Aún así no es descartable que actuase aguas abajo en la cascada de señalización, regulando *Fst*, puesto que existen varias evidencias indirectas que sugieren que este miRNA posee algún papel en la regulación de genes de la ruta femenina, posibilidad que se investigará más adelante. Un diseño más avanzado de experimentos *in vivo*, consistiría en la obtención de ratones que sobre-expresen un homólogo estable de este miRNA y el análisis de los embriones transgénicos desde 10.5 dpc hasta 15.5 dpc, lo que probablemente proporcionaría unos resultados más relevantes.

Por otro lado la sobre-expresión de miR-144 en la hembra no ha producido un efecto visible en los niveles del mRNA de *Rspo1*. Se sabe que varios miRNAs pueden regular el mismo gen (An *et al.*, 2010) y precisamente en la región 3'UTR de *Rspo1* existe un elevado número de posibles dianas de miRNAs. Dependiendo del algoritmo utilizado para su identificación, el número de dianas puede oscilar entre 50 y 60, por lo que sería razonable pensar que este gen estuviese regulado de forma redundante por varios miRNAs, sobre todo si tenemos en cuenta que se trata de un gen maestro de la ruta ovárica. No obstante, la eliminación de este gen en el ovario provoca solamente una reversión sexual parcial (Chassot *et al.*, 2008; Tomizuka *et al.*, 2008), por lo que es de esperar que haya otras rutas operando en el desarrollo ovárico.

Seis de los miRNAs que poseen posibles dianas en la región 3'UTR

6. Discusión

de *Rspo1* aparecen en nuestro *microarray* (miR-10, miR-342, miR-675-5p, miR-710, miR-743a, miR-465), aunque sus perfiles de expresión son variados. Entre ellos cabe destacar miR-465a/b/c, que se activa en gónada de 13.5 de ambos sexos y que podría estar regulado por SRY, según nuestros análisis bioinformáticos. Por tanto, probablemente exista algún tipo de interacción compleja en la regulación de este gen por parte de los miRNAs, que merece un estudio futuro más detallado, estudiando, por ejemplo, el efecto de la inhibición o de la sobre-expresión conjunta de dos o más miRNAs (miR-144 y miR-465, por ejemplo).

A pesar de que la mayoría de miRNAs provocan una disminución en los niveles de mRNA de sus genes diana (Guo *et al.*, 2010), la no existencia de efectos sobre el mRNA de *Rspo1* no descarta que este miRNA pueda afectar de forma significativa a su traducción, reduciendo por tanto los niveles de proteína. Sin embargo, no existen anticuerpos comerciales que detecten eficientemente esta proteína de ratón, a pesar de haber testado varios de ellos. La posible actuación de miR-144 sobre la traducción de *Rspo1* se podrá continuar investigando en el futuro, utilizando nuevos anticuerpos que puedan ser generados. En este sentido, en colaboración con el laboratorio del Dr. Robin Lovell-Badge, ya hemos puesto en marcha la producción de ratones transgénicos que sobre-expresen constructos que contengan este miRNA, mediante un sistema inducible con tamoxifeno.

-Secuencias reguladoras y promotoras de mmu-miR-144

Es conocido que GATA4 promueve la transcripción de *mmu-miR-144* en cardiomiocitos (Zhang *et al.*, 2010). El gen *Gata4* es un factor de transcripción que se expresa tempranamente en la cresta genital de ambos sexos, elevando su expresión en testículo poco después en el desarrollo y colaborando en la activación de varios genes muy importantes en la diferenciación masculina, como *Sf1* o *Amh*. Es razonable pensar que este factor de transcripción pueda actuar en el testículo embrionario tal como lo hace en corazón, activando el promotor de *mmu-miR-144*. El análisis realizado con TESS reveló además la presencia de un presunto sitio de unión al factor de transcripción SRY en esta región, que en ratón se expresa en las células pre-Sertoli del primordio gonadal XY, justo antes de la diferenciación sexual (Koopman *et al.*, 1990; Sekido y Lovell-Badge, 2008). Estos datos sugieren que alguno o varios de los factores de transcripción típicos de la ruta masculina activarían el miRNA(s) encargado(s) de inhibir los genes de la ruta femenina. Es posible que SRY y GATA4 actúen conjuntamente activando miR-144 en el comienzo del desarrollo gonadal y que más tarde se eleve la expresión de este miRNA por la acción de GATA4, cuyos niveles aumentan considerablemente en el macho coincidiendo con el aumento de miR-144.

Aunque los datos bioinformáticos disponibles permiten imaginar un atractivo modelo de regulación negativa de *Rspo1* por miR-144 en testículo, en donde la activación del miRNA dependería de SRY, los resultados

experimentales obtenidos no apoyan por el momento esta hipótesis, posiblemente porque en la regulación de este importante gen maestro del desarrollo ovárico estén implicados más elementos, que podrían ser otros miRNAs y factores de transcripción.

-Hipótesis sobre la posible intervención de miR-124 y miR-144 en el desarrollo gonadal

Ante la observación de los resultados recogidos en estos primeros estudios sobre la regulación por miRNAs de los principales genes determinantes del sexo, hemos resumido los principales hallazgos en una hipótesis que engloba diversos elementos reguladores, incluidos los miRNAs. Por tanto, esta hipótesis (Figura 6.1) resume el estado actual de conocimientos sobre la regulación de la ruta ovárica y la testicular, introduciendo los miRNAs como nuevos elementos reguladores. En la parte superior de la figura se representa la ruta de diferenciación ovárica que opera en individuos XX, donde vemos como SF1 y/o WT1 activarían la expresión de *mmu-miR-124*, que provocaría un descenso de los niveles de mensajero y proteína SOX9, algo necesario para reprimir el inicio del desarrollo testicular y que, en consecuencia, la gónada XX pueda desarrollarse como ovario. Este modelo identifica así el elemento inhibidor de *Sox9* en la gónada XX, lo que durante años supuso una intrigante incógnita en el proceso de determinación sexual en mamíferos. Por otro lado, la ausencia de proteína SRY en la gónada femenina haría que *mmu-miR-144*, y probablemente otros miRNAs, no se activasen y, por tanto, no se reducirían los niveles de expresión de *Rspo1* y/o de *Fst*, imprescindibles para que la gónada se desarrolle como ovario. En el caso de la ruta testicular (parte inferior de la figura 6.1), la presencia de SRY y/o GATA4 activaría el promotor de *mmu-mir-144*, y probablemente otros miRNAs, que se encargarían de reprimir *Rspo1* y/o *Fst*, impidiendo que se inicie la ruta ovárica. Además, REST inhibiría la expresión de *mmu-miR-124* impidiendo que éste reduzca la expresión de *Sox9*, que sería activado por el tandem SRY+SF1 iniciando así la ruta de diferenciación testicular. La identificación de miRNAs implicados en la regulación de los genes maestros de la determinación sexual en mamíferos, ofrece una explicación de por qué 20 años después del descubrimiento de SRY, aún no se ha dilucidado por completo este proceso.

6. Discusión

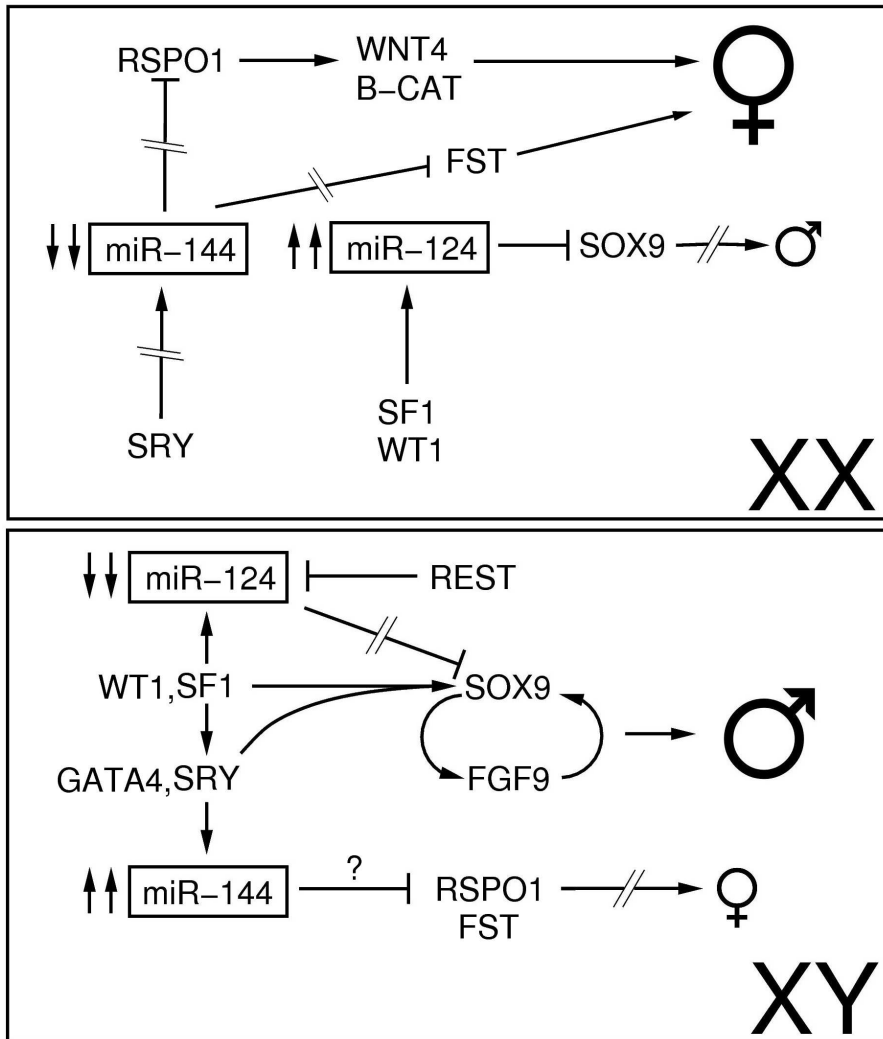


Figura 6.1: Hipótesis sobre el posible papel de miR-124 y miR-144 en el control genético del desarrollo gonadal. En la parte superior se representa esquematizada la ruta ovárica (XX) y en la inferior la ruta testicular (XY). Consultar el texto para una descripción de estos modelos. Las flechas indican activación génica mientras que los segmentos acabados en una línea perpendicular indican represión génica.

7. Conclusiones

Contenidos

7.1. Conclusiones	239
-----------------------------	-----

7.1. Conclusiones

1. El patrón de expresión diferencial específico de sexo de varios miRNAs durante el período crítico de la determinación sexual, junto con la identificación de dianas potenciales para esos miRNAs en los genes maestros que controlan este proceso, sugiere que los miRNAs desempeñan papeles cruciales en la regulación de dichos genes en mamíferos.
2. El número de miRNAs implicados en el desarrollo ovárico es mayor que en el desarrollo testicular, y el número de genes pro-testiculares con potenciales dianas es mayor que de genes pro-ováricos. Ambos hechos apuntan a que es más necesaria una inhibición activa de los genes pro-testiculares en la ruta de desarrollo femenina que al contrario en la masculina.
3. Los miRNAs identificados en el experimento de *microarray* realizado, junto con los datos del programa μ iRNAM, abren un nuevo y amplio campo de estudio, ante la multitud de nuevos posibles mecanismos y puntos de regulación génica en que estos miRNAs pueden estar implicados durante la determinación y diferenciación sexual.
4. Los análisis bioinformáticos de las posibles secuencias reguladoras de varios miRNAs sugieren una expresión coordinada de miRNAs localizados en *clusters* en los cromosomas X y 12. Los resultados obtenidos en los experimentos de *microarrays* apoyan esta expresión coordinada.
5. Dos miRNAs emergen como posibles candidatos a la regulación del desarrollo gonadal: miR-124 actuaría como un regulador de la ruta femenina, debido a su diana funcional en *Sox9*, y a sus dianas

7. Conclusiones

potenciales en otros importantes genes pro-testiculares, tales como *Sox8*, *Dmrt1* o *Ar*; miR-144 lo haría como regulador de la ruta masculina dadas sus dianas potenciales en genes pro-ováricos como *Rspo1* y *Fst*.

6. La inhibición de miR-124 en células gonadales XX activa la expresión ectópica de *Sox9*, indicando claramente que este miRNA es el responsable de la bajada de expresión de *Sox9* en la gónada femenina en el momento crítico de la determinación sexual.
7. La sobre-expresión ectópica de miR-124 reduce los niveles de *Sox9* en condrocitos pero no en células gonadales XY, demostrando que la expresión de este gen es muy robusta en testículo desde las etapas más tempranas de la diferenciación gonadal y que en ambos tipos celulares operan distintos mecanismos de regulación para este gen.
8. *Rspo1* posee una diana funcional para miR-144, aunque la manipulación *ex-vivo* de los niveles de este miRNA no produce efectos significativos en los niveles de mRNA de este gen.
9. Los datos bioinformáticos, junto con los experimentales derivados de nuestro estudio, permiten la elaboración de un modelo de regulación de los genes de la determinación del sexo en el que los microRNAs juegan papeles clave.

Bibliografía

- Adams I. y McLaren A. (2002) Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development*, **129**:1155–64.
- Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Li P.W., Hoskins R.A., Galle R.F., George R.A., Lewis S.E., Richards S., Ashburner M., Henderson S.N., Sutton G.G., Wortman J.R., Yandell M.D., Zhang Q., Chen L.X., Brandon R.C., Rogers Y.H., Blazej R.G., Champe M., Pfeiffer B.D., Wan K.H., Doyle C., Baxter E.G., Helt G., Nelson C.R., Gabor G.L., Abril J.F., Agbayani A., An H.J., Andrews-Pfannkoch C., Baldwin D., Ballew R.M., Basu A., Baxendale J., Bayraktaroglu L., Beasley E.M., Beeson K.Y., Benos P.V., Berman B.P., Bhandari D., Bolshakov S., Borkova D., Botchan M.R., Bouck J., Brokstein P., Brottier P., Burtis K.C., Busam D.A., Butler H., Cadieu E., Center A., Chandra I., Cherry J.M., Cawley S., Dahlke C., Davenport L.B., Davies P., de Pablos B., Delcher A., Deng Z., Mays A.D., Dew I., Dietz S.M., Dodson K., Doup L.E., Downes M., Dugan-Rocha S., Dunkov B.C., Dunn P., Durbin K.J., Evangelista C.C., Ferraz C., Ferriera S., Fleischmann W., Fosler C., Gabrielian A.E., Garg N.S., Gelbart W.M., Glasser K., Glodek A., Gong F., Gorrell J.H., Gu Z., Guan P., Harris M., Harris N.L., Harvey D., Heiman T.J., Hernandez J.R., Houck J., Hostin D., Houston K.A., Howland T.J., Wei M.H., Ibegwam C., Jalali M., Kalush F., Karpen G.H., Ke Z., Kennison J.A., Ketchum K.A., Kimmel B.E., Kodira C.D., Kraft C., Kravitz S., Kulp D., Lai Z., Lasko P., Lei Y., Levitsky A.A., Li J., Li Z., Liang Y., Lin X., Liu X., Mattei B., McIntosh T.C., McLeod M.P., McPherson D., Merkulov G., Milshina N.V., Mobarry C., Morris J., Moshrefi A., Mount S.M., Moy M., Murphy B., Murphy L., Muzny D.M., Nelson D.L., Nelson D.R., Nelson K.A., Nixon K., Nusskern D.R., Pacleb J.M., Palazzolo M., Pittman G.S., Pan S., Pollard J., Puri V., Reese M.G., Reinert K., Remington K., Saunders R.D., Scheeler F., Shen H., Shue B.C., Sidén-Kiamos I., Simpson M., Skupski M.P., Smith T., Spier E., Spradling A.C., Stapleton M., Strong R., Sun E., Svirskas R., Tector C., Turner R., Venter E., Wang A.H., Wang X., Wang Z.Y., Wassarman D.A., Weinstock G.M., Weissbach J., Williams S.M., Woodage T., Worley K.C., Wu D., Yang S., Yao Q.A., Ye J., Yeh R.F., Zaveri J.S., Zhan M., Zhang G., Zhao Q., Zheng L., Zheng X.H., Zhong F.N., Zhong W., Zhou X., Zhu S., Zhu X., Smith H.O., Gibbs R.A., Myers E.W., Rubin G.M. y Venter J.C. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **287**:2185–2195.
- Albrecht K.H. y Eicher E.M. (2001) Evidence that sry is expressed in pre-sertoli cells and sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol*, **240**:92–107.
- Alemán L.M., Doench J. y Sharp P.A. (2007) Comparison of sirna-induced off-target rna and protein effects. *RNA*, **13**:385–395.
- Alexiou P., Maragkakis M., Papadopoulos G.L., Reczko M. y Hatzigeorgiou A.G. (2009) Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification. *Bioinformatics*, **25**:3049–3055.
- Amanai M., Brahmajyosyula M. y Perry A.C.F. (2006) A restricted role for sperm-borne microRNAs in mammalian fertilization. *Biol Reprod*, **75**:877–884.

