



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Metabolismo, función y regulación de RNAs no codificantes

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área de CIENCIAS BIOLOGICAS

Federico Fuchs Wightman



Federico Fuchs W.
DNI 37.141.270

Director de tesis: Dr. Manuel de la Mata

Consejero de estudios: Dra. Anabella Srebrow

Lugar de trabajo: IFIBYNE (UBA-CONICET)

Buenos Aires, 2023



Manuel de la Mata
Investigador adjunto, IFIBYNE-UBA-CONICET.
Jefe de trabajos prácticos, FBMC-FCEN-UBA.
e-mail: mmata@fbmc.fcen.uba.ar

Metabolismo, función y regulación de RNAs no codificantes

Resumen

Los ARNs circulares (*circRNAs*) han sido propuestos como "esponjas" o bloqueadores de *microRNAs*, una propiedad compartida con los ARNs lineales. Alternativamente, ciertos ARNs inducen la degradación de *microRNAs* a través del proceso de Degradación de *microRNAs* Dirigida por su ARN blanco (*Target Directed MicroRNA Degradation*, o TDMD). Se desconoce si los transcritos lineales y circulares son equivalentes a la hora de desencadenar el mecanismo de TDMD. En este trabajo, demostramos que la topología del ARN puede ser determinante para la vía de TDMD. A través de un nuevo sistema que expresa un *circRNA* mientras se reduce el ARN lineal coexpresado, demostramos que los *circRNAs* difieren en su capacidad de desencadenar TDMD en relación a sus contrapartes lineales: algunos ARNs circulares no pueden inducir TDMD mientras que las secuencias lineales equivalente sí, y viceversa en otros casos. Ampliamos esta noción al examinar al par previamente bien estudiado de miR-7 y *Cdr1as*. Basándonos en el conocimiento anterior de que el ARN circular *Cdr1as* protege a miR-7 del TDMD mediado por Cyrano, demostramos que tanto la depleción de *Cdr1as* como la sobreexpresión de una versión lineal artificial de *Cdr1as* impulsan la degradación de miR-7, consistente con una actividad de TDMD diferencial entre ambas topologías. Al analizar los datos de secuenciación de ARN de un sistema de diferenciación neuronal, detectamos posibles eventos de regulación post-transcripcional de *microRNA* mediados por *circRNAs*, que sugieren que este tipo de regulación puede estar más extendido de lo que se pensaba anteriormente.

Palabras clave: ARNs circulares/ microARNs/ TDMD/ Esponja

Metabolism, function and regulation of non-coding RNAs

Abstract

Circular RNAs (circRNAs) have been proposed to “sponge” or block microRNAs, a property shared with linear RNAs. Alternatively, certain RNAs induce microRNA destruction through the process of Target RNA-Directed MicroRNA Degradation (TDMD). Whether both linear and circular transcripts are equivalent in driving TDMD is unknown. Here we show that RNA topology may be determinant for TDMD. Through a novel system that expresses a circRNA while reducing the co-expressed cognate linear RNA, we show that circRNAs differ in their ability to trigger TDMD relative to their linear counterparts: some circular RNAs cannot induce TDMD while their linear equivalent sequences can, and vice versa in other cases. We further explored this notion by seizing the previously well studied pair of miR-7 and *Cdr1as*. Based on the previous knowledge that *Cdr1as* circular RNA protects miR-7 from Cyrano-mediated TDMD, we demonstrate that both depletion of *Cdr1as* and overexpression of an artificial linear version of *Cdr1as* drive miR-7 degradation, consistent with a differential TDMD activity between topologies. By analysing RNA sequencing data of a neuron differentiation system, we detect potential events of circRNA-mediated post-transcriptional microRNA regulation, suggesting that this kind of regulation might be more widespread than originally thought.

Keywords: circRNAs/ microRNAs/ TDMD/ Sponge

Agradecimientos

Una cuestión de oportunidades

Hacer un doctorado, especialmente uno atravesado por una pandemia, es un desafío muy grande para cualquiera que se lo proponga. Es largo, frustrante y difícil, aunque, a pesar de todo, pude disfrutarlo mucho. La realidad es que el poder sentarme a escribir esto y, en retrospectiva, reconocer a esta etapa como una de las más felices de mi vida, tiene más que ver con el mérito de otras personas que con el mío. Es a eso a lo que me refiero con el subtítulo *una cuestión de oportunidades*.

La primera y más obvia oportunidad es haber podido estudiar una carrera que me apasiona (biología), y luego continuar profundizando en eso con un doctorado. Argentina es, sin duda, un país lleno de defectos, pero también es un país que a mí me brindó educación pública y gratuita de altísimo nivel, y la posibilidad de hacer un doctorado becado, a través de la maravillosa Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, IFIBYNE, CONICET y ANPCyT. Estas instituciones, que a veces uno da por sentado, **son una fábrica de oportunidades sin las cuales yo nunca hubiese llegado a hacer esta tesis.**

Desde lo personal, si de mérito individual se trata, la primera vez que me presenté a una beca CONICET fui rechazado. Hubo dos personas que vieron algo en mí a pesar de mi fracaso y decidieron, beca ANPCyT mediante, darme una nueva oportunidad. Mi director, el Dr. Manuel De la Mata, y la Dra. Anabella Srebrow. **Yo estaba listo para dejar la ciencia, pero ellos decidieron no soltarme la mano.** Espero haber estado a la altura.

La posibilidad de doctorarme no fue solamente una instancia de formación académica e intelectual. Yo tuve la oportunidad de entrar a un laboratorio rodeado por un grupo de personas que brindó las condiciones necesarias para sacar lo mejor de mí, tanto desde un punto de vista profesional como humano. Por haber empezado ese grupo y haber generado la cultura laboral y humana que lo caracteriza, entre muchas otras cosas, le agradezco al Dr. Alberto Kornblihtt. Por haberlo continuado, expandido y potenciado, les agradezco a los ya nombrados Anabella y Manu, y también a los Dres.

Ezequiel “Petry” Petrillo, Vale Buggiano, Nolo Muñoz, Nacho Schor y Lu Giono. **Su infinita ayuda, orientación, paciencia, motivación, inspiración y cariño hizo posible todo lo que hice y potenciará todo lo que haré.**

Sin embargo, no fueron solo los directores quienes me llevaron hacia buen puerto. Tuve la suerte de entrar y poder aprender (y disfrutar) de becarios, investigadores y técnicos que me ayudaron a integrarme y a hacer prácticamente todo lo que hice, como Guilli Kubaczka, Lau Bragado, Berta “La Gringa” Pozzi, Mica Godoy, Pablito Mammi, Pepe Clemente, Ine Patop, Martu García Sola, Silvio Traba, Nico Nieto, Lucho Marasco, Esteban Cardinaux, Amaranta Avendaño y Orlandito Andrada, como también de otros contemporáneos (o más chicos) como Mari Ayre, JC Muñoz, Lukaku Servi, Pocho Gaioli, Ine Beckerman, Meli Magalnik, Pepito Stigliano, Martin lungman, Cami Arcushin, Flor Rodriguez, Rochi Tognacca, Adri Botto, Eze Nazer, Peter Salaberry, Nacho Burgos, Agus Romero, Eve Olszanowski y tantos nuevos jóvenes que están empezando. También destaco al grupo del Dr. Iusem, el primer laboratorio de biología molecular que me abrió las puertas (en tiempos de mi tesis de licenciatura) y en donde hice mis primeras herramientas, especialmente a Marti Ricardi mi entonces director. Haber tenido la oportunidad de trabajar con todos ellos, y tantos otros integrantes del IFIBYNE, fue, en gran parte, lo que hizo de mi día a día una experiencia tan feliz y, obviamente, formativa. **A veces, la diferencia entre llegar a un resultado o no, es que un amigo se quede con vos hasta medianoche cebándote mates, te coseche células un domingo o te enseñe a analizar datos de una nueva manera;** nada hubiera sido posible sin ellos.

Por otra parte, también a través de mi director Manu, **tuve la oportunidad de colaborar y conocer grupos de otros institutos y países**, permitiendo enriquecer incalculablemente la investigación y mi formación. Agradezco profundamente a los grupos del Dr. Refojo en IBIOBA (especialmente a Jero Lukin, Sebas Giusti y el propio Damian), del Dr. Wilusz en Baylor College of Medicine, de la Dra. Ventura en el IFIBYNE, del Dr. Schratt en ETH-Zurich y del Dr. Fededa en UNSAM. También a investigadores y referentes que tuve el gusto de conocer en congresos, cursos o *workshops*, de quienes pude aprender y recibir invaluable ayuda como la Dra. Graciela Boccaccio y el Dr. Fede Ariel.

En línea con lo comentado arriba, destaco la inmensa oportunidad que significó para mí poder ser dirigido por el Dr. Manuel De la Mata. Desde que empecé a estudiar, escucho a becarios quejarse de distintos problemas con sus directores. Lo he escuchado en Argentina y en el exterior, en becarios de licenciatura, doctorales o post docs. Algunos problemas graves y otros no, recurrentes o esporádicos, de todo tipo, pero nunca me pude identificar con ninguno. Yo no soy una persona fácil, soy gravemente neurótico, tengo baja tolerancia a la frustración, un temperamento particular y, sin embargo, **mi director siempre encontró la forma de mantenerme motivado, calmo y alegre, fue una fuente interminable de ideas, de confianza y de ayuda hasta para ponerse a pipetear codo a codo en un fin de semana.** No puedo estar más agradecido por haber tenido la chance de formar parte de su laboratorio y aprovecho para incluir también a los otros miembros del grupo, Marquitos Palavecino, Luz Pierelli, Maru Gándara y Fausti Salgado. A las chicas, que están empezando su camino, solo puedo recomendarles aprovechar al máximo al mejor director que les podía tocar.

Además, durante la experiencia de desarrollo y testeo en la pandemia de COVID-19, a pesar de tratarse de circunstancias muy tristes y estresantes, tuve la oportunidad de aprender a trabajar de formas muy distintas, conociendo mucha gente a la que siempre le estaré agradecido por permitirme ser parte de sus aportes: el equipo de @Anti__Fakenews, a los integrantes del equipo de testeo en INBIRS y los integrantes del equipo de desarrollo en IFIBYNE. Todos ellos con **su apoyo y sus enseñanzas aliviaron enormemente la carga de una circunstancia compleja y me ayudaron a generar herramientas poco convencionales para un estudiante doctoral, pero que hoy agradezco profundamente tener.**

No obstante, las oportunidades para mí empezaron un largo tiempo antes de ser un estudiante universitario. Fui y soy un privilegiado, sin importar por donde se lo mire. Tuve la posibilidad de ir al colegio, de estudiar, de trabajar y de conocer muchos de los lugares más bellos del mundo, y no puedo dejar de agradecerle a mi familia y a mis amigos por eso. Mis padres, Alejandro y Carina, y mi hermana, Camila, **construyeron un mundo en el que me fue posible desarrollarme profesionalmente y ser feliz, a pesar de todas mis limitaciones.** Pero no lo hicieron solos: mis abuelos, Jorge, Tritri,

Tita, Pepe, Gerry y Bibi; mis tíos, Carito y el Pelle, Gaby y Hugo, Picho y Myri, Andy y Axel, Pauli y Lily, Ricky, Juli, Gra y Alex, Na y Willy, y Xime; mis primos, Tify, JP y Joha, el Melli, Luni y Rami, Manu y Sancho, Jose y Joa, Umi y Sofi, Loli, Lupe y Teo, Viole, Miru y Jo, Ian y Marco, Isa, Ine y Herni; mis amigos, Abra, Santi, Tintin, Suis, Jordi, Gulu, Brai, Gaba, Gasty, Lucho, Lemos, Ivito, Bru, el Kbe, Ardi, Matata, Diegui, Yamiro, Randy, Lama, Emita, Fabini, los muchachos del club (Mati, Hory, Gonza, la +19/25, los veteranos y todos los demás), los del futbol (Jauser y MVL) y el tenis, los de Aspen, los de Zárate (Cianchis y Molens), y los de la vida; mi familia en Houston, Alan, Lee y Michael, y en Colombia; mi padrino Luisito; mi segunda madre Mari; mi psico Norberto. Gracias a todos ellos, **en mi cabeza nunca existieron los imposibles, pero no porque tuviera algún talento especial, sino porque los vi a ellos hacerlo todo antes.** Los vi (o los escuché) estudiar en universidades de renombre mundial, terminar no una sino dos carreras, trabajar día y noche apasionadamente, desarrollarse laboralmente en Argentina o en el exterior, en el deporte y en la vida, innovar, transformar y hasta sobrevivir una guerra mundial. También los vi divertirse, enamorarse, pelearse, contenerse y no dejar de seguir empujando. Por ellos nunca me sentí solo, nunca sentí que no me iba a alcanzar la energía, porque **me enseñaron a creer que no había nada que no pudiera hacer y esa es una de las oportunidades más grandes que a uno le pueden dar.**

Vivimos en una sociedad que tiende a dar premios individuales a esfuerzos colectivos. No es mi intención cambiar todo el sistema en el que vivimos con esta tesis, pero espero haber dejado tan claro como me es posible que el trabajo aquí expuesto es el reflejo del esfuerzo, la pasión y el cariño de muchas más personas que quien escribe. El verdadero determinante de esta investigación estuvo más relacionado con las interminables oportunidades que aportó dicho grupo de personas, que con cualquier aporte que haya salido de mí. A todos ellos les estaré eternamente agradecido por haberme hecho quien soy, espero haber sido digno de todo lo que me dieron, **todo lo que hice y lo que vaya a hacer en mi carrera solamente fue (y va a ser) posible gracias a las posibilidades que generaron para mí.** Espero que sepan, también, que voy a trabajar toda mi vida para intentar, de una manera u otra, retribuirlo.

"The more I see, the less I know" – Red Hot Chili Peppers

Índice

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
AGRADECIMIENTOS	4
UNA CUESTIÓN DE OPORTUNIDADES	4
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y TRADUCCIONES	12
INTRODUCCIÓN	13
ARNs NO CODIFICANTES	13
LOS MICRORNAs	14
DEGRADACIÓN DE MICRORNAs	16
IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE TDMD	17
ARQUITECTURA DE LOS SITIOS TDMD Y PREDICCIÓN	18
TDMD ES MEDIADO POR LA ENZIMA ZSWIM8	20
ALARGAMIENTO Y RECORTE DE MICRORNAs DURANTE TDMD	21
CAMBIOS ESTRUCTURALES EN AGO DURANTE TDMD	22
ARNs CIRCULARES	22
ARNs CIRCULARES COMO ESPONJAS DE MICRORNAs	23
OBJETIVOS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS	27
<i>CDR1As</i> Y miR-7	27
ARNs CIRCULARES ARTIFICIALES EN VECTORES LENTIVIRALES	28
ARNs CIRCULARES ARTIFICIALES GENÉRICOS EN pCDNA 3.1	28
ARNs CIRCULARES ARTIFICIALES CON SITIOS PARA <i>MICRORNAs</i> EN pCDNA 3.1	29

FLAG/HA-AGO2	29
CULTIVO CELULAR Y TRANSFECCIONES TRANSITORIAS	30
PRODUCCIÓN DE LENTIVIRUS	30
ANIMALES USADOS EN ESTE ESTUDIO	31
CULTIVO NEURONALES Y TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL	31
TRANSFECCIÓN E INMUNOPRECIPITACIÓN DE FLAG/HA-AGO2 (AGO2 RIP)	32
FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR	32
EXTRACCIÓN DE ARN	33
CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-qPCR	33
NORTHERN BLOT	34
WESTERN BLOT	35
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS INTERACCIONES ENTRE CIRCARNAS Y MIRNAS	36
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO PARA PREDECIR SITIOS CON ARQUITECTURA TDMD EN CIRCARNAS	38
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS TARGETS DE MIR-7 Y MIR-181b/d	38
RESULTADOS	39
SECCIÓN I: MEJORANDO LA EXPRESIÓN DE CIRCARNAS ARTIFICIALES.	39
COMPARACIÓN ENTRE PROMOTORES (CMV, SV40, TRE o PGK)	42
COMPARACIÓN ENTRE INTRONES FLANQUEANTES (ZKSCAN1 vs. LACCASE2)	45
EFFECTO DE LA ADICIÓN DE UN SITIO DE MIR-92A-3P EN LA ISOFORMA LINEAL	45
TRADUCCIÓN DEL <i>CIRCRNA</i> ARTIFICIAL	48
VALIDACIÓN DEL SISTEMA DE DEGRADACIÓN DE LA ISOFORMA LINEAL EN NEURONAS	53
SECCIÓN II: EVALUANDO EL EFECTO DE LA TOPOLOGÍA DEL TARGET SOBRE LA ESTABILIDAD DE LOS MICRORNAS.	57
ARNs CIRCULARES EXÓGENOS Y TDMD EN CÉLULAS HEK293T	57
ARNs CIRCULARES EXÓGENOS Y TDMD EN NEURONAS	60
INTERACCIÓN FÍSICA ENTRE <i>CIRCRNA</i> Y <i>MIRNA</i> , Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	64
CASO ENDÓGENO: INFLUENCIA DE LA TOPOLOGÍA EN LA INTERACCIÓN ENTRE <i>CDR1AS</i> Y MIR-7	68
GENERALIZANDO LO APRENDIDO: REDES DE INTERACCIÓN ENTRE <i>CIRCARNAS</i> Y <i>MIRNAS</i> EN DIFERENCIACIÓN NEURONAL	74
	10

LOS <i>MICRORNAs</i> MÁS “ESPONJEADOS” ESTÁN ENRIQUECIDOS EN SITIOS CON ARQUITECTURA DE INTERACCIÓN TIPO TDMD	78
SECCIÓN III: ELUCIDANDO EL MECANISMO DE DEGRADACIÓN DE LOS <i>MICRORNAs</i> (TDMD)	82
PRUEBA DE CONCEPTO DEL FUNCIONAMIENTO DEL REPORTERO	84
DETENIMIENTO DEL PROYECTO	86
<u>DISCUSIÓN</u>	88
RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	88
DIFERENCIAS FUNCIONALES ENTRE LAS TOPOLOGÍAS LINEAL Y CIRCULAR	91
TDMD Y LOS <i>CIRC</i>RNAs COMO REGULADORES DE <i>MIRNAs</i>	92
EFFECTOS RÍO ABAJO SOBRE LOS TARGET CANÓNICOS REGULADOS POR LOS <i>MIRNAs</i>	94
ALCANCE Y LIMITACIONES DE ESTE ESTUDIO	98
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	99
<u>APÉNDICE</u>	112
TABLA SUPLEMENTARIA I	112
TABLA SUPLEMENTARIA III	113
TABLA SUPLEMENTARIA III	114

Abreviaturas, acrónimos y traducciones

- *circRNA*: ARN circular.
- *miRNA* o *microRNA*: microARN.
- *mRNA*: ARN mensajero.
- *Target*: refiere a un ARN con el que interactúa un dado *microRNA*.
- TDMD son las siglas en inglés de *Target directed microRNA degradation*, o degradación del *miRNA* mediada por su *target* en español.
- *Knockout/down*: refiere a una intervención que produce la disminución (*knockdown*) o completa remoción (*knockout*) de la expresión de un dado gen. A lo largo del trabajo se utilizará alternativamente la castellanización *noqueo*.
- *Slicing*: refiere a la acción de corte mediada por la interacción entre un dado *microRNA* y un *target*, cuando el sitio de interacción tiene perfecta complementariedad.
- *Bulged (WT)*: refiere a un sitio de interacción entre un *miRNA* y su *target*, donde sucede una complementariedad extendida hacia el extremo 3' del *miRNA*, pero con una "joroba" de bases no apareadas en el medio.
- *Seed-mut*: refiere a un sitio de interacción entre un *miRNA* y su *target*, donde la secuencia semilla del *miRNA* se encuentra mutada, provocando la no funcionalidad del sitio.
- RISC: complejo de silenciamiento inducible por RNA o *RNA inducible silencing complex*, en inglés.
- *Splicing*: corte y empalme. En el *backsplicing* los sitios dador y aceptor de *splicing* se invierten.
- *Ratio*: cociente.

Introducción

En esta tesis, los resultados se encontrarán articulados en tres secciones, todas vinculadas principalmente con dos tipos de ARNs llamados *microRNAs* (*miRNAs*) y ARNs circulares (*circRNAs*), y su interacción. Las particularidades de ambas clases de ARN se abordarán con detalle a continuación.

En la primera sección, se describirá el desarrollo de herramientas necesarias para poder abordar las preguntas biológicas correspondientes a la segunda sección. En particular, se produjeron construcciones capaces de sobreexpresar ARNs circulares en forma más abundante y limpia que las pre-existentes, en parte a través de degradar selectivamente a la isoforma lineal generada en la transcripción y procesamiento del *pre-mRNA*.

En la segunda sección, se describirá el efecto que la sobreexpresión de ARNs circulares artificiales o ARNs circulares endógenos tienen sobre la estabilidad de *microRNAs* particulares.

En la tercera sección, se describirá la puesta a punto de un *screening* cuyo objetivo era elucidar el mecanismo de degradación de *microRNAs*.

Para introducir los conceptos necesarios para abordar las tres secciones, es necesario empezar por situar a los *microRNAs* y a los ARNs circulares como parte de una superfamilia de ARNs llamada *ARNs no codificantes*.

ARNs no codificantes

Todas las células que componen la vida de este planeta guardan su información genética en moléculas de doble cadena de Ácido Desoxirribonucleico (ADN). El ADN, además de replicarse, necesita ser *expresado* con el objetivo de guiar la síntesis de otras moléculas en la célula. El primer paso mediante el cual se materializa dicha expresión es conocido como *transcripción*, durante la cual se sintetiza un polímero bioquímicamente cercano al ADN, llamado Ácido Ribonucleico (ARN), usando fragmentos de ADN como templado (Alberts et al., 2014). A su vez, algunos de los ARNs transcriptos pueden ser usados como templado para la síntesis de proteínas, en un

proceso conocido como *traducción* (Alberts et al., 2014). Este tipo de ARN es conocido como ARN mensajero (*mRNA*), y fue el principal foco de atención de la biología molecular moderna en sus inicios. En contraposición, el resto de los ARNs que no contenían información para sintetizar proteínas, los ARNs no codificantes (*ncRNAs*), fueron mayormente ignorados hasta hace relativamente poco tiempo. Sin embargo, los estudios que se fueron acumulando, especialmente durante los últimos 30 años, expandieron a niveles previamente inimaginables el abanico de funciones y regulaciones en las que participa esta clase de moléculas (Cech and Steitz, 2014; Slack and Chinnaiyan, 2019). Partiendo del entendimiento de la mecánica traduccional basada en ARNs ribosomales (*rRNAs*) y de transferencia (*tRNAs*) en la década de 1950, pasando por el descubrimiento de los ARNs pequeños nucleares (*snRNAs*) como partícipes del *splicing* en los 80', la "revolución" en el estudio de estas moléculas se aceleró especialmente a partir del año 2000, empujada por la emergencia de los *microRNAs* (*miRNAs*), los ARNs largos no codificantes (*lncRNAs*) y los ARNs circulares (*circRNAs*), entre otros (Cech and Steitz, 2014; Slack and Chinnaiyan, 2019).

A lo largo de esta tesis, la atención se centrará principalmente en el estudio de la estabilidad y la función de los *microRNAs*, su mecanismo de degradación y los potenciales efectos de su interacción con ARNs circulares, en el contexto de células animales.

Los *microRNAs*

Los *microRNAs* son pequeñas moléculas regulatorias, de alrededor de 22 nucleótidos de largo, que dirigen la represión postranscripcional de ARNs mensajeros a lo largo y a lo ancho de tejidos y organismos en el vasto árbol evolutivo (Bartel, 2018). La mayor parte de los *microRNAs* son derivados de intrones o exones de transcritos primarios no codificantes sintetizados por la ARN polimerasa II (Cai et al., 2004; Lee et al., 2003). Existen excepciones, como la familia *Mir449a-c*, proveniente de intrones de transcritos primarios codificantes (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001). El primer transcripto generado (*pri-miRNA*), usualmente largo, tiene una estructura secundaria con forma de "horquilla", que es reconocida por el complejo Microprocessor en el núcleo, formado por Drosha y DGCR8. La actividad catalítica de

tipo ARNasa III (*RNase III*) sobre sustratos de ARN doble cadena de Drosha, procesa el *pri-miRNA* dejando una nueva horquilla recortada (*pre-miRNA*) (Lee et al., 2003). El *pre-miRNA* es exportado al citoplasma por Exportin-5 (Bohnsack et al., 2004; Yi et al., 2003), y sufre una segunda ronda de clivaje por Dicer, otra enzima con actividad de ARNasa tipo III (Bernstein et al., 2001; Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001). El corte en ambas hebras del *pre-miRNA* por Dicer permite liberarse de la horquilla, dejando un dúplex que es cargado en una proteína Argonauta (AGO), con ayuda de HSC70/HSP90 (Iwasaki et al., 2010; Miyoshi et al., 2010; Zhang et al., 2004). Luego, la llamada hebra “pasajera” del dúplex (también conocida como *miRNA**) es expulsada y degradada, para que AGO adopte una conformación RISC (complejo de silenciamiento inducible por ARN o *RNA inducible silencing complex*, en inglés) estable que carga a la hebra “guía” remanente (Khvorova et al., 2003; Liu et al., 2003; Tomari et al., 2004) (**Figura I1**). En algunos casos, ambas hebras del dúplex pueden terminar siendo cargadas en complejos RISC maduros. Por otra parte, algunos *miRNAs* se sintetizan por vías no canónicas, como los que son codificados en intrones completos (*mirtrons*) que saltan al complejo Microprocessor o miR-451, un *miRNA* cuya síntesis elude el clivaje por Dicer (Ha and Kim, 2014).

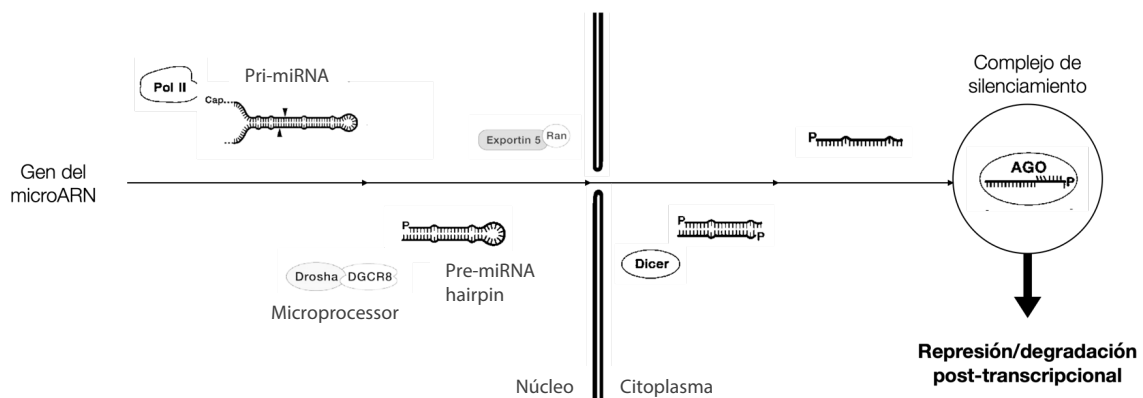


Figura I1: esquema ilustrativo de la vía de síntesis canónica de los *microRNAs*. Típicamente, una primera horquilla (*pri-miRNA*) es sintetizada en el núcleo por la ARN Polimerasa II, sufre una primera ronda de clivaje por el complejo Microprocessor, luego es exportada por Exportin-5, para sufrir una segunda ronda de corte por Dicer, dejando un dúplex que será cargado en AGO. Al complejo formado por AGO con el *miRNA* cargado se lo conoce como RISC y

puede ejercer represión/degradación de transcritos a nivel post-transcripcional. Adaptado de Bartel, 2018 (Bartel, 2018).

