

**ELS PREMIS NOBEL**

**DE L'ANY 2006**

**SOBRE EL PREMI NOBEL DE FISIOLOGIA**

**O MEDICINA**

**CONCEDIT A**

**ANDREW Z. FIRE**

**I CRAIG C. MELLO,**

**PER RAMIN SHIEKHATTAR,**

**INVESTIGADOR DE LA INSTITUCIÓ CATALANA**

**DE RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS,**

**AL CENTRE DE REGULACIÓ GENÒMICA**

**DE BARCELONA**

## EL MECANISME DE SILENCIAMENT GÈNIC PER PETIT RNA NO CODIFICANT

### RESUM

El Premi Nobel de Fisiologia o Medicina 2006 s'ha concedit a dos genetistes nord-americans, Andrew Z. Fire i Craig C. Mello, «pel seu descobriment del silenciament gènic per RNA de doble cadena». Durant molts anys, en el camp de la transcripció es va donar per fet que el DNA de doble cadena és transcrit a RNA de cadena simple, el qual finalment és traduït a proteïna. La idea que l'RNA també podia ser de doble cadena ni tan sols es considerava. A començaments dels anys noranta es va descobrir el fenomen de la cosupressió (supressió de l'expressió de dos gens en intentar sobreexpressar-se un dels dos), però el mecanisme responsable va romandre desconegut fins que Fire i Mello el van aclarir el 1998 en adonar-se que l'RNA de doble cadena causava una interferència potent i específica sobre l'expressió gènica.

58

PARAULES CLAU: silenciament gènic, expressió gènica, interferència gènica, RNA, RNA de doble cadena, transcripció, cosupressió.

### ABSTRACT

The 2006 Nobel Prize in Physiology or Medicine was awarded to two American geneticists, Andrew Z. Fire and Craig C. Mello, «for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA». A long held belief in the transcription field was the assumption that double-stranded DNA is transcribed into single-stranded RNA which in turn is translated into protein. The idea that RNA could also be double-stranded

was not considered. In the early 1990's the phenomenon of co-suppression has been discovered but the mechanism responsible for it remained unknown until Fire and Mello discovered it in 1998 finding that the double stranded mixtures caused potent and specific interference with gene expression.

KEY WORDS: gene silencing, gene expression, genic interference, RNA, double stranded RNA, transcription, co-suppression.

Durant molts anys en el camp de la transcripció es va donar per fet que el DNA de doble cadena és transcrit a RNA de cadena simple, el qual finalment és traduït a proteïna. La idea que l'RNA també podia ser de doble cadena ni tan sols es considerava. Les primeres indicacions que proposaven l'RNA com a modulador de l'expressió gènica les van trobar Napoli i col·laboradors a partir d'estudis duts a terme a començaments de la dècada de 1990,<sup>1</sup> en els quals havien intentat sobreexpressar un gen que regula la pigmentació dels pètals de les flors de petúnia. Sobreexpressant el gen que produeix la pigmentació porpra dels pètals de la flor, tots esperaven aconseguir flors amb un color porpra més intens. Es van sorprendre en constatar que les flors de la planta transgènica resultant no eren de color porpra sinó blanques o bé tenien regions blanques sobre el fons porpra del fenotip salvatge. Quan van examinar els nivells de RNA missatger van descobrir que a les plantes transgèniques que sobreexpressaven la pigmentació porpra, en comptes de trobar-hi un increment dels nivells de RNA missatger, n'hi trobaven cinquanta vegades menys. Curiosament, les expressions de tots dos gens (el salvatge i l'introduït) es trobaven suprimides. El fenomen es va anomenar *cosupressió*, però el mecanisme responsable romanien desconegut.