Bibliografía

- Ambros V. (2003) MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*, **113**:673–676.
- Ambros V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature*, **431**:350–355.
- An J., Choi K.P., Wells C.A. y Chen Y.P.P. (2010) Identifying co-regulating microRNA groups. *J Bioinform Comput Biol*, **8**:99–115.
- Arango N., Lovell-Badge R. y Behringer R. (1999) Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell*, **99**:409–19.
- Argentaro A., Sim H., Kelly S., Preiss S., Clayton A., Jans D. y Harley V. (2003) A SOX9 defect of calmodulin-dependent nuclear import in campomelic dysplasia/autosomal sex reversal. *J Biol Chem*, **278**:33839–47.
- Armstrong J., Pritchard-Jones K., Bickmore W., Hastie N. y Bard J. (1993) The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev*, **40**:85–97.
- Austin C. y Edwards R. (1981) *Mechanism of sex differentiation in animals and man*. Academic Press Inc, London.
- Axelsen J.B. y Sneppen K. (2004) Quantifying the benefits of translation regulation in the unfolded protein response. *Phys Biol*, **1**:159–165.
- Azuma-Mukai A., Oguri H., Mituyama T., Qian Z.R., Asai K., Siomi H. y Siomi M.C. (2008) Characterization of endogenous human argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**:7964–7969.
- Babak T., Zhang W., Morris Q., Blencowe B.J. y Hughes T.R. (2004) Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference. *RNA*, **10**:1813–1819.
- Baek D., Villén J., Shin C., Camargo F.D., Gygi S.P. y Bartel D.P. (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, **455**:64–71.
- Bagga S., Bracht J., Hunter S., Massirer K., Holtz J., Eachus R. y Pasquinelli A.E. (2005) Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*, **122**:553–563.
- Bao N., Lye K.W. y Barton M.K. (2004) MicroRNA binding sites in Arabidopsis class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. *Dev Cell*, **7**:653–662.
- Barbara P.D.S., Bonneaud N., Boizet B., Desclozeaux M., Moniot B., Sudbeck P., Scherer G., Poulat F. y Berta P. (1998) Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol Cell Biol*, **18**:6653–6665.
- Barrionuevo F., Bagheri-Fam S., Klattig J., Kist R., Taketo M., Englert C. y Scherer G. (2006a) Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biol Reprod*, **74**:195–201.
- Barrionuevo F., Bagheri-Fam S., Klattig J., Kist R., Taketo M.M., Englert C. y Scherer G. (2006b) Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biol Reprod*, **74**:195–201.
- Barrionuevo F., Georg I., Scherthan H., Lécureuil C., Guillou F., Wegner M. y Scherer G. (2009) Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8. *Dev Biol*, **327**:301–312.
- Bartel D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**:281–297.
- Bartel D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, **136**:215–233.
- Baskerville S. y Bartel D.P. (2005) Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*, **11**:241–247.
- Basyuk E., Suavet F., Doglio A., Bordonné R. y Bertrand E. (2003) Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res*, **31**:6593–6597.

Bibliografía

- Behm-Ansmant I., Rehwinkel J., Doerks T., Stark A., Bork P. y Izaurralde E. (2006) mrna degradation by mirnas and gw182 requires both ccr4:not deadenylase and dcp1:dcp2 decapping complexes. *Genes Dev*, **20**:1885–1898.
- Beilharz T.H., Humphreys D.T., Clancy J.L., Thermann R., Martin D.I.K., Hentze M.W. y Preiss T. (2009) microrna-mediated messenger rna deadenylation contributes to translational repression in mammalian cells. *PLoS One*, **4**:e6783.
- Beitzinger M., Peters L., Zhu J.Y., Kremmer E. y Meister G. (2007) Identification of human microrna targets from isolated argonaute protein complexes. *RNA Biol*, **4**:76–84.
- Bell D., Leung K., Wheatley S., Ng L., Zhou S., Ling K., Sham M., Koopman P., Tam P. y Cheah K. (1997) SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet*, **16**:174–8.
- Benetti R., Gonzalo S., Jaco I., Muñoz P., Gonzalez S., Schoeftner S., Murchison E., Andl T., Chen T., Klatt P., Li E., Serrano M., Millar S., Hannon G. y Blasco M.A. (2008) A mammalian microrna cluster controls dna methylation and telomere recombination via rbl2-dependent regulation of dna methyltransferases. *Nat Struct Mol Biol*, **15**:268–279.
- van den Berg D.L.C., Snoek T., Mullin N.P., Yates A., Bezstarosti K., Demmers J., Chambers I. y Poot R.A. (2010) An oct4-centered protein interaction network in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, **6**:369–381.
- Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M. y Hannon G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of rna interference. *Nature*, **409**:363–366.
- Bernstein E., Kim S.Y., Carmell M.A., Murchison E.P., Alcorn H., Li M.Z., Mills A.A., Elledge S.J., Anderson K.V. y Hannon G.J. (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*, **35**:215–217.
- Berta P., Hawkins J., Sinclair A., Taylor A., Griffiths B., Goodfellow P. y Fellous M. (1990) Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, **348**:448–50.
- Betel D., Wilson M., Gabow A., Marks D.S. y Sander C. (2008) The microrna.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res*, **36**:D149–D153.
- Beuvink I., Kolb F.A., Budach W., Garnier A., Lange J., Natt F., Dengler U., Hall J., Filipowicz W. y Weiler J. (2007) A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian micrnas. *Nucleic Acids Res*, **35**:e52.
- Beverdam A. y Koopman P. (2006) Expression profiling of purified mouse gonadal somatic cells during the critical time window of sex determination reveals novel candidate genes for human sexual dysgenesis syndromes. *Hum Mol Genet*, **15**:417–431.
- Bhattacharyya S.N., Habermacher R., Martine U., Closs E.I. y Filipowicz W. (2006) Relief of microrna-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*, **125**:1111–1124.
- Bishop C.E., Whitworth D.J., Qin Y., Agoul-nik A.I., Agoul-nik I.U., Harrison W.R., Behringer R.R. y Overbeek P.A. (2000) A transgenic insertion upstream of sox9 is associated with dominant xx sex reversal in the mouse. *Nat Genet*, **26**:490–494.
- Blakaj A. y Lin H. (2008) Piecing together the mosaic of early mammalian development through micrnas. *J Biol Chem*, **283**:9505–9508.
- Boehm M. y Slack F. (2005) A developmental timing microrna and its target regulate life span in *c. elegans*. *Science*, **310**:1954–1957.
- Bohnsack M.T., Czapinski K. y Gorlich D. (2004) Exportin 5 is a rangtp-dependent dsrna-binding protein that mediates nuclear export of pre-mirnas. *RNA*, **10**:185–191.
- Bouma G.J., Washburn L.L., Albrecht K.H. y Eicher E.M. (2007) Correct dosage of fog2 and gata4 transcription factors is critical for fetal testis development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**:14994–14999.

Bibliografía

- Boutros M. y Ahringer J. (2008) The art and design of genetic screens: Rna interference. *Nat Rev Genet*, **9**:554–566.
- Boutros M., Kiger A.A., Armknecht S., Kerr K., Hild M., Koch B., Haas S.A., Paro R., Perrimon N. y Consortium H.F.A. (2004) Genome-wide rna analysis of growth and viability in drosophila cells. *Science*, **303**:832–835.
- Bowles J., Schepers G. y Koopman P. (2000) Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol*, **227**:239–55.
- Bradford S.T., Hiramatsu R., Maddugoda M.P., Bernard P., Chaboissier M.C., Sinclair A., Schedl A., Harley V., Kanai Y., Koopman P. y Wilhelm D. (2009) The cerebellin 4 precursor gene is a direct target of sry and sox9 in mice. *Biol Reprod*, **80**:1178–1188.
- Brennan J., Karl J. y Capel B. (2002) Divergent vascular mechanisms downstream of Sry establish the arterial system in the XY gonad. *Dev Biol*, **244**:418–28.
- Brennecke J., Aravin A.A., Stark A., Dus M., Kellis M., Sachidanandam R. y Hannon G.J. (2007) Discrete small rna-generating loci as master regulators of transposon activity in drosophila. *Cell*, **128**:1089–1103.
- Brennecke J., Hipfner D.R., Stark A., Russell R.B. y Cohen S.M. (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in drosophila. *Cell*, **113**:25–36.
- Brent A.E., Yucel G., Small S. y Desplan C. (2007) Permissive and instructive anterior patterning rely on mrna localization in the wasp embryo. *Science*, **315**:1841–1843.
- Brodersen P. y Voinnet O. (2009) Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**:141–148.
- Buchold G.M., Coarfa C., Kim J., Milosavljevic A., Gunaratne P.H. y Matzuk M.M. (2010) Analysis of microRNA expression in the prepubertal testis. *PLoS One*, **5**:e15317.
- Buehr M., Gu S. y McLaren A. (1993) Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development*, **117**:273–81.
- Bullejos M. y Koopman P. (2001) Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges. *Dev Dyn*, **221**:201–5.
- Cadigan K. y Nusse R. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*, **11**:3286–305.
- Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F. y Croce C.M. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- rna genes mir15 and mir16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**:15524–15529.
- Calin G.A., Ferracin M., Cimmino A., Leva G.D., Shimizu M., Wojcik S.E., Iorio M.V., Visone R., Sever N.I., Fabbri M., Iuliano R., Palumbo T., Pichiorri F., Roldo C., Garzon R., Sevignani C., Rassenti L., Alder H., Volinia S., gong Liu C., Kipps T.J., Negrini M. y Croce C.M. (2005) A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, **353**:1793–1801.
- Calin G.A., Sevignani C., Dumitru C.D., Hyslop T., Noch E., Yendamuri S., Shimizu M., Rattan S., Bullrich F., Negrini M. y Croce C.M. (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**:2999–3004.
- Canning C. y Lovell-Badge R. (2002) Sry and sex determination: how lazy can it be? *Trends Genet*, **18**:111–3.
- Carlberg C. y Seuter S. (2010) Dynamics of nuclear receptor target gene regulation. *Chromosoma*, **119**:479–484.
- Carthew R.W. y Sontheimer E.J. (2009) Origins and mechanisms of mirnas and sirnas. *Cell*, **136**:642–655.

- Castanotto D., Lingeman R., Riggs A.D. y Rossi J.J. (2009) Crm1 mediates nuclear-cytoplasmic shuttling of mature micrornas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**:21655–21659.
- Chaboissier M., Kobayashi A., Vidal V., Lutzkendorf S., van de Kant H., Wegner M., de Rooij D., Behringer R. y Schedl A. (2004) Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development*, **131**:1891–901.
- Chakrabarty A., Tranguch S., Daikoku T., Jensen K., Furneaux H. y Dey S.K. (2007) MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**:15144–15149.
- Chang T.C., Wentzel E.A., Kent O.A., Ramachandran K., Mullendore M., Lee K.H., Feldmann G., Yamakuchi M., Ferlito M., Lowenstein C.J., Arking D.E., Beer M.A., Maitra A. y Mendell J.T. (2007) Transactivation of mir-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell*, **26**:745–752.
- Chang T.C., Yu D., Lee Y.S., Wentzel E.A., Arking D.E., West K.M., Dang C.V., Thomas-Tikhonenko A. y Mendell J.T. (2008) Widespread microRNA repression by myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*, **40**:43–50.
- Chapman E.J. y Carrington J.C. (2007) Specialization and evolution of endogenous small rna pathways. *Nat Rev Genet*, **8**:884–896.
- Chassot A.A., Ranc F., Gregoire E.P., Roepers-Gajadien H.L., Taketo M.M., Camerino G., de Rooij D.G., Schedl A. y Chaboissier M.C. (2008) Activation of beta-catenin signaling by rspl1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet*, **17**:1264–1277.
- Chatterjee S. y Grosshans H. (2009) Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **461**:546–549.
- Chekulaeva M. y Filipowicz W. (2009) Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol*, **21**:452–460.
- Chekulaeva M., Filipowicz W. y Parker R. (2009) Multiple independent domains of dgw182 function in miRNA-mediated repression in *Drosophila*. *RNA*, **15**:794–803.
- Chen C.Z., Li L., Lodish H.F. y Bartel D.P. (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, **303**:83–86.
- Chen J.Z., Wang S., Tang R., Yang Q.S., Zhao E., Chao Y., Ying K., Xie Y. y Mao Y.M. (2002) Cloning and identification of a cDNA that encodes a novel human protein with thrombospondin type I repeat domain, hpwtsr. *Mol Biol Rep*, **29**:287–292.
- Chendrimada T.P., Finn K.J., Ji X., Bailat D., Gregory R.I., Liebhaber S.A., Pasquinelli A.E. y Shiekhattar R. (2007) MicroRNA silencing through recruitment of eIF6. *Nature*, **447**:823–828.
- Chendrimada T.P., Gregory R.I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K. y Shiekhattar R. (2005) Trbp recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, **436**:740–744.
- Cheng L.C., Pastrana E., Tavazoie M. y Doetsch F. (2009) miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat Neurosci*, **12**:399–408.
- Chi S.W., Zang J.B., Mele A. y Darnell R.B. (2009) Argonaute hits-clip decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature*, **460**:479–486.
- Chiang H.R., Schoenfeld L.W., Ruby J.G., Auyeung V.C., Spies N., Baek D., Johnston W.K., Russ C., Luo S., Babiarz J.E., Blelloch R., Schroth G.P., Nusbaum C. y Bartel D.P. (2010) Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev*, **24**:992–1009.
- Choi Y., Qin Y., Berger M.F., Ballow D.J., Bulky M.L. y Rajkovic A. (2007) Microarray analyses of newborn mouse ovaries lacking *nobox*. *Biol Reprod*, **77**:312–319.
- Choi Y. y Rajkovic A. (2006) Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Cell Mol Life Sci*, **63**:579–590.

Bibliografía

- ying Chu C. y Rana T.M. (2006) Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires rck/p54. *PLoS Biol*, **4**:e210.
- Cikaluk D.E., Tahbaz N., Hendricks L.C., Di-Mattia G.E., Hansen D., Pilgrim D. y Hobman T.C. (1999) Gerp95, a membrane-associated protein that belongs to a family of proteins involved in stem cell differentiation. *Mol Biol Cell*, **10**:3357–3372.
- Cocquet J., Pannetier M., Fellous M. y Veitia R.A. (2005) Sense and antisense foxl2 transcripts in mouse. *Genomics*, **85**:531–541.
- Combes A.N., Wilhelm D., Davidson T., Dejana E., Harley V., Sinclair A. y Koopman P. (2009) Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev Biol*, **326**:112–120.
- Conaco C., Otto S., Han J.J. y Mandel G. (2006) Reciprocal actions of rest and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**:2422–2427.
- Consortium M.G.S., Waterston R.H., Lindblad-Toh K., Birney E., Rogers J., Abril J.F., Agarwal P., Agarwala R., Ainscough R., Alexandersson M., An P., Antonarakis S.E., Attwood J., Baertsch R., Bailey J., Barlow K., Beck S., Berry E., Birren B., Bloom T., Bork P., Botcherby M., Bray N., Brent M.R., Brown D.G., Brown S.D., Bult C., Burton J., Butler J., Campbell R.D., Carninci P., Cawley S., Chiaromonte F., Chinwalla A.T., Church D.M., Clamp M., Clee C., Collins F.S., Cook L.L., Copley R.R., Coulson A., Couronne O., Cuff J., Curwen V., Cutts T., Daly M., David R., Davies J., Delehaunty K.D., Deri J., Dermitzakis E.T., Dewey C., Dickens N.J., Diekhans M., Dodge S., Dubchak I., Dunn D.M., Eddy S.R., Elnitski L., Emes R.D., Eswara P., Eyraas E., Felsenfeld A., Fewell G.A., Flicek P., Foley K., Frankel W.N., Fulton L.A., Fulton R.S., Furey T.S., Gage D., Gibbs R.A., Glusman G., Gnerre S., Goldman N., Goodstadt L., Grafham D., Graves T.A., Green E.D., Gregory S., Guigó R., Guyer M., Hardison R.C., Haussler D., Hayashizaki Y., Hillier L.W., Hinrichs A., Hlavina W., Holzer T., Hsu F., Hua A., Hubbard T., Hunt A., Jackson I., Jaffe D.B., Johnson L.S., Jones M., Jones T.A., Joy A., Kamal M., Karlsson E.K., Karolchik D., Kasprzyk A., Kawai J., Keibler E., Kells C., Kent W.J., Kirby A., Kolbe D.L., Korf I., Kucherlapati R.S., Kulbokas E.J., Kulp D., Landers T., Leger J.P., Leonard S., Letunic I., Levine R., Li J., Li M., Lloyd C., Lucas S., Ma B., Maglott D.R., Mardis E.R., Matthews L., Mauceli E., Mayer J.H., McCarthy M., McCombie W.R., McLaren S., McLay K., McPherson J.D., Meldrim J., Meredith B., Mesirov J.P., Miller W., Miner T.L., Mongin E., Montgomery K.T., Morgan M., Mott R., Mullikin J.C., Muzny D.M., Nash W.E., Nelson J.O., Nhan M.N., Nicol R., Ning Z., Nusbaum C., O'Connor M.J., Okazaki Y., Oliver K., Overton-Larty E., Pachter L., Parra G., Pepin K.H., Peterson J., Pevzner P., Plumb R., Pohl C.S., Poliakov A., Ponce T.C., Ponting C.P., Potter S., Quail M., Reymond A., Roe B.A., Roskin K.M., Rubin E.M., Rust A.G., Santos R., Sapojnikov V., Schultz B., Schultz J., Schwartz M.S., Schwartz S., Scott C., Seaman S., Searle S., Sharpe T., Sheridan A., Shownkeen R., Sims S., Singer J.B., Slater G., Smit A., Smith D.R., Spencer B., Stabenau A., Stange-Thomann N., Sugnet C., Suyama M., Tesler G., Thompson J., Torrents D., Trevaskis E., Tromp J., Ucla C., Ureta-Vidal A., Vinson J.P., Niederhausern A.C.V., Wade C.M., Wall M., Weber R.J., Weiss R.B., Wendl M.C., West A.P., Wetterstrand K., Wheeler R., Whelan S., Wierzbowski J., Willey D., Williams S., Wilson R.K., Winter E., Worley K.C., Wyman D., Yang S., Yang S.P., Zdobnov E.M., Zody M.C. y Lander E.S. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, **420**:520–562.
- Cool J., Carmona F.D., Szucsik J.C. y Capel B. (2008) Peritubular myoid cells are not the migrating population required for testis cord formation in the xy gonad. *Sex Dev*, **2**:128–133.
- Coveney D., Cool J., Oliver T. y Capel B. (2008) Four-dimensional analysis of vascularization during primary development of an organ, the gonad. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**:7212–7217.
- Creighton C.J., Benham A.L., Zhu H., Khan M.F., Reid J.G., Nagaraja A.K., Fountain