Ya sea mediante la vía canónica de síntesis o una alternativa, una vez formado el complejo RISC de silenciamiento, este “escanea” transcritos guiado por la secuencia del *microRNA* cargado. En animales, los blancos o *targets* son reconocidos, en mayor medida, por el apareamiento de secuencias de la región “semilla”, compuesta por las posiciones 2-7 del extremo 5' del *miRNA* (Bartel, 2018). Una vez que el transcrito apuntado es reconocido, normalmente en su 3' UTR, RISC recluta al complejo GW182, que interactúa con PABPC (Eulalio et al., 2008; Fabian et al., 2009). Este encuentro gatilla la vía de deadenilación por los complejos CCR4-NOT o PAN2-PAN3, que acortan la cola de poli-A del *mRNA* (Jonas and Izaurralde, 2015; Wahle and Winkler, 2013; Yamashita et al., 2005). Dependiendo del contexto fisiológico, dicho acortamiento puede inducir la inhibición de la traducción, la remoción del 5' CAP y la degradación del *target* (Jonas and Izaurralde, 2015).

Tanto la vía de síntesis de los *microRNAs*, como su función canónica, se encuentran estudiadas con cierta profundidad, mientras que mucho menos se conoce respecto de su mecanismo de degradación, recién investigado desde hace poco más de 10 años.

Degradación de *microRNAs*

La razón que explica el tardío interés en el decaimiento radica en que los *microRNAs* son generalmente estables, con tiempos de vida media de días (Bail et al., 2010; Gantier et al., 2011; van Rooij et al., 2007). El posterior descubrimiento de excepciones a esa estabilidad para ciertos *miRNAs* específicos, incluyendo ejemplos en neuronas (Krol et al., 2010; Rajasethupathy et al., 2009; Sethi and Lukiw, 2009), ciclo celular (Rissland et al., 2011) e infecciones virales (Buck et al., 2010; Demián Cazalla, Therese Yario, 2010; Lee et al., 2013; Marcinowski et al., 2012), abrió un abanico de preguntas respecto de su mecanismo de degradación.

El primer paso para elucidar dicho mecanismo fue el descubrimiento, en *Drosophila*, que determinados transcritos con sitios de unión a *microRNAs* podían gatillar su degradación, en contraposición con el caso canónico de silenciamiento (Ameres et al.,

2010). Esta característica le dio el nombre de **degradación de *microRNAs* dirigida por su target** (*Target directed microRNA degradation* o TDMD, en inglés). Durante TDMD, el decaimiento del *miRNA* no se debe a variaciones en sus niveles de transcripción ni procesamiento, sino a la degradación activa del *microRNA* maduro cargado en *Argonauta* (AGO) (De la Mata et al., 2015; Demián Cazalla, Therese Yario, 2010; Kleaveland et al., 2018). A diferencia de lo que sucede en las interacciones canónicas entre *miRNAs* y *targets*, mayormente limitadas a la secuencia semilla, en TDMD, la complementariedad de bases se extiende hacia el extremo 3' del *microRNA*, con una "joroba" o "bulto" no complementaria en el medio (Fuchs Wightman et al., 2018). Esta arquitectura de interacción extendida invierte el resultado de la interacción entre *target* y *miRNA*, dando lugar a la degradación del *miRNA* en lugar del silenciamiento del *target* (**Figura I2**).

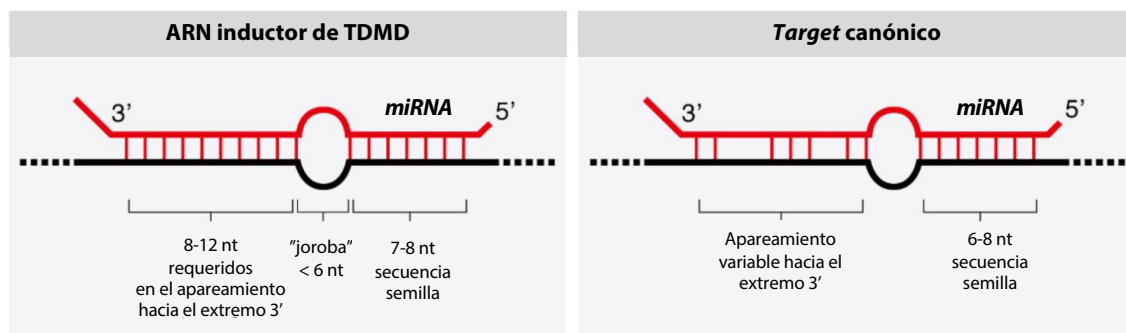


Figura I2: ilustración de dos tipos de arquitectura de interacción entre *microRNAs* y *targets*. A la izquierda, un sitio típico de TDMD, en donde la secuencia semilla se encuentra completamente apareada, seguida de una "joroba" o bulto sin aparear, con complementariedad extendida hacia el extremo 3' del *miRNA*. A la derecha, un sitio canónico en donde la complementariedad se encuentra mayormente limitada a la secuencia semilla, pudiendo haber algunas bases apareadas hacia el 3' del *miRNA* complementando. Adaptado de Fuchs Wightman et al., 2018 (Fuchs Wightman et al., 2018).

Importancia biológica de TDMD

TDMD se encuentra conservado en animales, pero no en plantas, donde la vida y obra de los *microRNAs* es muy distinta (suelen presentar apareamientos extensos y se encuentran metilados, haciéndolos más estables). Múltiples transcritos capaces de

gatillar la vía del TDMD se han ido describiendo, incluyendo ARNs artificiales (De la Mata et al., 2015; Xie et al., 2012), endógenos (Bitetti et al., 2018; Fletcher et al., 2022; Ghini et al., 2018; Kingston et al., 2022; Kleaveland et al., 2018; Li et al., 2021; Sheng et al., 2022; Simeone et al., 2022) y virales (Demián Cazalla, Therese Yario, 2010; Lee et al., 2013; Libri et al., 2012; Marcinowski et al., 2012; McCaskill et al., 2015). En algunos de estos ejemplos, la disrupción de la degradación del *microRNA* puede tener consecuencias biológicas concretas. Esto lejos se encuentra de ser una sorpresa, dado que estudios de pérdida de función de genes de *miRNAs* en ratones revelaron diversos fenotipos, que incluyen defectos en el desarrollo del esqueleto, dientes, cerebro, ojos, neuronas, músculos, corazón, pulmones, riñones, hígado, páncreas, intestino, piel, ovarios, testículos, placenta, timo, como también efectos fisiológicos y comportamentales (Bartel, 2018). Así, la desregulación de miR-7 (regulado por el *lncRNA Cyrano* y el *circRNA Cdr1as* como veremos a continuación) produce una disminución en el filtrado sensoriomotor, un fenotipo asociado a desórdenes neuropsiquiátricos (Kleaveland et al., 2018; Piwecka et al., 2017). En forma semejante, la degradación de miR-29b por el transcripto *NREP* tiene un efecto sobre el comportamiento tanto en ratones como peces cebra (Bitetti et al., 2018). También se ha relacionado a ejemplos de TDMD con cáncer, como miR-30b/c y miR-346, degradados por *Serpine1* y *NORAD*, respectivamente (Fletcher et al., 2022; Ghini et al., 2018; Simeone et al., 2022). En *Drosophila*, la disrupción del mecanismo genera defectos en el desarrollo (Kingston et al., 2022) y la respuesta a estrés (Sheng et al., 2022). Finalmente, una serie de trabajos ha mostrado en múltiples virus (como en *Herpesvirus saimiri* o en citomegalovirus humano y de ratón) que transcriptos virales degradan activamente por TDMD a *microRNAs* endógenos para facilitar la infección (Buck et al., 2010; Demián Cazalla, Therese Yario, 2010; Lee et al., 2013; Libri et al., 2012; Marcinowski et al., 2012; McCaskill et al., 2015).

Arquitectura de los sitios TDMD y predicción

A pesar de los numerosos ejemplos que denotan la importancia del mecanismo, el descubrimiento de nuevos sitios TDMD continúa siendo un limitante en este campo de estudio. Desde un punto de vista más amplio, la predicción de sitios tanto

canónicos como de TDMD ha sido encarada con distintos enfoques, aún obteniéndose tasas altas de falsos positivos (Pinzon et al., 2017). Los algoritmos para sitios canónicos se han basado en características como la conservación (Targetscan) (Agarwal et al., 2015) o en reglas específicas de interacción (RNA22, PITA) (Kertesz et al., 2007; Miranda et al., 2006). En el caso de sitios TDMD, además, se complementa la predicción para la secuencia semilla con la de la región 3' del *miRNA* (scanMiR y TDMDFinder) (Simeone et al., 2022; Soutschek et al., 2022).

Las “reglas” específicas que dan forma a los posibles sitios de TDMD no son fácilmente delimitables. Como se mostró anteriormente, la arquitectura general consiste en una complementariedad completa en la secuencia semilla, una “joroba” donde no hay apareamiento y una complementariedad extendida hacia el 3' del *microRNA*. La “joroba” puede ser asimétrica y tener entre 3 y 7 nucleótidos no apareados, e influye en la tolerancia de bases no apareadas hacia el extremo 3' (De la Mata et al., 2015). Por ejemplo, el transcripto *m169* del citomegalovirus murino, capaz de degradar a miR-27, no tolera ni una sola base no apareada en el extremo 3', probablemente debido al gran tamaño de la joroba (Haas et al., 2016). Así, la cantidad de bases complementarias en la región 3' del *microRNA* que son necesarias para que se produzca TDMD eficientemente varía de acuerdo a la arquitectura del *target*. A su vez, otras condiciones como la línea celular o tejido, o la estequiometría *miRNA:target* también son determinantes para el TDMD (Ameres et al., 2010; De la Mata et al., 2015).

La dificultad para establecer reglas claras de interacción produce una falta de consistencia en las predicciones basadas en algoritmos, que a su vez provocó una serie de esfuerzos para generar mapas experimentales de interacciones *miRNA-target*, usando técnicas apoyadas en bioquímica y secuenciación como CLIP-Seq/HITS-CLIP, PAR-CLIP o CLASH (Hausser and Zavolan, 2014; Moore et al., 2015). Conceptualmente, estas técnicas se basan en el entrecruzamiento (*crosslinking*) químico o por UV entre ARNs y proteínas, inmunoprecipitación y secuenciación de los ARNs que interactúan con el complejo RISC (Chi et al., 2009; Moore et al., 2015). Un solo trabajo, en una única línea celular, ha sido publicado al momento de escribir esta tesis en el cual logran identificar algunos *targets* de TDMD por una de estas técnicas (CLASH) (Li et al., 2021), indicando que esto sigue siendo uno de los grandes desafíos en esta área de estudio.

TDMD es mediado por la enzima ZSWIM8

En contraste con la predicción de sitios, la puntualización *de microRNAs* que sufren TDMD sí ha resultado más trivial desde el descubrimiento de la enzima mediadora del mecanismo: **ZSWIM8** (Han et al., 2020; Shi et al., 2020). La actividad de esta E3 ubiquitin-ligasa actúa sobre Argonata cuando se da una interacción con el tipo de complementariedad de bases previamente descrita, ubiquitina a la proteína Argonata que es enviada a degradación, dejando al *miRNA* desprotegido para la acción de exonucleasas no identificadas (Han et al., 2020; Shi et al., 2020) (**Figura I3**). El *target*, en cambio, es reciclado. Mediante el *knock-out/down* de ZSWIM8 en distintas líneas celulares, seguido de la secuenciación de ARNs pequeños, se identificó que hasta decenas de *miRNAs* presumiblemente sufren este tipo de regulación dependiendo de la línea celular (Han et al., 2020; Shi et al., 2020). Asimismo, se ha desarrollado un modelo estadístico para intentar distinguir con mayor exactitud a los sustratos primarios de ZSWIM8 de *otros microRNAs* que pudieran variar como efecto secundario de la depleción (Wang and Bartel, 2022).

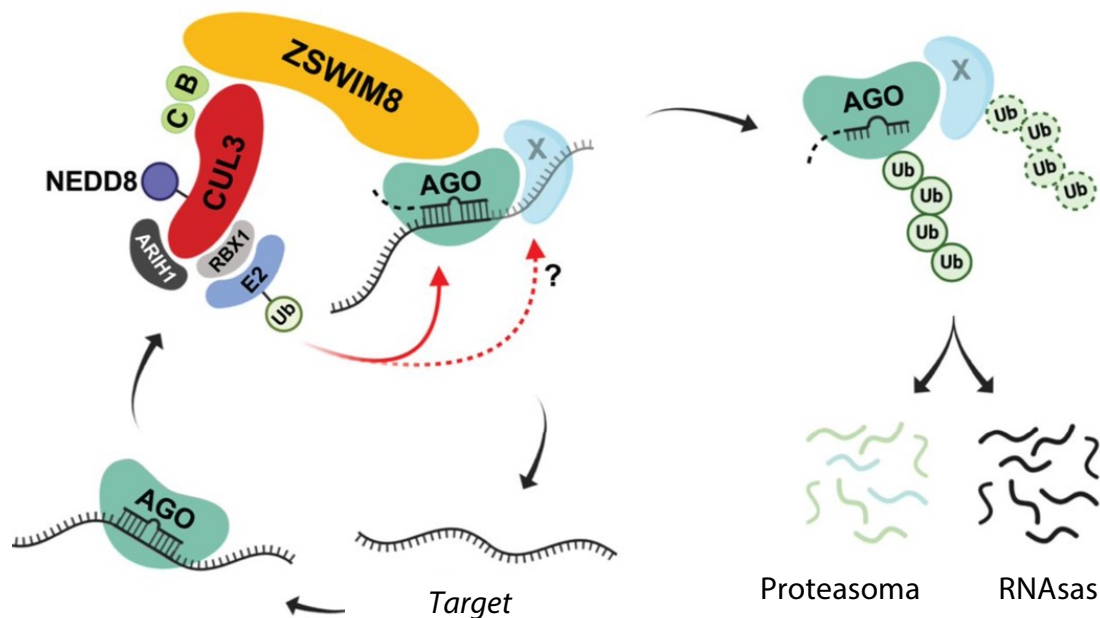


Figura I3: esquema ilustrando el mecanismo de degradación *de microRNAs* gatillado por sus *targets* (TDMD), mediado por la ubiquitin ligasa ZSWIM8. Cuando un *microRNA* interactúa con su *target* con una complementariedad extendida hacia su extremo 3', dejando una "joroba" en el medio, se produce un

cambio de conformación de AGO que expone residuos de Lisina susceptibles a ser ubiquitinados por ZSWIM8, llevando a la degradación de AGO y del *miRNA* cargado. Adaptado de Han et al., 2020 (Han et al., 2020).

La determinación de ZSWIM8 como enzima mediadora de TDMD fue realizada mediante un *screening* basado en CRISPR, por dos grupos de investigación en paralelo, y publicado a fines de 2020 (Han et al., 2020; Shi et al., 2020). Brevemente, los investigadores diseñaron un reportero codificando una proteína fluorescente cuya expresión es modulada por miR-7. Dado que miR-7 sufre TDMD de manera natural por el *lncRNA Cyrano*, de interrumpirse el mecanismo de TDMD, los niveles de miR-7 subirían, disminuyendo en consecuencia los niveles de fluorescencia de reportero. El *screening* consistió en generar un pool de virus en donde cada uno llevaba una guía de CRISPR distinta, luego infectar de manera tal de asegurar que un solo virus como máximo transduzca una solo célula, así *knockeando* un gen por vez. Luego se separaron las células en un citómetro de flujo y se secuenciaron las guías que resultaron integradas al genoma de las células. En aquellas células en las cuales ocurrió una pérdida de fluorescencia, las guías de CRISPR que afectan al TDMD se depletaron en la secuenciación (Han et al., 2020; Shi et al., 2020). En la sección III de esta tesis se describe la puesta a punto de un *screening* de similares características y objetivo, cuya ejecución debió abortarse frente a las publicaciones previamente nombradas.

Alargamiento y recorte de microRNAs durante TDMD

Para muchos de los ejemplos de TDMD nombrados anteriormente, una característica distintiva es que correlacionan fuertemente con el alargamiento/acortamiento (*tailing/trimming*, en inglés) de los extremos 3' y 5' del *miRNA* respectivamente. En un principio, se consideró que estas especies modificadas podían ser intermediarios durante TDMD (Fuchs Wightman et al., 2018). Sin embargo, las evidencias que se han ido acumulando sugieren lo contrario: las modificaciones en el extremo 3' del *miRNA* parecen ser independientes y no relacionadas con su degradación (Han et al., 2020; Kleaveland et al., 2018; Shi et al., 2020).

Cambios estructurales en AGO durante TDMD

Otro aspecto relevante en la degradación de *microRNAs* es la forma en que la proteína Argonauta cambia su conformación, permitiendo su ubiquitinación y posterior degradación (Han et al., 2020). Las bases estructurales de AGO en contexto de TDMD se elucidaron a partir de la cristalización de la proteína cargada con un sitio canónico o uno con arquitectura de TDMD (Sheu-Gruttadauria et al., 2019). En el segundo caso, se encontró que AGO adopta una conformación extendida que exhibe una “hendidura” mayor y una liberación del extremo 3’ del *miRNA* desde el dominio PAZ de AGO, dejándolo más disponible para sufrir modificaciones y/o degradación (Sheu-Gruttadauria et al., 2019). Además, se reportó que dicho cambio de conformación expone residuos de Lisina susceptibles de ser ubiquitinados por ZSWIM8, llevando a la degradación de AGO (Han et al., 2020; Shi et al., 2020). La mutación de algunos de esos residuos produce una proteína Argonauta inmune a degradación por TDMD (Han et al., 2020).

ARNs Circulares

En los últimos años, tomó fuerza una hipótesis que propone a un subgrupo de ARNs circulares (*circRNAs*) como “esponjas” de *microRNAs*. Los *circRNAs* son transcritos covalentemente cerrados, en contraposición con la mayor parte de los ARNs que son lineales y tienen un extremo 5’ CAP y un extremo 3’ poliadenilado. Para el común denominador de los ARNs, durante la transcripción, se produce un precursor (*pre-mRNA*) dentro del cual hay regiones que forman parte de los ARNs maduros (*exones*) y fracciones que son eliminadas (*intrones*) (Alberts et al., 2014). El proceso de corte y empalme, mediante el cual se remueven los intrones y empalman los exones, es conocido como *splicing* (Alberts et al., 2014), y en la mayoría de los casos da como resultado una molécula lineal, como vimos anteriormente. El proceso involucra sitios dadores 5’ y sitios aceptores 3’ de *splicing*, con los primeros típicamente ubicados río arriba de los segundos. En el particular caso de los ARNs circulares, el sitio *dador* de *splicing* es empalmado con un sitio *aceptor* que se encuentra río arriba, en vez de río abajo, formando una molécula circular covalentemente cerrada y sin extremos 5’ ni 3’

(Wilusz, 2018). Este tipo de corte y empalme en donde los sitios se encuentran invertidos es conocido como *backsplicing* (Wilusz, 2018) (**Figura I4**).

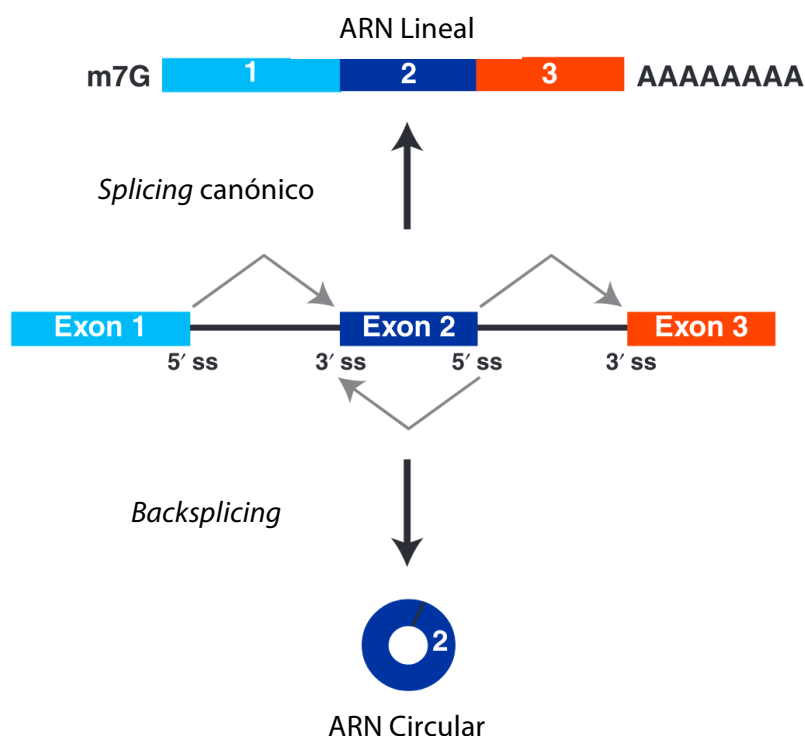


Figura I4: esquema ilustrando al *splicing* canónico, que da como resultado un transcripto lineal, y al *backsplicing*, que da como resultado un transcripto circular. Adaptado de Wilusz, 2018 (Wilusz, 2018).

ARNs Circulares como esponjas de microRNAs

Como consecuencia de su circularidad, esta familia de ARNs no posee extremos susceptibles a la acción de exonucleasas, haciéndola potencialmente inmune a la degradación provocada por *microRNAs* cuyo mecanismo de acción involucra el reclutamiento y acción de este tipo de enzimas. Esto transforma a la idea de “esponja” en algo muy tentador como función para los circRNAs. El concepto se basó en la teoría de ARNs endógenos competidores (*ceRNAs*), es decir, transcriptos que, mediante ofrecer sitios de unión a *microRNAs*, los titulan de manera tal que no estén disponibles para actuar sobre otros transcriptos (Cesana et al., 2011; Poliseno et al., 2010; Salmena et al., 2011). Dicha suposición, sin embargo, se ha demostrado improbable para la gran mayoría de los casos de *ceRNAs* individuales supuestamente activos debido a la

necesidad de que exista un nivel de expresión excepcionalmente alto del *target* competidor si este supone tener significancia estequiométrica respecto del total de sitios disponibles para un dado *microRNA* (Bosson et al., 2014; Denzler et al., 2014).

Existen muy pocos ejemplos con demostraciones adecuadas de interacciones con significancia biológica entre un ARN circular y un *microRNA*, dejando en claro que parecen tratarse más de excepciones que de la regla. Uno de los primeros casos reportados fue el *circRNA Sry* de ratón, que contiene 16 sitios conservados para miR-138 (Hansen et al., 2013). Posteriormente, se fueron publicando más ejemplos como *circHIPK3*, *circZNF91*, *circHECTD1* en humanos y otros tantos en *Drosophila* (Kristensen et al., 2019; Wang et al., 2016; Westholm et al., 2014; Zheng et al., 2016). El caso de estudio más representativo, sin embargo, es el de *CDR1as* (también conocido como ciRS-7), un ARN circular derivado de un *lncRNA* antisentido y expresado varios órdenes de magnitud por encima del gen *CDR1* de la hebra opuesta (Hansen et al., 2011; Piwecka et al., 2017). Su mayor particularidad es que cuenta con más de 60 sitios conservados para miR-7, mucho más que cualquier otro par circ-miR, transformándolo en el modelo de esponja por excelencia (Hansen et al., 2013; Memczak et al., 2013). El “esponjeo” de *CDR1as* a miR-7 forma parte de una red de regulación de ARNs no codificantes, que además cuenta con un *lncRNA* llamado *Cyrano*, capaz de degradar a miR-7 mediante TDMD, y miR-671, capaz de degradar a *CDR1as* por tener una complementariedad de bases total, produciendo un corte catalítico en dicho *circRNA* (*slicing*, en inglés) (Fuchs Wightman et al., 2018; Hansen et al., 2011; Kleaveland et al., 2018; Piwecka et al., 2017) (**Figura I5**). La depleción de *CDR1as* provoca una caída en miR-7 (Memczak et al., 2013; Piwecka et al., 2017), presumiblemente por encontrarse más disponible para la potente degradación de *Cyrano* (Kleaveland et al., 2018), y fenotipos relacionados con la función neuronal (Piwecka et al., 2017). Si bien el descrito es el caso más paradigmático, no es el único conocido de “protección” o estabilización de un *miRNA* por parte de un *circRNA*: en un estudio realizado en una línea celular de cáncer de próstata, se encontró que la depleción de *circCSNK1G3* provocaba una desestabilización de miR-181b/d, mientras que su sobreexpresión lo estabilizaba (Chen et al., 2019); notablemente, los sitios de *circCSNK1G3* para el *microRNA* tienen una arquitectura de interacción de tipo TDMD.

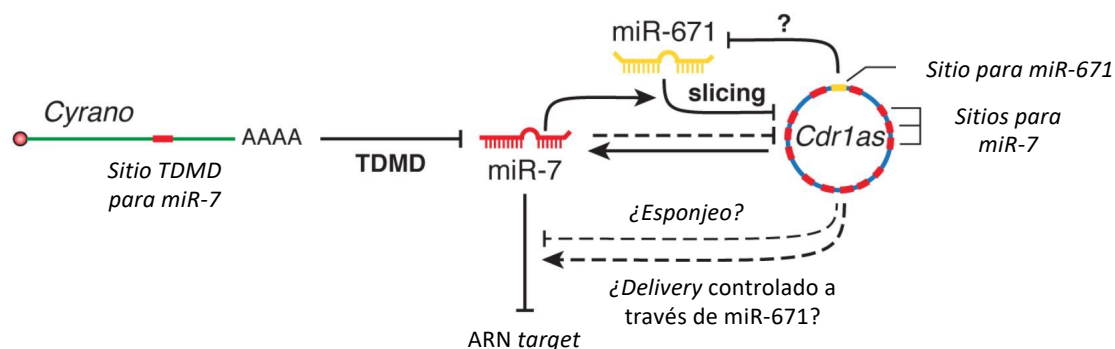


Figura I5: esquema conceptual de la red de regulación compuesta por *Cdr1as*, *Cyrano*, miR-7 y miR-671. En ella, el *lncRNA Cyrano* degrada a miR-7 por TDMD, mientras que el ARN circular *Cdr1as* lo protege funcionando como una esponja. El *microRNA* miR-671, además, es capaz de degradar a *Cdr1as* gracias a que posee un sitio de total complementariedad que produce un corte catalítico de AGO. Adaptado de Fuchs Wightman et al., 2018 (Fuchs Wightman et al., 2018).

Curiosamente, una plétora de trabajos muy similares entre sí sucedió a los primeros reportes de *circRNAs* como esponjas de *miRNAs*: la búsqueda “*circRNA sponge*” en Pubmed arroja más de 4 mil resultados al momento de escribir esta tesis; en la amplia mayoría de los casos, se propone que algún ARN circular funciona como esponja de algún *microRNA*, previniendo que este ejerza su función canónica sobre otros transcritos, normalmente sin estudiar su estequiometría, con muy cuestionable capacidad de sobre-expresión de *circRNAs* y falta de controles que demuestren circularidad (Dodbele et al., 2021; Nielsen et al., 2022). Motivados por lo intrigante de este fenómeno y los anteriores reportes nombrados, nos embarcamos a navegar dentro del mundo, en gran parte desconocido, de la degradación de los *microRNAs* y su interacción con ARNs circulares, como veremos en los objetivos a continuación.

Objetivos

Con la intención de elucidar con mayor detalle los posibles tipos de regulación que subyacen a los fenómenos introducidos anteriormente, en esta tesis se propuso estudiar las interacciones entre ARNs circulares y *microRNAs*, la posibilidad de los primeros de gatillar TDMD o estabilizar *miRNAs* y los potenciales efectos río abajo sobre los *targets* de los mismos.

En general, el campo de estudio de *circRNAs* ha sido fuente de cierta controversia alrededor de la capacidad para sobreexpresar en forma limpia y eficiente este tipo de moléculas, como se nombró anteriormente. En la Sección I de este trabajo, se propuso mejorar este tipo de herramientas para permitir estudiar distintas potenciales funciones de los ARNs circulares en forma más rigurosa.