1. NAPOLI *et al.* (1990).

Malgrat que ja s'havia demostrat abans que la introducció de RNA a les cèl·lules podia disminuir la funció gènica,<sup>2</sup> aquest efecte es va atribuir a una funció antisentit de l'RNA introduït, de manera que l'RNA introduït s'unia a l'RNA salvatge tot produint la inactivació de l'RNA salvatge (interferència de l'RNA). L'any 1998, Andrew Z. Fire, Craig C. Mello i altres col·laboradors<sup>3</sup> estudiaven el mecanisme de la interferència de RNA en el nematode *Caenorhabditis elegans*. Van introduir RNA (sentit), RNA antisentit i RNA doble cadena (sentit + antisentit) per a un gen específic d'aquest nematode. Sorprenentment, van trobar que l'RNA de doble cadena era substancialment més efectiu en produir interferència que cap de les dues cadenes per separat. Van trobar que les cadenes simples purificades només produïen un efecte limitat, mentre que barreges de doble cadena causaven una interferència potent i específica sobre l'expressió gènica. Encara més intrigant resultava el descobriment que una quantitat petita de còpies de l'RNA de doble cadena podia interferir RNA molt abundants. Això indicava que el mecanisme d'acció no era un mecanisme antisentit. D'aquesta manera va néixer la història de la interferència de l'RNA i el 2006 Andrew Z. Fire i Craig C. Mello van rebre el Premi Nobel de Fisiologia o Medicina pel seu treball punter.

D'ençà de la publicació de l'article de Fire i Mello de 1998, ens hem adonat que, en la majoria dels organismes, a partir de precursors de doble cadena, es produeix una mena de RNA petit, que s'anomena *microRNA* (*miRNA*). Els miRNA tenen una llargada aproximada de 21 nucleòtids (nt) que en els sistemes mamífers sovint produeixen una repressió de la traducció de gens que codifiquen proteïnes. La maquinària enzimàtica implicada en la biogènesi dels miRNA es manté en

2. COGONI *et al.* (1996).

3. FIRE *et al.* (1998).

plantes i animals. El miRNA madur és processat a partir de molècules precursors llargues, pels enzims anomenats *droscha* ('sermó' en hebreu) i *dicer* (nom anglès d'un estri de cuina que serveix per tallar les verdures en bastonets o a daus). Inicialment, els miRNA són transcrits per la RNA-polimerasa II com a transcrits primaris llargs, que són tallats per una RNAa III endonucleasa, *droscha*, tot alliberant un bucle de ~60-70 nt que és conegut com a *pre-miRNA*.<sup>4</sup> Una vegada transcrit, el pre-miRNA es plega sobre ell mateix i forma un RNA de doble cadena que pren una forma semblant a la d'un clip per als cabells (*hairpin*). Després el pre-miRNA és transportat al citoplasma, on un segon enzim RNAa III, *dicer*, intervé en el processament final del miRNA tallant asimètricament el *hairpin* de doble cadena a ~22 nt del lloc de tall de *droscha*, i així allibera el miRNA madur.<sup>5</sup> *Dicer* també és l'enzim responsable del processament de RNA de doble cadena exògens per generar petits RNA inhibitoris (siRNA) de ~22 nt de llargada que poden intervenir en la interferència de RNA en animals.<sup>6</sup>

L'RNA *lin-4*, un gen que es coneix que controla el programa de desenvolupament de la larva de *Caenorhabditis elegans*, va ser el primer miRNA identificat, quan es va descobrir que no codificava per a cap proteïna sinó que produïa un petit RNA que donava lloc a una repressió de la traducció. Aquest resultat va obrir el camí per al descobriment d'una nova i abundant categoria de RNA reguladors no codificants: els miRNA.<sup>7</sup> La importància d'aquesta classe de RNA reguladors en la regulació gènica es va comprendre amb el descobriment d'un segon RNA regulador, el *let-7*,<sup>8</sup> així com amb el reconeixement posterior de tants altres miRNA i les respectives dia-

4. LEE *et al.* (2002); LEE *et al.* (2003); CULLEN (2004).
5. CARMELL i HANNON (2004); HUTVAGNER *et al.* (2001).
6. BERNSTEIN *et al.* (2001).
7. LEE *et al.* (1993); WIGHTMAN *et al.* (1993).
8. REINHART *et al.* (2000); SLACK *et al.* (2000).

nes de regulació. Es creu que els miRNA d'animals reconeixen els seus RNA missatgers diana per aparellament de bases incomplet, del qual resulta una inhibició de la traducció de la diana. Els miRNA de plantes són més exactament complementaris respecte a les seves dianes i actuen com a guia per tal d'iniciar la degradació del transcrit mitjançant la interferència de l'RNA.<sup>9</sup>