- M.D., Dziadek O., Han D., Ma L., Kim J., Hawkins S.M., Anderson M.L., Matzuk M.M. y Gunaratne P.H. (2010) Discovery of novel micrnas in female reproductive tract using next generation sequencing. *PLoS One*, **5**:e9637.
- Crews D. (1993) The organizational concept and vertebrates without sex chromosomes. *Brain Behav Evol*, **42**:202–14.
- Crews D. (1994) Temperature, steroids and sex determination. *J Endocrinol*, **142**:1–8.
- Croce C.M. (2009) Causes and consequences of micrna dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*, **10**:704–714.
- Czech B., Zhou R., Erlich Y., Brennecke J., Binari R., Villalta C., Gordon A., Perrimon N. y Hannon G.J. (2009) Hierarchical rules for argonaute loading in drosophila. *Mol Cell*, **36**:445–456.
- Dale T. (1998) Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J*, **329** (Pt 2):209–23.
- De Grandi A., Calvari V., Bertini V., Bulfone A., Peverali G., Camerino G., Borsani G. y Guioli S. (2000) The expression pattern of a mouse doublesex-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation. *Mech Dev*, **90**:323–6.
- De Santa Barbara P., Bonneaud N., Boizet B., Desclozeaux M., Moniot B., Sudbeck P., Scherer G., Poulat F. y Berta P. (1998) Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol*, **18**:6653–65.
- De Santa Barbara P., Moniot B., Poulat F. y Berta P. (2000) Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev Dyn*, **217**:293–8.
- Derry M.C., Yanagiya A., Martineau Y. y Sonnenberg N. (2006) Regulation of poly(a)-binding protein through pabp-interacting proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **71**:537–543.
- Didiano D. y Hobert O. (2006) Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for mirna-target interactions. *Nat Struct Mol Biol*, **13**:849–851.
- Diederichs S. y Haber D.A. (2007) Dual role for argonautes in micrna processing and posttranscriptional regulation of micrna expression. *Cell*, **131**:1097–1108.
- DiNapoli L. y Capel B. (2008) Sry and the standoff in sex determination. *Mol Endocrinol*, **22**:1–9.
- Ding L. y Han M. (2007) Gw182 family proteins are crucial for micrna-mediated gene silencing. *Trends Cell Biol*, **17**:411–416.
- Ding L., Spencer A., Morita K. y Han M. (2005) The developmental timing regulator ain-1 interacts with miriscs and may target the argonaute protein alg-1 to cytoplasmic p bodies in c. elegans. *Mol Cell*, **19**:437–447.
- Doench J.G. y Sharp P.A. (2004) Specificity of micrna target selection in translational repression. *Genes Dev*, **18**:504–511.
- Du X., Hublitz P., Günther T., Wilhelm D., Englert C. y Schüle R. (2002) The lim-only coactivator fhl2 modulates wt1 transcriptional activity during gonadal differentiation. *Biochim Biophys Acta*, **1577**:93–101.
- Dunn K.L. y Davie J.R. (2003) The many roles of the transcriptional regulator ctf. *Biochem Cell Biol*, **81**:161–167.
- Duursma A.M., Kedde M., Schrier M., le Sage C. y Agami R. (2008) mir-148 targets human dnmt3b protein coding region. *RNA*, **14**:872–877.
- Dykxhoorn D.M., Novina C.D. y Sharp P.A. (2003) Killing the messenger: short rnas that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**:457–467.
- Easow G., Teleman A.A. y Cohen S.M. (2007) Isolation of micrna targets by mirnp immunopurification. *RNA*, **13**:1198–1204.
- Echeverri C.J. y Perrimon N. (2006) High-throughput rnai screening in cultured cells: a user's guide. *Nat Rev Genet*, **7**:373–384.

Bibliografía

- Eisen M.B., Spellman P.T., Brown P.O. y Botstein D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**:14863–14868.
- Ender C., Krek A., Friedländer M.R., Beitzinger M., Weinmann L., Chen W., Pfeffer S., Rajewsky N. y Meister G. (2008) A human snorna with microrna-like functions. *Mol Cell*, **32**:519–528.
- Esau C., Kang X., Peralta E., Hanson E., Marcusson E.G., Ravichandran L.V., Sun Y., Koo S., Perera R.J., Jain R., Dean N.M., Freier S.M., Bennett C.F., Lollo B. y Griffey R. (2004) Microrna-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **279**:52361–52365.
- Esquela-Kerscher A. y Slack F.J. (2006) Oncomirs - micrornas with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**:259–269.
- Eulalio A., Helms S., Fritsch C., Fauser M. y Izaurralde E. (2009a) A c-terminal silencing domain in gw182 is essential for mirna function. *RNA*, **15**:1067–1077.
- Eulalio A., Huntzinger E. y Izaurralde E. (2008) Gw182 interaction with argonaute is essential for mirna-mediated translational repression and mrna decay. *Nat Struct Mol Biol*, **15**:346–353.
- Eulalio A., Huntzinger E., Nishihara T., Rehwinkel J., Fauser M. y Izaurralde E. (2009b) Deadenylation is a widespread effect of mirna regulation. *RNA*, **15**:21–32.
- Eulalio A., Rehwinkel J., Stricker M., Huntzinger E., Yang S.F., Doerks T., Dorner S., Bork P., Boutros M. y Izaurralde E. (2007) Target-specific requirements for enhancers of decapping in mirna-mediated gene silencing. *Genes Dev*, **21**:2558–2570.
- Eulalio A., Triteschler F. y Izaurralde E. (2009c) The gw182 protein family in animal cells: new insights into domains required for mirna-mediated gene silencing. *RNA*, **15**:1433–1442.
- Eystathioy T., Chan E.K.L., Tenenbaum S.A., Keene J.D., Griffith K. y Fritzier M.J. (2002) A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, gw182, associates with a unique population of human mrnas within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell*, **13**:1338–1351.
- Fabian M.R., Mathonnet G., Sundermeier T., Mathys H., Zipprich J.T., Svitkin Y.V., Rivas F., Jinek M., Wohlschlegel J., Doudna J.A., Chen C.Y.A., Shyu A.B., Yates J.R., Hannon G.J., Filipowicz W., Duchaine T.F. y Sonenberg N. (2009) Mammalian mirna risc recruits caf1 and pabp to affect pabp-dependent deadenylation. *Mol Cell*, **35**:868–880.
- Fabian M.R., Sonenberg N. y Filipowicz W. (2010) Regulation of mrna translation and stability by micrornas. *Annu Rev Biochem*, **79**:351–379.
- Farh K.K.H., Grimson A., Jan C., Lewis B.P., Johnston W.K., Lim L.P., Burge C.B. y Bartel D.P. (2005) The widespread impact of mammalian micrornas on mrna repression and evolution. *Science*, **310**:1817–1821.
- Fiedler S.D., Carletti M.Z., Hong X. y Christenson L.K. (2008) Hormonal regulation of microrna expression in periovulatory mouse mural granulosa cells. *Biol Reprod*, **79**:1030–1037.
- Filipowicz W., Bhattacharyya S.N. y Sonenberg N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by micrornas: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, **9**:102–114.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E. y Mello C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded rna in caenorhabditis elegans. *Nature*, **391**:806–811.
- Flynt A.S. y Lai E.C. (2008) Biological principles of microrna-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nat Rev Genet*, **9**:831–842.
- Ford C., Jones K., Polani P., De Almeida J. y Briggs J. (1959) A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet*, **1**:711–3.
- Forman J.J., Legesse-Miller A. y Collier H.A. (2008) A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7

Bibliografía

- microrna targets dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**:14879–14884.
- Foster J., Dominguez-Steglich M., Guioli S., Kowk G., Weller P., Stevanovic M., Weissenbach J., Mansour S., Young I., Goodfellow P. y et al. (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*, **372**:525–30.
- Foster J.W., Brennan F.E., Hampikian G.K., Goodfellow P.N., Sinclair A.H., Lovell-Badge R., Selwood L., Renfree M.B., Cooper D.W. y Graves J.A. (1992) Evolution of sex determination and the y chromosome: Sry-related sequences in marsupials. *Nature*, **359**:531–533.
- Frank F., Sonenberg N. y Nagar B. (2010) Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide rna by human ago2. *Nature*, **465**:818–822.
- Friedman R.C., Farh K.K.H., Burge C.B. y Bartel D.P. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, **19**:92–105.
- Fukuda T., Yamagata K., Fujiyama S., Matsumoto T., Koshida I., Yoshimura K., Mihara M., Naitou M., Endoh H., Nakamura T., Akimoto C., Yamamoto Y., Katagiri T., Foulds C., Takezawa S., Kitagawa H., Ichi Takeyama K., O'Malley B.W. y Kato S. (2007) Dead-box rna helicase subunits of the drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol*, **9**:604–611.
- Galgano A., Forrer M., Jaskiewicz L., Kanitz A., Zavolan M. y Gerber A.P. (2008) Comparative analysis of mRNA targets for human puf-family proteins suggests extensive interaction with the miRNA regulatory system. *PLoS One*, **3**:e3164.
- Gatfield D., Martelot G.L., Vejnar C.E., Gerlach D., Schaad O., Fleury-Olela F., Ruskeepää A.L., Oresic M., Esau C.C., Zdobnov E.M. y Schibler U. (2009) Integration of microRNA mir-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev*, **23**:1313–1326.
- Genini M., Schwalbe P., Scholl F.A., Remppis A., Mattei M.G. y Schäfer B.W. (1997) Subtractive cloning and characterization of dral, a novel lim-domain protein down-regulated in rhabdomyosarcoma. *DNA Cell Biol*, **16**:433–442.
- Gessler M., König A. y Bruns G. (1992) The genomic organization and expression of the WT1 gene. *Genomics*, **12**:807–13.
- Ghildiyal M., Xu J., Seitz H., Weng Z. y Zamore P.D. (2010) Sorting of drosophila small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway. *RNA*, **16**:43–56.
- Ghildiyal M. y Zamore P.D. (2009) Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet*, **10**:94–108.
- Gibbins D.J., Ciaudo C., Erhardt M. y Voinnet O. (2009) Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*, **11**:1143–1149.
- Gingras A.C., Raught B. y Sonenberg N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem*, **68**:913–963.
- Giraldez A.J., Cinalli R.M., Glasner M.E., Enright A.J., Thomson J.M., Baskerville S., Hammond S.M., Bartel D.P. y Schier A.F. (2005) MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science*, **308**:833–838.
- Giraldez A.J., Mishima Y., Rihel J., Grocock R.J., Dongen S.V., Inoue K., Enright A.J. y Schier A.F. (2006) Zebrafish mir-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*, **312**:75–79.
- Giuli G., Shen W. y Ingraham H. (1997) The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo. *Development*, **124**:1799–807.
- Gong Y., Eggert H. y Englert C. (2001) The murine Wilms tumor suppressor gene (wt1) locus. *Gene*, **279**:119–126.

Bibliografía

- Gonzalez G. y Behringer R.R. (2009) Dicer is required for female reproductive tract development and fertility in the mouse. *Mol Reprod Dev*, **76**:678–688.
- Gonzalez S., Pisano D.G. y Serrano M. (2008) Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by sirnas and mirnas. *Cell Cycle*, **7**:2601–2608.
- Gregory R.I., Yan K.P., Amuthan G., Chandrimada T., Doratotaj B., Cooch N. y Shiekhattar R. (2004) The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, **432**:235–240.
- Grimson A., Farh K.K.H., Johnston W.K., Garrett-Engle P., Lim L.P. y Bartel D.P. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, **27**:91–105.
- Grün D., Wang Y.L., Langenberger D., Gunsalus K.C. y Rajewsky N. (2005) microRNA target predictions across seven drosophila species and comparison to mammalian targets. *PLoS Comput Biol*, **1**:e13.
- Gu S., Jin L., Zhang F., Sarnow P. y Kay M.A. (2009) Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, **16**:144–150.
- Gu Z., Eleswarapu S. y Jiang H. (2007) Identification and characterization of microRNAs from the bovine adipose tissue and mammary gland. *FEBS Lett*, **581**:981–988.
- Gubbay J., Collignon J., Koopman P., Capel B., Economou A., Münsterberg A., Vivian N., Goodfellow P. y Lovell-Badge R. (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, **346**:245–250.
- Guo H., Ingolia N.T., Weissman J.S. y Bartel D.P. (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, **466**:835–840.
- Gwizdek C., Ossareh-Nazari B., Brownawell A.M., Doglio A., Bertrand E., Macara I.G. y Dargemont C. (2003) Exportin-5 mediates nuclear export of mini-helix-containing RNAs. *J Biol Chem*, **278**:5505–5508.
- Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R. y Aebersold R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, **19**:1720–1730.
- Habert R., Lejeune H. y Saez J. (2001) Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*, **179**:47–74.
- Hacker A., Capel B., Goodfellow P. y Lovell-Badge R. (1995) Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development*, **121**:1603–14.
- Hafner M., Landthaler M., Burger L., Khorshid M., Hausser J., Berninger P., Rothballer A., Ascano M., Jungkamp A.C., Munschauer M., Ulrich A., Wardle G.S., Dewell S., Zavolan M. y Tuschl T. (2010) Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by par-clip. *Cell*, **141**:129–141.
- Hagan J.P., Piskounova E. y Gregory R.I. (2009) Lin28 recruits the tRNA Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol*, **16**:1021–1025.
- Hager G.L., Fletcher T.M., Xiao N., Baumann C.T., Müller W.G. y McNally J.G. (2000) Dynamics of gene targeting and chromatin remodeling by nuclear receptors. *Biochem Soc Trans*, **28**:405–410.
- Hammell M., Long D., Zhang L., Lee A., Carmack C.S., Han M., Ding Y. y Ambros V. (2008) mirwip: microRNA target prediction based on microRNA-containing ribonucleoprotein-enriched transcripts. *Nat Methods*, **5**:813–819.
- Hammes A., Guo J., Lutsch G., Leheste J., Landrock D., Ziegler U., Gubler M. y Schedl A. (2001) Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell*, **106**:319–29.
- Han J., Lee Y., Yeom K.H., Nam J.W., Heo I., Rhee J.K., Sohn S.Y., Cho Y., Zhang B.T. y Kim V.N. (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, **125**:887–901.