Dicha mejora en la sobreexpresión permitió llevar a cabo un estudio comparativo de los efectos sobre la estabilidad de *miRNAs* específicos de *circRNAs* y controles lineales de igual secuencia, detallado en la Sección II. Asimismo, se realizó una comparación entre el caso conocido de *Cdr1as* y una versión lineal artificial del mismo, descubriendo que las distintas topologías determinaron el efecto que la molécula tuvo sobre miR-7. Los experimentos incluyeron cultivos primarios de neuronas (donde TDMD es más activo) y líneas celulares.

Adicionalmente, mediante el análisis computacional de datos de secuenciación públicos de diferenciación de células madre a células de tipo neuronal, se buscó expandir lo encontrado en el área experimental, investigando posibles pares de *miRNA-circRNA* a escala global, y analizar la potencialidad de algunos de esos sitios para gatillar TDMD.

Finalmente, uno de los objetivos iniciales de este proceso doctoral era encontrar a la enzima responsable de mediar el mecanismo de TDMD. Con ese fin, se diseñó y puso a punto un reportero capaz de monitorear la disrupción de dicho mecanismo en un *screening* basado en CRISPR. Si bien se logró generar la herramienta necesaria, antes de llevar a cabo el experimento concreto, este último objetivo quedó trunco debido a dos trabajos de alto impacto que se publicaron con el mismo fin (Han et al., 2020; Shi et al., 2020).

Materiales y métodos

Construcción de plásmidos

A menos que se especifique lo contrario, los plásmidos lentivirales derivan de pRRLSIN.cPPT.SYN.WPRE (De la Mata et al., 2015). Además, los clonados se realizaron utilizando una T4 ligasa (NEB), enzimas de restricción (NEB, Promega o ThermoFisher), PCR (Taq de INBIO Highway o Phusion) y/o Gibson Assembly (Gibson et al., 2009).

Las transformaciones se realizaron por electroporación o método químico, usando cepas apropiadas para vectores lentivirales (STBL3 o NEB Stable). Brevemente: se mezcló 1-5 μ L de la ligación/plásmido en un tubo de microcentrífuga con las bacterias y se dejó en hielo por 10-30 minutos; se electroporó o dio el *shock* térmico, se agregó 950 μ L de LB y se dejó recuperando por 30-45 minutos; finalmente, se plaqueó en una placa de LB Agar con el antibiótico correspondiente.

Las preparaciones de plásmidos de pequeña escala (*miniprep*) se realizaron usando un kit de extracción siguiendo el protocolo del fabricante (Qiagen). Luego se cuantificaron mediante medir su absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro (Nanodrop).

Cdr1as y miR-7

La versión lineal de *Cdr1as* (lin*Cdr1as*) se amplificó vía PCR a partir de ADN genómico de rata (ver *primers* en la Tabla Suplementaria 1). Luego de purificar el producto corrido en un gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit), se lo clonó en pCR II-Blunt-TOPO (ThermoFisher) y luego subclonado en pRRLSIN.cPPT.SYN.WPRE. La versión lineal de *Cdr1as* sin el sitio de miR-671 (inmune a sh*Cdr1as*, ver abajo), fue generada mediante amplificación por PCR del *Cdr1as* original pero perdiendo intencionalmente 174 nucleótidos del segmento 3'-terminal, luego re-clonándolo en el plásmido original usando los sitios BamHI-Sall (Tabla Suplementaria 1). El transcripto lineal usado como control negativo consiste de GFP expresada desde pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE (Addgene 12252).

El siRNAmiR (sh*Cdr1as*) es una versión ingenierizada de miR-671 – previamente descrito como un regulador natural de *Cdr1as* (Hansen et al., 2011)- diseñada para ser perfectamente complementaria al *circRNA*, de manera de maximizar su capacidad de *slicing*. El vector lentiviral se generó mediante insertar ADN sintético (gBlock, IDT) vía Gibson Assembly (Gibson et al., 2009) en los sitios BamHI-NheI de pRRLSIN.cPPT.SYN.WPRE.

La construcción para editar a nivel genómico los sitios de splicing de *Cdr1as* por CRISPR/Cas9 está basada en lentiCRISPRv2 (Addgene #52961), siguiendo el protocolo del laboratorio de Zhang (Sanjana et al., 2014; Shalem et al., 2014) (Tabla Suplementaria 1).

ARNs circulares artificiales en vectores lentivirales

Las construcciones para expresar ARNs circulares desde vectores lentivirales fueron generadas mediante insertar fragmentos de ADN sintético (gBlocks, IDT) incluyendo los intrones del *circRNA* natural ZKSCAN1(Liang and Wilusz, 2014), flanqueando a la secuencia codificante de *mCherry* seguido de sitios de miR-132 (De la Mata et al., 2015) modulado por el promotor inducible por Tetraciclina (TREp). Sitios para miR-124 fueron subsecuentemente insertados río abajo de la región circularizable, de manera de encontrarse solo en la isoforma lineal. Los controles lineales fueron previamente descritos (De la Mata et al., 2015). Adicionalmente, se sustituyeron los sitios de miR-124 por miR-92a para mostrar degradación selectiva de la isoforma lineal en líneas celulares usando un fragmento de ADN sintético (gBlock, IDT) y los sitios BsrGI-Sall.

ARNs circulares artificiales genéricos en pCDNA 3.1

Las construcciones para expresar ARNs circulares en líneas celulares no neuronales fueron generadas a partir de los plásmidos pcDNA3.1(+) ZKSCAN1 MCS Exon Vector (Addgene #69893) y pcDNA3.1(+) Laccase2 MCS Exon Vector (Addgene #69901). Primero, se les adicionó un sitio de miR-92a río abajo del intrón *downstream* ZKSCAN1/Laccase2 pero río arriba de la señal de poliadenilación usando los sitios NotI-ApaI y oligos complementarios fosforilados como inserto (Tabla Suplementaria 1).

Segundo se insertó como secuencia circularizable un IRES con una versión de GFP partida de forma tal que solo se exprese si la molécula se circularizó, usando los sitios BamHI-NotI y AgeI-SacII para los *backbones* de Laccase2 y ZKSCAN1, respectivamente. El inserto se obtuvo del plásmido pcDNA3.1(+) Laccase2 MCS-UNC circGFP (gentileza del laboratorio del Dr. Jeremy Wilusz, Baylor College of Medicine, Houston, TX, Estados Unidos).

En tercer lugar, se sustituyó el promotor CMV por SV40, PGK o TRE, con el objetivo de optimizar la expresión del plásmido con Split GFP y *backbone* Laccase2. Para SV40, se usaron los sitios BglII-NheI para el plásmido y BglII-AvrII para el inserto, obtenido de la construcción pGL4.13/GUG-FFLuc-3XFLAG (Addgene #127334). Para PGK y TRE, se amplificaron los promotores por PCR, agregando sitios para MfeI y NheI (Tabla Suplementaria 1), desde pRosetta_v2 (Addgene #136477) o una de las construcciones de ARN circular en vector lentiviral con promotor inducible descrita anteriormente, respectivamente.

ARNs circulares artificiales con sitios para *microRNAs* en pCDNA 3.1

Se seleccionó la construcción basada en Laccase2 con sitios para degradación de la isoforma lineal por miR-92a, donde se agregaron sitios con arquitectura compatible con TDMD para miR-7 y miR-218 dentro de la secuencia circularizable. Para eso, se generaron los insertos por PCR, usando un oligo sintético de templado (Tabla Suplementaria 1), para luego ligarlos en el plásmido abierto con BsrGI. Luego se hicieron variantes de *circRNAs* de menor longitud, levantando por PCR fragmentos del círculo original y reclonando en el mismo *backbone* (Tabla Suplementaria 1) con las enzimas AgeI y SacII. Finalmente, se generaron todos los controles lineales correspondientes moviendo la secuencia circularizable a pCDNA 3.1 sin los intrones Laccase2 por PCR (Tabla Suplementaria 1) y ligación, con las enzimas NheI y XbaI.

FLAG/HA-AGO2

El vector lentiviral para expresión de FLAG/HA-AGO2 bajo el promotor Syn (pLV-FLAG-HA-AGO2) fue generado mediante amplificar FLAG/HA-AGO2 desde pIRESneo-FLAG/HA-AGO2 (Addgene #10822).

Cultivo celular y transfecciones transitorias

Los dos institutos donde se realizaron las transfecciones correspondientes a esta tesis (IFIBYNE, UBA-CONICET, y Baylor College of Medicine, EE. UU.) contaban con células HEK293T y/o HEK293FT. Las células fueron controladas para contaminaciones de micoplasma y solamente se usaron aquellas limpias para los experimentos. Las células se crecieron en DMEM-F12 (Gibco) suplementado con suero fetal bovino 10% (v/v) y 25 U/mL de Penicilina-Estreptomicina (Gibco), con la adición de Genenticina para las HEK293FT. Para los experimentos en placas de 24 pocillos, se plaquearon 100.000/125.000 células, y para escalas mayores el equivalente apropiado para la superficie del pocillo. El día después de plaquear, las células fueron transfectadas usando PEI, siguiendo un protocolo previamente descrito (De la Mata et al., 2015), o Lipofectamina 2000 (Thermo), siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, se diluyó la cantidad deseada de ADN en medio sin completar, mientras se diluía una cantidad correspondiente de PEI/Lipo en otro tubo de medio sin completar. Ambas soluciones se mezclaron y se esperó 15/20 minutos a que se estabilicen los complejos. Luego, se echaron los complejos sobre las células suavemente para no levantarlas. En el caso de Lipofectamina, se utilizaron 4 μ L del reactivo por cada 1,6 μ g de ADN, mientras que para PEI, fueron 3,6 μ L por cada 0.8 μ g de ADN.

Producción de lentivirus

Se produjeron partículas virales recombinantes en la línea celular HEK293T. Las células se co-transfectaron usando el método PEI con el vector de expresión lentiviral y los dos vectores de empaquetamiento de segunda generación: pMD2.G (Addgene #12259) y pCMVR8.74 (Addgene #22036). Los sobrenadantes con partículas virales se recolectaron 48-72 horas después de la transfección, y fueron concentrados usando filtros de centrifugación (Amicon Ultra-15, con corte de peso molecular de 100 kDa, Millipore Cat. #UFC910024), centrifugando hasta que el volumen total se reducía hasta aproximadamente 500 μ L.

Animales usados en este estudio

Los experimentos realizados con neuronas de ratón, se llevaron a cabo en el Instituto en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA) en colaboración con el grupo del Dr. Damián Refojo. Todos los animales usados en este estudio fueron obtenidos siguiendo el protocolo experimental no. No.2020-04-DR con la aprobación de la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) en el Instituto en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBa) – CONICET – Partner Institute of the Max Planck Society.

Cultivo neuronales y transducción lentiviral

Neuronas corticales e hipocampales fueron disectadas el día embrionario 16.5 y 18.5 (E16.5 y E18.5), respectivamente, con embriones CD1 de sexos mezclados, en colaboración con el grupo del Dr. Damián Refojo (IBioBA). La preparación de los cultivos fue realizada como se describió previamente (Giusti et al., 2014; Vogl et al., 2015). Brevemente, el cortex de un embrión CD1 fue disectado y se preparó una suspensión neuronal mediante digestión con Tripsina y ruptura mecánica del tejido. Las neuronas se plaquearon en una placa de 24 pocillos con una densidad de 150.000 células por pocillo y se mantuvieron en medio Neurobasal-A (ThermoFisher) con 2% B27 y 0.5% mM GlutaMAX-1 (ThermoFisher), a 37 °C y 5% CO₂.

La eutanasia de los animales para generar los cultivos se realizó de acuerdo al protocolo experimental no. 2020-04-DR, evaluado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de IBioBA-CONICET, de acuerdo con los principios para investigaciones biomédicas que incluyen animales del Consejo para Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas.

Las neuronas se transdujeron 4-7 días luego de plaquear (DIV4-7) con las construcciones lentivirales correspondientes, de acuerdo a lo descrito en los apartados de Resultados y las Figuras. En aquellos casos donde la construcción contaba con un promotor inducible, se cotransdujo con un plásmido que expresa la proteína transactivadora (LB-Syn-tTA). El ARN se extrajo 7 días después de la infección.

Transfección e inmunoprecipitación de FLAG/HA-AGO2 (AGO2 RIP)

El plásmido que expresa FLAG/HA-AGO2 fue transfectado en células HEK293T como se describió arriba. La inmunoprecipitación de FLAG/HA-AGO2 se realizó con bolitas magnéticas Anti-FLAG M2 (Sigma. Cat #M8823). Las bolitas fueron lavadas dos veces con *buffer* (50 mM Tris HCl, 15 mM NaCl, pH 7.4). Para cada inmunoprecipitación, se utilizó una placa de 6 cm con 50% de confluencia de células. Las células se lavaron una vez con PBS frío y se lisaron con 500 µl de *buffer* de lisis [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) TRITON X-100, 1 mM EDTA, con inhibidor de proteasas (cOmplete, EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail, Roche) e inhibidor de RNasas (Invitrogen)]. Los lisados se incubaron 30 minutos en hielo, se centrifugó a 16.000 g por 10 minutos a 4 grados y se mezcló el sobrenadante con las bolitas limpias. Luego de 2 horas de rotación a 4 grados, las bolitas se lavaron 3 veces con *buffer* TBS. Como control, se usaron HEK293T sin transfectar. La expresión y eficacia de inmunoprecipitación se controló por *Western Blot*, usando un anticuerpo anti-HA (clone 3F10, Roche). El ARN se extrajo usando Trizol (Invitrogen) directamente en las bolitas.

Fraccionamiento subcelular

En resumen, se transfectó uno de los constructos que expresan *circRNAs* y el control lineal en células HEK293T tal como se describió anteriormente, en placas de 6 pocillos con una confluencia del 50%. Después de 48 horas, se recolectaron las células utilizando 500 µl de PBS, se transfirieron a un tubo de microcentrífuga y se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 350 µl de PBS con 0,1 % de NP-40 (IGEPAL). Se separaron 150 µl y se lo llamó fracción TOTAL. El volumen restante se centrifugó durante 10 segundos a 10,000 rpm. Se separaron 150 µl del sobrenadante y se lo llamó fracción CITOPLASMÁTICA. El *pellet* se resuspendió en 150 µl de PBS con 0,1% de NP-40 (IGEPAL) y se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 150 µl de PBS con 0,1% de NP-40 (IGEPAL). A esto se lo llamó fracción NUCLEAR. De las 150 µl de cada fracción, se utilizaron 75 µl para *Western Blot* y 75 µl para la extracción de ARN seguida de RT-qPCR.

Extracción de ARN

Todas las extracciones de ARN se realizaron usando el reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se cosecharon las células con Trizol. Se agregó 0,2 mL de cloroformo por cada 1 mL de Trizol. Se centrifugó 15 minutos a 12.000 g y 4 grados. Se tomó la fase acuosa y se la pasó a un nuevo tubo. Se agregó un volumen de isopropanol y se precipitó por media hora. Se centrifugó por 10 minutos a 12.000 g y 4 grados. Se descartó el sobrenadante y limpio el *pellet* con etanol 70%. Se resuspendió el *pellet* en agua ultrapura.

Cuantificación de la expresión génica por RT-qPCR

Los niveles de expresión de *miRNAs* y U6 se determinaron utilizando los ensayos Taqman® microRNA (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante o utilizando SYBR Green y RT-qPCR de *stem-loop* (ver la Tabla Suplementaria 2 para el diseño de oligos). Los niveles de *microRNA* se normalizaron a los niveles de U6. Se realizaron curvas estándar para los *miRNAs* y U6 analizados con diluciones seriales de ADNc seleccionados, lo que permitió calcular las abundancias relativas. Para la cuantificación de ARNm, los *circRNA* artificiales y *Cdr1as*, se trató el ARN total con *RNase* (Kit DNA-free™, Ambion) y se retrotranscribió utilizando hexámeros aleatorios y SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) o MMLV-RT (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. La abundancia de los ARNm, los *circRNA* artificiales y *Cdr1as* se determinó utilizando qPCR basada en *SYBR green* con una mezcla para qPCR personalizada (Tabla Suplementaria 3) y *primers* específicos (detallados en la Tabla Suplementaria 2). Alternativamente, se utilizó la mezcla para qPCR de *SYBR green* de INBIO highway (Ref M130). Se realizaron curvas estándar para los amplicones analizados con diluciones seriales de ADNc seleccionados, lo que permitió calcular las abundancias relativas. El programa de corrida se especifica en la Tabla Suplementaria 3.

Northern blot

Los *Northern blots* se realizaron de acuerdo a procedimientos estándar (Tatomer et al., 2017), en colaboración con el laboratorio de la Dra. Roditi en Berna, Suiza o con el laboratorio del Dr. Wilusz en Baylor College of Medicine, Estados Unidos. Se transfectaron las distintas construcciones que expresan ARNs circulares en HEK293T o HEK293FT como se explicó anteriormente. Se extrajo ARN y un total de 10 µg se cargó en cada calle de un gel de agarosa 1,2 % desnaturalizante, corrido por 3/3,5 horas a 95 V. Finalizada la corrida, se realizaron 2 lavados con 250 mL de agua ultrapura y 2 lavados con 10X SSC.

La transferencia se hizo por capilaridad. Se colocó un vidrio transversal a un recipiente de pírrex con ~600 mL de 10X SSC, con un papel Whatman doblado en forma de C, de manera tal que las puntas se sumerjan en el *buffer*. Sobre el papel se colocó el gel dado vuelta y una membrana Hybond-N encima, seguida de 3 papeles Whatman del tamaño del gel. Eso se envolvió con todo el aparato con papel film, dejando una ventana sobre el Whatman. Arriba, se agregaron aproximadamente 7 cm de papeles tipo servilleta y un libro pesado para comprimir lo apilado (**Figura M1**). Se dejó transfiriendo por toda la noche.

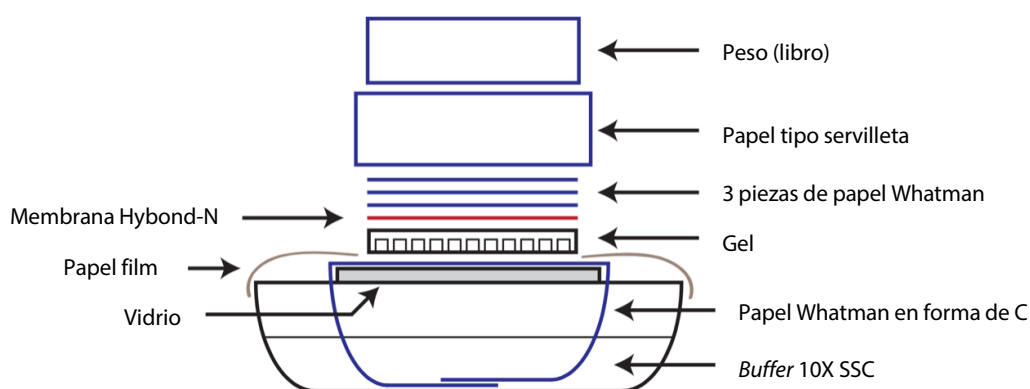


Figura M1: aparato de transferencia de *Northern blot* por capilaridad. Adaptado de Tatomer et al., 2017 (Tatomer et al., 2017).

Los ARNs se fijaron en la membrana por UV con un dosaje de energía de 120 milijoules por unidad de área. Luego, la membrana se colocó en un tubo, se agregó *buffer* de

hibridación y sonda, y se dejó en un horno de hibridación toda la noche. La sonda se preparó mediante marcar radiactivamente un oligo de ADN antisentido usando la T4 kinasa y [γ - 32 P] ATP. Los oligos utilizados pueden encontrarse en la Tabla Suplementaria 2.

Finalmente, luego de realizar dos lavados con 2X SSC 0,5 % SDS, se expuso la membrana en una pantalla *Phosphorimager* y se escaneó en un equipo Typhoon FLA 9500 (Cytiva). Las intensidades relativas de las bandas se midieron por densitometría usando Gel Analyzer.

Alternativamente, se utilizaron sondas biotiniladas para evitar utilizar material radiactivo. Estas se revelaron utilizando un Kit de módulo de detección quimioluminiscente de ácidos nucleicos (Thermo). Brevemente, El sistema incluye un sustrato de luminol mejorado para peroxidasa de rábano picante (HRP) con *buffers* de bloqueo y de lavado que permiten detectar a la sonda biotinilada en una película fotográfica.

Western blot

Las muestras proteicas fueron corridas en geles de poliacrilamida con SDS, en *buffer* de corrida durante 50 minutos a 200 V. Luego, se transfirieron a una membrana de Nitrocelulosa (GE Healthcare) por 1 hora a 100 V en *buffer* de transferencia. La membrana se bloqueó por una hora en solución con 5 % de leche en TBS. Después, se agregó la dilución apropiada del anticuerpo primario, y se incubo toda la noche a 4 grados. Al día siguiente, se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS 0,1 % tween-20 (TTBS), y luego se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente, acoplado a fluoróforo (Licor). Se hicieron 4 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS y se escaneó la membrana en un equipo Odyssey para detección de los anticuerpos Licor.

Los anticuerpos utilizados fueron: anti-HA 3F10 (Rat, 1:2500), anti-Tubulin (polyclonal rabbit anti β Tubulin H-235 from Santa Cruz Biotechnology, 1:2500) and Histone-3 (polyclonal rabbit anti H3 H-0164 from Merck, 1:2500); el secundario utilizado fue IRDye® 800CW (LI- COR Biosciences).

A continuación, se detalla la composición de los *buffers* mencionados:

- *Buffer* de corrida: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS.
- *Buffer* transferencia: 25 mM Tris, 192 mM glycine, Metanol 20%.

Análisis estadístico

Para procesar información, diseñar y visualizar gráficos y hacer pruebas estadísticas, se utilizó el lenguaje de programación R (en el contexto de R Studio). Los datos se normalizaron y escalaron entre experimentos usando una normalización de longitud unitaria (*Unit Length Normalization*, en inglés). Esta consiste en dividir cada elemento del vector por la distancia euclídea del vector, que es la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de los elementos del vector. Los gráficos de barras, líneas, puntos y *boxplots* se diseñaron usando los paquetes ggplot2 y ggpubr. Las pruebas estadísticas usando R base y/o ggpubr (con su complemento rstatix). Para los experimentos en donde se compararon 2 condiciones, se realizaron t-tests desapareados, mientras que cuando se hicieron comparaciones múltiples, se corrigió por Bonferroni ($_{ns}$: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$). Para las comparaciones en donde se encontraban múltiples grupos, se usó ANOVA seguido de Tukey o un modelo generalizado lineal (GLM) con emmeans cuando la distribución no era normal, de acuerdo se indique en el texto. Cuando se compararon múltiples *targets* de miR-7 entre condiciones, se realizó un ANOVA de dos factores seguido de Tukey, mostrando el p-ajustado.

Análisis bioinformático de las interacciones entre circRNAs y miRNAs

Dos *datasets* producidos por el laboratorio de la Dra. Ling Ling Chen fueron combinados para generar un análisis que comprenda la expresión de *miRNAs*, *circRNAs* y *mRNAs* durante la diferenciación de células H9 (hESC) a neuronas de prosencéfalo. Los *datasets* pueden descargarse de la plataforma GEO bajo las siguientes identificaciones: GSE73325, GSE56152 y GSE63709. Es importante destacar que, aunque se realizó el mismo proceso de diferenciación en ambos casos, el procedimiento de secuenciación se hizo a diferentes días (D26 y D35,

respectivamente). A pesar de que esto es definitivamente subóptimo, la posibilidad de observar ciertos fenómenos motivó a continuar con el análisis.

Los datos de interacciones entre *circRNAs* y *miRNAs* fueron obtenidos de la base de datos Starbase/ENCORI v3. Se seleccionó esta fuente debido a que combina la predicción de sitios por varios programas con datos de validación experimental (por ejemplo, de CLIP). Los parámetros elegidos para descarga desde su API fueron: assembly = hg19, geneType= circRNA & miRNA, clipExpNum=1, program= all, programNum= 2, target= all and cellType= all.

El pre-análisis realizado en R fue el siguiente:

- Las tablas de expresión génica fueron cargadas y unidas usando el paquete Tidyverse y/o el paquete readxl. Para unir tablas considerando las coordenadas genómicas se utilizó el paquete Fuzzyjoin.

Análisis con los *miRNAs* en perspectiva:

- Se calculó un número absoluto de sitios validados para cada *miRNA* en cada *circRNA*.
- Se calculó un número relativo de sitios efectivos mediante multiplicar el número calculado arriba por el número de lecturas de secuenciación sobre la unión de *backsplicing* (como *proxy* de la expresión de cada *circRNA*) – se realizó un promedio entre las lecturas pre- y post-diferenciación.
- El número total de sitios efectivo para cada *miRNA* se calculó mediante sumar todos los sitios efectivos de cada *miRNA* a lo largo de todos los *circRNAs*.
- El coeficiente de “esponjeo” de cada *miRNA* se definió mediante dividir el número total de sitios efectivo por la abundancia del *miRNA* (promedio pre- y post-diferenciación).
- Los *microRNAs* se separaron en cuartiles para simplificar el análisis y la visualización.

Todos los gráficos se programaron e ilustraron usando los paquetes ggplot2, ggrepel, ggpubr y/o viridis. El diagrama de red mostrando interacciones se realizó usando el paquete IGraph. Los análisis estadísticos, cuando correspondieron, se calcularon usando ggpubr.

Para el análisis de *pri-miRNAs*, se utilizó la plataforma Galaxy. Brevemente, se extrajeron las lecturas crudas de GSE73325 y se recortaron usando Trim Galore!, para luego mapearlas al genoma de referencia humano (hg38) con el RNA-STAR aligner. Las cuentas de *primiR* se obtuvieron de los archivos BAM mapeados usando featureCounts y el archivo de anotación obtenido de miRBase.

Análisis bioinformático para predecir sitios con arquitectura TDMD en circRNAs

Para predecir sitios con arquitectura tipo TDMD en *circRNAs*, usamos el paquete scanMiR en R. Brevemente, todas las secuencias de *circRNAs* humanos fueron obtenidas de la base de datos circBase y se usaron para alimentar la función *findSeedMatches* del paquete scanMiR para predecir sitios. Los datos se filtraron para quedarse solamente con los *circRNAs* que tenían al menos una lectura sobre la unión de *backsplicing* en los datos de diferenciación descritos anteriormente.

Finalmente, se calculó la proporción de *microRNAs* con sitios TDMD predichos. Se realizaron pruebas exactas de Fisher para estudiar su enriquecimiento en sitios. El paquete ggpie se utilizó para hacer los gráficos de torta y ggpubr para los gráficos de violín. La estadística se hizo con rstatix.

Análisis bioinformático de los targets de miR-7 y miR-181b/d

Los *targets* predichos de miR-7 se obtuvieron de TargetScan 7.1 de ratón, mientras que los de miR-181b/d de TargetScan 7.2 humano. Las lecturas crudas se descargaron para experimentos de KO de *Cdr1as* (Piwecka et al., 2017) y KD de *circCSNK1G3* (Chen et al., 2019), códigos GSE93130 y GSE113124, respectivamente. Luego se realizó un análisis de expresión diferencial usando el paquete DESeq2. Los gráficos y el análisis se realizaron de la misma forma que se describió anteriormente.

Resultados

Sección I: Mejorando la expresión de circRNAs artificiales.

Los estudios involucrando ARNs circulares han sido motivo de cierta controversia durante los últimos años, al punto tal que ameritó la publicación de dos trabajos dedicados exclusivamente a mejorar las prácticas, rigurosidad y controles en este campo de investigación (Dodbele et al., 2021; Nielsen et al., 2022).