Les anàlisis de les localitzacions gèniques dels >200 miRNA de mamífer identificats respecte a les unitats de transcripció conegudes van revelar que la majoria (~70%) dels gens de miRNA s'originen a partir d'unitats de transcripció independents que sovint contenen agrupacions de miRNA.<sup>10</sup> Les funcions biològiques d'alguns dels miRNA han estat identificades en plantes i animals. S'ha vist que hi ha miRNA implicats en el control de la mort cel·lular i la proliferació cel·lular en mosques,<sup>11</sup> en la regulació de la diferenciació del llinatge hematopoètic en mamífers,<sup>12</sup> en el patronatge neuronal en nematodes<sup>13</sup> i en el control del desenvolupament de la fulla i la flor en plantes.<sup>14</sup> Més recentment, el descobriment que el miRNA *let-7* regula l'expressió del protooncogen RAS tant en *Caenorhabditis elegans* com en humans, juntament amb les observacions segons les quals els nivells d'alguns miRNA es veuen reduïts en una varietat de càncers, obre la possibilitat que alguns miRNA actuïn com a gens supressors de tumors.<sup>15</sup> Recentment hem aïllat un complex que contenia

9. PALATNIK *et al.* (2003); TANG *et al.* (2003).
10. RODRIGUEZ *et al.* (2004).
11. BRENNECKE *et al.* (2003); XU *et al.* (2003).
12. CHEN *et al.* (2003).
13. JOHNSTON i HOBERT (2003).
14. AUKERMAN *et al.* (2003); CHEN *et al.* (2004); EMERY *et al.* (2003); PALATNIK *et al.* (2003).
15. JOHNSON *et al.* (2005); GREGORY, R. I. i SHIEKHATTAR, R. (2005).

*droscha* i que constitueix la maquinària cel·lular responsable del processament del pri-miRNA a pre-miRNA.<sup>16</sup> Aquest complex, «microprocessador», conté *droscha* i la proteïna d'unió a RNA de doble cadena DGCR8, un gen deletat en la síndrome de DiGeorge.<sup>17</sup> La síndrome de DiGeorge produeix dèficits congènits al cervell i al cor i afecta un de cada 4.000 nounats.

Independentment si l'origen dels petits RNA de 21-23 nt és a partir del processament de miRNA endògens o de RNA de doble cadena exògens, els petits RNA resultants són incorporats com a RNA de cadena simple en un complex ribonucleoproteic, conegut com a *RISC* (complex de silenciament induït per RNA).<sup>18</sup> El complex *RISC* és guiat fins als mRNA diana pel siRNA o el miRNA i depenent del grau de complementarietat entre el petit RNA guia i la seva diana, té lloc un tall endonucleolític de l'mRNA o, si no, una repressió de la traducció. Si el siRNA o el miRNA és totalment complementari a la seva diana, l'endonucleasa de *RISC* talla l'mRNA en un lloc pròxim a la meitat de la complementarietat del siRNA (o miRNA), mesurant des de l'extrem 5' del siRNA i tallant entre els nucleòtids que s'aparellen en els residus 10 i 11 del siRNA.<sup>19</sup> Encara que *RISC* ha estat purificat en cèl·lules de mosca i humanes, la seva composició polipeptídica exacta roman desconeguda.<sup>20</sup> No obstant això, estudis recents han demostrat que la proteïna Argonauta2 (*Ago2*) és l'endonucleasa catalítica del complex *RISC*.<sup>21</sup>