- Han J., Pedersen J.S., Kwon S.C., Belair C.D., Kim Y.K., Yeom K.H., Yang W.Y., Haussler D., Belloch R. y Kim V.N. (2009) Posttranscriptional crossregulation between drosha and dgcr8. *Cell*, **136**:75–84.
- Hannon G.J. (2002) Rna interference. *Nature*, **418**:244–251.
- Harley V., Jackson D., Hextall P., Hawkins J., Berkovitz G., Sockanathan S., Lovell-Badge R. y Goodfellow P. (1992) DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science*, **255**:453–6.
- Harley V., Lovell-Badge R. y Goodfellow P. (1994) Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res*, **22**:1500–1.
- Harpavat S. y Cepko C.L. (2006) Rcas-rnai: a loss-of-function method for the developing chick retina. *BMC Dev Biol*, **6**:2.
- Hatano O., Takayama K., Imai T., Waterman M., Takakusu A., Omura T. y Morohashi K. (1994) Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. *Development*, **120**:2787–97.
- Hattori T., Müller C., Gebhard S., Bauer E., Pausch F., Schlund B., Bösl M.R., Hess A., Surmann-Schmitt C., von der Mark H., de Crombrughe B. y von der Mark K. (2010) Sox9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development*, **137**:901–911.
- Hawkins J., Taylor A., Berta P., Levilliers J., Van der Auwera B. y Goodfellow P. (1992) Mutational analysis of SRY: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Hum Genet*, **88**:471–4.
- Hayashi K., de Sousa Lopes S.M.C., Kaneda M., Tang F., Hajkova P., Lao K., O'Carroll D., Das P.P., Tarakhovskiy A., Miska E.A. y Surani M.A. (2008) MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS One*, **3**:e1738.
- He X., Semenov M., Tamai K. y Zeng X. (2004) Ldl receptor-related proteins 5 and 6 in wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*, **131**:1663–1677.
- Heale B.S.E., Keegan L.P., McGurk L., Michlewski G., Brindle J., Stanton C.M., Caceres J.F. y O'Connell M.A. (2009) Editing independent effects of adars on the mirna/sirna pathways. *EMBO J*, **28**:3145–3156.
- Heikinheimo M., Ermolaeva M., Bielinska M., Rahman N., Narita N., Huhtaniemi I., Tapanainen J. y Wilson D. (1997) Expression and hormonal regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in the mouse ovary. *Endocrinology*, **138**:3505–14.
- Hendrickson D.G., Hogan D.J., Herschlag D., Ferrell J.E. y Brown P.O. (2008) Systematic identification of mrnas recruited to argonaute 2 by specific micrnas and corresponding changes in transcript abundance. *PLoS One*, **3**:e2126.
- Hendrickson D.G., Hogan D.J., McCullough H.L., Myers J.W., Herschlag D., Ferrell J.E. y Brown P.O. (2009) Concordant regulation of translation and mrna abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biol*, **7**:e1000238.
- Heo I., Joo C., Cho J., Ha M., Han J. y Kim V.N. (2008) Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor microRNA. *Mol Cell*, **32**:276–284.
- Heo I., Joo C., Kim Y.K., Ha M., Yoon M.J., Cho J., Yeom K.H., Han J. y Kim V.N. (2009) Tut4 in concert with lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell*, **138**:696–708.
- Hilbert M., Karow A.R. y Klostermeier D. (2009) The mechanism of atp-dependent rna unwinding by dead box proteins. *Biol Chem*, **390**:1237–1250.
- Hill D.A., Ivanovich J., Priest J.R., Gunnnett C.A., Dehner L.P., Desruisseau D., Jarzembowski J.A., Wikenheiser-Brokamp K.A., Suarez B.K., Whelan A.J., Williams G., Bracamontes D., Messinger

Bibliografía

- Y. y Goodfellow P.J. (2009) Dicer1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma. *Science*, **325**:965.
- Hiramatsu R., Matoba S., Kanai-Azuma M., Tsunekawa N., Katoh-Fukui Y., Kurohmaru M., Morohashi K.I., Wilhelm D., Koopman P. y Kanai Y. (2009) A critical time window of sry action in gonadal sex determination in mice. *Development*, **136**:129–138.
- Hong X., Hammell M., Ambros V. y Cohen S.M. (2009) Immunopurification of ago1 mirnps selects for a distinct class of microRNA targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**:15085–15090.
- Hong X., Luense L.J., McGinnis L.K., Nothnick W.B. y Christenson L.K. (2008) Dicer1 is essential for female fertility and normal development of the female reproductive system. *Endocrinology*, **149**:6207–6212.
- Hornstein E., Mansfield J.H., Yekta S., Hu J.K.H., Harfe B.D., McManus M.T., Baskerville S., Bartel D.P. y Tabin C.J. (2005) The microRNA mir-196 acts upstream of hoxb8 and shh in limb development. *Nature*, **438**:671–674.
- Houbaviy H.B., Murray M.F. y Sharp P.A. (2003) Embryonic stem cell-specific microRNAs. *Dev Cell*, **5**:351–358.
- Houston C., Opitz J., Spranger J., Macpherson R., Reed M., Gilbert E., Herrmann J. y Schinzel A. (1983) The campomelic syndrome: review, report of 17 cases, and follow-up on the currently 17-year-old boy first reported by Maroteaux et al in 1971. *Am J Med Genet*, **15**:3–28.
- Houwing S., Kamminga L.M., Berezikov E., Cronembold D., Girard A., van den Elst H., Philippov D.V., Blaser H., Raz E., Moens C.B., Plasterk R.H.A., Hannon G.J., Draper B.W. y Ketting R.F. (2007) A role for piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in zebrafish. *Cell*, **129**:69–82.
- Hu S.J., Ren G., Liu J.L., Zhao Z.A., Yu Y.S., Su R.W., Ma X.H., Ni H., Lei W. y Yang Z.M. (2008) MicroRNA expression and regulation in mouse uterus during embryo implantation. *J Biol Chem*, **283**:23473–23484.
- Huang B., Wang S., Ning Y., Lamb A.N. y Bartley J. (1999) Autosomal xx sex reversal caused by duplication of sox9. *Am J Med Genet*, **87**:349–353.
- Humphreys D.T., Westman B.J., Martin D.I.K. y Preiss T. (2005) MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4e/cap and poly(a) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**:16961–16966.
- Huntzinger E., Braun J.E., Heimstädt S., Zekri L. y Izaurralde E. (2010) Two pabpc1-binding sites in gw182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing. *EMBO J*, **29**:4146–4160.
- Huntzinger E. y Izaurralde E. (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*, **12**:99–110.
- Hutvagner G. y Simard M.J. (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**:22–32.
- Hwang H.W., Wentzel E.A. y Mendell J.T. (2007) A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science*, **315**:97–100.
- Ideker T., Thorsson V., Ranish J.A., Christman R., Buhler J., Eng J.K., Bumgarner R., Goodlett D.R., Aebersold R. y Hood L. (2001) Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science*, **292**:929–934.
- Ikeda Y., Shen W., Ingraham H. y Parker K. (1994) Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol*, **8**:654–662.
- Ikeda Y., Takeda Y., Shikayama T., Mukai T., Hisano S. y Morohashi K. (2001) Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. *Dev Dyn*, **220**:363–76.

- Iki T., Yoshikawa M., Nishikiori M., Jaudal M.C., Matsumoto-Yokoyama E., Mituhara I., Meshi T. y Ishikawa M. (2010) In vitro assembly of plant rna-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone hsp90. *Mol Cell*, **39**:282–291.
- Isotani A., Nakanishi T., Kobayashi S., Lee J., Chuma S., Nakatsuji N., Ishino F. y Okabe M. (2005) Genomic imprinting of xx spermatogonia and xx oocytes recovered from xx<->xy chimeric testes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**:4039–4044.
- Iwasaki S., Kawamata T. y Tomari Y. (2009) Drosophila argonaute1 and argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression. *Mol Cell*, **34**:58–67.
- Iwasaki S., Kobayashi M., Yoda M., Sakaguchi Y., Katsuma S., Suzuki T. y Tomari Y. (2010) Hsc70/hsp90 chaperone machinery mediates atp-dependent risc loading of small rna duplexes. *Mol Cell*, **39**:292–299.
- Jackson A.L., Bartz S.R., Schelter J., Kobayashi S.V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G. y Linsley P.S. (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by rna. *Nat Biotechnol*, **21**:635–637.
- Jackson R.J., Hellen C.U.T. y Pestova T.V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**:113–127.
- Jackson R.J. y Standart N. (2007) How do micrnas regulate gene expression? *Sci STKE*, **2007**:re1.
- Jacobs P. y Strong J. (1959) A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature*, **183**:302–3.
- Jager R., Anvret M., Hall K. y Scherer G. (1990) A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature*, **348**:452–4.
- Jakymiw A., Lian S., Eystathioy T., Li S., Satoh M., Hamel J.C., Fritzler M.J. y Chan E.K.L. (2005) Disruption of gw bodies impairs mammalian rna interference. *Nat Cell Biol*, **7**:1267–1274.
- Jeays-Ward K., Hoyle C., Brennan J., Dandonneau M., Alldus G., Capel B. y Swain A. (2003) Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development*, **130**:3663–70.
- Jenuwein T. y Allis C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**:1074–1080.
- Ji Z., Lee J.Y., Pan Z., Jiang B. y Tian B. (2009) Progressive lengthening of 3' untranslated regions of mrnas by alternative polyadenylation during mouse embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**:7028–7033.
- Jiménez R., Barrionuevo F. y Burgos M. (2000) A procedure for preparing amniotic cells for sexing embryos. *Trends in Genetics on line. Technical Tips on line* (<http://research.bmn.com/tto/T02062>).
- Jiménez R. (2009) Ovarian organogenesis in mammals: mice cannot tell us everything. *Sex Dev*, **3**:291–301.
- Jinek M., Fabian M.R., Coyle S.M., Sonenberg N. y Doudna J.A. (2010) Structural insights into the human gw182-pabc interaction in microrna-mediated deadenylation. *Nat Struct Mol Biol*, **17**:238–240.
- John B., Enright A.J., Aravin A., Tuschl T., Sander C. y Marks D.S. (2004) Human microrna targets. *PLoS Biol*, **2**:e363.
- Johnson C.D., Esquela-Kerscher A., Stefani G., Byrom M., Kelnar K., Ovcharenko D., Wilson M., Wang X., Shelton J., Shingara J., Chin L., Brown D. y Slack F.J. (2007) The let-7 microrna represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res*, **67**:7713–7722.
- Johnson S.M., Grosshans H., Shingara J., Byrom M., Jarvis R., Cheng A., Labourier E., Reinert K.L., Brown D. y Slack F.J. (2005) Ras is regulated by the let-7 microrna family. *Cell*, **120**:635–647.
- Johnston M., Geoffroy M.C., Sobala A., Hay R. y Hutvagner G. (2010) Hsp90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes

Bibliografía

- and microscopic p-bodies in human cells. *Mol Biol Cell*, **21**:1462–1469.
- Jones M.R., Quinton L.J., Blahna M.T., Neilson J.R., Fu S., Ivanov A.R., Wolf D.A. y Mizgerd J.P. (2009) Zcchc11-dependent uridylation of microRNA directs cytokine expression. *Nat Cell Biol*, **11**:1157–1163.
- Jordan B., Shen J., Olaso R., Ingraham H. y Vilain E. (2003) Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/beta-catenin synergy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**:10866–71.
- Jost A. (1953) Problems of fetal endocrinology: the gonadal and the hypophyseal hormones. *Recent Prog Horm Res*, **8**:379–418.
- Judson R.L., Babiarz J.E., Venere M. y Billech R. (2009) Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol*, **27**:459–461.
- Kahl P., Gullotti L., Heukamp L.C., Wolf S., Friedrichs N., Vorreuther R., Solleder G., Bastian P.J., Ellinger J., Metzger E., Schüle R. y Buettner R. (2006) Androgen receptor coactivators lysine-specific histone demethylase 1 and four and a half lim domain protein 2 predict risk of prostate cancer recurrence. *Cancer Res*, **66**:11341–11347.
- Kaivo-oja N., Jeffery L.A., Ritvos O. y Mottershead D.G. (2006) Smad signalling in the ovary. *Reprod Biol Endocrinol*, **4**:21.
- Kaletta T. y Hengartner M.O. (2006) Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov*, **5**:387–398.
- Kallio P.J., Poukka H., Moilanen A., Jänne O.A. y Palvimo J.J. (1995) Androgen receptor-mediated transcriptional regulation in the absence of direct interaction with a specific DNA element. *Mol Endocrinol*, **9**:1017–1028.
- Kamata T., Ichi Katsube K., Michikawa M., Yamada M., Takada S. y Mizusawa H. (2004) R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in wnt mutants. *Biochim Biophys Acta*, **1676**:51–62.
- Kanellopoulou C., Muljo S.A., Kung A.L., Ganesan S., Drapkin R., Jenuwein T., Livingston D.M. y Rajewsky K. (2005) Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev*, **19**:489–501.
- Karginov F.V., Conaco C., Xuan Z., Schmidt B.H., Parker J.S., Mandel G. y Hannon G.J. (2007) A biochemical approach to identifying microRNA targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**:19291–19296.
- Karube Y., Tanaka H., Osada H., Tomida S., Tatematsu Y., Yanagisawa K., Yatabe Y., Takamizawa J., Miyoshi S., Mitsudomi T. y Takahashi T. (2005) Reduced expression of dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*, **96**:111–115.
- Kato M. y Slack F.J. (2008) microRNAs: small molecules with big roles - *C. elegans* to human cancer. *Biol Cell*, **100**:71–81.
- Katoh T., Sakaguchi Y., Miyauchi K., Suzuki T., Kashiwabara S.I., Baba T. y Suzuki T. (2009) Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase gld-2. *Genes Dev*, **23**:433–438.
- Kawahara Y., Megraw M., Kreider E., Iizasa H., Valente L., Hatzigeorgiou A.G. y Nishikura K. (2008) Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic Acids Res*, **36**:5270–5280.
- Kawahara Y., Zinshteyn B., Sethupathy P., Iizasa H., Hatzigeorgiou A.G. y Nishikura K. (2007) Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science*, **315**:1137–1140.
- Kawakami Y., Rodríguez-León J. y Belmonte J.C.I. (2006) The role of *tgfbetas* and *sox9* during limb chondrogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, **18**:723–729.
- Kazanskaya O., Glinka A., del Barco Barantes I., Stannek P., Niehrs C. y Wu W. (2004) R-spondin2 is a secreted activator of wnt/beta-catenin signaling and is required for *xenopus* myogenesis. *Dev Cell*, **7**:525–534.

- Kedde M., Strasser M.J., Boldajipour B., Vrieling J.A.F.O., Slanchev K., le Sage C., Nagel R., Voorhoeve P.M., van Duijse J., Ørom U.A., Lund A.H., Perrakis A., Raz E. y Agami R. (2007) Rna-binding protein dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell*, **131**:1273–1286.
- Kent J., Wheatley S., Andrews J., Sinclair A. y Koopman P. (1996a) A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*, **122**:2813–22.
- Kent J., Wheatley S.C., Andrews J.E., Sinclair A.H. y Koopman P. (1996b) A male-specific role for sox9 in vertebrate sex determination. *Development*, **122**:2813–2822.
- Kertesz M., Iovino N., Unnerstall U., Gaul U. y Segal E. (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet*, **39**:1278–1284.
- Ketola I., Rahman N., Toppari J., Bielinska M., Porter-Tinge S., Tapanainen J., Huh-taniemi I., Wilson D. y Heikinheimo M. (1999) Expression and regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in developing mouse testis. *Endocrinology*, **140**:1470–80.
- Khan A.A., Betel D., Miller M.L., Sander C., Leslie C.S. y Marks D.S. (2009) Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol*, **27**:549–555.
- Khraiwesh B., Arif M.A., Seumel G.I., Osowski S., Weigel D., Reski R. y Frank W. (2010) Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell*, **140**:111–122.
- Kim D.H., Saetrom P., Snøve O. y Rossi J.J. (2008) MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**:16230–16235.
- Kim G.J., Georg I., Scherthan H., Merken-schlager M., Guillou F., Scherer G. y Bar-ionuevo F. (2010) Dicer is required for sertoli cell function and survival. *Int J Dev Biol*, **54**:867–875.
- Kim H.H., Kuwano Y., Srikantan S., Lee E.K., Martindale J.L. y Gorospe M. (2009) Hur recruits let-7/miR to repress c-myc expression. *Genes Dev*, **23**:1743–1748.
- Kim J., Inoue K., Ishii J., Vanti W.B., Voronov S.V., Murchison E., Hannon G. y Abeliovich A. (2007) A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science*, **317**:1220–1224.
- Kim Y., Kobayashi A., Sekido R., DiNapoli L., Brennan J., Chaboissier M., Poulat F., Behringer R., Lovell-Badge R. y Capel B. (2006a) Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol*, **4**:e187.
- Kim Y., Kobayashi A., Sekido R., DiNapoli L., Brennan J., Chaboissier M.C., Poulat F., Behringer R.R., Lovell-Badge R. y Capel B. (2006b) Fgf9 and wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol*, **4**:e187.
- Kocerha J., Faghihi M.A., Lopez-Toledano M.A., Huang J., Ramsey A.J., Caron M.G., Sales N., Willoughby D., Elmen J., Hansen H.F., Orum H., Kauppinen S., Kenny P.J. y Wahlestedt C. (2009) MicroRNA-219 modulates nmda receptor-mediated neurobehavioral dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**:3507–3512.
- Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P. y Lovell-Badge R. (1991a) Male development of chromosomally female mice transgenic for sry. *Nature*, **351**:117–121.
- Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P. y Lovell-Badge R. (1991b) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, **351**:117–21.
- Koopman P., Münsterberg A., Capel B., Vivian N. y Lovell-Badge R. (1990) Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, **348**:450–452.
- Kovalchuk O., Filkowski J., Meservy J., Il-nytskyy Y., Tryndyak V.P., Chekhun V.F. y Pogribny I.P. (2008) Involvement of microRNA-451 in resistance of the mcf-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. *Mol Cancer Ther*, **7**:2152–2159.
- Kozlov G., Safaei N., Rosenauer A. y Gehring K. (2010) Structural basis of binding of p-body-associated proteins gw182 and ataxin-2 by the m1le domain