El primer punto de conflicto respecto de los circRNAs se encuentra alrededor de su identificación a partir de datos de secuenciación. Dado que los ARNs circulares no tienen cola de poli-A, se encuentran depletados en *datasets* que involucran pasos de purificación con oligo(dT), por lo que solo son detectables en cantidades significativas cuando se utilizan protocolos que se limitan a depletar el ARN ribosomal (*rRNA*) y secuencian ARN total. Típicamente, se utilizan las lecturas (*reads*, en inglés) que solapan con las junturas de *backsplicing* y permiten determinar inequívocamente la existencia y abundancia de *circRNAs* específicos en un contexto dado (Szabo and Salzman, 2016). Si bien este es un enfoque válido, tiene algunos problemas que es necesario tomar en cuenta: las lecturas sobre sitios de *backsplicing* no necesariamente provienen de *circRNAs*, pudiendo haberse originado por eventos de *trans-splicing*, rearrreglos genómicos o eventos de cambio de templado (*template switching*, en inglés) durante la retrotranscripción de ARNs lineales; los algoritmos de detección pueden variar, algunos son guiados por anotaciones genómicas mientras que otros hacen predicciones *de novo*; las lecturas cortas son poco informativas respecto de la composición interna de los *circRNAs* (Dodbele et al., 2021).

El segundo motivo de debate es la validación de la circularidad de un ARN circular putativo. Existen múltiples métodos para hacerlo y se recomienda usar más de uno en simultáneo para darle robustez a lo concluido (Dodbele et al., 2021; Nielsen et al., 2022). La visualización por *Northern blot* es probablemente la forma más inequívoca de observar todas las isoformas de expresadas por un gen endógeno o un vector al mismo tiempo. Además, el *Northern Blot* permite distinguir entre distintas isoformas por medio de sondas complementarias a las junturas de *backsplicing*, que deberían

unirse solo *circRNAs* específicos. El lado negativo de esta técnica es que requiere de mucho material inicial y puede no ser suficientemente sensible si el *circRNA* presenta bajos niveles de expresión. Alternativamente, se puede utilizar una ARN exonucleasa llamada RNase R, que degrada ARNs lineales pero no circulares por carecer de extremos libres. Sin embargo, la RNase R puede tener serias dificultades degradando ARNs lineales muy estructurados (Xiao and Wilusz, 2019). Por último, mediante la utilización de distintas retrotranscriptasas, es posible amplificar por PCR y secuenciar los sitio de unión de *backsplicing*, descartando posible artefactos debidos a la actividad de *template switching*. Esto es porque es improbable que dos retrotranscriptasas distintas “salten” en las mismas secuencias (Dodbele et al., 2021).

Finalmente, uno de los causales de mayor discusión ha sido la capacidad de sobreexpresión de *circRNAs* en forma abundante y limpia. La estrategia para favorecer *backsplicing* y síntesis de ARNs circulares consiste en flanquear la secuencia que se desee circularizar con intrones de *circRNAs* naturales, que usualmente cuentan con secuencias reversas complementarias entre sí (como secuencias *Alu* en el caso de primates) (Dubin et al., 1995; Jeck et al., 2013; Liang and Wilusz, 2014; Zhang et al., 2014); permitiendo la sobreexpresión mediante la transfección de plásmidos o transducción de vectores virales. Estas construcciones suelen consistir de un promotor seguido del exón a circular flanqueado por los intrones y regiones complementarias (**Figura R1**). La ausencia de otros exones limita la cantidad de isoformas factibles de ser expresadas por la construcción, aunque esto no garantiza que el *circRNA* resulte ser el producto mayoritario. De hecho, la mayor parte de las construcciones utilizadas para sobreexpresar ARNs circulares tienen eficiencias de *backsplicing* bajas y generan productos no deseados como ARN sin procesar, concatémicos o ARN *trans-spliceado* (Ho-Xuan et al., 2020).

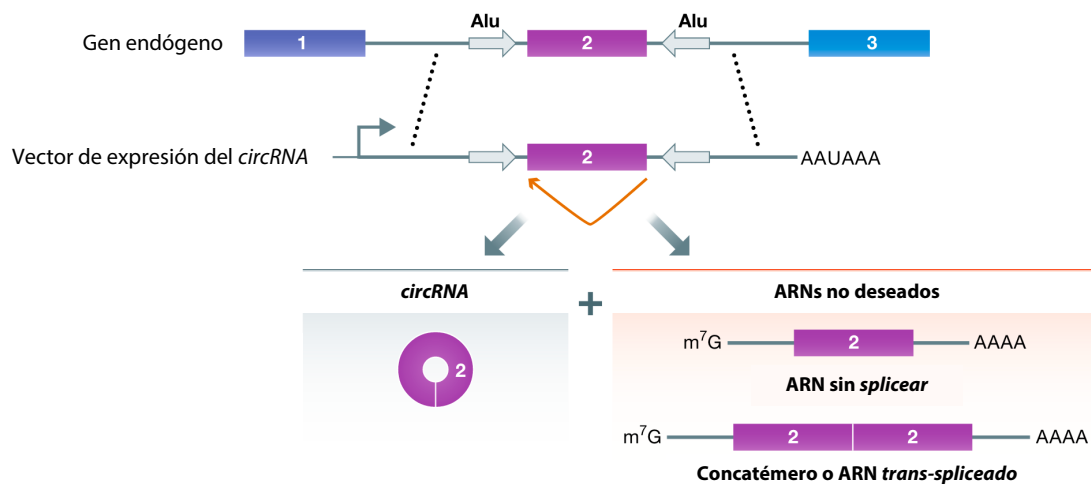


Figura R1: Esquema ilustrativo de un vector de expresión de un ARN circular y sus posibles productos. El exón a circularizar suele flanquearse por intrones con secuencias reversas complementarias, favoreciendo el *backsplicing*. Sin embargo, aun así, la eficiencia normalmente es baja, dando como resultado productos no deseados como ARN sin *splicear*. Adaptado de Dodbele et al., 2021 (Dodbele et al., 2021).

De esta manera, el primer objetivo de esta tesis fue generar construcciones que expresaran ARNs circulares en forma más limpia y abundante que las preexistentes, para luego estudiar sus potenciales efectos sobre *microRNAs*. Con eso en mente, en primer lugar, se produjeron vectores en los que se fueron variando las características que se describen a continuación:

- Se evaluaron cuatro promotores distintos, estudiando niveles de expresión total y el *ratio* entre isoformas lineal y circular. Los promotores utilizados fueron: CMV, TRE, PGK y SV40 (**Figura R2**).
- Se evaluaron dos pares de intrones flanqueantes, provenientes de los genes ZKSCAN1 de humano y Laccase2 de *Drosophila* (Kramer et al., 2015) (**Figura R2**).
- Se puso a prueba la adición de un sitio perfectamente complementario para un *microRNA* endógeno altamente expresado, únicamente presente en la isoforma lineal pero no en la circular, de manera de degradar selectivamente al producto no deseado (**Figura R2**). Esta posibilidad se ensayó en la línea

celular HEK293T, adicionando un sitio de miR-92a, y en neuronas corticales e hipocampales de ratón, donde se utilizaron 4 sitios en tándem de miR-124.

- Se evaluó la capacidad de traducción de las construcciones descritas anteriormente, usando como exón una versión de la proteína fluorescente GFP partida a la mitad, de manera tal que esta solamente se puede expresar a partir de un IRES (Sitio Interno de Entrada al Ribosoma en español) cuando se unen los fragmentos por *backsplicing* (**Figura R2**).

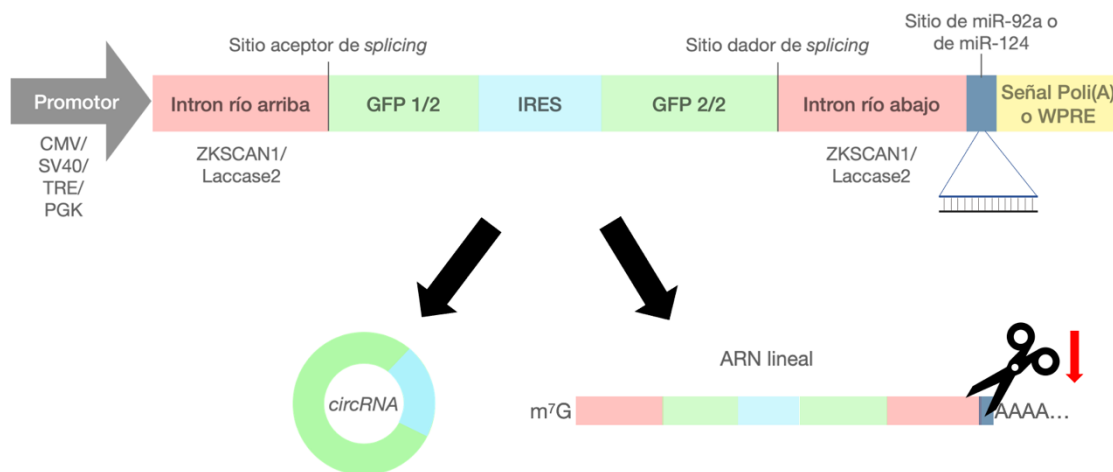


Figura R2: Esquema de las construcciones utilizadas para explorar las distintas alternativas de mejora de la expresión de ARNs circulares. Se evaluaron 4 promotores distintos (CMV, SV40, TRE o PGK), dos pares de intrones para favorecer circularización (ZKSCAN1 o Laccase2) y la presencia o ausencia de un sitio perfectamente complementario para producir degradación selectiva de la isoforma lineal. Además, el exón circularizable incluye a la proteína fluorescente GFP interrumpida de manera tal que solo se exprese desde la isoforma circular, guiada por un IRES, para evaluar la capacidad de traducción del *circRNA*.

Comparación entre promotores (CMV, SV40, TRE o PGK)

Con el objetivo de estudiar los niveles de expresión total y potenciales variaciones en el *ratio* de expresión lineal/circular, se clonaron en el vector de expresión para mamíferos pcDNA 3.1 cuatro promotores distintos (CMV, SV40, TRE o PGK) guiando la síntesis de un ARN circular artificial. Dicho constructo se diseñó de forma tal que solo exprese la proteína fluorescente GFP desde su isoforma circular (ver arriba).

En la **Figura R3A** se exhibe un *Northern blot* con una sonda contra GFP de las construcciones descritas arriba, transfectadas en células HEK293T. La cuantificación de múltiples repeticiones del mismo experimento se muestra en las **Figuras R3B-E**. Los promotores TRE y CMV mostraron los niveles de expresión total más altos, mientras que el promotor PGK tendió a tener el mejor *ratio* lineal/circular (aunque con niveles de expresión total bajos, y en forma no significativamente distinta respecto de CMV y TRE).

De lo realizado, se extrae que los promotores CMV y TRE serían los apropiados si se busca una expresión alta de ARN circular en células HEK293T, pudiendo variar en otras líneas celulares.

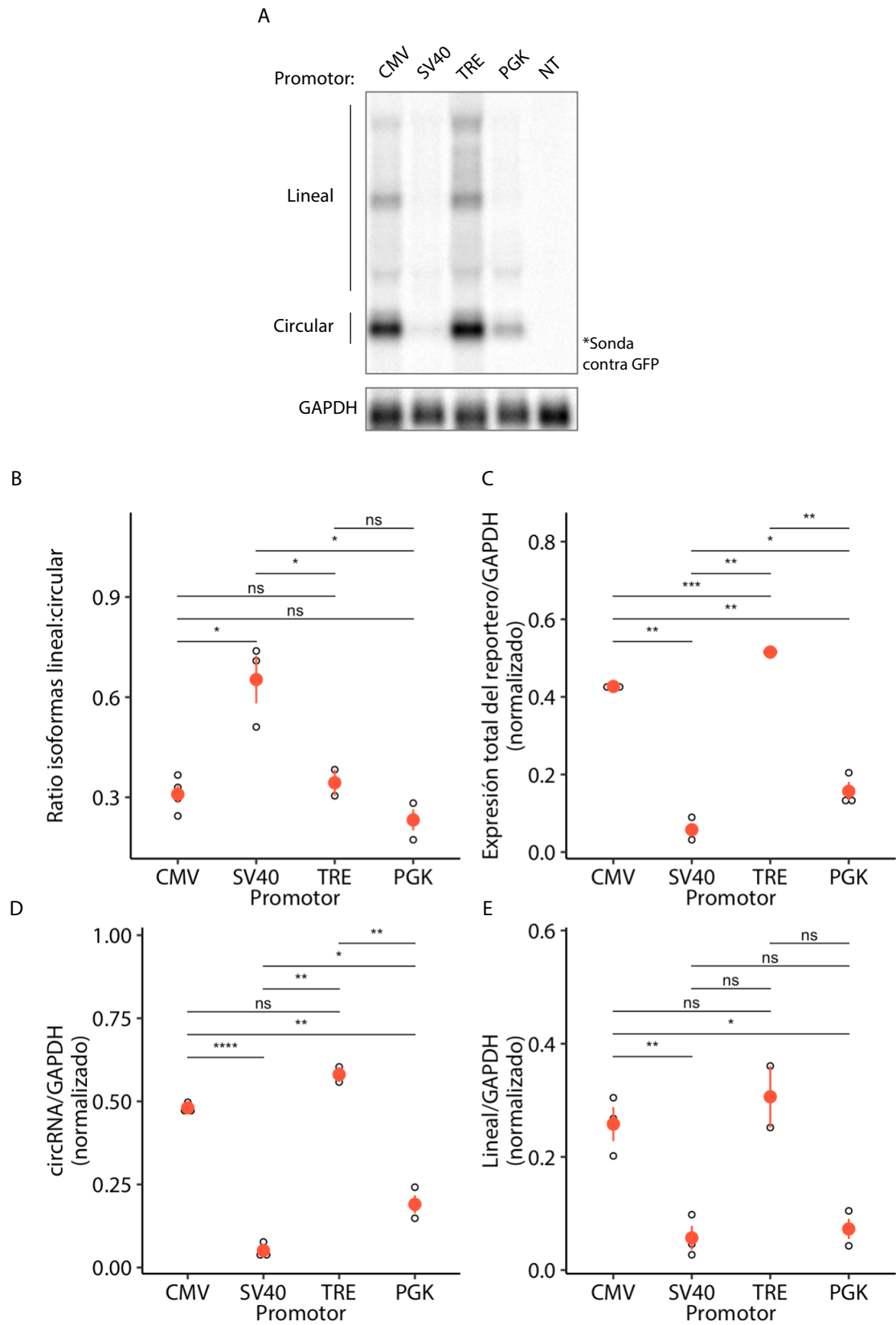


Figura R3:

(A) *Northern blot* revelado con una sonda antisentido contra GFP, mostrando la expresión de las construcciones con distintos promotores para expresar *circRNAs* en células HEK293T. Calle 1: CMV; calle 2: SV40; calle 3: TRE; calle 4: PGK; calle 5: no transfectada. Se muestra GAPDH como control de carga.

(B), (C), (D) y (E) Cuantificación de las distintas réplicas de transfección seguida de *Northern blot*, mostrando el *ratio* lineal:circular, la expresión total del reportero, la expresión de la isoforma circular y la expresión de la isoforma lineal, respectivamente. En rojo, se indica la media entre las réplicas y su error estándar. La diferencia entre las medias se evaluó mediante un test-t de Student (ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Del conjunto de las figuras, se extrae que los promotores CMV y TRE tienen los niveles de expresión más altos totales y del ARN circular. El mejor *ratio* lineal:circular tiende a suceder cuando se utiliza al promotor PGK, aunque no resultó significativamente distinto a CMV y TRE.

Comparación entre intrones flanqueantes (ZKSCAN1 vs. Laccase2)

Como se introdujo anteriormente, los intrones flanqueantes pueden inducir la circularización de una secuencia de interés (Liang and Wilusz, 2014). En este trabajo, se compararon dos pares de intrones distintos, provenientes del gen humano ZKSCAN1 y el gen Laccase2 de *Drosophila*, de acuerdo con lo recomendado por publicaciones anteriores (Dodbele et al., 2021; Kramer et al., 2015). Si bien la expresión total fue similar para ambos pares de intrones, en el caso de ZKSCAN1 se expresó una mayor proporción de isoforma lineal y una menor de circular, mientras que para Laccase2, se dio el balance opuesto (**Figura R4**). Así, al menos en células HEK293T, concluimos que el par de intrones del gen Laccase2 se destaca por encima del de ZKSCAN1 si se busca expresar un ARN circular con la menor proporción de lineal posible.

Efecto de la adición de un sitio de miR-92a-3p en la isoforma lineal

Se decidió incorporar un sitio con perfecta complementariedad para un *microRNA* endógeno altamente expresado en HEK293T (miR-92a-3p), únicamente presente en la

isoforma lineal, de manera tal de degradar selectivamente dicha isoforma y obtener un *circRNA* más limpio (**Figura R2**). Se compararon los niveles de ARN lineal, circular y su *ratio*, utilizando ambos pares de intrones flanqueantes (ZKSCAN1 y Laccase2), observándose una potente degradación de la isoforma lineal solamente cuando se utilizaron los intrones ZKSCAN1 (**Figura R4**). Podría especularse que los niveles de lineal expresados en la construcción con intrones Laccase2 son, desde el momento de síntesis, suficientemente bajos como para que no se evidencie su degradación en estado estacionario. Es destacable que los niveles de ARN circular no se ven afectados por la acción de miR-92a-3p.

Este resultado valida la estrategia de degradación selectiva de la isoforma lineal y, como se exhibirá más adelante, puede ser utilizado en otros tipos celulares (como neuronas).

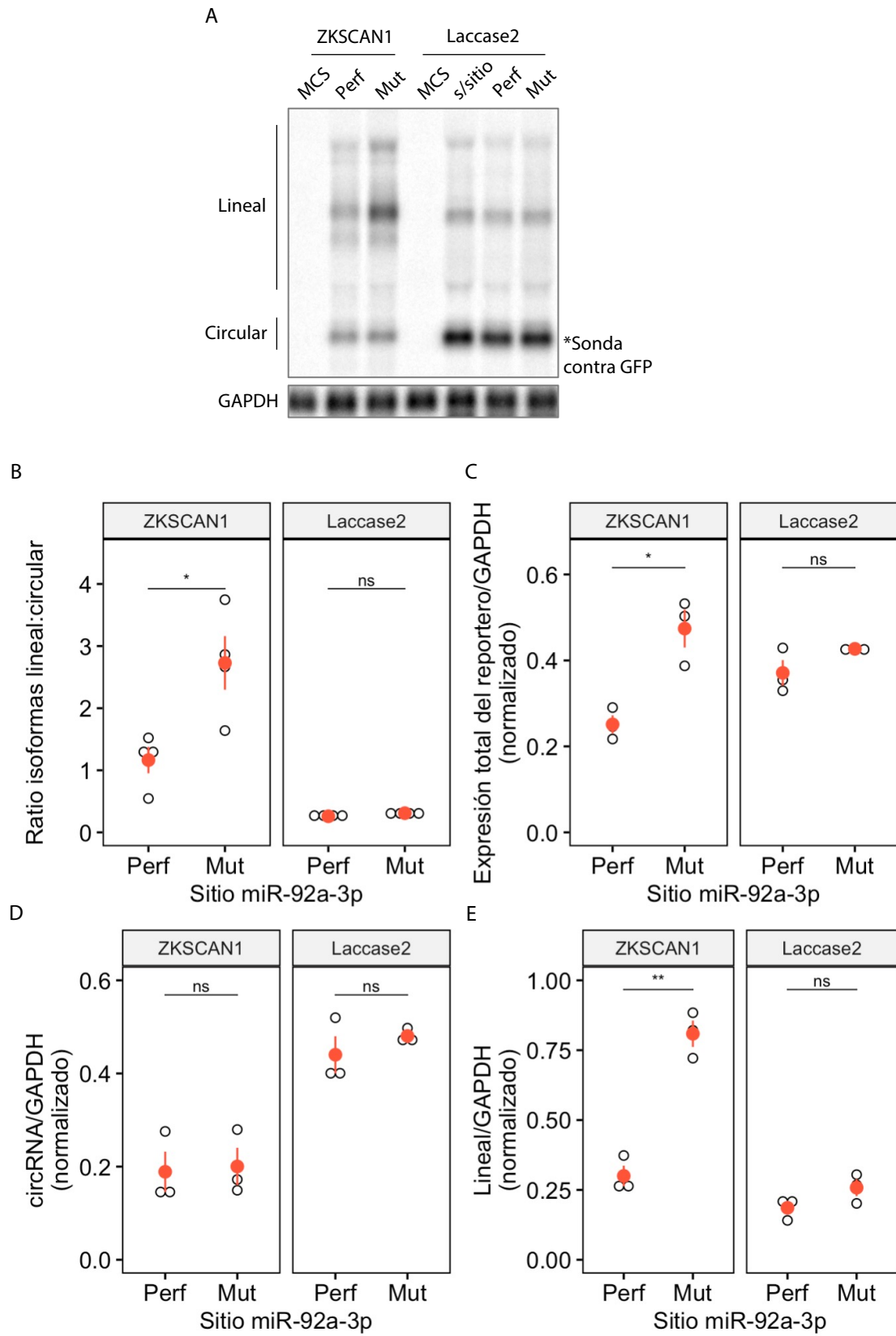


Figura R4:

(A) *Northern blot* revelado con una sonda antisentido contra GFP, mostrando la expresión de construcciones con sitios para miR-92a-3p con complementariedad perfecta o mutados, basadas en los intrones de los genes ZKSCAN1 o Laccase2. Calle 1: vector vacío de la construcción con intrones ZKSCAN1 y su sitio múltiple de clonado; calle 2: intrones ZKSCAN1 flanqueando a GFP partida con un IRES y sitio perfectamente complementario para miR-29a-3p; calle 3: intrones ZKSCAN1 flanqueando a GFP partida con un IRES y sitio mutado para miR-29a-3p; calle 4: vector vacío de la construcción con intrones Laccase2 y su sitio múltiple de clonado; calle 5: intrones Laccase2 flanqueando a GFP partida con un IRES sin sitio para miR-29a-3p; calle 6: intrones Laccase2 flanqueando a GFP partida con un IRES y un sitio perfectamente complementario para miR-29a-3p; calle 7: intrones Laccase2 flanqueando a GFP partida con un IRES y un sitio mutado para miR-29a-3p. Se muestra GAPDH como control de carga.

(B), (C), (D) y (E) Cuantificación de las distintas réplicas de transfección seguida de *Northern blot*, mostrando el *ratio* lineal:circular, la expresión total del reportero, la expresión de la isoforma circular y la expresión de la isoforma lineal, respectivamente. En rojo, se indica la media entre las réplicas y su error estándar. La diferencia entre las medias se evaluó mediante un test-t de Student (ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Del conjunto de las figuras, se extrae que el par de intrones del gen Laccase2 produce un mejor *ratio* lineal:circular que el par de intrones del gen ZKSCAN1. Asimismo, el sitio perfectamente complementario para miR-92a es efectivo degradando selectivamente a la isoforma lineal, sin afectar de manera significativa los niveles de ARN circular, aunque solamente cuando se utilizan los intrones ZKSCAN1.

Traducción del *circRNA* artificial

Como método alternativo para monitorear los niveles de circRNA producidos, se evaluó el efecto de las variables anteriormente descritas (promotor, intrones flanqueantes y sitio de miR-92a-3p) sobre la traducción del ARN circular. Para este propósito, nos aprovechamos de la versión de GFP interrumpida a la mitad y la

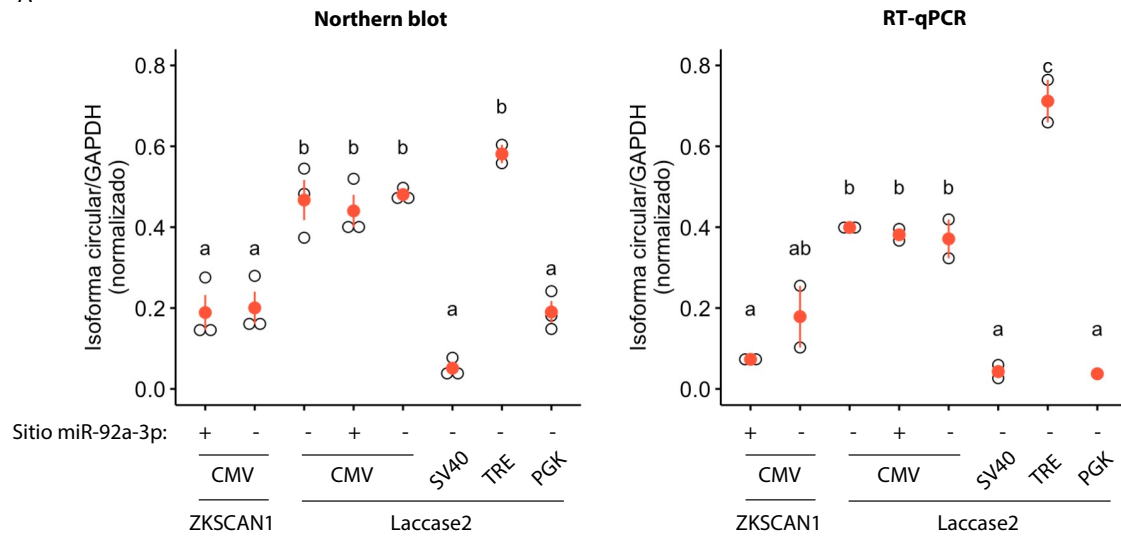
presencia de un IRES, de manera tal de solo poder ser traducida en forma completa si el ARN se encuentra circularizado (**Figura R2**). Esto fue complementado estudiando el fenómeno a distintos niveles: abundancia del transcripto circular por *Northern blot* y RT-qPCR, abundancia de la proteína GFP por *Western blot*, y fluorescencia por microscopía y citometría (**Figura R5**).

A nivel ARN, en presencia de un mismo promotor (CMV), se observó que los intrones del gen Laccase2 facilitaron la producción de mayores niveles de *circRNA* que los del gen ZKSCAN1 (**Figura R5A**). Por su parte, el promotor TRE produjo los niveles más altos tanto del transcripto como de fluorescencia, mientras que los promotores SV40 y PGK produjeron los niveles más bajos (**Figura R5A, B, C y D**). Finalmente, la presencia del sitio de miR-92a-3p no generó variaciones significativas a nivel ARN, aunque los niveles de fluorescencia, examinados por citometría, se vieron muy ligeramente disminuidos (**Figura R5D**). Es importante aclarar que, debido a la presencia de un sitio de *splicing* críptico en uno de los intrones ZKSCAN1, ocurrió un corrimiento en el marco de lectura en las construcciones con dichos intrones, que explica sus niveles indetectables de fluorescencia a pesar de expresar niveles medibles de ARN circular (**Figura R5E**).

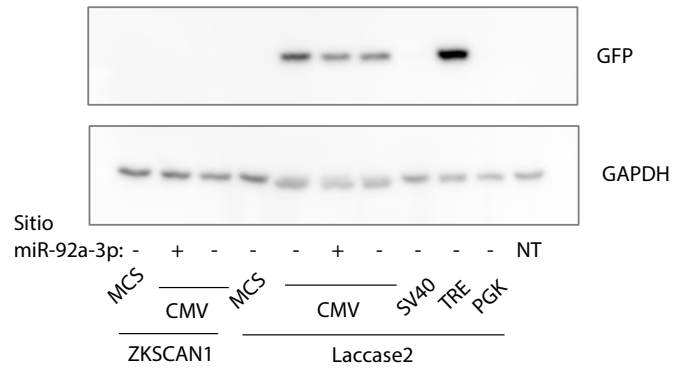
Finalmente, se estudió la relación entre los niveles de *circRNA* (por *Northern blot*) y de fluorescencia de GFP detectada por citometría, encontrando que correlacionan significativamente (**Figura R5F**). Se analizaron solamente las construcciones con intrones Laccase2, por la razón descrita en el párrafo anterior.

En general, de este set de resultados se extrae que, en concordancia con publicaciones anteriores, los *circRNAs* pueden ser eficientemente traducidos, a pesar de no tratarse de un fenómeno habitual en ARNs circulares naturales (Chen et al., 2023). Además, el nivel de fluorescencia correlacionó en gran medida con la cantidad de ARN circular, convirtiéndolo en un buen *proxy* para estudiar su expresión.