16. GREGORY *et al.* (2004).

17. SHIOHAMA *et al.* (2003); YAMAGISHI i SRIVASTAVA (2003).

18. HAMMOND *et al.* (2001); SONTHEIMER i CARTHEW (2004).

19. ELBASHIR *et al.* (2001a); ELBASHIR *et al.* (2001b).

20. HAMMOND *et al.* (2001); HUTVAGNER i ZAMORE (2002); MARTÍNEZ *et al.* (2002).

21. LIU *et al.* (2004); MEISTER *et al.* (2004).

El genoma dels eucariotes està empaquetat en forma de cromatina, la unitat fonamental de la qual és el nucleosoma.<sup>22</sup> El nucleosoma està compost per ~146 pb de DNA enrotllats al voltant d'un octàmer d'histones que conté dues còpies de cada H2A, H2B, H3 i H4.<sup>23</sup> L'heterocromatina és diferent estructuralment i bioquímicament i és important per al manteniment de la integritat del genoma. Les histones associades a l'heterocromatina pateixen modificacions posttraduccionals diferents, incloent-hi metilació de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9).<sup>24</sup> Addicionalment, proteïnes especialitzades no histones estan associades amb aquestes configuracions repressives de cromatina. La proteïna d'unió a heterocromatina 1 (HP1) és reclutada per metilació H3K9 i és un component estructural de l'heterocromatina pericentromèrica en un alt nombre d'espècies divergents.<sup>25</sup>

64

Recentment s'ha trobat que components de la via de RNAi estan implicats en la regulació a escala de DNA i cromatina a *Arabidopsis*,<sup>26</sup> a *Drosophila*,<sup>27</sup> a *Tetrahymena*,<sup>28</sup> i a *Schizosaccharomyces pombe*.<sup>29</sup> Significativament, aquests diversos exemples tenen en comú que en cada organisme hi ha involucrat algun membre de la família argonauta; això reforça la hipòtesi que les proteïnes argonauta formen la subunitat central d'un nombre de complexos efectors diferents que utilitzen una seqüència específica de reconeixement per diri-

22. WOLFFE (1998).

23. LUGER *et al.* (1997).24. NAKAYAMA *et al.* (2001).

25. EISSENBERG i ELGIN (2000).

26. ZILBERMAN *et al.* (2003); CHAN *et al.* (2004).27. PAL-BHADRA *et al.* (2004).28. MOCHIZUKI *et al.* (2002).29. VOLPE *et al.* (2002); HALL *et al.* (2002).



gir-se ja sigui a RNA o a DNA.<sup>30</sup> Potser l'exemple més ben caracteritzat és el del centròmer a *Schizosaccharomyces pombe*. Curiosament, es va trobar que petits RNA inicien aquestes estructures d'heterocromatina, i estudis genètics van identificar tres gens de RNAi requerits: una RNA-polimerasa dirigida per RNA (Rbp1), *dicer*, i un membre de la família argonauta, Ago1, que està codificat per la fissió del llevat.<sup>31</sup> La deleció de qualsevol d'aquests gens resulta en una pèrdua del silenciament del gen reporter integrat en repeticions centromèriques.<sup>32</sup> A més a més, aquests RNAi mutants resulten en una reducció de la metilació H3K9, i en una deslocalització de Swi6 (l'ortòleg HP1 de llevat) respecte al centròmer. L'heterocromatina implica arranjaments en tàndem de repeticions d'una seqüència, les dues cadenes de DNA d'aquestes repeticions són transcrites<sup>33</sup> i aquests RNA de doble cadena són processats per *dicer* a petits RNA de ~22-25 nt, que es creu que serveixen com a guies per dirigir els complexos efectors de RNAi fins a la cromatina que conté repeticions.<sup>34</sup> *Dicer* també és necessària en cèl·lules de vertebrat per a la formació de l'heterocromatina centromèrica.<sup>35</sup> Recentment s'ha aïllat el complex d'iniciació del silenciament gènic transcripcional induït per RNA (RITS) a *Schizosaccharomyces pombe* i conté Ago1, la proteïna *chromodomain Chp1*, així com també Tas3, una proteïna de funció desconeguda, i siRNA, que són complementaris a les repeticions centromèriques.<sup>36</sup> RITS és necessari per a la formació de l'heterocromatina, encara que el mecanisme a través del qual RITS dirigeix la modificació

30. KIDNER i MARTIENSEN (2004).

31. VOLPE *et al.* (2002); HALL *et al.* (2002).

32. VOLPE *et al.* (2002).

33. VOLPE *et al.* (2002).

34. REINHART i BARTEL (2002).

35. FUKAGAWA *et al.* (2004); KANELLOPOULOU *et al.* (2005).

36. VERDEL *et al.* (2004).

d'histones i la formació d'heterocromatina és desconegut, de la mateixa manera que es desconeix si RITS s'uneix al DNA del gen diana o bé a l'RNA transcrit a partir de les posicions diana.