Bibliografía

- of poly(a)-binding protein. *J Biol Chem*, **285**:13599–13606.
- Krek A., Grün D., Poy M.N., Wolf R., Rosenberg L., Epstein E.J., MacMenamin P., da Piedade I., Gunsalus K.C., Stoffel M. y Rajewsky N. (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*, **37**:495–500.
- Krol J., Busskamp V., Markiewicz I., Stadler M.B., Ribi S., Richter J., Duebel J., Bicker S., Fehling H.J., Schübeler D., Oertner T.G., Schrott G., Bibel M., Roska B. y Filipowicz W. (2010a) Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. *Cell*, **141**:618–631.
- Krol J., Loedige I. y Filipowicz W. (2010b) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, **11**:597–610.
- Krol J., Sobczak K., Wilczynska U., Drath M., Jasinska A., Kaczynska D. y Krzyzosiak W.J. (2004) Structural features of microRNA (mirna) precursors and their relevance to mirna biogenesis and small interfering rna/short hairpin rna design. *J Biol Chem*, **279**:42230–42239.
- Krützfeldt J., Rajewsky N., Braich R., Rajeev K.G., Tuschl T., Manoharan M. y Stoffel M. (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*, **438**:685–689.
- Kumar M.S., Lu J., Mercer K.L., Golub T.R. y Jacks T. (2007) Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet*, **39**:673–677.
- Kumar M.S., Pester R.E., Chen C.Y., Lane K., Chin C., Lu J., Kirsch D.G., Golub T.R. y Jacks T. (2009) Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes Dev*, **23**:2700–2704.
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Meyer J., Borkhardt A. y Tuschl T. (2003) New microRNAs from mouse and human. *RNA*, **9**:175–179.
- Lal A., Kim H.H., Abdelmohsen K., Kuwano Y., Pullmann R., Srikantan S., Subrahmanyam R., Martindale J.L., Yang X., Ahmed F., Navarro F., Dykxhoorn D., Lieberman J. y Gorospe M. (2008) p16(ink4a) translation suppressed by mir-24. *PLoS One*, **3**:e1864.
- Lal A., Navarro F., Maher C.A., Maliszewski L.E., Yan N., O'Day E., Chowdhury D., Dykxhoorn D.M., Tsai P., Hofmann O., Becker K.G., Gorospe M., Hide W. y Lieberman J. (2009) mir-24 inhibits cell proliferation by targeting e2f2, myc, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'utr microRNA recognition elements. *Mol Cell*, **35**:610–625.
- Landgraf P., Rusu M., Sheridan R., Sewer A., Iovino N., Aravin A., Pfeffer S., Rice A., Kamphorst A.O., Landthaler M., Lin C., Socci N.D., Hermida L., Fulci V., Chiaretti S., Foà R., Schliwka J., Fuchs U., Novosel A., Müller R.U., Schermer B., Bissels U., Inman J., Phan Q., Chien M., Weir D.B., Choksi R., Vita G.D., Frezzetti D., Trompeter H.I., Hornung V., Teng G., Hartmann G., Palkovits M., Lauro R.D., Wernet P., Macino G., Rogler C.E., Nagle J.W., Ju J., Papavasiliou F.N., Benzing T., Lichter P., Tam W., Brownstein M.J., Bosio A., Borkhardt A., Russo J.J., Sander C., Zavolan M. y Tuschl T. (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small rna library sequencing. *Cell*, **129**:1401–1414.
- Landthaler M., Gaidatzis D., Rothballer A., Chen P.Y., Soll S.J., Dinic L., Ojo T., Hafner M., Zavolan M. y Tuschl T. (2008) Molecular characterization of human argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs. *RNA*, **14**:2580–2596.
- Lazzaretti D., Tournier I. y Izaurralde E. (2009) The c-terminal domains of human tncr6a, tncr6b, and tncr6c silence bound transcripts independently of argonaute proteins. *RNA*, **15**:1059–1066.
- Lee R.C., Feinbaum R.L. y Ambros V. (1993) The *c. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**:843–854.
- Lee S.K. y Kumar P. (2009) Conditional RNAi: towards a silent gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, **61**:650–664.

Bibliografía

- Lee Y.S., Pressman S., Andress A.P., Kim K., White J.L., Cassidy J.J., Li X., Lubell K., Lim D.H., Cho I.S., Nakahara K., Preall J.B., Bellare P., Sontheimer E.J. y Carthew R.W. (2009) Silencing by small rnas is linked to endosomal trafficking. *Nat Cell Biol*, **11**:1150–1156.
- Lehrbach N.J., Armisen J., Lightfoot H.L., Murfitt K.J., Bugaut A., Balasubramanian S. y Miska E.A. (2009) Lin-28 and the poly(u) polymerase pup-2 regulate let-7 microrna processing in caenorhabditis elegans. *Nat Struct Mol Biol*, **16**:1016–1020.
- Lei N. y Heckert L. (2004) Gata4 regulates testis expression of Dmrt1. *Mol Cell Biol*, **24**:377–88.
- Lewis B.P., Burge C.B. y Bartel D.P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microrna targets. *Cell*, **120**:15–20.
- Lewis B.P., Hung Shih I., Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P. y Burge C.B. (2003) Prediction of mammalian microrna targets. *Cell*, **115**:787–798.
- Li J., Yang Z., Yu B., Liu J. y Chen X. (2005) Methylation protects mirnas and sirnas from a 3'-end uridylation activity in arabidopsis. *Curr Biol*, **15**:1501–1507.
- Li M. y Rohrer B. (2006) Gene silencing in xenopus laevis by dna vector-based rna interference and transgenesis. *Cell Res*, **16**:99–105.
- Li S., Lian S.L., Moser J.J., Fritzler M.L., Fritzler M.J., Satoh M. y Chan E.K.L. (2008) Identification of gw182 and its novel isoform tngw1 as translational repressors in ago2-mediated silencing. *J Cell Sci*, **121**:4134–4144.
- Lian S.L., Li S., Abadal G.X., Pauley B.A., Fritzler M.J. y Chan E.K.L. (2009) The c-terminal half of human ago2 binds to multiple gw-rich regions of gw182 and requires gw182 to mediate silencing. *RNA*, **15**:804–813.
- Lim L.P., Lau N.C., Garrett-Engele P., Grimson A., Schelter J.M., Castle J., Bartel D.P., Linsley P.S. y Johnson J.M. (2005) Microarray analysis shows that some micrornas downregulate large numbers of target mrnas. *Nature*, **433**:769–773.
- Lin S.Y., Johnson S.M., Abraham M., Vella M.C., Pasquinelli A., Gamberi C., Gottlieb E. y Slack F.J. (2003) The c elegans hunchback homolog, hbl-1, controls temporal patterning and is a probable microrna target. *Dev Cell*, **4**:639–650.
- Linsley P.S., Schelter J., Burchard J., Kibukawa M., Martin M.M., Bartz S.R., Johnson J.M., Cummins J.M., Raymond C.K., Dai H., Chau N., Cleary M., Jackson A.L., Carleton M. y Lim L. (2007) Transcripts targeted by the microrna-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol Cell Biol*, **27**:2240–2252.
- Liu C.G., Calin G.A., Meloon B., Gamlie N., Sevignani C., Ferracin M., Dumitru C.D., Shimizu M., Zupo S., Dono M., Alder H., Bullrich F., Negrini M. y Croce C.M. (2004) An oligonucleotide microchip for genome-wide microrna profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**:9740–9744.
- Liu J., Rivas F.V., Wohlschlegel J., Yates J.R., Parker R. y Hannon G.J. (2005) A role for the p-body component gw182 in microrna function. *Nat Cell Biol*, **7**:1261–1266.
- Llave C., Xie Z., Kasschau K.D. y Carrington J.C. (2002) Cleavage of scarecrow-like mirna targets directed by a class of arabidopsis mirna. *Science*, **297**:2053–2056.
- Lu J., Getz G., Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert B.L., Mak R.H., Ferrando A.A., Downing J.R., Jacks T., Horvitz H.R. y Golub T.R. (2005) Microrna expression profiles classify human cancers. *Nature*, **435**:834–838.
- Ludbrook L. y Harley V. (2004) Sex determination: a 'window' of DAX1 activity. *Trends Endocrinol Metab*, **15**:116–21.
- Lugli G., Larson J., Martone M.E., Jones Y. y Smalheiser N.R. (2005) Dicer and eif2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *J Neurochem*, **94**:896–905.

Bibliografía

- Lund E., Güttinger S., Calado A., Dahlberg J.E. y Kutay U. (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, **303**:95–98.
- Luo X., Ikeda Y. y Parker K. (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, **77**:481–90.
- Lykke-Andersen K., Gilchrist M.J., Grabarek J.B., Das P., Miska E. y Zernicka-Goetz M. (2008) Maternal argonaute 2 is essential for early mouse development at the maternal-zygotic transition. *Mol Biol Cell*, **19**:4383–4392.
- Lynch J.A. y Desplan C. (2006) A method for parental rna interference in the wasp *nasonia vitripennis*. *Nat Protoc*, **1**:486–494.
- Ma E., MacRae I.J., Kirsch J.F. y Doudna J.A. (2008) Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain. *J Mol Biol*, **380**:237–243.
- Maatouk D.M., DiNapoli L., Alvers A., Parker K.L., Taketo M.M. y Capel B. (2008) Stabilization of beta-catenin in xy gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet*, **17**:2949–2955.
- Malki S., Berta P., Poulat F. y Boizet-Bonhoure B. (2005) Cytoplasmic retention of the sex-determining factor SOX9 via the microtubule network. *Exp Cell Res*, **309**:468–75.
- Mangelsdorf D., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P. y Evans R. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, **83**:835–9.
- Maniataki E. y Mourelatos Z. (2005) Human mitochondrial trnamet is exported to the cytoplasm and associates with the argonaute 2 protein. *RNA*, **11**:849–852.
- Mansfield K.D. y Keene J.D. (2009) The ribonome: a dominant force in co-ordinating gene expression. *Biol Cell*, **101**:169–181.
- Mansour S., Hall C., Pembrey M. y Young I. (1995) A clinical and genetic study of campomelic dysplasia. *J Med Genet*, **32**:415–20.
- Mansour S., Offiah A., McDowall S., Sim P., Tolmie J. y Hall C. (2002) The phenotype of survivors of campomelic dysplasia. *J Med Genet*, **39**:597–602.
- Manuylov N.L., Smagulova F.O., Leach L. y Tevosian S.G. (2008) Ovarian development in mice requires the gata4-fog2 transcription complex. *Development*, **135**:3731–3743.
- Manuylov N.L., Smagulova F.O. y Tevosian S.G. (2007) Fog2 excision in mice leads to premature mammary gland involution and reduced *esr1* gene expression. *Oncogene*, **26**:5204–5213.
- Marcon E., Babak T., Chua G., Hughes T. y Moens P.B. (2008) mirna and pirna localization in the male mammalian meiotic nucleus. *Chromosome Res*, **16**:243–260.
- Maroney P.A., Yu Y., Fisher J. y Nilsen T.W. (2006) Evidence that microRNAs are associated with translating messenger rnas in human cells. *Nat Struct Mol Biol*, **13**:1102–1107.
- Marsh E.E., Lin Z., Yin P., Milad M., Chakravarti D. y Bulun S.E. (2008) Differential expression of microRNA species in human uterine leiomyoma versus normal myometrium. *Fertil Steril*, **89**:1771–1776.
- Marton S., Garcia M.R., Robello C., Persson H., Trajtenberg F., Pritsch O., Rovira C., Naya H., Dighiero G. y Cayota A. (2008) Small rnas analysis in cll reveals a deregulation of mirna expression and novel mirna candidates of putative relevance in cll pathogenesis. *Leukemia*, **22**:330–338.
- Mathonnet G., Fabian M.R., Svitkin Y.V., Parsyan A., Huck L., Murata T., Biffo S., Merrick W.C., Darzynkiewicz E., Pillai R.S., Filipowicz W., Duchaine T.F. y Sonenberg N. (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eif4f. *Science*, **317**:1764–1767.
- Matranga C., Tomari Y., Shin C., Bartel D.P. y Zamore P.D. (2005) Passenger-strand cleavage facilitates assembly of sirna into ago2-containing rnai enzyme complexes. *Cell*, **123**:607–620.

Bibliografía

- Matthews J.C., Hori K. y Cormier M.J. (1977) Purification and properties of renilla reniformis luciferase. *Biochemistry*, **16**:85–91.
- Matzuk M.M., Lu N., Vogel H., Sellheyer K., Roop D.R. y Bradley A. (1995) Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature*, **374**:360–363.
- Mavrakis K.J., Wolfe A.L., Oricchio E., Palomero T., de Keersmaecker K., McJunkin K., Zuber J., James T., Khan A.A., Leslie C.S., Parker J.S., Paddison P.J., Tam W., Ferrando A. y Wendel H.G. (2010) Genome-wide rna-mediated interference screen identifies mir-19 targets in notch-induced t-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Cell Biol*, **12**:372–379.
- Mayr C. y Bartel D.P. (2009) Widespread shortening of 3'utrs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell*, **138**:673–684.
- Mayr C., Hemann M.T. y Bartel D.P. (2007) Disrupting the pairing between let-7 and hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science*, **315**:1576–1579.
- McFarlane L. y Wilhelm D. (2009) Non-coding rnas in mammalian sexual development. *Sex Dev*, **3**:302–316.
- McLaren A. (2003) Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol*, **262**:1–15.
- Meister G., Landthaler M., Patkaniowska A., Dorsett Y., Teng G. y Tuschl T. (2004) Human argonaute2 mediates rna cleavage targeted by mirnas and sirnas. *Mol Cell*, **15**:185–197.
- Meister G., Landthaler M., Peters L., Chen P.Y., Urlaub H., Lührmann R. y Tuschl T. (2005) Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol*, **15**:2149–2155.
- Melo S.A., Roper S., Moutinho C., Aaltonen L.A., Yamamoto H., Calin G.A., Rossi S., Fernandez A.F., Carneiro F., Oliveira C., Ferreira B., Liu C.G., Villanueva A., Capella G., Schwartz S., Shiekhatar R. y Esteller M. (2009) A tarbp2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and dicer1 function. *Nat Genet*, **41**:365–370.
- Meng F., Henson R., Wehbe-Janek H., Smith H., Ueno Y. y Patel T. (2007) The microRNA let-7a modulates interleukin-6-dependent stat-3 survival signaling in malignant human cholangiocytes. *J Biol Chem*, **282**:8256–8264.
- Menke D. y Page D. (2002) Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad. *Gene Expr Patterns*, **2**:359–67.
- Merchant-Larios H. (1976) The onset of testicular differentiation in the rat: An ultrastructural study. *Am J Anat*, **145**:319–329.
- Merchant-Larios H., Moreno-Mendoza N. y Buehr M. (1993) The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol*, **37**:407–15.
- Merchant-Larios H. y Taketo T. (1991a) Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *J Electron Microsc Tech*, **19**:158–71.
- Merchant-Larios H. y Taketo T. (1991b) Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *J Electron Microsc Tech*, **19**:158–171.
- Merritt W.M., Lin Y.G., Han L.Y., Kamat A.A., Spannuth W.A., Schmandt R., Urbauer D., Pennacchio L.A., Cheng J.F., Nick A.M., Deavers M.T., Mourad-Zeidan A., Wang H., Mueller P., Lenburg M.E., Gray J.W., Mok S., Birrer M.J., Lopez-Berestein G., Coleman R.L., Bar-Eli M. y Sood A.K. (2008) Dicer, drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med*, **359**:2641–2650.
- Michael M.Z., Connor S.M.O., van Holst Pellekaan N.G., Young G.P. y James R.J. (2003) Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*, **1**:882–891.
- Michlewski G., Guil S., Semple C.A. y Cáceres J.F. (2008) Posttranscriptional regulation of mirnas harboring conserved terminal loops. *Mol Cell*, **32**:383–393.

Bibliografía

- Miller T.E., Ghoshal K., Ramaswamy B., Roy S., Datta J., Shapiro C.L., Jacob S. y Majumder S. (2008) MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27kip1. *J Biol Chem*, **283**:29897–29903.
- Miranda K.C., Huynh T., Tay Y., Ang Y.S., Tam W.L., Thomson A.M., Lim B. y Rigoutsos I. (2006) A pattern-based method for the identification of microRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell*, **126**:1203–1217.
- Mishima T., Takizawa T., Luo S.S., Ishibashi O., Kawahigashi Y., Mizuguchi Y., Ishikawa T., Mori M., Kanda T., Goto T. y Takizawa T. (2008) MicroRNA (mirna) cloning analysis reveals sex differences in mirna expression profiles between adult mouse testis and ovary. *Reproduction*, **136**:811–822.
- Mishima Y., Giraldez A.J., Takeda Y., Fujiwara T., Sakamoto H., Schier A.F. y Inoue K. (2006) Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish mir-430. *Curr Biol*, **16**:2135–2142.
- Mitchell P. y Tollervey D. (2000) mRNA stability in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev*, **10**:193–198.
- Miyoshi K., Tsukumo H., Nagami T., Siomi H. y Siomi M.C. (2005) Slicer function of *Drosophila* argonautes and its involvement in rISC formation. *Genes Dev*, **19**:2837–2848.
- Mohn F. y Schübeler D. (2009) Genetics and epigenetics: stability and plasticity during cellular differentiation. *Trends Genet*, **25**:129–136.
- Molnár A., Schwach F., Studholme D.J., Thuenemann E.C. y Baulcombe D.C. (2007) miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature*, **447**:1126–1129.
- Montenegro D., Romero R., Pineles B.L., Tarca A.L., Kim Y.M., Draghici S., Kusanovic J.P., Kim J.S., Erez O., Mazaki-Tovi S., Hassan S., Espinoza J. y Kim C.J. (2007) Differential expression of microRNAs with progression of gestation and inflammation in the human chorioamniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol*, **197**:289.e1–289.e6.
- Moore M.J. (2005) From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science*, **309**:1514–1518.
- Morgan M.J. y Madgwick A.J. (1996) Slim defines a novel family of LIM-proteins expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, **225**:632–638.
- Mu P., Han Y.C., Betel D., Yao E., Squatrito M., Ogradowski P., de Stanchina E., D'Andrea A., Sander C. y Ventura A. (2009) Genetic dissection of the mir-17-92 cluster of microRNAs in myc-induced B-cell lymphomas. *Genes Dev*, **23**:2806–2811.
- Munsterberg A. y Lovell-Badge R. (1991) Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development*, **113**:613–24.
- Murchison E.P., Partridge J.F., Tam O.H., Cheloufi S. y Hannon G.J. (2005) Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**:12135–12140.
- Murchison E.P., Stein P., Xuan Z., Pan H., Zhang M.Q., Schultz R.M. y Hannon G.J. (2007) Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev*, **21**:682–693.
- Nachtigal M., Hirokawa Y., Enyeart-VanHouten D., Flanagan J., Hammer G. y Ingraham H. (1998) Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell*, **93**:445–54.
- Nagaraja A.K., Andreu-Vieyra C., Franco H.L., Ma L., Chen R., Han D.Y., Zhu H., Agno J.E., Gunaratne P.H., DeMayo F.J. y Matzuk M.M. (2008) Deletion of Dicer in somatic cells of the female reproductive tract causes sterility. *Mol Endocrinol*, **22**:2336–2352.
- Nagy A., Perrimon N., Sandmeyer S. y Plasterk R. (2003) Tailoring the genome: the power of genetic approaches. *Nat Genet*, **33 Suppl**:276–284.