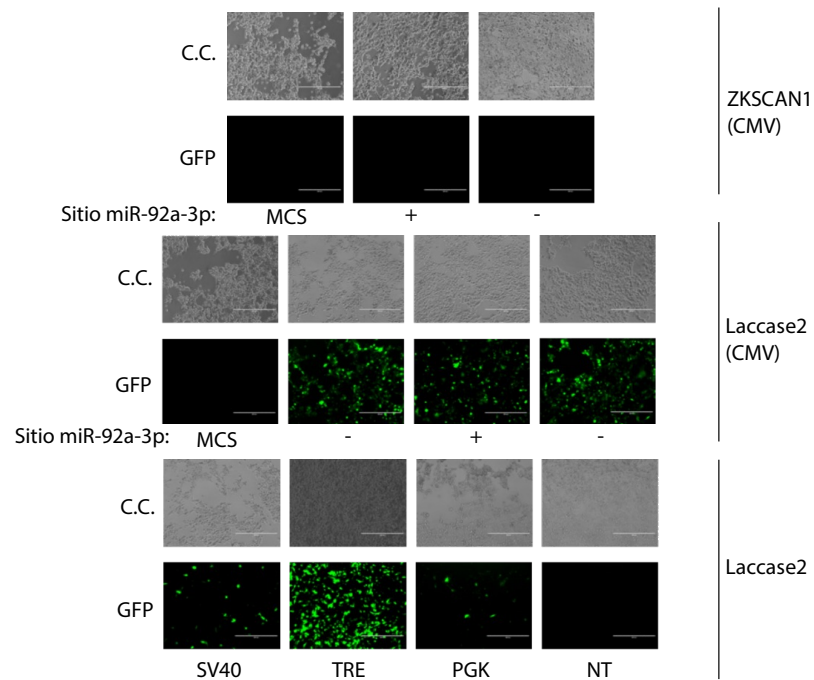
A



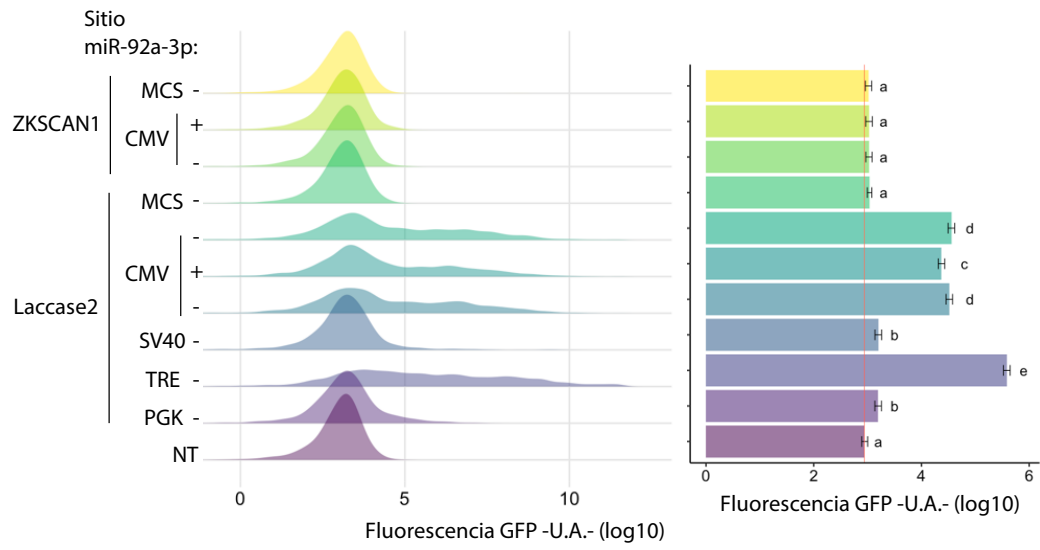
B



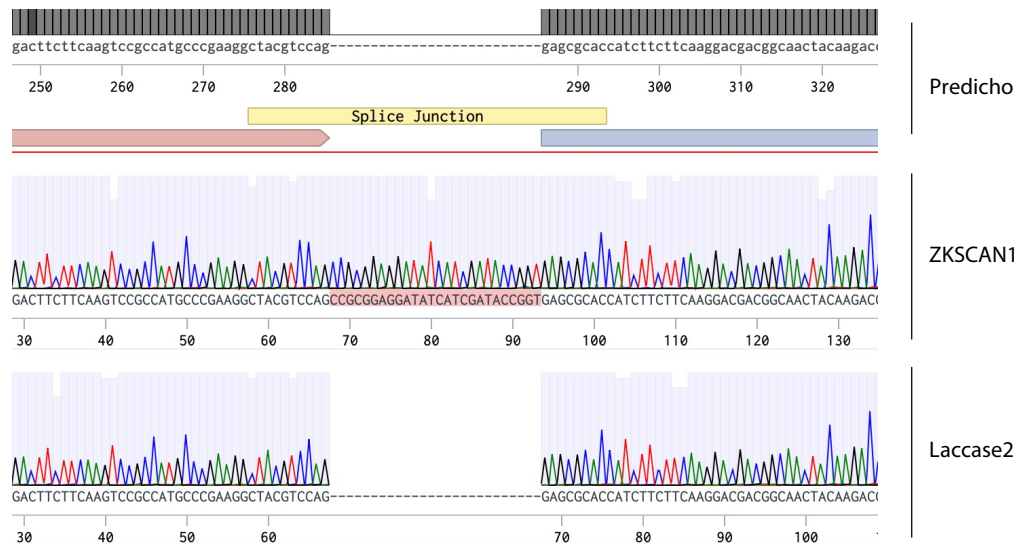
C



D



E



F

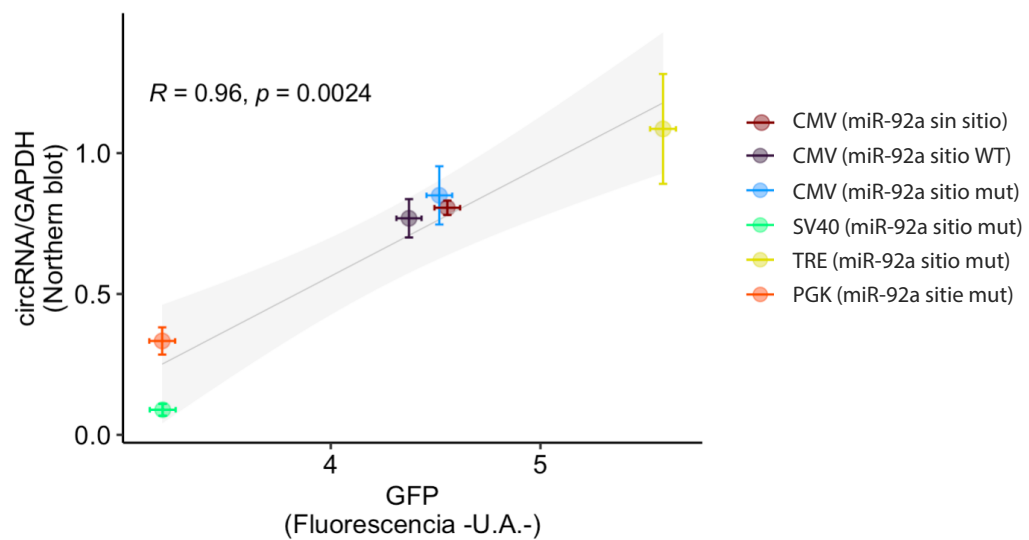


Figura R5: Se transfectaron células HEK293T con las distintas construcciones sintetizadas para la expresión del *circRNA*, variando intrones flanqueantes (ZKSCAN1 o Laccase2), promotor (CMV, SV40, TRE o PGK) y sitio de miR-92a-3p (perfectamente complementario o mutado). MCS (*multiple cloning site*) refiere al vector vacío.

(A) Niveles de expresión del ARN circular medido por *Northern blot* (se muestra la cuantificación de 3 geles) y RT-qPCR, en ambos casos normalizado por GAPDH. La estadística mostrada surge del ajuste de un modelo lineal para los datos, seguido de comparaciones múltiples corregidas por el método Tukey. En rojo, se indica la media entre las réplicas y su error estándar.

Los niveles calculados por ambos métodos correlacionan en gran medida, generando confianza en las mediciones realizadas. El promotor TRE se destaca como el de mayor expresión, seguido de cerca por el promotor CMV. Las construcciones con intrones Laccase2 muestran niveles de ARN circular mayores a las de ZKSCAN1, en línea con lo descrito anteriormente. Por su parte, el sitio de miR-92a no parece afectar negativamente los niveles de *circRNA*.

(B) Niveles de la proteína GFP medido por *Western blot*. Se muestra GAPDH como control de carga. No se realizó una cuantificación por tratarse de un único gel.

(C) Fotografías, incluidas a modo ilustrativo, de las células HEK293T transfectadas con las distintas construcciones. Se muestran imágenes con campo claro (C.C.) y fluorescencia verde (GFP) tomadas por microscopía.

(D) A la izquierda, un *ridgeplot* (gráfico de densidad en función de los niveles de fluorescencia de GFP en unidades arbitrarias y escala logarítmica). A la derecha, las medias marginales estimadas por cuadrados mínimos (*EMM*) y sus intervalos de confianza; la línea roja exhibe la media de las células sin transfectar. La estadística mostrada surge de hacer un modelo lineal generalizado para los datos, seguido de comparaciones múltiples corregidas por el método Tukey.

Utilizando el promotor TRE se obtuvieron los niveles de fluorescencia más altos, seguido por las construcciones con CMV (siempre considerando intrones

Laccase2). Aquí sí se observa una diferencia, aunque mínima, frente a la presencia del sitio de miR-92a.

(E) Alineamiento del resultado de secuenciación del sitio de *back-splicing*, amplificado por PCR, de una construcción con intrones ZKSCAN1 y otra con Laccase2.

Se observa una inserción en el sitio de *backsplicing* para la construcción con intrones ZKSCAN1, que explica la ausencia total de fluorescencia en los experimentos anteriores.

(F) Niveles de *circRNA* (medido por *Northern blot*) en función de los niveles de fluorescencia observados para GFP por citometría. Se graficaron solo las construcciones con intrones Laccase2, considerando que las de ZKSCAN1 no expresaron correctamente la proteína GFP. Se muestran las medias con sus respectivos errores estándar, tanto para los niveles de ARN circular como de fluorescencia.

Validación del sistema de degradación de la isoforma lineal en neuronas

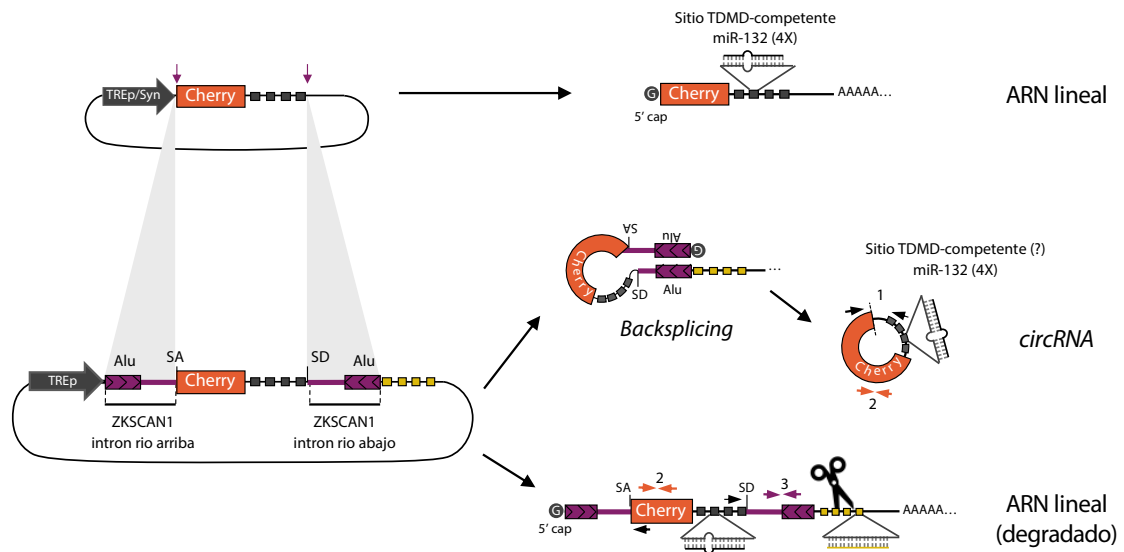
Debido a que el mecanismo de TDMD es particularmente eficiente en neuronas (De la Mata et al., 2015), también se corroboró allí la posibilidad de degradar la isoforma lineal selectivamente mediante la acción de un *microRNA* endógeno. Para esta construcción, se utilizaron intrones del gen ZKSCAN1 (similares a los utilizados anteriormente, aunque sin el sitio críptico de *splicing*), al *microRNA* miR-124-3p (en vez de miR-92a-3p) debido a su alta expresión en neuronas y el promotor TRE. La elección de los intrones de ZKSCAN1, en vez los de Laccase2, tuvo que ver con la posibilidad de hacer el clonado deseado en un vector apto para la producción de lentivirus, necesarios para transducir neuronas.

El ARN circular consistió de la secuencia codificante de la proteína fluorescente roja mCherry y sitios para miR-132-3p, cuya expresión en la forma de un RNA lineal es capaz de inducir TDMD (De la Mata et al., 2015). Una ilustración de lo esperado de cada construcción puede observarse en la **Figura R6A**.

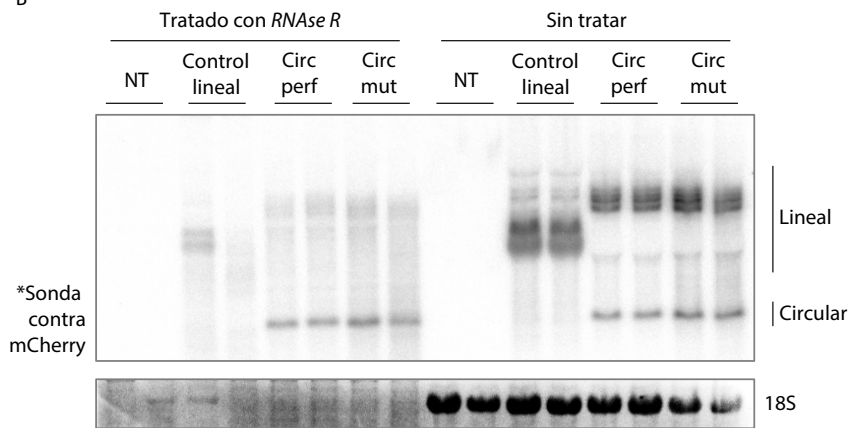
En lo que concierne a la expresión del *circRNA* propiamente dicho, en primer lugar se corroboró la expresión *per se* en células HEK293T. Además, se confirmó la circularidad del transcripto mediante una digestión con la enzima *RNase R* que resultó incapaz de degradar los ARNs circulares por carecer estos de extremos libres pero que degradó eficiente todos los ARNs lineales (**Figura R6B**). Es importante destacar que las células HEK293T no expresan miR-124-3p, por lo que no se esperaba ver degradación alguna de la isoforma lineal, sino solamente confirmar la expresión del ARN circular.

Luego, se empaquetaron las distintas construcciones (circulares o controles lineales) en vectores lentivirales y se transdujeron neuronas corticales o hipocampales de ratón. Para distinguir cada isoforma, se diseñaron *primers* específicos contra cada especie de interés, tal como se describe en la **Figura R6A**. Finalmente, se midieron los niveles de las isoformas lineal, circular y el total de expresión por RT-qPCR, encontrando que el sistema de degradación de la isoforma lineal actúa en forma selectiva y es efectivo también en células neuronales (**Figura R6C**).

A



B



C

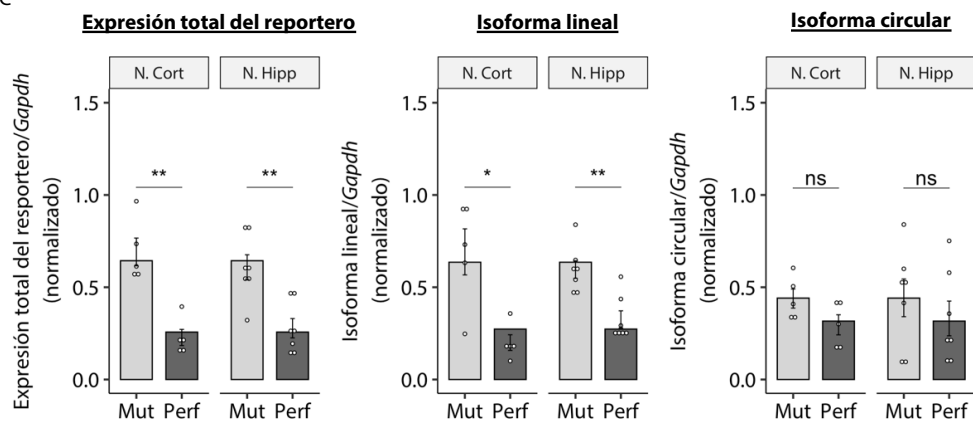


Figura R6:

(A) Esquema ilustrativo del vector de expresión del ARN circular para transducción de neuronas.

Se exhibe la construcción del inductor de TDMD lineal contra miR-132 previamente publicado (De la Mata et al., 2015). Sobre esta, se agregaron los intrones del gen ZKSCAN1 para favorecer la circularización. Adicionalmente, se incluyeron cuatro sitios con perfecta complementariedad para miR-124 (altamente expresado en neuronas), con el fin de degradar selectivamente la isoforma lineal.

(B) *Northern blot* de la sobreexpresión de un ARN circular pensado para neuronas en células HEK293T. A la izquierda, los ARNs extraídos fueron tratados con la enzima *RNAse R* que degrada ARNs lineales pero no circulares. A la derecha, los mismos ARNs sin tratar. Los ARNs fueron revelados con una sonda contra *mCherry*. En el panel inferior, se muestra al ARN 18S como control de carga.

(C) Medición de los niveles de isoforma circular, lineal y total de la construcción de sobreexpresión luego de transducir neuronas hipocampales o corticales con un vector lentiviral. La diferencia entre las medias se evaluó mediante un test-t de Student (ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Se observa una disminución significativa de la isoforma lineal, así como de la expresión total del vector, mientras que la isoforma circular permanece sin ser afectada.

Sección II: Evaluando el efecto de la topología del target sobre la estabilidad de los microRNAs.

Luego de realizar el estudio exhaustivo de sobreexpresión de ARNs circulares, se seleccionaron las construcciones más efectivas para los distintos modelos y se procedió a investigar el efecto de los *circRNAs* en la estabilidad de los *microRNAs*. Para esto, como se describirá con mayor detalle a continuación, se insertaron en las construcciones circulares sitios de unión a miRNAs con arquitectura de interacción capaces de provocar TDMD cuando están presentes en RNA lineales. A continuación, se estudió el efecto sobre la estabilidad de un *miRNAs* de un ARN circular con sitios tipo TDMD, utilizando como control una versión idéntica, pero con sitios mutados en la región de unión a la semilla de los *miRNAs*. En paralelo, se realizaron los mismos experimentos con controles de *ARNs* lineales. Adicionalmente, se estudiaron distintas construcciones artificiales en células HEK293T y en modelos neuronales, aparte de indagar sobre el caso endógeno de *Cdr1as* y miR-7 introducido anteriormente.

ARNs circulares exógenos y TDMD en células HEK293T

Con el objetivo de estudiar el potencial efecto de los *circRNAs* sobre la estabilidad de los *microRNAs*, se clonó un sitio con arquitectura de interacción tipo TDMD contra miR-218-5p en la construcción con promotor CMV, intrones Laccase2 y sitios con perfecta complementariedad para miR-92a en la isoforma lineal (**Figura R7A**). El sitio de miR-218-5p fue extraído de un caso previamente validado en la bibliografía (Li et al., 2021), así como los 20 nucleótidos flanqueantes (para mantenerlo en su contexto directo). Adicionalmente, se generó un segundo *circRNA* acortando la secuencia original de ~1300 a ~350 nucleótidos (**Figura R7A**). Esto fue motivado por dos razones: la primera es que el tamaño promedio de los ARNs circulares naturales ronda las 350 bases (Zhang et al., 2021); la segunda es que un reporte reciente demostró que acortar un *target* lineal puede disminuir su capacidad de gatillar TDMD (Li et al., 2021). Para ambos tamaños se generaron los controles lineales correspondientes.

En primer lugar, se corroboró que los niveles de expresión de la construcción circular fueran similares a los de los respectivos controles lineales (**Figura R7B**). Se evaluaron,

tanto por *Northern blot* como por RT-qPCR, los niveles de expresión de las distintas construcciones (**Figura R7B y C**). En todos los casos, los transcriptos expresados fueron detectables y observables en un gel (**Figura R7B**). La cuantificación arrojó que la expresión de la variante lineal de ~1300 bases fue significativamente mayor a de la variante lineal, mientras que no se obtuvieron diferencias significativas entre las construcciones de ~350 bases (**Figura R7C**). Además, se confirmó la circularidad de los transcriptos mediante un tratamiento con la *RNase R*, donde se observó una mayor degradación para las construcciones lineales que las circulares (**Figura R7D**).

A pesar de encontrar cierta diferencia de expresión entre algunas de las construcciones, decidimos estudiar el efecto de las distintas variantes circulares y lineales sobre miR-218-5p. Para eso, se comparó siempre una versión con un sitio con arquitectura tipo TDMD *-Bulged (WT)-* contra una equivalente, pero con el sitio mutado *-Seed-mut-*. En línea con lo reportado anteriormente, mientras que el transcripto lineal de ~1300 nucleótidos produjo una degradación significativa del *miRNA*, su versión recortada de ~350 bases fue incapaz de hacerlo (**Figura R7E**). Llamativamente, este fenómeno no se reprodujo con la versión circularizada, que fue capaz de degradar con ambos tamaños (**Figura R7E**), aun pese a que la expresión de la versión circular de ~1300 bases fue menor que la de la lineal equivalente. Alternativamente al miR-218-5p maduro, se midieron los niveles de sus pri-miR (pri-miR-218-1 y 2) y otro *miRNA* no relacionado (miR-9-5p). En ningún caso se detectaron efectos significativos por parte de los ARNs lineales o circulares, descartándose posibles efectos indirectos transcripcionales o de maduración del *miRNA* (**Figura R7E**). Las hebras pasajeras de miR-218 (miR-218-1-3p y miR-218-2-3p) no pudieron ser detectadas por RT-qPCR.

Este primer experimento en la línea celular HEK293T sugiere que la topología circular del *target* puede tener un efecto determinante en su funcionalidad, independientemente de su secuencia primaria y de la presencia de la cola de poli(A) y el CAP, presentes en el ARN lineal.

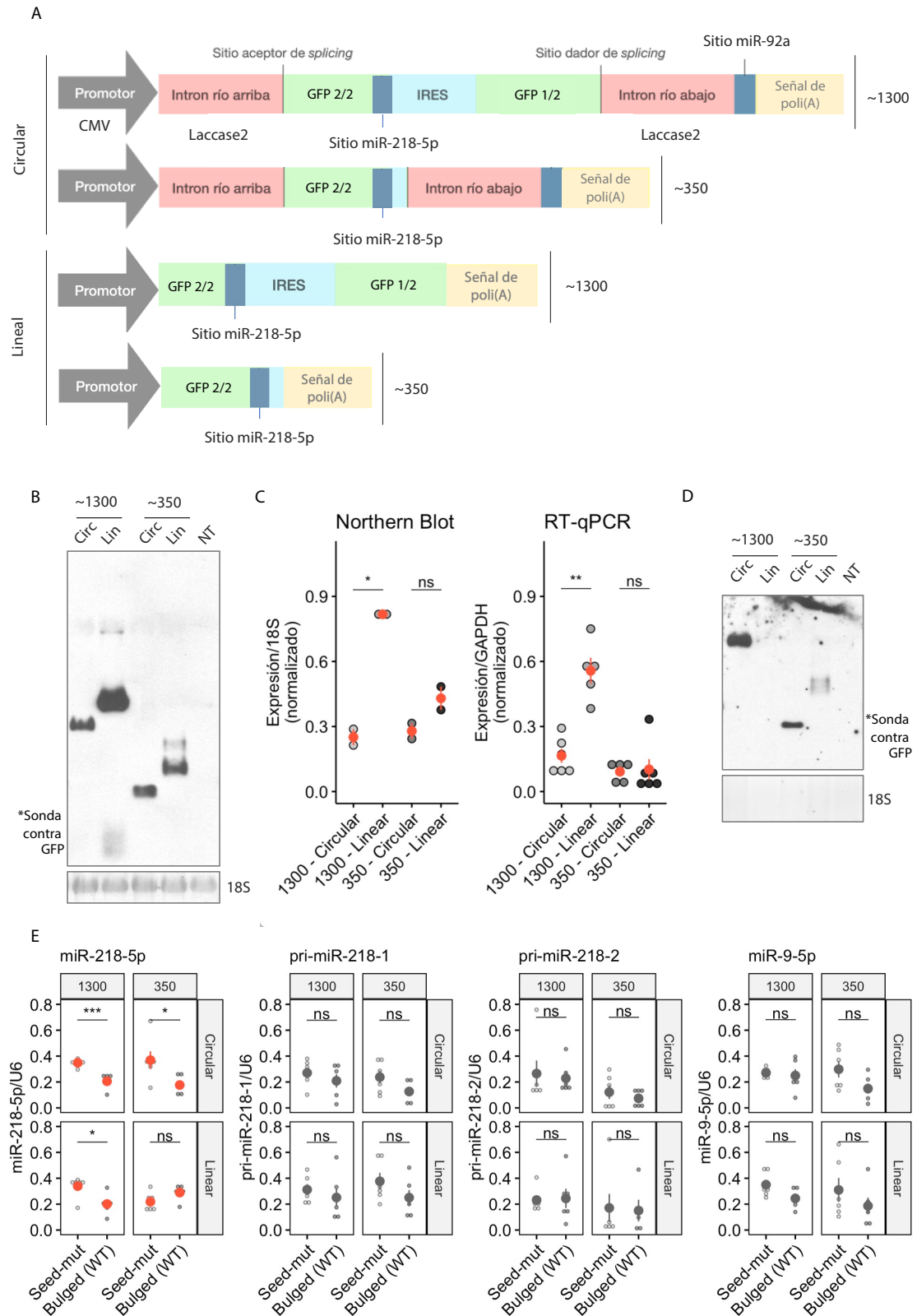


Figura R7:

(A) Esquema ilustrativo de las construcciones utilizadas para evaluar el efecto de la topología de distintos *targets* sobre la estabilidad de miR-218-5p. Todas se

basaron en el *backbone* con intrones Laccase2 y un sitio con perfecta complementariedad para miR-92a para la degradación de la isoforma lineal. Se generaron cuatro posibilidades distintas, dos circulares y dos lineales, de ~1300 y ~350 nucleótidos de tamaño. En los cuatro casos, se incluyó un sitio con arquitectura de interacción tipo TDMD para miR-218-5p dentro del ARN a ser expresado.

(B) *Northern blot* de la sobreexpresión de las construcciones de ~1300 y ~350 bases, tanto de topología circular como lineal. Se reveló con una sonda contra GFP. En el panel inferior se muestra al *rRNA* 18S como control de carga.

(C) Cuantificaciones de la expresión de las construcciones de ~1300 y ~350 bases, tanto de topología circular como lineal, por *Northern blot* y RT-qPCR.

Se observa una mayor expresión de la construcción lineal de ~1300 bases con relación a su respectiva circular. La diferencia de expresión entre las construcciones de ~350 bases no fue significativa.

(D) *Northern blot* con los remanentes de *circRNA* o ARN lineal luego de un tratamiento con *RNase R*, capaz de degradar transcritos lineales pero no circulares.

Se observa una potente degradación de las construcciones lineales pero no de las circulares, confirmando la topología covalentemente cerrada de las últimas.