A part de la formació de l'heterocromatina centromèrica dirigida per RNAi en llevats, l'RNA de doble cadena adreçat a seqüències de DNA de promotors gènics desencadena silenciament transcripcional en plantes,<sup>37</sup> i informes recents suggereixen que aquesta via també podria existir en humans.<sup>38</sup> La introducció exògena de siRNA dirigits a illes CpG del promotor d'E-cadherina va resultar en una metilació del DNA, així com també una metilació de les histones (H3K9) de la regió del promotor, i això es correlacionava amb la regulació a la baixa de l'expressió gènica d'E-cadherina.<sup>39</sup>

#### CONCLUSIONS

Des del començament de la dècada del 2000 fins ara s'han descobert centenars de miRNA tant en plantes com en animals. La recerca actual està explorant els possibles papers d'aquests miRNA en desenvolupament i fisiologia. Aquest és un nou camp de recerca fascinant amb un ampli potencial per ajudar a entendre més bé la regulació gènica i per desenvolupar teràpies noves i eficaces.

#### BIBLIOGRAFIA

AUKERMAN, M. J.; SAKAI, H. (2003). «Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its

37. METTE *et al.* (2002).

38. KAWASAKI i TAIRA (2004); MORRIS *et al.* (2004).

39. KAWASAKI i TAIRA (2004).

- APETALA2-like target genes». *Plant Cell*, núm. 15, p. 2730-2741.
- BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M.; HANNON, G. J. (2001). «Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference». *Nature*, núm. 409, p. 363-366.
- BRENNECKE, J.; HIPFNER, D. R.; STARK, A.; RUSSELL, R. B.; COHEN, S. M. (2003). «Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*». *Cell*, vol. 113, p. 25-36.
- CARMELL, M. A.; HANNON, G. J. (2004). «RNAse III enzymes and the initiation of gene silencing». *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 11, p. 214-218.
- CHAN, S. W.; ZILBERMAN, D.; XIE, Z.; JOHANSEN, L. K.; CARRINGTON, J. C.; JACOBSEN, S. E. (2004). «RNA silencing genes control de novo DNA methylation». *Science*, núm. 303, p. 1336.
- CHEN, C. Z.; LI, L.; LODISH, H. F.; BARTEL, D. P. (2003). «MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation». *Science*, núm. 303, p. 83-86.
- CHEN, X. (2004). «A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development». *Science*, núm. 303, p. 2022-2025.
- COGONI, C.; IRELAND, J. T.; SCHUMACHER, M.; SCHMIDHAUSER, T. J.; SELKER, E. U.; MACINO, G. (1996). «Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation». *EMBO Journal*, núm. 15, p. 3153-3163.
- CULLEN, B. R. (2004). «Transcription and processing of human microRNA precursors». *Molecular Cell*, vol. 16, p. 861-865.
- EISSENBERG, J. C.; ELGIN, S. C. (2000). «The HP1 protein fami-