- Nakagawa A., Shi Y., Kage-Nakadai E., Mitani S. y Xue D. (2010) Caspase-dependent conversion of dicer ribonuclease into a death-promoting deoxyribonuclease. *Science*, **328**:327–334.
- Nakano H., Amemiya S., Shiokawa K. y Taira M. (2000) Rna interference for the organizer-specific gene *xlim-1* in xenopus embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, **274**:434–439.
- Nakielnny S. y Dreyfuss G. (1999) Transport of proteins and rnas in and out of the nucleus. *Cell*, **99**:677–690.
- Narlikar G.J., Fan H.Y. y Kingston R.E. (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, **108**:475–487.
- Navarro F., Gutman D., Meire E., Cáceres M., Rigoutsos I., Bentwich Z. y Lieberman J. (2009) mir-34a contributes to megakaryocytic differentiation of k562 cells independently of p53. *Blood*, **114**:2181–2192.
- Nilsen T.W. (2007) Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet*, **23**:243–249.
- Nolde M.J., Saka N., Reinert K.L. y Slack F.J. (2007) The caenorhabditis elegans pumilio homolog, puf-9, is required for the 3'utr-mediated repression of the let-7 microRNA target gene, hbl-1. *Dev Biol*, **305**:551–563.
- Nolo R., Morrison C.M., Tao C., Zhang X. y Halder G. (2006) The bantam microRNA is a target of the hippo tumor-suppressor pathway. *Curr Biol*, **16**:1895–1904.
- Nottrott S., Simard M.J. y Richter J.D. (2006) Human let-7a mirna blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol*, **13**:1108–1114.
- Nusse R. (2003) Wnts and hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development*, **130**:5297–5305.
- O'Bryan M.K., Takada S., Kennedy C.L., Scott G., ichi Harada S., Ray M.K., Dai Q., Wilhelm D., de Kretser D.M., Eddy E.M., Koopman P. y Mishina Y. (2008) Sox8 is a critical regulator of adult sertoli cell function and male fertility. *Dev Biol*, **316**:359–370.
- O'Donnell K.A., Wentzel E.A., Zeller K.I., Dang C.V. y Mendell J.T. (2005) c-myc-regulated microRNAs modulate e2f1 expression. *Nature*, **435**:839–843.
- do Oh C., Maity S.N., Lu J.F., Zhang J., Liang S., Coustry F., de Crombrughe B. y Yasuda H. (2010) Identification of sox9 interaction sites in the genome of chondrocytes. *PLoS One*, **5**:e10113.
- Okamura K., Liu N. y Lai E.C. (2009) Distinct mechanisms for microRNA strand selection by drosophila argonautes. *Mol Cell*, **36**:431–444.
- Olesnicki E.C., Brent A.E., Tonnes L., Walker M., Pultz M.A., Leaf D. y Desplan C. (2006) A caudal mrna gradient controls posterior development in the wasp nasonia. *Development*, **133**:3973–3982.
- Olive V., Bennett M.J., Walker J.C., Ma C., Jiang I., Cordon-Cardo C., Li Q.J., Lowe S.W., Hannon G.J. y He L. (2009) mir-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev*, **23**:2839–2849.
- Olsen P.H. y Ambros V. (1999) The lin-4 regulatory rna controls developmental timing in caenorhabditis elegans by blocking lin-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol*, **216**:671–680.
- Ostermeier G.C., Goodrich R.J., Moldenhauer J.S., Diamond M.P. y Krawetz S.A. (2005) A suite of novel human spermatozoal rnas. *J Androl*, **26**:70–74.
- Ottolenghi C., Pelosi E., Tran J., Colombino M., Douglass E., Nedorezov T., Cao A., Forabosco A. y Schlessinger D. (2007) Loss of wnt4 and foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum Mol Genet*, **16**:2795–2804.
- Ozen M., Creighton C.J., Ozdemir M. y Ittmann M. (2008) Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene*, **27**:1788–1793.

Bibliografía

- Pak J. y Fire A. (2007) Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science*, **315**:241–244.
- Pan Q., Luo X., Toloubeydokhti T. y Chegini N. (2007) The expression profile of microRNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. *Mol Hum Reprod*, **13**:797–806.
- Pandur P., Maurus D. y Kahl M. (2002) Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network. *Bioessays*, **24**:881–884.
- Papaioannou M.D., Pitetti J.L., Ro S., Park C., Aubry F., Schaad O., Vojnar C.E., Kühne F., Descombes P., Zdobnov E.M., McManus M.T., Guillou F., Harfe B.D., Yan W., Jégou B. y Nef S. (2009) Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Dev Biol*, **326**:250–259.
- Pare J.M., Tahbaz N., López-Orozco J., LaPointe P., Lasko P. y Hobman T.C. (2009) Hsp90 regulates the function of argonaute 2 and its recruitment to stress granules and P-bodies. *Mol Biol Cell*, **20**:3273–3284.
- Park S., Meeks J., Raverot G., Pfaff L., Weiss J., Hammer G. y Jameson J. (2005) Nuclear receptors Sfl and Dax1 function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development. *Development*, **132**:2415–23.
- Parma P., Radi O., Vidal V., Chaboissier M., Dellambra E., Valentini S., Guerra L., Schedl A. y Camerino G. (2006a) R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet*.
- Parma P., Radi O., Vidal V., Chaboissier M.C., Dellambra E., Valentini S., Guerra L., Schedl A. y Camerino G. (2006b) R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet*, **38**:1304–1309.
- Paroo Z., Ye X., Chen S. y Liu Q. (2009) Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/ERK signaling. *Cell*, **139**:112–122.
- Pasquinelli A.E., Reinhart B.J., Slack F., Martindale M.Q., Kuroda M.I., Maller B., Hayward D.C., Ball E.E., Degnan B., Müller P., Spring J., Srinivasan A., Fishman M., Finnerty J., Corbo J., Levine M., Leahy P., Davidson E. y Ruvkun G. (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, **408**:86–89.
- Pastorelli L.M., Wells S., Fray M., Smith A., Hough T., Harfe B.D., McManus M.T., Smith L., Woolf A.S., Cheeseman M. y Greenfield A. (2009) Genetic analyses reveal a requirement for Dicer1 in the mouse urogenital tract. *Mamm Genome*, **20**:140–151.
- Patient R. y McGhee J. (2002) The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr Opin Genet Dev*, **12**:416–22.
- Patrão M.T.C.C., Silva E.J.R. y Avellar M.C.W. (2009) Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, **53**:934–945.
- Pawlicki J.M. y Steitz J.A. (2010) Nuclear networking fashions pre-messenger RNA and primary microRNA transcripts for function. *Trends Cell Biol*, **20**:52–61.
- Payne A.H. y Youngblood G.L. (1995) Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod*, **52**:217–225.
- Perrimon N., Ni J.Q. y Perkins L. (2010) In vivo RNAi: today and tomorrow. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**:a003640.
- Pestova T.V., Shatsky I.N. y Hellen C.U. (1996) Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4f: the 4a subunit and the central domain of the 4g subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes. *Mol Cell Biol*, **16**:6870–6878.
- Petersen C.P., Bordeleau M.E., Pelletier J. y Sharp P.A. (2006) Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*, **21**:533–542.

Bibliografía

- Piao X., Zhang X., Wu L. y Belasco J.G. (2010) Ccr4-not deadenylates mrna associated with rna-induced silencing complexes in human cells. *Mol Cell Biol*, **30**:1486–1494.
- Pillai R.S., Artus C.G. y Filipowicz W. (2004) Tethering of human ago proteins to mrna mimics the mirna-mediated repression of protein synthesis. *RNA*, **10**:1518–1525.
- Pillai R.S., Bhattacharyya S.N., Artus C.G., Zoller T., Cougot N., Basyuk E., Bertrand E. y Filipowicz W. (2005) Inhibition of translational initiation by let-7 microRNA in human cells. *Science*, **309**:1573–1576.
- Pillai R.S., Bhattacharyya S.N. y Filipowicz W. (2007) Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol*, **17**:118–126.
- Poliseno L., Tuccoli A., Mariani L., Evangelista M., Citti L., Woods K., Mercatanti A., Hammond S. y Rainaldi G. (2006) MicroRNAs modulate the angiogenic properties of huvecs. *Blood*, **108**:3068–3071.
- Poy M.N., Eliasson L., Krutzfeldt J., Kuwajima S., Ma X., Macdonald P.E., Pfeffer S., Tuschl T., Rajewsky N., Rorsman P. y Stoffel M. (2004) A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*, **432**:226–230.
- Preiss S., Argentaro A., Clayton A., John A., Jans D., Ogata T., Nagai T., Barroso I., Schafer A. y Harley V. (2001) Compound effects of point mutations causing campomelic dysplasia/autosomal sex reversal upon SOX9 structure, nuclear transport, DNA binding, and transcriptional activation. *J Biol Chem*, **276**:27864–72.
- Qin Y. y Bishop C. (2005) Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry. *Hum Mol Genet*, **14**:1221–9.
- Rackley R., Flenniken A., Kuriyan N., Kessler P., Stoler M. y Williams B. (1993) Expression of the Wilms' tumor suppressor gene WT1 during mouse embryogenesis. *Cell Growth Differ*, **4**:1023–31.
- Rajasethupathy P., Fiumara F., Sheridan R., Betel D., Puthanveetil S.V., Russo J.J., Sander C., Tuschl T. y Kandel E. (2009) Characterization of small RNAs in aplasia reveals a role for mir-124 in constraining synaptic plasticity through creb. *Neuron*, **63**:803–817.
- Rajewsky N. (2006) microRNA target predictions in animals. *Nat Genet*, **38 Suppl**:S8–13.
- Ramachandran V. y Chen X. (2008) Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science*, **321**:1490–1492.
- Rand T.A., Petersen S., Du F. y Wang X. (2005) Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, **123**:621–629.
- Raymond C., Kettlewell J., Hirsch B., Bardwell V. y Zarkower D. (1999) Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol*, **215**:208–20.
- Raymond C., Murphy M., O'Sullivan M., Bardwell V. y Zarkower D. (2000) Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev*, **14**:2587–95.
- Razin A. (1998) CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection. *EMBO J*, **17**:4905–4908.
- Rehwinkel J., Behm-Ansmant I., Gatfield D. y Izaurralde E. (2005) A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA*, **11**:1640–1647.
- Rehwinkel J., Natalin P., Stark A., Brennecke J., Cohen S.M. y Izaurralde E. (2006) Genome-wide analysis of mRNAs regulated by Drosophila melanogaster. *Mol Cell Biol*, **26**:2965–2975.
- Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M., Pasquinelli A.E., Bettinger J.C., Rougvie A.E., Horvitz H.R. y Ruvkun G. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **403**:901–906.

Bibliografía

- Ritchie M.E., Silver J., Oshlack A., Holmes M., Diyagama D., Holloway A. y Smyth G.K. (2007) A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics*, **23**:2700–2707.
- Ritchie W., Flamant S. y Rasko J.E.J. (2009) Predicting microrna targets and functions: traps for the unwary. *Nat Methods*, **6**:397–398.
- Ro S., Park C., Sanders K.M., McCarrey J.R. y Yan W. (2007a) Cloning and expression profiling of testis-expressed micrornas. *Dev Biol*, **311**:592–602.
- Ro S., Park C., Young D., Sanders K.M. y Yan W. (2007b) Tissue-dependent paired expression of mirnas. *Nucleic Acids Res*, **35**:5944–5953.
- Robb G.B., Brown K.M., Khurana J. y Rana T.M. (2005) Specific and potent rna in the nucleus of human cells. *Nat Struct Mol Biol*, **12**:133–137.
- Robb G.B. y Rana T.M. (2007) Rna helicase a interacts with risc in human cells and functions in risc loading. *Mol Cell*, **26**:523–537.
- Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J.L. y Bradley A. (2004) Identification of mammalian microrna host genes and transcription units. *Genome Res*, **14**:1902–1910.
- van Rooij E., Sutherland L.B., Qi X., Richardson J.A., Hill J. y Olson E.N. (2007) Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microrna. *Science*, **316**:575–579.
- Roush S. y Slack F.J. (2008) The let-7 family of micrornas. *Trends Cell Biol*, **18**:505–516.
- Rousset F., Bouchon D., Pintureau B., Juchault P. y Solignac M. (1992) Wolbachia endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc Biol Sci*, **250**:91–8.
- Rybak A., Fuchs H., Hadian K., Smirnova L., Wulczyn E.A., Michel G., Nitsch R., Krappmann D. y Wulczyn F.G. (2009) The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific e3 ubiquitin ligase for the mirna pathway protein ago2. *Nat Cell Biol*, **11**:1411–1420.
- Rybak A., Fuchs H., Smirnova L., Brandt C., Pohl E.E., Nitsch R. y Wulczyn F.G. (2008) A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol*, **10**:987–993.
- Rüdel S., Flatley A., Weinmann L., Kremmer E. y Meister G. (2008) A multifunctional human argonaute2-specific monoclonal antibody. *RNA*, **14**:1244–1253.
- Sah D.W.Y. (2006) Therapeutic potential of rna interference for neurological disorders. *Life Sci*, **79**:1773–1780.
- Sandberg R., Neilson J.R., Sarma A., Sharp P.A. y Burge C.B. (2008) Proliferating cells express mrnas with shortened 3' untranslated regions and fewer microrna target sites. *Science*, **320**:1643–1647.
- Sandy P., Ventura A. y Jacks T. (2005) Mammalian rna: a practical guide. *Biotechniques*, **39**:215–224.
- Sato E., Kimura N., Yokoo M., Miyake Y. y Ikeda J.E. (2006) Morphodynamics of ovarian follicles during oogenesis in mice. *Microsc Res Tech*, **69**:427–435.
- Scadden A.D.J. (2005) The risc subunit tudor-sn binds to hyper-edited double-stranded rna and promotes its cleavage. *Nat Struct Mol Biol*, **12**:489–496.
- Schepers G., Wilson M., Wilhelm D. y Koopman P. (2003) SOX8 is expressed during testis differentiation in mice and synergizes with SF1 to activate the Amh promoter in vitro. *J Biol Chem*, **278**:28101–8.
- Schmahl J., Eicher E., Washburn L. y Capel B. (2000) Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development*, **127**:65–73.
- Schmidt D., Ovitt C.E., Anlag K., Fehsenfeld S., Gredsted L., Treier A.C. y Treier M. (2004) The murine winged-helix transcription factor foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*, **131**:933–942.