(E) Medición de los niveles de miR-218-5p por RT-qPCR, normalizados por U6. Se incluyeron a los pri-miR-218-1 y 2, y a miR-9-5p como controles de la especificidad del efecto sobre el *miRNA* maduro.

De los resultados, se extrae que solamente miR-218-5p maduro es degradado, a través de TDMD, por los ARNs circulares de ~1300 y ~350 bases, y el lineal de ~1300, mientras que no se observa degradación para ARN lineal más pequeño.

ARNs circulares exógenos y TDMD en neuronas

El mecanismo de degradación de *microRNAs* mediado por sus *targets* (TDMD) se ha probado particularmente activo en neuronas (De la Mata et al., 2015), a partir de lo

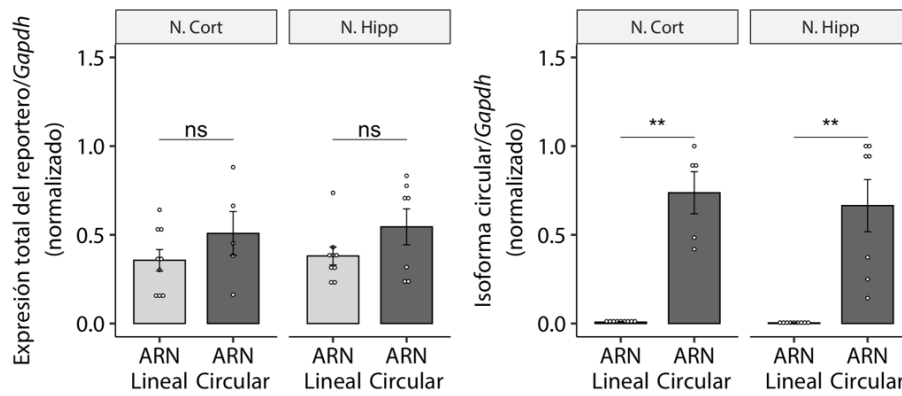
cual decidimos estudiar el potencial efecto de los ARNs circulares en los *microRNAs* en este tipo celular. Para eso, se partió de un inductor de TDMD artificial previamente descrito por nuestro laboratorio (De la Mata et al., 2015), capaz de degradar a miR-132 cuando se lo transduce en neuronas. Dicha construcción consistió de la secuencia de la proteína mCherry, seguida de 4 sitios en tándem contra miR-132, con arquitectura de interacción de tipo TDMD -*Bulged (WT)*- (o una versión mutada -*Seed-mut*-). Para provocar la circularización del inductor, se agregaron intrones del gen ZKSCAN1 flanqueando la secuencia. Además, se incluyó un sitio de miR-124 solamente presente en la isoforma lineal, de manera de degradarla selectivamente, como se explicó en la sección anterior (**Figura R6A**).

Siguiendo el mismo razonamiento que antes, con el objetivo de obtener niveles de expresión comparables entre las construcciones circulares y los controles lineales, se eligió el promotor TRE para los *circRNAs* y el promotor SYN para los ARNs lineales. La **Figura R8A** muestra que la expresión total de la construcción para expresar ARN circular con promotor TRE y la de la construcción para expresar ARN lineal con promotor SYN no exhibe diferencias significativas, haciendo comparables ambas construcciones. A continuación, se procedió a evaluar el efecto sobre miR-132, de ambas topologías. Se incluyeron, además, sendos controles para verificar que cualquier cambio (o falta del mismo), fuera exclusivo del *microRNA* maduro a través de TDMD, y no debido a cambios transcripcionales o influencia sobre la maquinaria de maduración de los *miRNAs*. Como puede observarse en la **Figura R8B**, el inductor lineal, tal como había sido reportado previamente, es capaz de degradar en forma específica a miR-132-3p, sin afectar a su hebra pasajera (miR-132-5p) ni al *pri-miRNA* u otros *microRNAs* no relacionados, apoyando la noción de que se trata de una degradación activa mediada por el *target* (TDMD). Llamativamente, dicha degradación no se recapitula cuando se circulariza el inductor (**Figura R8B**), en contraposición con lo observado en células HEK293T.

En este segundo experimento, la diferencia en el efecto de TDMD entre las topologías circular y lineal se mantienen, pero el sentido se invierte. Mientras que en las construcciones estudiadas en células HEK293T encontramos un *circRNA* capaz de degradar cuando el lineal equivalente era incapaz, para la construcción estudiada en

neuronas el lineal es efectivo gatillando degradación cuando el circular no. En conjunto, ambos resultados sugieren, aunque desde lugares opuestos, que la topología del *target* puede determinar el destino de la interacción.

A



B

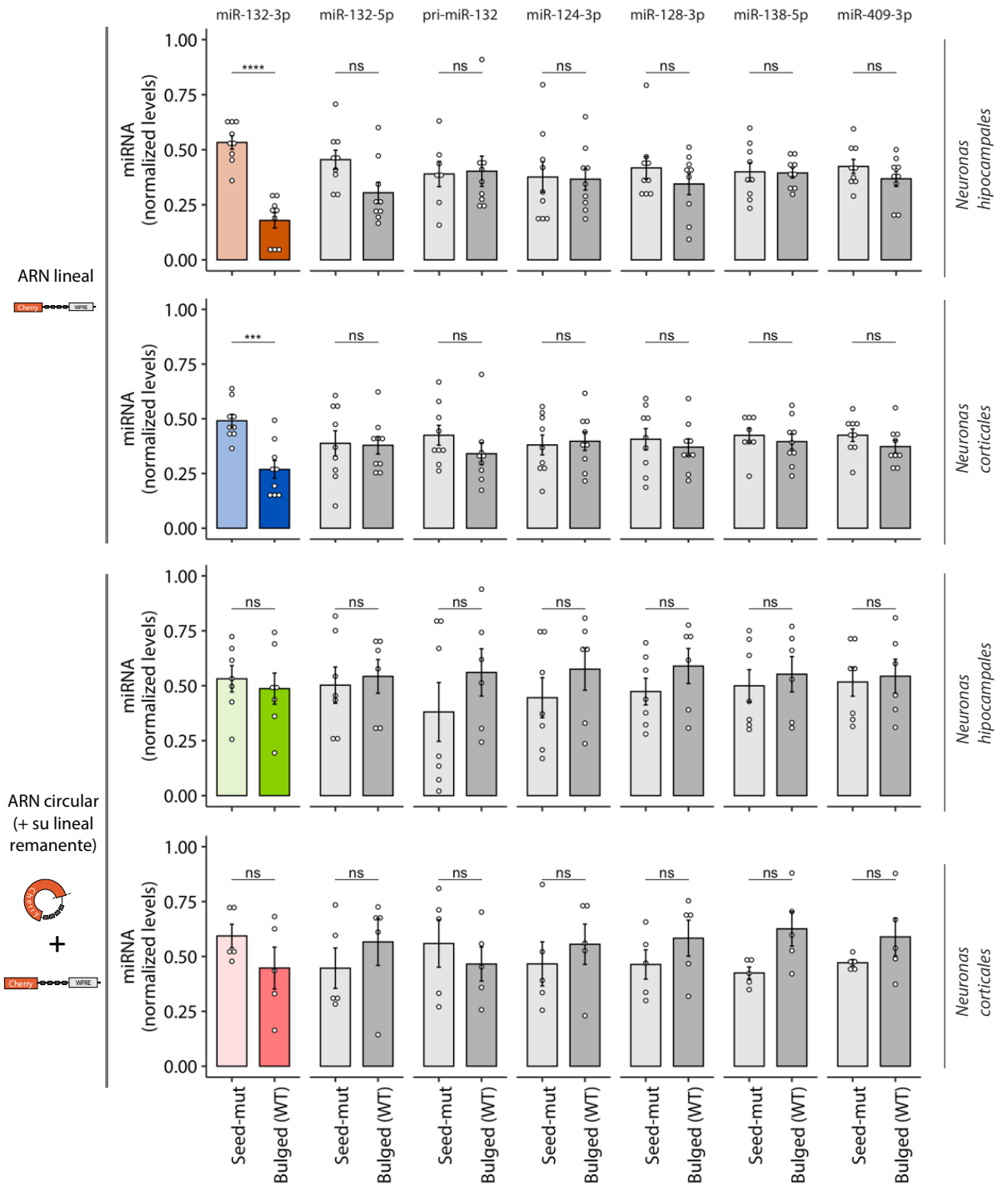


Figura R8:

(A) Medición de los niveles de isoforma circular y del total de las construcciones de sobreexpresión del ARN circular y el control lineal, luego de transducir neuronas hipocampales o corticales con un vector lentiviral.

La expresión total de ambas construcciones obtenida no presenta diferencias significativas. Asimismo, y de acuerdo con lo esperado, la única en presentar niveles medibles de ARN circular es la construcción con intrones ZKSCAN1, mientras que no se detecta ARN circular en aquella que carece de ellos.

(B) Medición de los niveles de miR-132-3p, su hebra pasajera (miR-132-5p), pri-miR-132 y otros *microRNAs* control (miR-124-3p, miR-128-3p, miR-138-5p y miR-409-3p), frente a la sobreexpresión de la construcción circular o su control lineal, en neuronas hipocámpales o corticales. Los ARNs expresados, sean circulares o lineales, contenían sitios con arquitectura tipo TDMD *-Bulged (WT)-* contra miR-132-3p o sitios mutados *-Seed-mut-* como control.

Solamente se observó degradación de miR-132-3p maduro frente a la expresión de la construcción lineal con sitios tipo TDMD *-Bulged (WT)-*, en ambos tipos neuronales, mientras que no se obtuvieron diferencias significativas con las construcciones circulares.

La diferencia entre las medias se evaluó mediante un test-t de Student (ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$), y, cuando se realizaron múltiples comparaciones, se corrigió por el método de Bonferroni.

Interacción física entre *circRNA* y *miRNA*, y localización subcelular

Con el objetivo de verificar que la aparente imposibilidad para degradar del ARN circular en neuronas no se debía a una imposibilidad de interacción física entre el *circRNA* y el *miRNA*, se realizó un experimento de inmunoprecipitación de ARN (RIP) purificando específicamente AGO2 y aislando todas las especies de ARN coprecipitadas. Con este fin, co-transfectamos células HEK293T con una versión etiquetada con el péptido FLAG de la proteína Argonauta (FLAG/HA-AGO2) junto a las diferentes construcciones que expresan *circRNAs*. Debido a la baja abundancia de miR-132 en las células HEK293T, también se cotransfectó un vector para pri-miR-132. A continuación se realizó una inmunoprecipitación seguida de un análisis por RT-qPCR del *circRNA*. Observamos que el *circRNA* artificial se purificó efectivamente junto con AGO2 solo cuando presentaba sitios de tipo TDMD para miR-132, pero no en presencia de sitios contra miR-132 mutados en la región semilla del *miRNA* (**Figura R9A**). Para

controlar que la IP fuera específica, se mostró que los niveles de un RNA no relacionado (U6) no dependen del tipo de sitio en el ARN circular (**Figura R9A**). Además, en la **Figura R9B**, se exhibe que la IP fue efectiva, dado que los niveles de IP/*Input* de un miRNA no relacionado (miR-27) fueron mucho mayores que los de U6, algo esperable considerando que los *miRNA* son cargados en AGO2 mientras que U6 no. También se corroboró la expresión e inmunoprecipitación de FLAG/HA-AGO2 por *Western blot* (**Figura R9C**). Estos resultados demuestran que el ARN circular es capaz de unirse específicamente al complejo RISC, descartando que defectos en la unión de *circRNA*-AGO2 puedan explicar la falta de actividad TDMD observada.

En segunda instancia, para excluir la posibilidad de que las diferencias observadas fueran una consecuencia trivial de una localización aberrante del *circRNA* en relación con la isoforma lineal, se realizó un fraccionamiento subcelular, entre núcleo y citoplasma para analizar la localización subcelular de las distintas especies. Nuestros resultados mostraron que el *circRNA* artificial se acumula en el citoplasma en proporciones similares con relación al control lineal, y que es solo ligeramente menor en el compartimento nuclear (**Figura R9D y E**), sugiriendo que la incapacidad del *circRNA* para desencadenar TDMD no está relacionada con su retención en el núcleo. Se controló el correcto fraccionamiento subcelular por *Western blot* (**Figura R9F**), verificando que β -*Tubulin* fracciona en citoplasma pero no en núcleo e *Histone-3* en núcleo y no citoplasma. A su vez, por RT-qPCR se verificó que la relación entre GAPDH y U6 correlacione con lo predicho, esperando encontrar a GAPDH mayormente en citoplasma y a U6 mayormente en núcleo (**Figura R9G**).

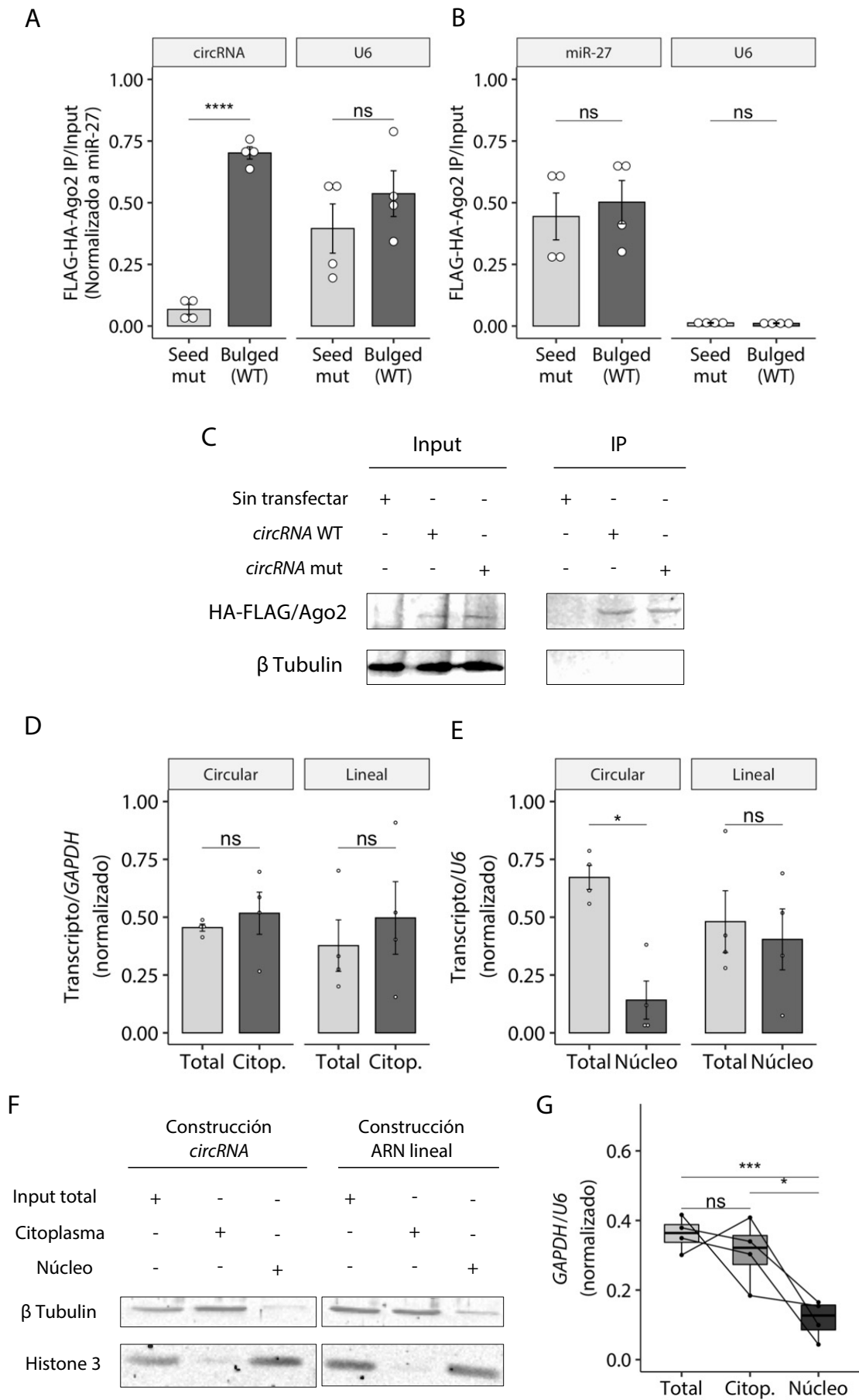


Figura R9:

(A) Inmunoprecipitación de AGO2-FLAG/HA (RIP) seguida de RT-qPCR en células HEK293T. La abundancia relativa del *circRNA* se midió utilizando *primers* divergentes específicos para la unión de *backsplicing* del *circRNA* y se normalizó a los niveles de un *miRNA* no relacionado (miR-27a) que no se esperaba que sea afectado por el *circRNA*. Se muestran los niveles basales de unión inespecífica de U6 a AGO2.

Se observa que el *circRNA* solamente es capaz de ser inmunoprecipitado cuando posee sitios para miR-132, pero no si estos se encuentran mutados. Tampoco se observa inmunoprecipitación específica de un ARN no relacionado (U6). Esto indica que el ARN circular es capaz de interactuar físicamente con miR-132 de manera específica.

(B) Control de calidad de la IP 1. Se midieron los niveles de U6 (control negativo) y miR-27 (control positivo) para verificar la eficiencia de la inmunoprecipitación de HA-FLAG/AGO2.

Del *ratio* IP/Input se desprende que miR-27 se carga eficientemente al complejo RISC, mientras que U6, al no interactuar con AGO2, está prácticamente ausente en la fracción coimmunoprecipitada con AGO2.

(C) Control de calidad de la IP 2. Ensayo de *Western blot* con el anticuerpo anti-HA a partir del *input* o de la IP de FLAG-AGO2 en células HEK-293T no transfectadas o co-transfectadas con el vector de expresión del *circRNA* que porta sitios miR-132 tipo TDMD -*Bulged (WT)*- o mutaciones en la región semilla (*Seed-mut*) junto con el vector HA-FLAG/AGO2.

Se observa una banda correspondiente a AGO2-FLAG/HA solamente en las células transfectadas, tanto en el input como en la fracción inmunoprecipitada. Por su parte, el control de carga (β -*Tubulin*) es detectable solamente en el input y no en la fracción inmunoprecipitada, demostrando que la técnica funcionó correctamente.

(D) y (E) Fraccionamiento subcelular que muestra las cantidades relativas de la fracción total vs. citoplasma (D) y la fracción total vs. nuclear (E), seguido de RT-qPCR de las isoformas de ARN circulares y lineales normalizadas por GAPDH (para citoplasma) o U6 (para núcleo).

Este análisis demuestra que el *circRNA* se exporta eficientemente al citoplasma, descartando así que la ausencia de degradación de miR-132 tenga que ver con una retención nuclear del ARN circular.

(F) *Western blot* representativo de células HEK293T transfectadas con el vector de expresión del *circRNA* o el control de ARN lineal, tras el fraccionamiento subcelular. Se utilizaron β -Tubulin e Histone-3 como marcadores de citoplasma y núcleo, respectivamente.

(G) El *Boxplot* muestra las medias de la relación GAPDH/U6 medidas por RT-qPCR, confirmando el correcto fraccionamiento subcelular de muestras tanto transfectadas con el vector de expresión de *circRNA* como con el control lineal.

La diferencia entre las medias se evaluó mediante un test-t de Student (ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Caso endógeno: influencia de la topología en la interacción entre *Cdr1as* y miR-7

Para extender lo observado a través de los sistemas de sobreexpresión de *circRNAs* artificiales hacia un caso endógeno conocido, se decidió estudiar la interacción *Cdr1as*-miR-7 (Hansen et al., 2013; Memczak et al., 2013). Con la intención de determinar si la topología circular de *Cdr1as* es importante para cumplir su función en la modulación de la abundancia de miR-7, se diseñaron herramientas para manipular los niveles endógenos de *Cdr1as* en neuronas primarias de roedores. Para reducir *Cdr1as*, se generó un vector lentiviral capaz de expresar un ARN de interferencia basado en precursores de miRNAs (*shRNAmiR*) específico contra *Cdr1as* (*shCdr1as*) y se transdujo en neuronas primarias con alta eficiencia. *ShCdr1as* fue basado en la secuencia de miR-671, un regulador natural de *Cdr1as* como se introdujo anteriormente, mutando dos de sus bases nucleotídicas para lograr una perfecta

complementariedad (**Figura R10A**). En línea con reportes previos (Piwecka et al., 2017), la reducción de *Cdr1as* produjo una caída en los niveles de miR-7, lo cual es consistente con un papel de estabilización del *circRNA* para este *miRNA* (**Figura R10B y C**). Además, como estrategia ortogonal para reducir los niveles de *Cdr1as* y descartar posibles efectos indirectos o artefactuales causados por *shCdr1as*, se utilizó CRISPR/Cas9 para mutar los sitios de *splicing* del gen endógeno *Cdr1as*. Para ello, se expresaron dos *sgRNAs* contra los sitios dador y aceptor de *splicing* de *Cdr1as*, respectivamente (**Figura R10D**). A pesar de alcanzar una eficacia menor en la reducción de *Cdr1as* en comparación con el *shCdr1as*, se observó un efecto similar consistente con la estabilización de miR-7 por *Cdr1as* (**Figura R10E**).

A fin de evaluar el efecto de la topología circular (o su ausencia) en la capacidad de *Cdr1as* para estabilizar a miR-7, se generó una versión lineal artificial del transcripto -*linCdr1as*- carente del sitio reconocido por *shCdr1as*. De esta manera, fue posible disminuir los niveles del ARN circular endógeno, mientras se sobreexpresaba al mismo tiempo una versión lineal del mismo. Curiosamente, la disminución de la abundancia de miR-7 causada por la reducción de *Cdr1as* endógeno no pudo ser rescatada ni aumentada mediante la co-expresión de *Cdr1as* lineal, incluso cuando los niveles del *linCdr1as* artificial alcanzados fueron similares a los del *Cdr1as* endógeno de las células control (**Figura R10B y C**).

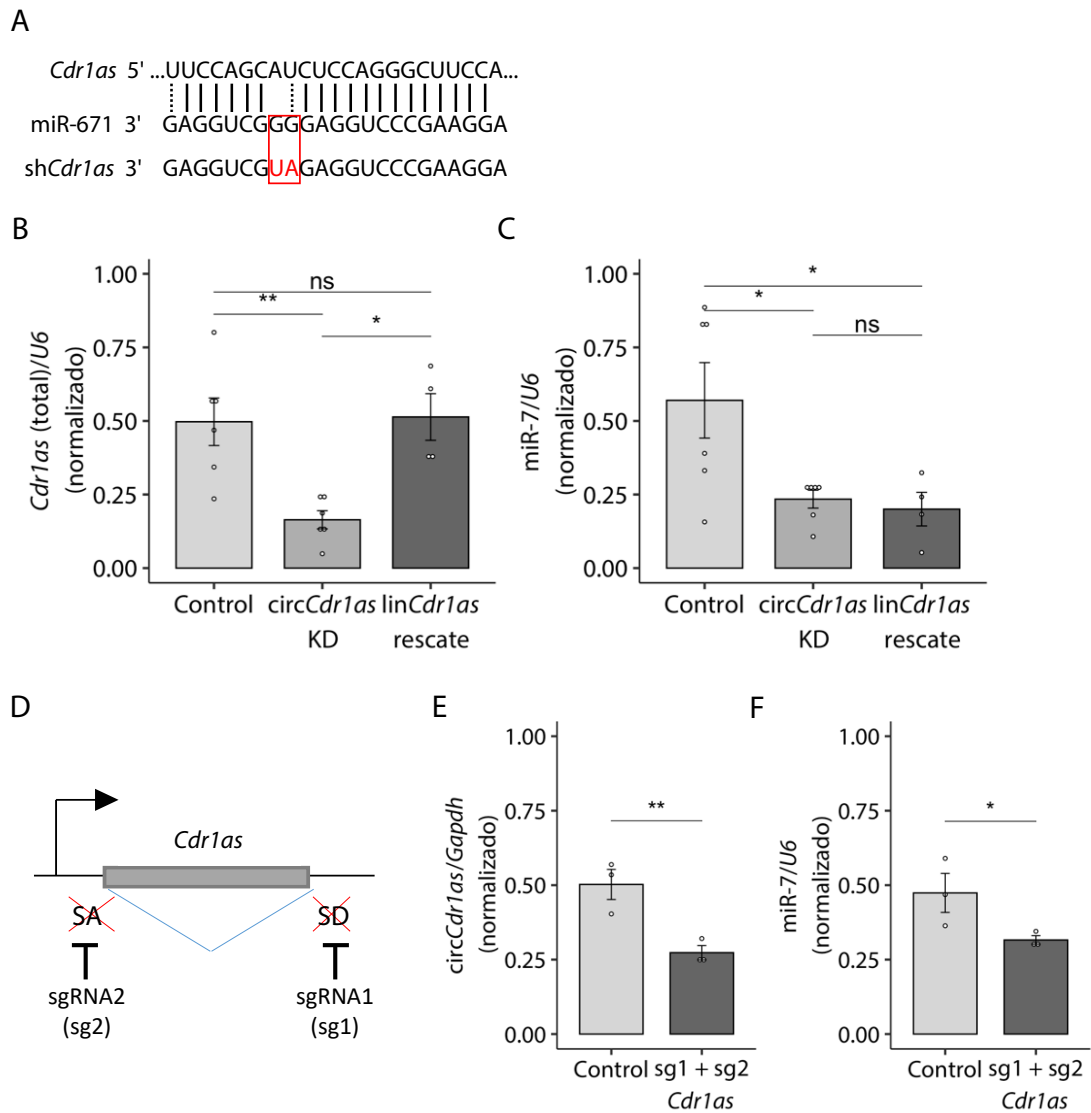


Figura R10:

(A) Esquema ilustrativo de las secuencias del sitio de unión de miR-671 y sh*Cdr1as* dentro de *Cdr1as*. sh*Cdr1as* se basa en miR-671 con dos cambios nucleotídicos que lo hacen perfectamente complementario al *circRNA* para maximizar su capacidad de corte.

(B) Niveles totales de *Cdr1as* (suma de lineal más circular) medidos por RT-qPCR tras la transducción de un shRNA aleatorio control, solo sh*Cdr1as*, o sh*Cdr1as* rescatado con una versión lineal de *Cdr1as* (lin*Cdr1as*) que carece del sitio de unión a sh*Cdr1as*, en neuronas primarias corticales.

Se observa un noqueo efectivo del ARN circular endógeno y un rescate de los niveles totales pero con su versión lineal.

(C) Abundancia de miR-7, medida en las mismas muestras que en el ítem (B).

El noqueo del *Cdr1as* endógeno produce una desestabilización del *miRNA*, de acuerdo con lo publicado previamente (Piwecka et al., 2017). El rescate con la versión lineal de *Cdr1as* no rescata los niveles de miR-7.

(D) Esquema ilustrativo del diseño de las guías para disrumpir por CRISPR/Cas9 el *splicing* de *Cdr1as*.

(E) Niveles totales de *Cdr1as* tras la edición CRISPR/Cas9 de los sitios de *splicing* de *Cdr1as*, medidos por RT-qPCR en neuronas primarias del hipocampo. Se utilizó como método ortogonal para disminuir los niveles del círculo endógeno.

Se observa una disminución significativa pero menos efectiva que la obtenida mediante *shCdr1as*.

(F) Abundancia de miR-7, medida en las mismas muestras que en el ítem (E).

En línea con lo obtenido para *shCdr1as*, la disrupción del *circRNA* endógeno produce una desestabilización de miR-7.