- ly: getting a grip on chromatin». *Current Opinion in Genetics & Development*, vol. 10, p. 204-210.
- ELBASHIR, S. M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. (2001a). «RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs». *Genes & Development*, vol. 15, p. 188-200.
- ELBASHIR, S. M.; MARTÍNEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. (2001b). «Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate». *EMBO Journal*, núm. 20, p. 6877-6888.
- EMERY, J. F.; FLOYD, S. K.; ÁLVAREZ, J.; ESHED, Y.; HAWKER, N. P.; IZHAKI, A.; BAUM, S. F.; BOWMAN, J. L. (2003). «Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes». *Current Biology*, vol. 13, p. 1768-1774.
- FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. (1998). «Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*». *Nature*, núm. 391, p. 806-811.
- FUKAGAWA, T.; NOGAMI, M.; YOSHIKAWA, M.; IKENO, M.; OKAZAKI, T.; TAKAMI, Y.; NAKAYAMA, T.; OSHIMURA, M. (2004). «Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells». *Nature Cell Biology*, núm. 6, p. 784-791.
- GREGORY, R. I.; YAN, K. P.; AMUTHAN, G.; CHENDRIMADA, T.; DOTRATOTAI, B.; COOCH, N.; SHIEKHATTAR, R. (2004). «The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs». *Nature*, núm. 432, p. 235-240.
- GREGORY, R. I.; SHIEKHATTAR, R. (2005). «MicroRNAs biogenesis and cancer». *Cancer Research*, núm. 65, p. 3509-3512.
- HALL, I. M.; SHANKARANARAYANA, G. D.; NOMA, K.; AYOUB, N.; COHEN, A.; GREWAL, S. I. (2002). «Establishment and maintenance of a heterochromatin domain». *Science*, núm. 297, p. 2232-2237.
- HAMMOND, S. M.; BOETTCHER, S.; CAUDY, A. A.; KOBAYASHI, R.; HANNON, G. J. (2001). «Argonaute2, a link between ge-

- netic and biochemical analyses of RNAi». *Science*, núm. 293, p. 1146-1150.
- HUTVAGNER, G.; ZAMORE, P. D. (2002). «A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex». *Science*, núm. 297, p. 2056-2060.
- HUTVAGNER, G.; McLACHLAN, J.; PASQUINELLI, A. E.; BALINT, E.; TUSCHL, T.; ZAMORE, P. D. (2001). «A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA». *Science*, núm. 293, p. 834-838.
- JOHNSON, S. M.; GROSSHANS, H.; SHINGARA, J.; BYROM, M.; JARVIS, R.; CHENG, A.; LABOURIER, E.; REINERT, K. L.; BROWN, D.; SLACK, F. J. (2005). «RAS is regulated by the let-7 microRNA family». *Cell*, vol. 120, p. 635-647.
- JOHNSTON, R. J.; HOBERT, O. (2003). «A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*». *Nature*, núm. 426, p. 845-849.
- KANELLOPOULOU, C.; MULJO, S. A.; KUNG, A. L.; GANESAN, S.; DRAPKIN, R.; JENUWEIN, T.; LIVINGSTON, D. M.; RAJEWSKY, K. (2005). «Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing». *Genes & Development*, vol. 19, p. 489-501.
- KAWASAKI, H.; TAIRA, K. (2004). «Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNA in human cells». *Nature*, núm. 431, p. 211-217.
- KIDNER, C. A.; MARTIENSSEN, R. A. (2004). «Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1». *Nature*, núm. 428, p. 81-84.
- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. (1993). «The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*». *Cell*, vol. 75, p. 843-854.
- LEE, Y.; JEON, K.; LEE, J. T.; KIM, S.; KIM, V. N. (2002). «MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization». *EMBO Journal*, núm. 21, p. 4663-4670.

- LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; CHOI, H.; KIM, J.; YIM, J.; LEE, J.; PROVOST, P.; RADMARK, O.; KIM, S.; KIM, V. N. (2003). «The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing». *Nature*, núm. 425, p. 415-419.
- LIU, J.; CARMELL, M. A.; RIVAS, F. V.; MARSDEN, C. G.; THOMSON, J. M.; SONG, J. J.; HAMMOND, S. M.; JOSHUA-TOR, L.; HANNON, G. J. (2004). «Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi». *Science*, núm. 305, p. 1437-1441.
- LUGER, K.; MADER, A. W.; RICHMOND, R. K.; SARGENT, D. F.; RICHMOND, T. J. (1997). «Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution». *Nature*, núm. 389, p. 251-260.
- MARTÍNEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; URLAUB, H.; LUHRMANN, R.; TUSCHL, T. «Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi». (2002). *Cell*, vol. 110, p. 563-574.
- MEISTER, G.; LANDTHALER, M.; PATKANIOWSKA, A.; DORSETT, Y.; TENG, G.; TUSCHL, T. (2004). «Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs». *Molecular Cell*, vol. 15, p. 185-197.
- METTE, M. F.; VAN DER WINDEN, J.; MATZKE, M.; MATZKE, A. J. (2002). «Short RNAs can identify new candidate transposable element families in *Arabidopsis*». *Plant Physiology*, vol. 130, p. 6-9.
- MOCHIZUKI, K.; FINE, N. A.; FUJISAWA, T.; GOROVSKY, M. A. (2002). «Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena*». *Cell*, vol. 110, p. 689-699.
- MORRIS, K. V.; CHAN, S. W.; JACOBSEN, S. E.; LOONEY, D. J. (2004). «Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells». *Science*, núm. 305, p. 1289-1292.
- NAKAYAMA, J.; RICE, J. C.; STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D.; GREWAL, S. I. (2001). «Role of histone H3 lysine 9 methylation in