- Schmitter D., Filkowski J., Sewer A., Pillai R.S., Oakeley E.J., Zavolan M., Svoboda P. y Filipowicz W. (2006) Effects of dicer and argonaute down-regulation on mrna levels in human hek293 cells. *Nucleic Acids Res*, **34**:4801–4815.
- Schug J. (2003) Using TESS to Predict Transcription Factor Binding Sites in DNA Sequence. In A.D. Baxevanis, ed., *Current Protocols in Bioinformatics*. J. Wiley and Sons.
- Sdassi N., Silveri L., Laubier J., Tilly G., Costa J., Layani S., Vilotte J.L. y Provost F.L. (2009) Identification and characterization of new mirnas cloned from normal mouse mammary gland. *BMC Genomics*, **10**:149.
- Seggerson K., Tang L. y Moss E.G. (2002) Two genetic circuits repress the caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-28 after translation initiation. *Dev Biol*, **243**:215–225.
- Sekido R. (2010) Sry: A transcriptional activator of mammalian testis determination. *Int J Biochem Cell Biol*, **42**:417–420.
- Sekido R., Bar I., Narvaez V., Penny G. y Lovell-Badge R. (2004a) SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol*, **274**:271–9.
- Sekido R., Bar I., Narváez V., Penny G. y Lovell-Badge R. (2004b) Sox9 is up-regulated by the transient expression of sry specifically in sertoli cell precursors. *Dev Biol*, **274**:271–279.
- Sekido R. y Lovell-Badge R. (2008) Sex determination involves synergistic action of sry and sfl1 on a specific sox9 enhancer. *Nature*, **453**:930–934.
- Sekido R. y Lovell-Badge R. (2009) Sex determination and sry: down to a wink and a nudge? *Trends Genet*, **25**:19–29.
- Selbach M., Schwanhäusser B., Thierfelder N., Fang Z., Khanin R. y Rajewsky N. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, **455**:58–63.
- Sethi P. y Lukiw W.J. (2009) Micro-rna abundance and stability in human brain: specific alterations in alzheimer's disease temporal lobe neocortex. *Neurosci Lett*, **459**:100–104.
- Sethupathy P., Megraw M. y Hatzigeorgiou A.G. (2006) A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. *Nat Methods*, **3**:881–886.
- Shapiro D. (1990) Sex-changing fish as a manipulable system for the study of the determination, differentiation, and stability of sex in vertebrates. *J Exp Zool Suppl*, **4**:132–6.
- Sharp P.A., Sugden B. y Sambrook J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in haemophilus parainfluenzae using analytical agarose–ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, **12**:3055–3063.
- Shen J.H.C. y Ingraham H.A. (2002) Regulation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by sox proteins. *Mol Endocrinol*, **16**:529–540.
- Shen W., Moore C., Ikeda Y., Parker K. y Ingraham H. (1994) Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell*, **77**:651–61.
- Shin C., Nam J.W., Farh K.K.H., Chiang H.R., Shkumatava A. y Bartel D.P. (2010) Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Mol Cell*, **38**:789–802.
- Shingara J., Keiger K., Shelton J., Laosinchai-Wolf W., Powers P., Conrad R., Brown D. y Labourier E. (2005) An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling. *RNA*, **11**:1461–1470.
- Shyu A.B., Wilkinson M.F. y van Hoof A. (2008) Messenger rna regulation: to translate or to degrade. *EMBO J*, **27**:471–481.
- Sijen T., Steiner F.A., Thijssen K.L. y Plassterk R.H.A. (2007) Secondary sirnas result from unprimed rna synthesis and

Bibliografía

- form a distinct class. *Science*, **315**:244–247.
- da Silva S.M., Hacker A., Harley V., Goodfellow P., Swain A. y Lovell-Badge R. (1996) Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet*, **14**:62–68.
- Simmer F., Moorman C., van der Linden A.M., Kuijk E., van den Berghe P.V.E., Kamath R.S., Fraser A.G., Ahringer J. y Plasterk R.H.A. (2003) Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions. *PLoS Biol*, **1**:E12.
- Simoni M., Gromoll J. y Nieschlag E. (1997) The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev*, **18**:739–773.
- Sinclair A., Berta P., Palmer M., Hawkins J., Griffiths B., Smith M., Foster J., Frischauf A., Lovell-Badge R. y Goodfellow P. (1990a) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, **346**:240–4.
- Sinclair A.H., Berta P., Palmer M.S., Hawkins J.R., Griffiths B.L., Smith M.J., Foster J.W., Frischauf A.M., Lovell-Badge R. y Goodfellow P.N. (1990b) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, **346**:240–244.
- Sinkkonen L., Hügenschmidt T., Berninger P., Gaidatzis D., Mohn F., Artus-Revel C.G., Zavolan M., Svoboda P. y Filipowicz W. (2008) MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol*, **15**:259–267.
- Skromne I. y Prince V.E. (2008) Current perspectives in zebrafish reverse genetics: moving forward. *Dev Dyn*, **237**:861–882.
- Smith C. y Sinclair A. (2004) Sex determination: insights from the chicken. *Bioessays*, **26**:120–32.
- Smith C.A., Shoemaker C.M., Roeszler K.N., Queen J., Crews D. y Sinclair A.H. (2008) Cloning and expression of r-spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. *BMC Dev Biol*, **8**:72.
- Sonenberg N. (2008) eIF4e, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. *Biochem Cell Biol*, **86**:178–183.
- Song R., Ro S., Michaels J.D., Park C., McCarey J.R. y Yan W. (2009) Many X-linked microRNAs escape meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet*, **41**:488–493.
- Später D., Hill T.P., Gruber M. y Hartmann C. (2006) Role of canonical Wnt-signalling in joint formation. *Eur Cell Mater*, **12**:71–80.
- Stark A., Brennecke J., Bushati N., Russell R.B. y Cohen S.M. (2005) Animal microRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell*, **123**:1133–1146.
- Su H., Trombly M.I., Chen J. y Wang X. (2009) Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. *Genes Dev*, **23**:304–317.
- Sugimoto A. (2004) High-throughput RNAi in *Caenorhabditis elegans*: genome-wide screens and functional genomics. *Differentiation*, **72**:81–91.
- Suzuki H.I., Yamagata K., Sugimoto K., Iwamoto T., Kato S. y Miyazono K. (2009) Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*, **460**:529–533.
- Swain A. y Lovell-Badge R. (1999) Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev*, **13**:755–767.
- Sönnichsen B., Koski L.B., Walsh A., Marschall P., Neumann B., Brehm M., Alleaume A.M., Artelt J., Bettencourt P., Cassin E., Hewitson M., Holz C., Khan M., Lazik S., Martin C., Nitzsche B., Ruer M., Stamford J., Winzi M., Heinkel R., Röder M., Finell J., Häntsch H., Jones S.J.M., Jones M., Piano F., Gunsalus K.C.,

- Oegema K., Gönczy P., Coulson A., Hyman A.A. y Echeverri C.J. (2005) Full-genome rna1 profiling of early embryogenesis in *caenorhabditis elegans*. *Nature*, **434**:462–469.
- Tahara S.M., Morgan M.A. y Shatkin A.J. (1981) Two forms of purified m7g-cap binding protein with different effects on capped mrna translation in extracts of uninfected and poliovirus-infected hela cells. *J Biol Chem*, **256**:7691–7694.
- Tahbaz N., Carmichael J.B. y Hobman T.C. (2001) Gerp95 belongs to a family of signal-transducing proteins and requires hsp90 activity for stability and golgi localization. *J Biol Chem*, **276**:43294–43299.
- Tahbaz N., Kolb F.A., Zhang H., Jaronczyk K., Filipowicz W. y Hobman T.C. (2004) Characterization of the interactions between mammalian paz piwi domain proteins and dicer. *EMBO Rep*, **5**:189–194.
- Takada S., Berezikov E., Choi Y.L., Yamashita Y. y Mano H. (2009) Potential role of mir-29b in modulation of dnmt3a and dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos. *RNA*, **15**:1507–1514.
- Takada S., Berezikov E., Yamashita Y., Lagos-Quintana M., Kloosterman W.P., Enomoto M., Hatanaka H., ichiro Fujiwara S., Watanabe H., Soda M., Choi Y.L., Plasterk R.H.A., Cuppen E. y Mano H. (2006) Mouse microRNA profiles determined with a new and sensitive cloning method. *Nucleic Acids Res*, **34**:e115.
- Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K., Tomida S., Osada H., Endoh H., Harano T., Yatabe Y., Nagino M., Nimura Y., Mitsudomi T. y Takahashi T. (2004) Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*, **64**:3753–3756.
- Talbert P.B. y Henikoff S. (2006) Spreading of silent chromatin: inaction at a distance. *Nat Rev Genet*, **7**:793–803.
- Tang F., Kaneda M., O'Carroll D., Hajkova P., Barton S.C., Sun Y.A., Lee C., Tarakhovskiy A., Lao K. y Surani M.A. (2007) Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev*, **21**:644–648.
- Tang G., Reinhart B.J., Bartel D.P. y Zamore P.D. (2003) A biochemical framework for rna silencing in plants. *Genes Dev*, **17**:49–63.
- Tavazoie S.F., Alarcón C., Oskarsson T., Padua D., Wang Q., Bos P.D., Gerald W.L. y Massagué J. (2008) Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*, **451**:147–152.
- Tay Y., Zhang J., Thomson A.M., Lim B. y Rigoutsos I. (2008) MicroRNAs to nanog, oct4 and sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, **455**:1124–1128.
- Teague E.M.C.O., der Hoek K.H.V., der Hoek M.B.V., Perry N., Wagaarachchi P., Robertson S.A., Print C.G. y Hull L.M. (2009) MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Mol Endocrinol*, **23**:265–275.
- Telfer A. y Poethig R.S. (1998) Hasty: a gene that regulates the timing of shoot maturation in *arabidopsis thaliana*. *Development*, **125**:1889–1898.
- Tevosian S., Albrecht K., Crispino J., Fujiwara Y., Eicher E. y Orkin S. (2002) Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development*, **129**:4627–34.
- Tevosian S., Deconinck A., Cantor A., Ri-eff H., Fujiwara Y., Corfas G. y Orkin S. (1999) FOG-2: A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins Friend of GATA-1 and U-shaped. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**:950–5.
- Thermann R. y Hentze M.W. (2007) *Drosophila* mir2 induces pseudopolysomes and inhibits translation initiation. *Nature*, **447**:875–878.
- Thomson J.M., Newman M., Parker J.S., Morin-Kensicki E.M., Wright T. y Hammond S.M. (2006) Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev*, **20**:2202–2207.

Bibliografía

- Till S., Lejeune E., Thermann R., Bortfeld M., Hothorn M., Enderle D., Heinrich C., Hentze M.W. y Ladurner A.G. (2007) A conserved motif in argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the argonaute piwi domain. *Nat Struct Mol Biol*, **14**:897–903.
- Tilmann C. y Capel B. (1999) Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development*, **126**:2883–90.
- Tolia N.H. y Joshua-Tor L. (2007) Slicer and the argonautes. *Nat Chem Biol*, **3**:36–43.
- Tomari Y., Du T., Haley B., Schwarz D.S., Bennett R., Cook H.A., Koppetsch B.S., Theurkauf W.E. y Zamore P.D. (2004) Risc assembly defects in the drosophila *rnai* mutant *armitage*. *Cell*, **116**:831–841.
- Tomizuka K., Horikoshi K., Kitada R., Sugawara Y., Iba Y., Kojima A., Yoshitome A., Yamawaki K., Amagai M., Inoue A., Oshima T. y Kakitani M. (2008) R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating wnt-4 signaling. *Hum Mol Genet*, **17**:1278–1291.
- Tommerup N., Schempp W., Meinecke P., Pedersen S., Bolund L., Brandt C., Goodpasture C., Guldborg P., Held K., Reinwein H. y et al. (1993) Assignment of an autosomal sex reversal locus (SRA1) and campomelic dysplasia (CMPD1) to 17q24.3-q25.1. *Nat Genet*, **4**:170–4.
- Topol L., Chen W., Song H., Day T.F. y Yang Y. (2009) Sox9 inhibits wnt signaling by promoting beta-catenin phosphorylation in the nucleus. *J Biol Chem*, **284**:3323–3333.
- Trabucchi M., Briata P., Garcia-Mayoral M., Haase A.D., Filipowicz W., Ramos A., Gherzi R. y Rosenfeld M.G. (2009) The rna-binding protein *ksrp* promotes the biogenesis of a subset of micrornas. *Nature*, **459**:1010–1014.
- Tremblay J. y Viger R. (1999) Transcription factor GATA-4 enhances Mullerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Mol Endocrinol*, **13**:1388–401.
- Tremblay J. y Viger R. (2001) GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. *Endocrinology*, **142**:977–86.
- Tremblay J. y Viger R. (2003a) A mutated form of steroidogenic factor 1 (SF-1 G35E) that causes sex reversal in humans fails to synergize with transcription factor GATA-4. *J Biol Chem*, **278**:42637–42.
- Tremblay J. y Viger R. (2003b) Novel roles for GATA transcription factors in the regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **85**:291–8.
- Triboulet R., Chang H.M., Lapierre R.J. y Gregory R.I. (2009) Post-transcriptional control of *dger8* expression by the microprocessor. *RNA*, **15**:1005–1011.
- Tritschler F., Huntzinger E. y Izaurralde E. (2010) Role of *gw182* proteins and *pabpc1* in the mirna pathway: a sense of déjà vu. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**:379–384.
- Tsai M.C., Manor O., Wan Y., Mosammaparast N., Wang J.K., Lan F., Shi Y., Segal E. y Chang H.Y. (2010) Long noncoding rna as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*, **329**:689–693.
- Tung P. y Fritz I. (1987) Morphogenetic restructuring and formation of basement membranes by Sertoli cells and testis peritubular cells in co-culture: inhibition of the morphogenetic cascade by cyclic AMP derivatives and by blocking direct cell contact. *Dev Biol*, **120**:139–53.
- Turner B.M. (1991) Histone acetylation and control of gene expression. *J Cell Sci*, **99** (Pt 1):13–20.
- Uda M., Ottolenghi C., Crisponi L., Garcia J.E., Deiana M., Kimber W., Forabosco A., Cao A., Schlessinger D. y Pilia G. (2004) *Foxl2* disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet*, **13**:1171–1181.
- Uhlenhaut N.H., Jakob S., Anlag K., Eisenberger T., Sekido R., Kress J., Treier A.C., Klugmann C., Klasen C., Holter N.I., Riethmacher D., Schütz G., Cooney A.J.,

- Lovell-Badge R. y Treier M. (2009) Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by foxl2 ablation. *Cell*, **139**:1130–1142.
- Vagin V.V., Sigova A., Li C., Seitz H., Gvozdev V. y Zamore P.D. (2006) A distinct small rna pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*, **313**:320–324.
- Vainio S., Heikkila M., Kispert A., Chin N. y McMahon A. (1999) Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, **397**:405–9.
- Valencia-Sanchez M.A., Liu J., Hannon G.J. y Parker R. (2006) Control of translation and mrna degradation by mirnas and sirnas. *Genes Dev*, **20**:515–524.
- Vasudevan S. y Steitz J.A. (2007) Au-rich-element-mediated upregulation of translation by foxl1 and argonaute 2. *Cell*, **128**:1105–1118.
- Vasudevan S., Tong Y. y Steitz J.A. (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, **318**:1931–1934.
- Vella M.C., Choi E.Y., Lin S.Y., Reinert K. y Slack F.J. (2004) The *c. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'utr. *Genes Dev*, **18**:132–137.
- Venken K.J.T. y Bellen H.J. (2005) Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet*, **6**:167–178.
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O., Yandell M., Evans C.A., Holt R.A., Gocayne J.D., Amanatides P., Ballew R.M., Huson D.H., Wortman J.R., Zhang Q., Kodira C.D., Zheng X.H., Chen L., Skupski M., Subramanian G., Thomas P.D., Zhang J., Miklos G.L.G., Nelson C., Broder S., Clark A.G., Nadeau J., McKusick V.A., Zinder N., Levine A.J., Roberts R.J., Simon M., Slayman C., Hunkapiller M., Bolanos R., Delcher A., Dew I., Fasulo D., Flanigan M., Florea L., Halpern A., Hannenhalli S., Kravitz S., Levy S., Mobarry C., Reinert K., Remington K., Abu-Threideh J., Beasley E., Biddick K., Bonazzi V., Brandon R., Cargill M., Chandra-mouliswaran I., Charlab R., Chaturvedi K., Deng Z., Francesco V.D., Dunn P., Eilbeck K., Evangelista C., Gabrielian A.E., Gan W., Ge W., Gong F., Gu Z., Guan P., Heiman T.J., Higgins M.E., Ji R.R., Ke Z., Ketchum K.A., Lai Z., Lei Y., Li Z., Li J., Liang Y., Lin X., Lu F., Merkulov G.V., Milshina N., Moore H.M., Naik A.K., Narayan V.A., Neelam B., Nusskern D., Rusch D.B., Salzberg S., Shao W., Shue B., Sun J., Wang Z., Wang A., Wang X., Wang J., Wei M., Wides R., Xiao C., Yan C., Yao A., Ye J., Zhan M., Zhang W., Zhang H., Zhao Q., Zheng L., Zhong F., Zhong W., Zhu S., Zhao S., Gilbert D., Baumhueter S., Spier G., Carter C., Cravchik A., Woodage T., Ali F., An H., Awe A., Baldwin D., Baden H., Barnstead M., Barrow I., Beeson K., Busam D., Carver A., Center A., Cheng M.L., Curry L., Danaher S., Davenport L., Desilets R., Dietz S., Dodson K., Doup L., Ferriera S., Garg N., Gluecksmann A., Hart B., Haynes J., Haynes C., Heiner C., Hladun S., Hostin D., Houck J., Howland T., Ibegwam C., Johnson J., Kalush F., Kline L., Koduru S., Love A., Mann F., May D., McCawley S., McIntosh T., McMullen I., Moy M., Moy L., Murphy B., Nelson K., Pfannkoch C., Pratts E., Puri V., Qureshi H., Reardon M., Rodriguez R., Rogers Y.H., Romblad D., Ruhfel B., Scott R., Sitter C., Smallwood M., Stewart E., Strong R., Suh E., Thomas R., Tint N.N., Tse S., Vech C., Wang G., Wetter J., Williams S., Williams M., Windsor S., Winn-Deen E., Wolfe K., Zaveri J., Zaveri K., Abril J.F., Guigó R., Campbell M.J., Sjolander K.V., Karlak B., Kejariwal A., Mi H., Lazareva B., Hatton T., Narechania A., Diemer K., Muruganujan A., Guo N., Sato S., Bafna V., Istrail S., Lippert R., Schwartz R., Walenz B., Yooseph S., Allen D., Basu A., Baxendale J., Blick L., Caminha M., Carnes-Stine J., Caulk P., Chiang Y.H., Coyne M., Dahlke C., Mays A., Dombroski M., Donnelly M., Ely D., Esparham S., Fosler C., Gire H., Glanowski S., Glasser K., Glodek A., Gorokhov M., Graham K., Gropman B., Harris M., Heil J., Henderson S., Hoover J., Jennings D., Jordan C., Jordan J., Kasha J., Kagan L., Kraft C., Levitsky A., Lewis M., Liu X., Lopez J., Ma D., Majoros W., McDaniel