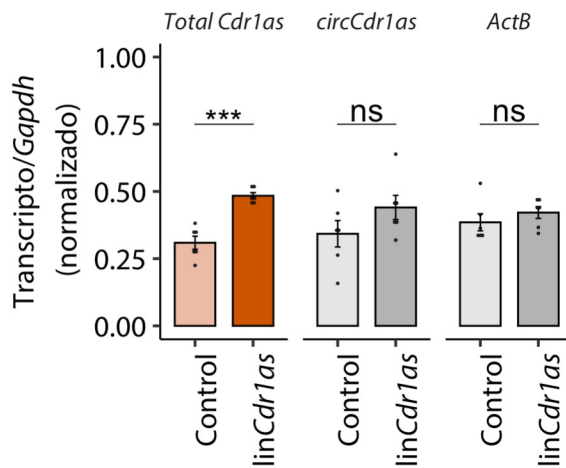
La diferencia entre las medias se evaluó mediante un test-t de Student (ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, *: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).**

Notablemente, la expresión aislada de *linCdr1as* -sin reducir el *Cdr1as* endógeno- causó una desestabilización significativa de miR-7 (**Figuras 11A y B**), consistente con que el TDMD es inducido por el ARN expresado solo bajo una topología lineal. Para excluir la posibilidad de que la disminución de miR-7 fuera una consecuencia de cambios en la transcripción y/o maduración del *miRNA* al transducir *linCdr1as*, se evaluó la abundancia del transcripto primario (pri-miR-7a-1), las hebras pasajeras de miR-7 (miR-7a-1-3p y miR-7a-2-3p) y dos *miRNAs* control adicionales (miR-9 y miR-132). El resultado obtenido arroja que la hebra guía miR-7-5p, pero no las hebras pasajeras ni los otros *miRNAs* control, sufre una degradación guiada por la versión lineal de *Cdr1as*. Confirma así que la reducción en miR-7 es un efecto post-transcripcional que ocurre después del procesamiento del *miRNA* y, por lo tanto, es compatible con que la construcción *linCdr1as* puede desencadenar TDMD (**Figuras 11A y B**). Una inspección cuidadosa de los sitios de miR-7 presentes en *Cdr1as* mostró que no menos de 3 de

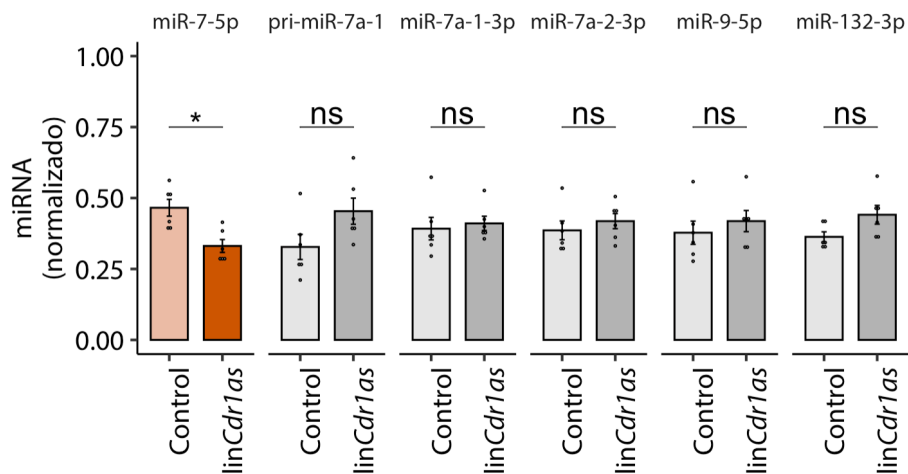
ellos exhiben una complementariedad de apareamiento de bases compatible con una arquitectura competente para TDMD (**Figura 11C**). Es importante destacar que el efecto observado en miR-7 causado por la sobreexpresión de lin*Cdr1as* lineal no correlacionó con una variación significativa en la abundancia endógena de *Cdr1as* (circular) ni de un gen control no relacionado (*ActB*), sugiriendo que no hay efectos indirectos potenciales debido a la sobreexpresión del transgen (**Figura 11A**). Las distintas isoformas de *Cdr1as* fueron factibles de ser distinguidas por RT-qPCR mediante pares de *primers* diseñados de manera que amplifiquen solo la isoforma circular (*primers* divergentes) o el total de todas las isoformas, como se exhibe en la **Figura 11D**.

En conjunto, lo observado en el par *Cdr1as*-miR-7 refuerza lo encontrado anteriormente para los distintos ARNs circulares artificiales: una misma secuencia primaria de ARN, puede producir efectos distintos sobre la estabilidad de un *microRNA*, dependiendo de si está o no circularizada. Esto indica fuertemente que existen diferencias intrínsecas entre las topologías circulares y lineales, aunque no siempre los diferenciales ocurran en la misma dirección, como se analizará en detalle en la discusión.

A



B



C



D

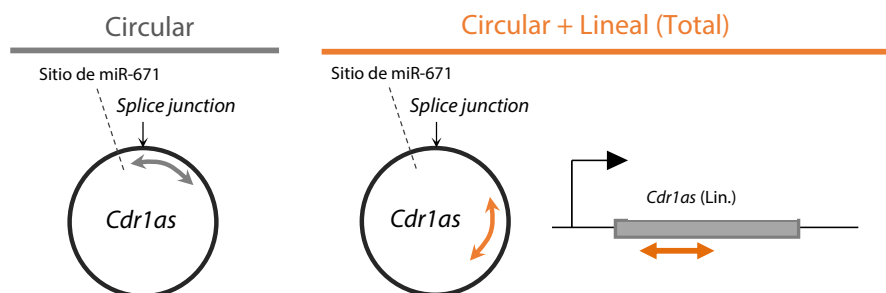


Figura R11:

(A) Niveles de expresión del total de *Cdr1as*, de *Cdr1as* exclusivamente circular (usando *primers* divergentes) y de un gen no relacionado (*ActB*), tras la sobre-expresión de *Cdr1as* lineal (lin*Cdr1as*). Los niveles se normalizaron a *Gapdh*.

Se obtuvo un aumento significativo de los niveles totales de *Cdr1as*, sin afectar los niveles de su isoforma circular.

(B) Niveles de expresión de la hebra guía de miR-7 (miR-7-5p), las hebras pasajeras (miR-7a-1-3p y miR-7a-2-3p), el ARN primario (pri-miR-7a-1) y dos *miRNAs* no relacionados (miR-9-5p y miR-132-3p). Todos los niveles de los distintos *miRNAs* se normalizaron a U6, mientras que el nivel del pri-miR se normalizó a *Gapdh*.

La degradación selectiva de miR-7-5p maduro sugiere que la versión lineal de *Cdr1as* provoca su desestabilización mediante el mecanismo de TDMD.

(C) Tres ejemplos de posibles sitios de unión con arquitectura de interacción tipo TDMD para miR-7 presentes en *Cdr1as*, alineados e ilustrados utilizando scanMiR (Soutschek et al., 2022).

(D) Esquema ilustrativo del diseño de *primers* utilizado para amplificar las distintas isoformas de *Cdr1as*. En gris, el amplicón exclusivo de la isoforma circular. En naranja, el amplicón presente tanto en la isoforma circular como lineal.

La diferencia entre las medias se evaluó mediante un test-t de Student (ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$), y, cuando se realizaron múltiples comparaciones, se corrigió por el método de Bonferroni.

Generalizando lo aprendido: redes de interacción entre *circRNAs* y *miRNAs* en diferenciación neuronal

Los resultados obtenidos, en conjunción con reportes previos descriptos anteriormente, sugieren un abanico de posibles destinos para una interacción entre un *miRNA* y un *circRNA*. En primera instancia, los casos, introducidos al inicio de esta

tesis, *Cdr1as* y *circCSNK1G3* (Chen et al., 2019; Piwecka et al., 2017), prueban que puede existir una estabilización de un *microRNA* mediada por un ARN circular. El ejemplo particular de *Cdr1as* fue, además, validado en este mismo trabajo (ver **Figura R10**). En segundo lugar, y en forma opuesta, en un apartado anterior se demostró que los círculos pueden llegar a degradar a un *microRNA*, al menos en las condiciones y con los ARNs circulares expresados en esta tesis (ver **Figura R7**). Finalmente, también encontramos un *circRNA* capaz de interactuar físicamente con un *miRNA*, sin degradarlo, aun en condiciones estequiométricas similares a las de un control lineal que sí fue capaz de desestabilizar (ver **Figuras R8 y R9**).

Este tríada de posibilidades nos llevó a proponernos estudiar en forma más generalizada la interacción entre los dos tipos de moléculas. Para eso, analizamos datos de secuenciación disponibles de expresión de *miRNAs*, *circRNAs*, *mRNAs* y *RNAs* nacientes de células hESC H9, tanto indiferenciadas como diferenciadas en progenitores de neuronas del cerebro anterior (*Forebrain – FB-*) (Chen et al., 2015; Zhang et al., 2016). Razonamos que este modelo sería apropiado para investigar distintas hipótesis desde el punto de vista de que una proporción significativa de *circRNAs* están fuertemente regulados durante la diferenciación neuronal, con una mayor frecuencia de aumento que de disminución (Rybak-Wolf et al., 2015; You et al., 2015). Concomitantemente, se conocen ejemplos de *miRNAs* específicos de neuronas que son más susceptibles a la degradación en neuronas con mayor grado de maduración (Krol et al., 2010), un escenario en el que los *circRNAs* podrían actuar regulando selectivamente la estabilidad de los *microRNAs*. Para considerar solo los pares *circRNA-miRNA* bioquímicamente respaldados, utilizamos un catálogo de interacciones *mRNA-miRNA*, *lncRNA-miRNA* y *circRNA-miRNA*, predichas con base en datos de experimentos tipo CLIP-Seq. Dicho catálogo está disponible en la base de datos STARBASE v3/ENCORI (Li et al., 2014; Yang et al., 2011) y fue utilizado en este análisis como una estimación de las interacciones legítimas.

En primer lugar, tomando la perspectiva del *miRNA*, se analizó los cambios en su abundancia a lo largo de la diferenciación correlacionaban con el grado de “esponjeo” (“*sponging*”) impuesto por los *circRNAs*. Para ello, inicialmente calculamos el número de “sitios *miRNA*-específicos efectivos” (“*miRNA-specific effective sites*”) contribuidos

por todos los ARNs circulares, estimados a partir del número total de sitios miRNA-específicos presentes en todos los *circRNAs* ponderados por los niveles de expresión de cada *circRNA* (un promedio entre sus niveles antes y después de la diferenciación, consulte Materiales y Métodos). Observamos que el número de sitios efectivos para *microRNAs* en *circRNAs* no mostró una correlación aparente con cambios en la abundancia de los primeros durante la diferenciación (**Figura 12A**). Luego, se calculó un coeficiente de “esponjeo sufrido” (“*sponging suffered*”) para cada *miRNA* mediante normalizar los sitios efectivos *miRNA*-específicos al nivel de abundancia de cada *microRNA* -promedio entre antes y después de la diferenciación- (**Figura 12B y C**). De este análisis no emerge una “preferencia” clara hacia la estabilización o degradación de miRNAs por parte de sus *circRNAs* afines, ya que los *microRNAs* no evidencian ningún patrón particular de variación neto en su regulación a lo largo de los cuartiles. (**Figura 12B y C**). Sin embargo, sí resulta interesante destacar que los cambios en los niveles de *microRNAs* pertenecientes al cuartil de los más “esponjeados” son los que muestran peor correlación con los cambios en los niveles de expresión de sus respectivos *pri-miRNAs*. Si consideramos al cambio en la abundancia de los *pri-miRNAs* como una aproximación del cambio en los niveles de transcripción de los respectivos genes de cada *microRNA* durante la diferenciación, este resultado sugiere que los *miRNAs* pertenecientes al cuartil más “esponjeados” son los más sujetos a una regulación post-transcripcional a nivel del *miRNA* maduro (**Figuras 12D**). Al ajustar los datos a un modelo de regresión múltiple con interacción, encontramos que, a medida que aumenta el nivel de “esponjeamiento”, disminuye la correlación entre *miRNA* maduro y *pri-miRNA* (**Figura 12D**). En resumen, aunque no podemos descartar que la biogénesis (a partir de *pri-miRNAs*) de los *miRNAs* más altamente regulados sea más eficiente que la de los menos regulados, nuestro análisis argumenta a favor de un efecto post-transcripcional de los *circRNAs* sobre la estabilidad de los *miRNAs* que actúa en paralelo, aunque de manera independiente, a los cambios en la transcripción de los *miRNAs*. Este efecto se produciría a través de la interacción concertada de *miRNAs* individuales con múltiples y/o altamente expresados *circRNAs* a lo largo de la diferenciación resultando en una regulación neta positiva o negativa en la estabilidad de distintos miRNAs específicamente.

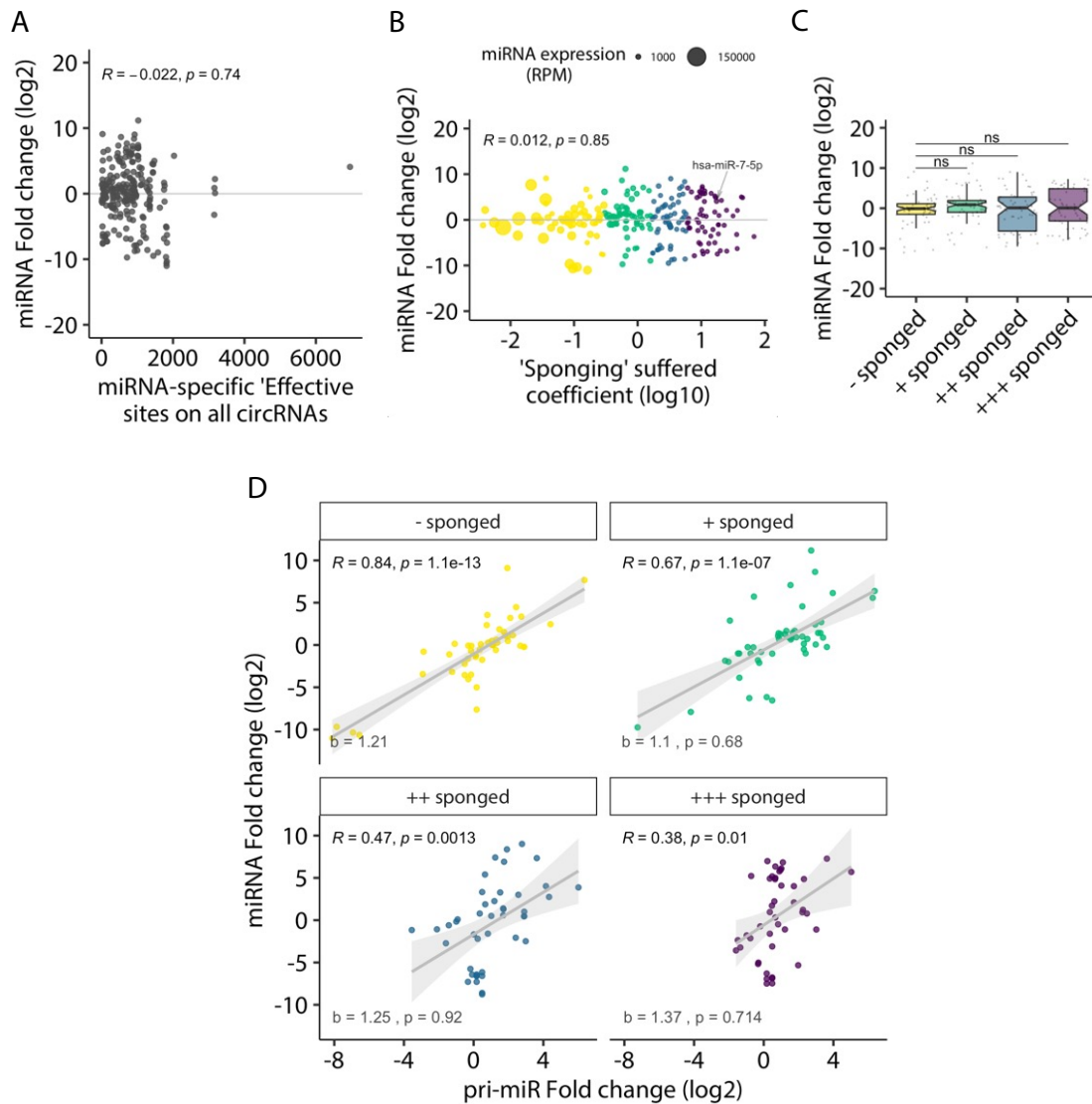


Figura R12:

(A) Gráfico de dispersión de las veces de cambio en la expresión *-fold change-* de *miRNAs* (log2) a lo largo de la diferenciación (de células hESC H9 en neuronas del cerebro anterior -FB-), en función del número de sitios efectivos de cada *microRNA* -*miRNA specific 'effective' sites*-.

(B) Gráfico de dispersión de las veces de cambio en la expresión *-fold change-* de *miRNAs* (log2) a lo largo de la diferenciación en función del coeficiente de "esponjeo" sufrido *-'sponging' suffered-* (log10). Coloreado por cuartiles de acuerdo con el coeficiente de "esponjeo" sufrido.

(C) *Boxplot* de las veces de cambio en la expresión *-fold change-* de *miRNAs* (log2) a lo largo de la diferenciación, separados por cuartiles en orden creciente de coeficientes de "esponjeo" sufrido.

(D) Gráfico de dispersión de las veces de cambio en la expresión *-fold change-* de *miRNAs* (log2) en función de las veces de cambio en la expresión *-fold change-* de sus *pri-miRNAs* (log2), agrupados de acuerdo con los cuartiles de coeficiente de "esponjeo" sufrido. Leyendas para cada gráfico facetado: R = coeficiente de correlación de Pearson con su correspondiente p-valor; b = pendiente de cada curva y p-valores para los términos de interacción entre cada cuartil y la referencia (cuartil "- *sponged*") dentro de un modelo de regresión múltiple con interacción.

Se observa una menor correlación entre la expresión de *miRNA* maduro y *pri-miR* a medida que aumenta el coeficiente de "esponjeo", sugiriendo que esos *microRNAs* pueden estar más sometidos a regulaciones post-transcripcionales.

Los *microRNAs* más "esponjados" están enriquecidos en sitios con arquitectura de interacción tipo TDMD

Para determinar la existencia de posibles asociaciones entre características específicas de los *circRNAs* y su capacidad para interactuar con *miRNAs*, realizamos los siguientes análisis. Primero comparamos la longitud mediana de los ARNs circulares que interactúan con *microRNAs* sujetos a diferentes grados de "esponjeo". De acuerdo con este análisis, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las longitudes medianas de los *circRNAs* entre diferentes cuartiles de "esponjeo" (**Figura R13A**). Luego, analizamos las regiones genómicas de las que surgen los *circRNAs* con sitios de unión predichos para *microRNAs* de los diferentes cuartiles de "esponjeo". Considerando que la mayoría de los círculos se expresan a partir de genes codificantes de proteínas (Guo et al., 2014), analizamos las regiones genómicas superpuestas (CDS, 5'UTR, 3'UTR, etc.) solo de los genes que expresan *circRNAs*. En este análisis observamos que la región genómica de la que se originan los *circRNAs* no presenta una correlación con el grado de "esponjeo" de los *miRNAs* con los que se compromete a través de la diferenciación (**Figura R13B**).

La concepción establecida de que un número limitado de sitios de TDMD endógenos- presentes incluso a niveles sub-estequiométricos- pueden actuar catalíticamente para competir con decenas de miles de sitios de unión posibles para un *miRNA* presentes en el transcriptoma (Ulitsky, 2018), podría contradecir nuestra interpretación de que un número proporcionalmente menor de sitios presentes en *circRNAs* puede antagonizar o superar a los sitios endógenos genuinos de TDMD. Una posible explicación a esta incógnita sería si los propios *circRNAs* tuvieran ellos mismos sitios con arquitectura del tipo TDMD. En este escenario, junto con su capacidad de evitar ser degradados por *miRNAs*, los *circRNAs* portadores de sitios tipo TDMD se unirían con alta afinidad y de manera muy productiva a sus *miRNAs* afines. En este contexto, buscamos arquitecturas similares a TDMD tanto en ARNs circulares como en 3' UTRs de ARNs mensajeros lineales, usando una herramienta de predicción de sitios TDMD (Soutschek et al., 2022). Según este análisis, los *miRNAs* más "esponjeados" están enriquecidos en interacciones similares a TDMD (tanto lineales como de *circRNAs*) en comparación con los *miRNAs* menos "esponjeados", mientras que la proporción de interacciones que involucran *circRNAs* se vuelve aún más sobrerrepresentada (**Figura R13C**).

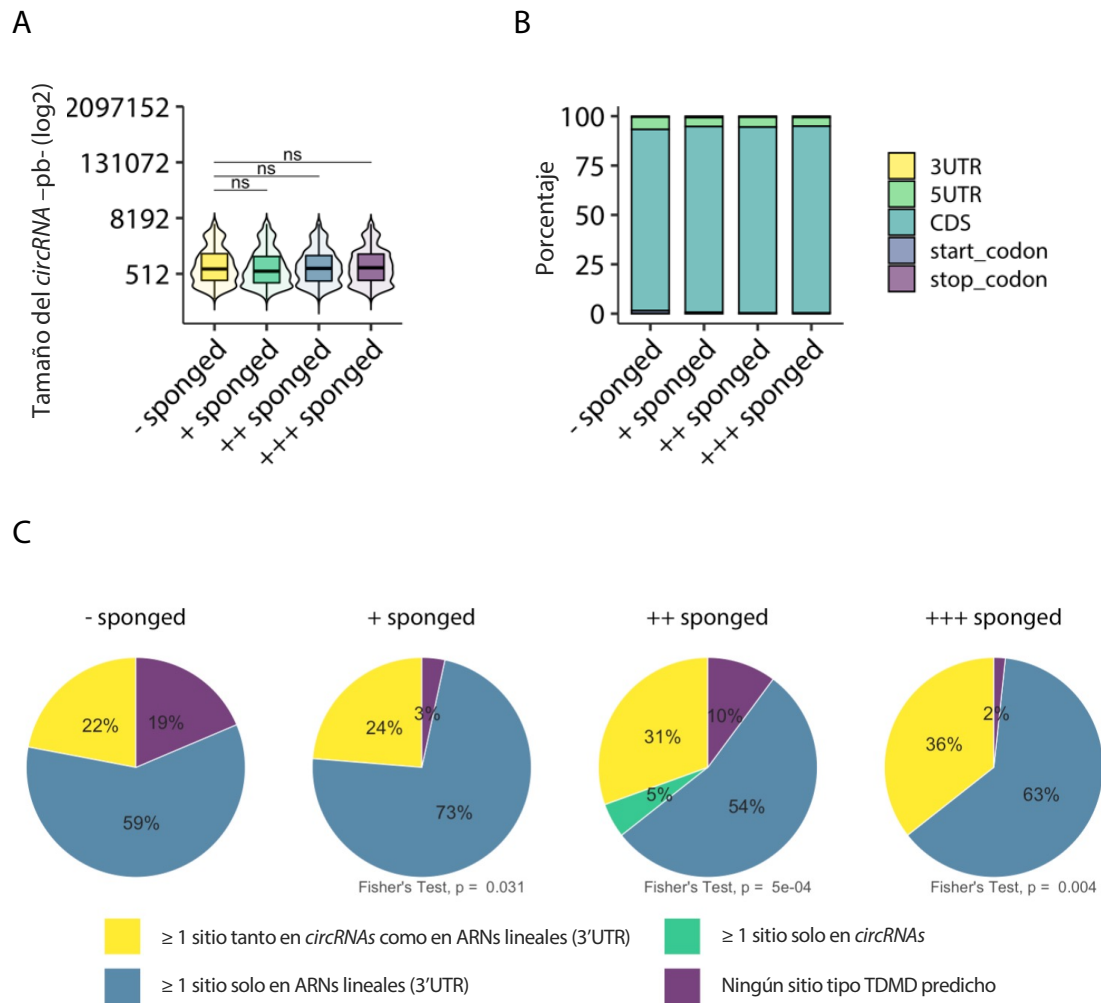


Figura R13:

(A) *Violinplot y Boxplot* mostrando el tamaño de *circRNAs* (en pares de bases, escala log2) que interactúan con *miRNAs* de cada uno de los cuartiles de "esponjeo" diferentes. Se muestran estadísticas de un modelo lineal generalizado con *emmeans* (comparación de medias marginales estimadas por cuadrados mínimos) entre el grupo menos "esponjeado" y los grupos restantes (ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

(B) Gráfico de barras que representa los porcentajes de regiones genómicas superpuestas (CDS, 5'UTR, 3'UTR, etc.) que dan lugar a los *circRNAs* con sitios de unión predichos contra *miRNAs* dentro de diferentes cuartiles de "esponjeo" sufridos.

(C) Gráficos de torta mostrando la proporción de interacciones ARNs lineales-*miRNAs*, y *circRNAs-miRNAs* que involucran al menos un sitio tipo TDMD predicho contra *microRNAs* dentro de los cuartiles de coeficientes de "esponjeo sufrido" (*sponging suffered*) crecientes. Se muestran los p-valores para la prueba exacta de Fisher comparando cada cuartil contra el cuartil menos "esponjeado" ("*sponged*"). Se observa un enriquecimiento en sitios tipo TDMD hacia el cuartil más "esponjeado" ("*+++ sponged*").

En conjunto, los resultados obtenidos a través del análisis bioinformático complementan lo previamente descrito a nivel experimental.

Lo obtenido sugiere que, dependiendo de cada caso particular, pueden existir *circRNAs* que estabilicen, no afecten o desestabilicen a *miRNAs* específicos. Asimismo, cual sea el efecto descrito para un *circRNA*, no necesariamente se recapitula en su lineal cognato, pudiendo hasta ser opuesto.

De lo analizado, no podemos anticipar que alguno de los tres posibles destinos de la interacción nombrados será claramente mayoritario. Sin embargo, sí se puede concluir que los *microRNAs* que más "esponjeados" se encuentran parecieran ser los más regulados a nivel post-transcripcional, tanto por ARNs lineales como por, especialmente, *circRNAs*.

Sección III: Elucidando el mecanismo de degradación de los *microRNAs*

(TDMD)

Como se introdujo anteriormente, los *microRNAs* pueden ser degradados cuando la interacción con su *target* se extiende hacia el extremo 3' del *miRNA*, a través del mecanismo de TDMD (**Figura I2**). Este tipo de regulación se conoció durante varios años, desde que se descubrieron los primeros casos de ARNs virales degradando *miRNAs* endógenos (Buck et al., 2010; Demián Cazalla, Therese Yario, 2010), sin que se haya logrado elucidar qué enzimas participaban del mecanismo.

Con el objetivo de encontrar la o las enzimas responsables de mediar TDMD, se diseñó un reportero dual capaz de evaluar si el mecanismo se encuentra activo o no. Para eso, se incluyeron en el reportero dos genes: un primer gen de proteína fluorescente (GFP) con sitios con perfecta complementariedad (que producen *slicing*) en su 3' UTR, factibles de ser silenciados por miR-132-5p; y un segundo gen de otra proteína fluorescente (mCherry) con sitios con arquitectura de TDMD contra miR-132-5p, en su 3' UTR. Así, si el mecanismo de TDMD se encontrara activo, miR-132-5p debería ser degradado por el transcripto de mCherry y los niveles de GFP no deberían verse afectados. Por el contrario, si TDMD se encontrara inactivo, miR-132-5p permanecería intacto y silenciaría al transcripto de GFP. A fin de disrumpir el mecanismo de TDMD, se planeaba utilizar una librería de ARNs guía de CRISPR/Cas9, esperando que alguna de las mutaciones provocadas suceda en algún gen importante para el funcionamiento de la vía. En la **Figura R14** se ilustra el putativo funcionamiento del reportero.