- epigenetic control of heterochromatin assembly». *Science*, núm. 292, p. 110-113.
- NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. (1990). «Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans». *Plant Cell*, vol. 2, p. 279-289.
- PAL-BHADRA, M.; LEIBOVITCH, B. A.; GANDHI, S. G.; RAO, M.; BHADRA, U.; BIRCHLER, J. A.; ELGIN, S. C. (2004). «Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery». *Science*, núm. 303, p. 669-672.
- PALATNIK, J. F.; ALLEN, E.; WU, X.; SCHOMMER, C.; SCHWAB, R.; CARRINGTON, J. C.; WEIGEL, D. (2003). «Control of leaf morphogenesis by microRNAs». *Nature*, núm. 425, p. 257-263.
- REINHART, B. J.; SLACK, F. J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A. E.; BETTINGER, J. C.; ROUVIE, A. E.; HORVITZ, H. R.; RUVKUN, G. (2000). «The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*». *Nature*, núm. 403, p. 901-906.
- REINHART, B. J.; BARTEL, D. P. (2002). «Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats». *Science*, núm. 297, p. 1831.
- RODRÍGUEZ, A.; GRIFFITHS-JONES, S.; ASHURST, J. L.; BRADLEY, A. (2004). «Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units». *Genome Research*, vol. 14, p. 1902-1910.
- SLACK, F. J.; BASSON, M.; LIU, Z.; AMBROS, V.; HORVITZ, H. R.; RUVKUN, G. (2000). «The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor». *Molecular Cell*, vol. 5, p. 659-669.
- SHIOHAMA, A.; SASAKI, T.; NODA, S.; MINOSHIMA, S.; SHIMIZU, N. (2003). «Molecular cloning and expression analysis of a

- novel gene DGCR8 located in the DiGeorge syndrome chromosomal region». *Biochemical and biophysical research communications*, núm. 304, p. 184-190.
- SONTHEIMER, E. J.; CARTHEW, R. W. (2004). «Molecular biology. Argonaute journeys into the heart of RISC». *Science*, núm. 305, p. 1409-1410.
- TANG, G.; REINHART, B. J.; BARTEL, D. P.; ZAMORE, P. D. (2003). «A biochemical framework for RNA silencing in plants». *Genes & Development*, vol. 17, p. 49-63.
- VERDEL, A.; JIA, S.; GERBER, S.; SUGIYAMA, T.; GYGI, S.; GREWAL, S. I.; MOAZED, D. (2004). «RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex». *Science*, núm. 303, p. 672-676.
- VOLPE, T. A.; KIDNER, C.; HALL, I. M.; TENG, G.; GREWAL, S. I.; MARTIENSEN, R. A. (2002). «Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi». *Science*, núm. 297, p. 1833-1837.
- WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. (1993). «Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*». *Cell*, vol. 75, p. 855-862.
- WOLFFE, A. (1998). *Chromatin: Structure and function*. San Diego, California: Academic Press.
- XU, P.; VERNOOY, S. Y.; GUO, M.; HAY, B. A. (2003). «The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism». *Current Biology*, vol. 13, p. 790-795.
- YAMAGISHI, H.; SRIVASTAVA, D. (2003). «Unraveling the genetic and developmental mysteries of 22q11 deletion syndrome». *Trends in Molecular Medicine*, vol. 9, p. 383-389.
- ZILBERMAN, D.; CAO, X.; JACOBSEN, S. E. (2003). «ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation». *Science*, núm. 299, p. 716-719.