Bibliografía

- J., Murphy S., Newman M., Nguyen T., Nguyen N., Nodell M., Pan S., Peck J., Peterson M., Rowe W., Sanders R., Scott J., Simpson M., Smith T., Sprague A., Stockwell T., Turner R., Venter E., Wang M., Wen M., Wu D., Wu M., Xia A., Zandieh A. y Zhu X. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, **291**:1304–1351.
- Vidal V.P., Chaboissier M.C., de Rooij D.G. y Schedl A. (2001) Sox9 induces testis development in xx transgenic mice. *Nat Genet*, **28**:216–217.
- Viger R., Mertineit C., Trasler J. y Nemer M. (1998) Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Mullerian inhibiting substance promoter. *Development*, **125**:2665–75.
- Viswanathan S.R. y Daley G.Q. (2010) Lin28: A microRNA regulator with a macro role. *Cell*, **140**:445–449.
- Viswanathan S.R., Daley G.Q. y Gregory R.I. (2008) Selective blockade of microRNA processing by lin28. *Science*, **320**:97–100.
- Viswanathan S.R., Mermel C.H., Lu J., Lu C.W., Golub T.R. y Daley G.Q. (2009a) microRNA expression during trophectoderm specification. *PLoS One*, **4**:e6143.
- Viswanathan S.R., Powers J.T., Einhorn W., Hoshida Y., Ng T.L., Toffanin S., O'Sullivan M., Lu J., Phillips L.A., Lockhart V.L., Shah S.P., Tanwar P.S., Mermel C.H., Beroukhir R., Azam M., Teixeira J., Meyerson M., Hughes T.P., Llovet J.M., Radich J., Mullighan C.G., Golub T.R., Sorensen P.H. y Daley G.Q. (2009b) Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet*, **41**:843–848.
- Voinnet O. (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, **136**:669–687.
- Volff J., Zarkower D., Bardwell V. y Schartl M. (2003) Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in metazoans. *J Mol Evol*, **57 Suppl 1**:S241–9.
- Wagner T., Wirth J., Meyer J., Zabel B., Held M., Zimmer J., Pasantes J., Bricarelli F., Keutel J., Hustert E. y et al. (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell*, **79**:1111–20.
- Wakiyama M., Takimoto K., Ohara O. y Yokoyama S. (2007) Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev*, **21**:1857–1862.
- Walters R.W., Bradrick S.S. y Gromeier M. (2010) Poly(a)-binding protein modulates mRNA susceptibility to cap-dependent miRNA-mediated repression. *RNA*, **16**:239–250.
- Wang B., Love T.M., Call M.E., Doench J.G. y Novina C.D. (2006) Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Mol Cell*, **22**:553–560.
- Wang C. y Li Q. (2007) Identification of differentially expressed microRNAs during the development of Chinese murine mammary gland. *J Genet Genomics*, **34**:966–973.
- Wang Y., Juranek S., Li H., Sheng G., Tuschl T. y Patel D.J. (2008) Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide RNA and target RNA duplex. *Nature*, **456**:921–926.
- Wang Y., Medvid R., Melton C., Jaenisch R. y Blalock R. (2007a) Dgcr8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet*, **39**:380–385.
- Wang Y., Weng T., Gou D., Chen Z., Chintagari N.R. y Liu L. (2007b) Identification of rat lung-specific microRNAs by microRNA microarray: valuable discoveries for the facilitation of lung research. *BMC Genomics*, **8**:29.
- Wargelius A., Ellingsen S. y Fjose A. (1999) Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, **263**:156–161.

- Watanabe T., Takeda A., Mise K., Okuno T., Suzuki T., Minami N. y Imai H. (2005) Stage-specific expression of micrnas during xenopus development. *FEBS Lett*, **579**:318–324.
- Wei Y., Renard C.A., Labalette C., Wu Y., Lévy L., Neuveut C., Prieur X., Flajole M., Prigent S. y Buendia M.A. (2003) Identification of the lim protein fhl2 as a coactivator of beta-catenin. *J Biol Chem*, **278**:5188–5194.
- Weinmann L., Höck J., Ivacevic T., Ohrt T., Mütze J., Schulle P., Kremmer E., Benes V., Urlaub H. y Meister G. (2009) Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mrnas. *Cell*, **136**:496–507.
- Weinstein I.B. (2002) Cancer. addiction to oncogenes—the achilles heal of cancer. *Science*, **297**:63–64.
- Wells S.E., Hillner P.E., Vale R.D. y Sachs A.B. (1998) Circularization of mrna by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell*, **2**:135–140.
- Welshons W. y Russell L. (1959) The Y-chromosome as the bearer of male determining factors in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, **45**:560–6.
- de Wet J.R., Wood K.V., Helinski D.R. y DeLuca M. (1985) Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**:7870–7873.
- Wibrand K., Panja D., Tiron A., Ofte M.L., Skaftnesmo K.O., Lee C.S., Pena J.T.G., Tuschl T. y Bramham C.R. (2010) Differential regulation of mature and precursor micrna expression by nmda and metabotropic glutamate receptor activation during ltp in the adult dentate gyrus in vivo. *Eur J Neurosci*, **31**:636–645.
- Wienholds E., Kloosterman W.P., Miska E., Alvarez-Saavedra E., Berezikov E., de Bruijn E., Horvitz H.R., Kauppinen S. y Plasterk R.H.A. (2005) Micrna expression in zebrafish embryonic development. *Science*, **309**:310–311.
- Wienholds E., Koudijs M.J., van Eeden F.J.M., Cuppen E. y Plasterk R.H.A. (2003) The micrna-producing enzyme dicer1 is essential for zebrafish development. *Nat Genet*, **35**:217–218.
- Wightman B., Ha I. y Ruvkun G. (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in c. elegans. *Cell*, **75**:855–862.
- Wilhelm D. (2007) R-spondin1—discovery of the long-missing, mammalian female-determining gene? *Bioessays*, **29**:314–318.
- Wilhelm D., Hiramatsu R., Mizusaki H., Widjaja L., Combes A.N., Kanai Y. y Koopman P. (2007) Sox9 regulates prostaglandin d synthase gene transcription in vivo to ensure testis development. *J Biol Chem*, **282**:10553–10560.
- Wilhelm D., Martinson F., Bradford S., Wilson M., Combes A., Beverdam A., Bowles J., Mizusaki H. y Koopman P. (2005) Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Dev Biol*.
- Wilson M., Jeyasuria P., Parker K. y Koopman P. (2005a) The transcription factors steroidogenic factor-1 and SOX9 regulate expression of Vanin-1 during mouse testis development. *J Biol Chem*, **280**:5917–23.
- Wilson M.J., Jeyasuria P., Parker K.L. y Koopman P. (2005b) The transcription factors steroidogenic factor-1 and sox9 regulate expression of vanin-1 during mouse testis development. *J Biol Chem*, **280**:5917–5923.
- Winter J., Jung S., Keller S., Gregory R.I. y Diederichs S. (2009) Many roads to maturity: micrna biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, **11**:228–234.
- Wu E., Thivierge C., Flamand M., Mathonnet G., Vashisht A.A., Wohlschlegel J., Fabian M.R., Sonenberg N. y Duchaine T.F. (2010a) Pervasive and cooperative deadenylation of 3'utrs by embryonic micrna families. *Mol Cell*, **40**:558–570.

Bibliografía

- Wu H., Sun S., Tu K., Gao Y., Xie B., Krainer A.R. y Zhu J. (2010b) A splicing-independent function of sf2/asf in microRNA processing. *Mol Cell*, **38**:67–77.
- Wu L., Fan J. y Belasco J.G. (2006) MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**:4034–4039.
- Wu L., Fan J. y Belasco J.G. (2008) Importance of translation and nonnucleolytic ago proteins for on-target RNA interference. *Curr Biol*, **18**:1327–1332.
- Wu L., Zhou H., Zhang Q., Zhang J., Ni F., Liu C. y Qi Y. (2010c) DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Mol Cell*, **38**:465–475.
- Xie X., Lu J., Kulbokas E.J., Golub T.R., Mootha V., Lindblad-Toh K., Lander E.S. y Kellis M. (2005) Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, **434**:338–345.
- Xin M., Small E.M., Sutherland L.B., Qi X., McAnally J., Plato C.F., Richardson J.A., Bassel-Duby R. y Olson E.N. (2009) MicroRNAs mir-143 and mir-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes Dev*, **23**:2166–2178.
- Xu N., Papagiannakopoulos T., Pan G., Thomson J.A. y Kosik K.S. (2009) MicroRNA-145 regulates Oct4, Sox2, and Klf4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*, **137**:647–658.
- Xu P., Vernooij S.Y., Guo M. y Hay B.A. (2003) The drosophila microRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol*, **13**:790–795.
- Yan N., Lu Y., Sun H., Qiu W., Tao D., Liu Y., Chen H., Yang Y., Zhang S., Li X. y Ma Y. (2009) Microarray profiling of microRNAs expressed in testis tissues of developing primates. *J Assist Reprod Genet*, **26**:179–186.
- Yan W., Morozumi K., Zhang J., Ro S., Park C. y Yanagimachi R. (2008) Birth of mice after intracytoplasmic injection of single purified sperm nuclei and detection of messenger RNAs and microRNAs in the sperm nuclei. *Biol Reprod*, **78**:896–902.
- Yang Y., Bai W., Zhang L., Yin G., Wang X., Wang J., Zhao H., Han Y. y Yao Y.Q. (2008) Determination of microRNAs in mouse preimplantation embryos by microarray. *Dev Dyn*, **237**:2315–2327.
- Yang Z., Jakymiw A., Wood M.R., Eystathiou T., Rubin R.L., Fritzler M.J. y Chan E.K.L. (2004) Gw182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J Cell Sci*, **117**:5567–5578.
- Yao H., DiNapoli L. y Capel B. (2003) Meiotic germ cells antagonize mesonephric cell migration and testis cord formation in mouse gonads. *Development*, **130**:5895–902.
- Yao H., Matzuk M., Jorgez C., Menke D., Page D., Swain A. y Capel B. (2004) Folliculin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn*, **230**:210–5.
- Yeap B.B., Krueger R.G. y Leedman P.J. (1999) Differential posttranscriptional regulation of androgen receptor gene expression by androgen in prostate and breast cancer cells. *Endocrinology*, **140**:3282–3291.
- Yekta S., Shih I.H. y Bartel D.P. (2004) MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, **304**:594–596.
- Yi R., Qin Y., Macara I.G. y Cullen B.R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, **17**:3011–3016.
- Yigit E., Batista P.J., Bei Y., Pang K.M., Chen C.C.G., Tolia N.H., Joshua-Tor L., Mitani S., Simard M.J. y Mello C.C. (2006) Analysis of the *C. elegans* argonaute family reveals that distinct argonautes act sequentially during RNAi. *Cell*, **127**:747–757.
- Yu F., Yao H., Zhu P., Zhang X., Pan Q., Gong C., Huang Y., Hu X., Su F., Lieberman J. y Song E. (2007) let-7 regulates self-renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*, **131**:1109–1123.
- Yu Z., Raabe T. y Hecht N.B. (2005) MicroRNA mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell

- transition protein 2 (tnp2) messenger rna (mrna) by mrna cleavage. *Biol Reprod*, **73**:427–433.
- Yuan X., Liu C., Yang P., He S., Liao Q., Kang S. y Zhao Y. (2009) Clustered micrornas' coordination in regulating protein-protein interaction network. *BMC Syst Biol*, **3**:65.
- Yuan X., Lu M.L., Li T. y Balk S.P. (2001) Sry interacts with and negatively regulates androgen receptor transcriptional activity. *J Biol Chem*, **276**:46647–46654.
- Zarkower D. (2001) Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity? *Nat Rev Genet*, **2**:175–85.
- Zdanowicz A., Thermann R., Kowalska J., Jemielity J., Duncan K., Preiss T., Darzynkiewicz E. y Hentze M.W. (2009) Drosophila mir2 primarily targets the m7gpppn cap structure for translational repression. *Mol Cell*, **35**:881–888.
- Zekri L., Huntzinger E., Heimstädt S. y Izaurralde E. (2009) The silencing domain of gw182 interacts with pabpc1 to promote translational repression and degradation of microrna targets and is required for target release. *Mol Cell Biol*, **29**:6220–6231.
- Zeng Y. y Cullen B.R. (2004) Structural requirements for pre-microrna binding and nuclear export by exportin 5. *Nucleic Acids Res*, **32**:4776–4785.
- Zeng Y. y Cullen B.R. (2005) Efficient processing of primary microrna hairpins by drosha requires flanking nonstructured rna sequences. *J Biol Chem*, **280**:27595–27603.
- Zhang H., Kolb F.A., Brondani V., Billy E. y Filipowicz W. (2002) Human dicer preferentially cleaves dsrnas at their termini without a requirement for atp. *EMBO J*, **21**:5875–5885.
- Zhang L., Ding L., Cheung T.H., Dong M.Q., Chen J., Sewell A.K., Liu X., Yates J.R. y Han M. (2007) Systematic identification of c. elegans mirisc proteins, mirnas, and mrna targets by their interactions with gw182 proteins ain-1 and ain-2. *Mol Cell*, **28**:598–613.
- Zhang L., Volinia S., Bonome T., Calin G.A., Greshock J., Yang N., Liu C.G., Gianakakis A., Alexiou P., Hasegawa K., Johnstone C.N., Megraw M.S., Adams S., Lassus H., Huang J., Kaur S., Liang S., Sethupathy P., Leminen A., Simossis V.A., Sandaltzopoulos R., Naomoto Y., Katsaros D., Gimotty P.A., DeMichele A., Huang Q., Bützow R., Rustgi A.K., Weber B.L., Birrer M.J., Hatzigeorgiou A.G., Croce C.M. y Coukos G. (2008) Genomic and epigenetic alterations deregulate microrna expression in human epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**:7004–7009.
- Zhang X., Graves P.R. y Zeng Y. (2009) Stable argonaute2 overexpression differentially regulates microrna production. *Biochim Biophys Acta*, **1789**:153–159.
- Zhang X., Wang X., Zhu H., Zhu C., Wang Y., Pu W.T., Jegga A.G. y Fan G.C. (2010) Synergistic effects of the gata-4-mediated mir-144/451 cluster in protection against simulated ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte death. *J Mol Cell Cardiol*, **49**:841–850.
- Zhao T., Li G., Mi S., Li S., Hannon G.J., Wang X.J. y Qi Y. (2007a) A complex system of small rnas in the unicellular green alga chlamydomonas reinhardtii. *Genes Dev*, **21**:1190–1203.
- Zhao Y., Ransom J.F., Li A., Vedantham V., von Drehle M., Muth A.N., Tsuchihashi T., McManus M.T., Schwartz R.J. y Srivastava D. (2007b) Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking mirna-1-2. *Cell*, **129**:303–317.
- Zhao Y., Samal E. y Srivastava D. (2005) Serum response factor regulates a muscle-specific microrna that targets hand2 during cardiogenesis. *Nature*, **436**:214–220.
- Zhou Y., Ching Y.P., Kok K.H., fu Kung H. y Jin D.Y. (2002) Post-transcriptional suppression of gene expression in xenopus embryos by small interfering rna. *Nucleic Acids Res*, **30**:1664–1669.
- ming Zhu X., Han T., Sargent I.L., wu Yin G. y qing Yao Y. (2009) Differential expression profile of micrornas in human placen-

Bibliografía

tas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*, **200**:661.e1–661.e7.

Zimmermann T.S., Lee A.C.H., Akinc A., Bramlage B., Bumcrot D., Fedoruk M.N., Harborth J., Heyes J.A., Jeffs L.B., John M., Judge A.D., Lam K., McClintock K., Nechev L.V., Palmer L.R., Racie T., Röhl I., Seiffert S., Shanmugam S., Sood V., Soutschek J., Toudjarska I., Wheat A.J., Yaworski E., Zedalis W., Koteliansky V., Manoharan M., Vornlocher H.P. y MacLachlan I. (2006) Rnai-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, **441**:111–114.

Zipprich J.T., Bhattacharyya S., Mathys H. y Filipowicz W. (2009) Importance of the c-terminal domain of the human gw182 protein tnrc6c for translational repression. *RNA*, **15**:781–793.

Zisoulis D.G., Lovci M.T., Wilbert M.L., Hutt K.R., Liang T.Y., Pasquinelli A.E. y Yeo G.W. (2010) Comprehensive discovery of endogenous argonaute binding sites in *caenorhabditis elegans*. *Nat Struct Mol Biol*, **17**:173–179.