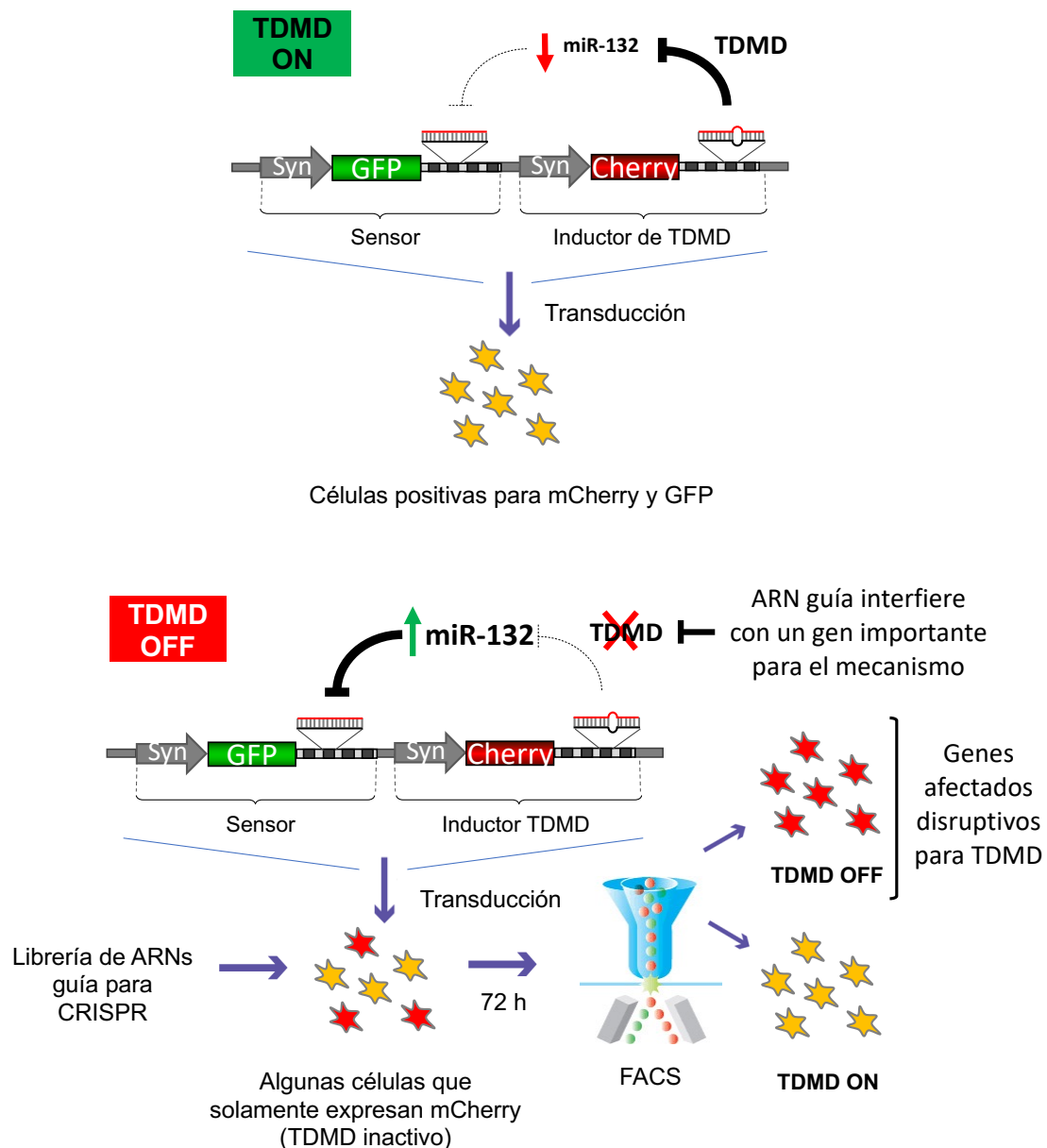


Figura R14: Esquema ilustrativo del funcionamiento del reportero dual de TDMD. La construcción cuenta con dos genes, GFP con sitios con perfecta complementariedad para miR-132 en su 3' UTR, y mCherry con sitios con arquitectura tipo TDMD en su 3' UTR. En situación de control (TDMD ON), el reportero debería expresar tanto mCherry como GFP. En caso de que una ARN guía de CRISPR produzca la disrupción de un gen importante para el mecanismo (TDMD OFF), miR-132 debería dejar de ser degradado, aumentar sus niveles y, por lo tanto, silenciar más a GFP, de manera tal que la célula se vuelva solo positiva para mCherry.

Prueba de concepto del funcionamiento del reportero

Para probar el funcionamiento del reportero y evaluar su sensibilidad, se clonó una serie de construcciones mutando los distintos sitios en los transcritos, para simular un *hit* del *screening*. Se compararon tres construcciones (**Figura R15A**): la primera, con los sitios tanto en GFP como mCherry mutados, donde se esperaría ver expresión de ambas proteínas fluorescentes; la segunda, donde solamente el sitio en mCherry se encuentra mutado, simulando que el mecanismo de TDMD no se encuentra activo y por lo tanto no hay degradación de miR-132; la tercera, donde los sitios en GFP tienen perfecta complementariedad, mientras que los sitios en mCherry tienen arquitectura de interacción para gatillar TDMD, simulando una situación de TDMD funcional normal.

Se transfectaron las distintas construcciones en células HEK293T, donde miR-132 tiene una expresión muy baja. Para resolver eso, se co-transfectó el pri-miR-132, a distintos niveles, de manera tal de evaluar también cómo respondería el reportero a las variaciones en su relación estequiométrica con el *miRNA*.

A niveles bajos de miR-132 (endógenos), no se observaron diferencias entre las distintas construcciones (**Figura R15B, C y D**). Sin embargo, a medida que se aumentaron los niveles de miR-132, se produjo un corrimiento en el perfil de fluorescencia de GFP para la construcción con los sitios de TDMD en mCherry mutado. Esta disminución de GFP es atribuible al efecto de degradación mediada por miR-132, dado que, en dicha construcción, el *microRNA* no puede ser desestabilizado por los sitios de TDMD en el transcripto de mCherry (mutados). Finalmente, en la tercera construcción, cuando los sitios de TDMD en mCherry sí se encuentran intactos, se produjo un rescate en los niveles de GFP. La magnitud del rescate fue mayor para el nivel intermedio de miR-132, indicando que el nivel más alto puede exceder al potencial de degradación mediada por el transcripto de mCherry.

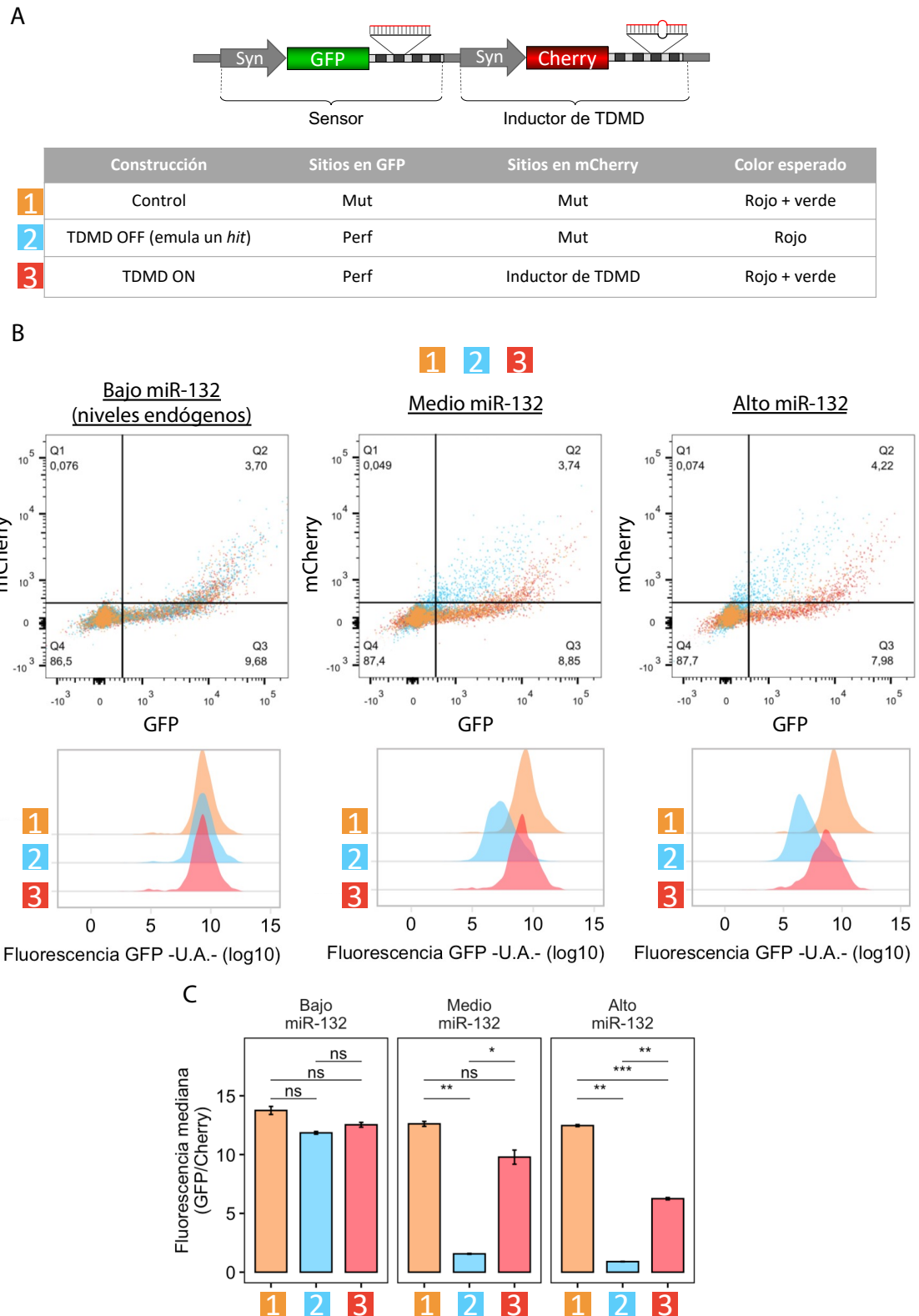


Figura R15:

(A) Esquema ilustrativo del reportero dual de la actividad de TDMD. Se incluyeron dos proteínas fluorescentes distintas: GFP, con 4 sitios con perfecta

complementariedad para miR-132 en su 3'UTR, y mCherry con 4 sitios con arquitectura de interacción tipo TDMD en su 3' UTR.

En la tabla se describen las 3 construcciones utilizadas para la prueba de concepto del reportero: 1) construcción con sitios mutados en ambos transcritos, no se esperaba degradación alguna (en naranja); 2) construcción con sitios perfectamente complementarios en GFP, se esperaba entonces que sea susceptible a degradación mediada por miR-132 (en celeste); 3) construcción equivalente a la 2, pero con sitios tipo TDMD en mCherry, a partir de los cuales se esperaba potencial degradación de miR-132 (en rojo).

(B) En los paneles superiores se muestran los niveles de fluorescencia de mCherry en función de los niveles de fluorescencia de GFP, para las 3 posibles cantidades de miR-132. Se observa un corrimiento de la nube de puntos celeste (construcción 2), presumiblemente debido a la degradación del transcripto de GFP mediada por miR-132, que luego es rescatado (en rojo) cuando se degrada miR-132 por TDMD.

El mismo fenómeno se observa en los perfiles de fluorescencia de GFP (paneles inferiores).

(C) Gráfico de barras de la fluorescencia mediana de GFP normalizada por mCherry, para todas las construcciones analizadas, con las 3 posibles condiciones de miR-132. Se reproduce lo observado en el ítem (B).

La diferencia entre las medias se evaluó mediante un test-t de Student (ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

Detenimiento del proyecto

A pesar de la positiva prueba de concepto, el proyecto debió ser abortado producto de la publicación de dos trabajos *back to back*, en donde describieron a ZSWIM8 como la enzima mediadora de TDMD (Chen et al., 2019; Han et al., 2020), como se introdujo anteriormente. En ambas publicaciones se realizaron *screenings* muy similares al aquí planteado, aunque utilizando a miR-7 y su inductor de TDMD endógeno CYRANO, en vez de un reportero dual.

El descubrimiento de ZSWIM8 como la enzima mediadora de TDMD permitió empezar a entender con mayor detalle la naturaleza del mecanismo y, a su vez, comprender la importancia e implicancias del mismo en diversos procesos biológicos. Como se nombró en la introducción, el *knock-out/down* de ZSWIM8 evidenció que la vía de TDMD es capaz de regular hasta decenas de *microRNAs* dependiendo del tejido o línea celular, afectando, potencialmente, centenares de procesos de vital importancia para la vida.

Discusión

Indudablemente, una de las preguntas que persisten en este campo de estudio es si la topología de los *circRNAs*, es decir, su naturaleza circular, es intrínsecamente relevante para que ejerzan algunas de sus funciones. Alternativamente, la forma circular de algunas moléculas podría haber sido seleccionada evolutivamente simplemente en función de su resistencia a las exonucleasas, lo que les confieren mayor estabilidad. Debido a diferentes razones técnicas, muchas de las cuales están relacionadas con los sistemas de expresión empleados, esta pregunta clave no ha sido abordada completamente hasta ahora. Con eso en mente, se realizará a continuación un resumen de los resultados obtenidos, seguido del análisis de las múltiples aristas que fueron surgiendo de ellos. El foco se centrará principalmente en las secciones I y II de resultados.

Resumen de los resultados obtenidos

El primer objetivo de esta tesis era mejorar la expresión de ARNs circulares artificiales. Esto surgió de la previa imposibilidad de hacerlo en forma “limpia”, con referencia a la cantidad de isoforma lineal que “escapaba” de constructos publicados anteriormente. En ese sentido, se probaron múltiples alternativas de promotores, intrones que favorecen la circularización y la introducción de un sitio contra un *miRNA* exclusivamente presente en la isoforma lineal, de manera de degradarla selectivamente (**Figura R2**).

La comparación entre los promotores CMV, TRE, SV40 y PGK arrojó que los dos primeros tuvieron los niveles de expresión de ARN circular más altos (TRE siendo ligeramente mayor). Asimismo, CMV y TRE tuvieron un *ratio* lineal:circular similar, apenas mejorado por el de PGK, aunque este último con mucha menor expresión (**Figura R3**).

Por otra parte, los intrones del gen Laccase2 produjeron niveles de ARN circular mayores a los de ZKSCAN1, con menor expresión de la isoforma lineal, obteniendo, en definitiva, una relación lineal:circular ampliamente superadora (**Figura R4**).

Finalmente, la presencia de un sitio con perfecta complementariedad para miR-92a, un *miRNA* altamente expresado en la línea celular utilizada, provocó una significativa degradación de la isoforma lineal (sin afectar la circular) cuando se utilizaron los intrones ZKSCAN1, pero no cuando se utilizaron los de Laccase2 (**Figura R4**). Especulamos que, para estos últimos, los niveles de la isoforma lineal detectados corresponden a la síntesis de nuevas moléculas, sin que llegue a existir una acumulación tal que permita una degradación detectable por parte de miR-92a.

Además, se estudió la traducción del *circRNA* expresado, mediante analizar los niveles de GFP por distintos métodos, incluyendo microscopia, *Western blot* y citometría de flujo. Se encontró una correlación positiva y significativa entre los niveles del ARN circular expresado (por *Northern blot*) y la fluorescencia de GFP detectada (por citometría) -**Figura R5**-.

Luego, se re-validó el sistema de degradación selectiva de la isoforma lineal en neuronas, corticales e hipocampales, de ratón (**Figura R6**). Para eso, se intercambió el sitio de miR-92a (altamente expresado en HEK293T) por cuatro sitios en tándem de miR-124 (altamente expresado en neuronas). De esta manera, se generó un set de herramientas válidas en distintos modelos para proceder con el segundo objetivo de la tesis: estudiar la interacción entre *circRNAs* y *miRNAs*, y los posibles efectos que pudieran tener sobre la estabilidad de estos últimos.

Se comenzó transfectando dos *circRNAs* de ~1300 y ~350 bases nucleotídicas de largo en células HEK293T. Dichas construcciones estuvieron basadas en la utilizada anteriormente con promotor CMV, intrones Laccase2 y sitio perfectamente complementario para miR-92a, aunque adicionalmente se les agregó un sitio con arquitectura de interacción tipo TDMD (o una versión mutada) contra miR-218-5p. En paralelo, se evaluaron controles lineales equivalentes en secuencia primaria, no obstante *capeados* y con cola de poli(A). Para las construcciones lineales, en línea con una publicación anterior (Li et al., 2021), el transcripto largo fue eficiente degradando a miR-218-5p, mientras que no así la versión recortada (**Figura R7**). Curiosamente, esto no se reprodujo para los ARNs circulares, donde ambos tamaños fueron efectivos desestabilizadores de miR-218-5p (**Figura R7**), marcando una diferencia entre la funcionalidad de las topologías.

Dicha diferencia se sostuvo, aunque en la dirección opuesta, cuando se trasladó la experimentación al modelo de neuronas. Allí, el *inductor* lineal de TDMD fue capaz de degradar a miR-132, de acuerdo con lo publicado previamente por nuestro grupo (De la Mata et al., 2015), mientras que la versión circularizada no (**Figura R8**). En todos estos casos, tanto en HEK293T como neuronas, se controló que la expresión total de cada construcción circular fuera comparable a la del control lineal equivalente (**Figuras R7 y 8**). También se estudiaron las razones más triviales que podrían haber explicado la falta de degradación, como la localización subcelular, sin encontrar diferencias entre las topologías que den significancia a lo observado (**Figura R9**).

Adicionalmente, se estudió el caso endógeno previamente descrito de miR-7 y *Cdr1as*, en donde el *circRNA* aparentemente protege al *miRNA* de la degradación por TDMD mediada por un *lncRNA* llamado *Cyrano* (Kleaveland et al., 2018; Piwecka et al., 2017). La lógica fue equivalente al utilizado anteriormente: comparar la funcionalidad de una versión linealizada de *Cdr1as* con la del *circRNA*. Para eso, se noqueó el ARN circular endógeno (provocando una desestabilización de miR-7) lo cual no fue rescatado por la expresión de la versión linealizada (**Figura R10**). Llamativamente, cuando se transdujo la versión linealizada sin noquear simultáneamente el *circRNA* endógeno, se obtuvo degradación de miR-7, en franca contraposición al efecto del ARN circular (**Figura R11**). Esto a su vez es consistente la presencia de no menos de tres sitios con arquitectura de interacción tipo TDMD dentro de *Cdr1as* (**Figura R11**).

El conjunto de los resultados obtenidos para el par *Cdr1as* – miR-7, refuerza la idea de que pueden existir diferencias funcionales entre las topologías circular y lineal de transcritos que comparten secuencia primaria (fuera del *Cap* y la poliadenilación).

Finalmente, se realizó un análisis bioinformático del comportamiento de *miRNAs* y *circRNAs* en una diferenciación de tipo neuronal. En particular, se calculó un coeficiente de “esponjeo” específico para cada *miRNA*, considerando el número de sitios validados bioquímicamente (ver Métodos) en *circRNAs*, y la expresión de cada *miRNA*. Si bien no se observó ningún patrón dominante cuando se analizó a los *microRNAs* maduros, sí se encontró que aquellos pertenecientes al cuartil de los más “esponjeados” correlacionan peor con la expresión de sus respectivos *pri-miRNAs*, sugiriendo que son los más regulados a nivel post-transcripcional (**Figura R12**).

Además, se encontró que esos *miRNAs* se encuentran enriquecidos en sitios con arquitectura de interacción tipo TDMD (**Figura R13**).

Diferencias funcionales entre las topologías lineal y circular

De los resultados obtenidos se extrae rápidamente que la capacidad de un transcripto de gatillar TDMD puede ser influenciada porque sea circular o lineal, aun si dichas isoformas compartieran la misma secuencia primaria -por fuera del CAP y la cola de poli(A)-. No obstante, resulta más complejo predecir el sentido de ese cambio: mientras que en HEK293T encontramos un *circRNA* capaz de degradar cuando su lineal equivalente no lo era (**Figura R7**), en neuronas se observó lo opuesto (**Figura R8**); a su vez, en este trabajo también se describieron dos *circRNAs* y un lineal capaces de degradar a su *miRNA* afín (**Figuras R7 y R8**), sumado al caso de *Cdr1as*, cuya versión circular estabiliza al *miRNA* y la lineal lo degrada (**Figuras R10 y 11**).

La primera intuición, probablemente, sería atribuir el fenómeno a alguna de las dos diferencias más obvias entre las topologías lineal y circular: el CAP en el extremo 5' y la cola de poli(A) en el 3'. Sin embargo, ambas especulaciones parecen improbables, dado que no explicarían la posible bidireccionalidad del cambio. Cabe preguntarse, en ese sentido, por qué algunas veces favorecerían el gatillado de TDMD, mientras que otras lo inhibirían. Además, en el pasado se ha descrito el caso de HSUR-1, que posee un extremo altamente estructurado pero no una cola de poli(A), e igualmente es capaz de degradar a *miR-27* (Cazalla et al., 2010; Pawlica et al., 2016).

Por otro lado, una explicación más plausible podría ser que la capacidad de gatillar, o no, TDMD, dependa, al menos en cierto grado, de la estructura tridimensional del *target*, y de cómo la circularización de dicho *target* modifica su estructura. En efecto, se ha reportado que algunos *circRNAs* pueden inhibir la respuesta inmune innata mediada por PKR, mientras que sus contrapartes lineales no. Este fenómeno se explica por la capacidad inherente de los *circRNAs* para plegarse en estructuras secundarias locales cortas más estables en comparación con sus contrapartes lineales, que a su vez permite una interacción más estable con PKR (Liu et al., 2019). En forma análoga, estas diferencias de plegamiento entre moléculas lineales y circulares podrían facilitar o dificultar tanto el acceso de un *miRNA* a su sitio, el acceso de ZSWIM8, o el cambio

conformacional necesario en AGO para que se produzca la ubiquitinación por ZSWIM8 (Han et al., 2020; Sheu-Gruttadauria et al., 2019; Shi et al., 2020). De hecho, la necesidad de un entorno “flexible” se ha descrito previamente como determinante de la eficiencia de TDMD (Fuchs Wightman et al., 2018; Li et al., 2021; Pawlica et al., 2016) y la “accesibilidad” al sitio se ha demostrado importante para la eficacia de silenciamiento de sitios canónicos (Kertesz et al., 2007). Además, múltiples reportes encontraron que ciertos *targets* de TDMD pueden necesitar elementos específicos en su secuencia por fuera del sitio *per se* para provocar una degradación eficiente (Han et al., 2020; Kleaveland et al., 2018; Lee et al., 2013), cuya disponibilidad también podría estar afectada por la estructura. En la misma línea, otra publicación reciente encontró diferencias termodinámicas en la interacción entre *miRNAs* y *targets*, dependiendo de si estos eran circulares o lineales (Petkovic et al., 2021).

En conjunto, parece sensato suponer que la capacidad de un *target* para desestabilizar a un dado *miRNA* depende de su estructura tridimensional en el espacio, y que, dicha estructura, varía si el *target* es circular o lineal. Sin embargo, se necesita generar evidencia experimental directa antes de poder aseverar esta especulación.

TDMD y los circRNAs como reguladores de miRNAs

En este trabajo se estudiaron múltiples interacciones entre *miRNAs* y *circRNAs* o *RNAs* lineales, principalmente enfocado en el fenómeno de TDMD. Cabe preguntarse, sin embargo, qué tan relevantes o generalizables son las interacciones estudiadas.

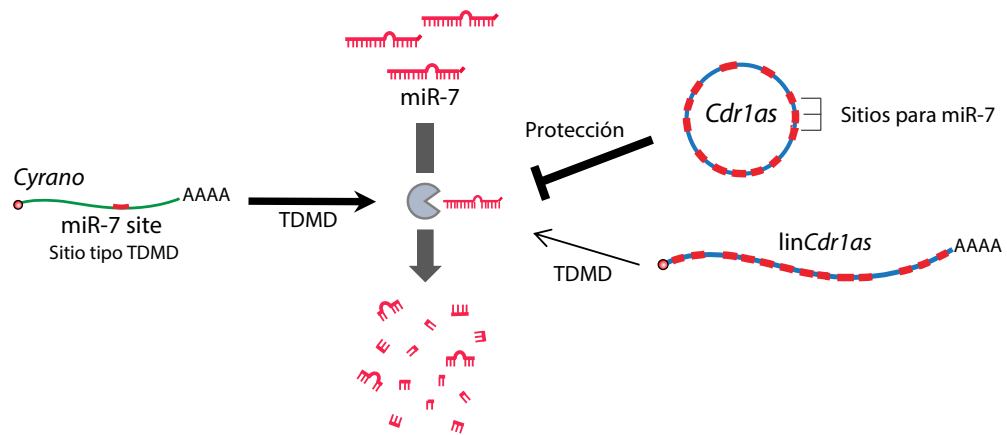
En ese sentido, como se describió anteriormente, el mecanismo de TDMD ha resultado ser mucho más influyente de lo que originalmente se imaginó. Los primeros trabajos que encontraron ARNs virales capaces de degradar *microRNAs* pertenecientes a la célula hospedadora (Buck et al., 2010; Demián Cazalla, Therese Yario, 2010; Lee et al., 2013; Libri et al., 2012; Marcinowski et al., 2012; McCaskill et al., 2015) innovaron dándole al mecanismo un rol relevante en infecciones virales. Sin embargo, se tardó algunos años para encontrar los primeros casos de *targets* endógenos (Bitetti et al., 2018; Fletcher et al., 2022; Ghini et al., 2018; Kingston et al., 2022; Kleaveland et al., 2018; Li et al., 2021; Sheng et al., 2022; Simeone et al., 2022), demostrando así la importancia del mecanismo para múltiples procesos biológicos. Finalmente, a partir

del descubrimiento de ZSWIM8 como enzima mediadora (Han et al., 2020; Shi et al., 2020), TDMD adquirió un rol central en la regulación de hasta decenas de *microRNAs*, y, consecuentemente, de otros tantos procesos biológicos.

La influencia que pudieran tener los *circRNAs* sobre esta vía, por otro lado, ha resultado algo más esquiva. Los casos de *Cdr1as* y *Sry* como “esponjas” o *decoys* de miR-7 y miR-138, respectivamente, han sido los primeros en capturar ampliamente la atención (Hansen et al., 2013; Memczak et al., 2013). Sin embargo, parecen tratarse más de ocurrencias particulares que generalizables, dada su alta expresión y la enorme cantidad de sitios que tienen para sus respectivos *miRNAs* (Wilusz, 2018). Además, la capacidad de *Cdr1as* de estabilizar a miR-7 (Piwecka et al., 2017) resulta aún más especial, aunque no es el único *circRNA* capaz de ejercer una función así: una publicación ha demostrado en células de cáncer de próstata que *circCSNK1G3* puede estabilizar a miR-181b/d. A su vez, en este trabajo, se probó la importancia de la topología circular para que *Cdr1as* pueda ejercer su función (**Figuras R10 y 11**), mostrando que una versión lineal del mismo produce un efecto opuesto (ver modelo en **Figura D1A**). Esto puede explicarse por la presencia de al menos tres sitios con arquitectura de interacción tipo TDMD en la secuencia de *Cdr1as* (**Figura R11**), un fenómeno que curiosamente se reproduce en *circCSNK1G3*, donde ambos sitios para miR-181b/d también poseen esa arquitectura de interacción (**Figura D1B**).

Más esquivo aún ha resultado encontrar *circRNAs* capaces de gatillar TDMD. Esta tesis es, a la fecha y hasta donde tenemos información, el primer trabajo en reportar un *circRNA* capaz de mediar la degradación de un *miRNA* (**Figura R7**). Ningún caso endógeno ha sido reportado aún, aunque esto no quiere decir que no pueda suceder en un futuro cercano. De hecho, también aquí, se facilitaron las primeras evidencias, aunque indirectas, que sugieren que los *miRNAs* que más interactúan con *circRNAs* podrían estar sometidos a mayor regulación post-transcrpcional (**Figuras R12 y 13**). Aún falta evidencia experimental inequívoca (por ejemplo, noqueando determinados *circRNAs*) antes de poder generalizar las distintas regulaciones posibles entre ARNs circulares y *microRNAs*.

A



B

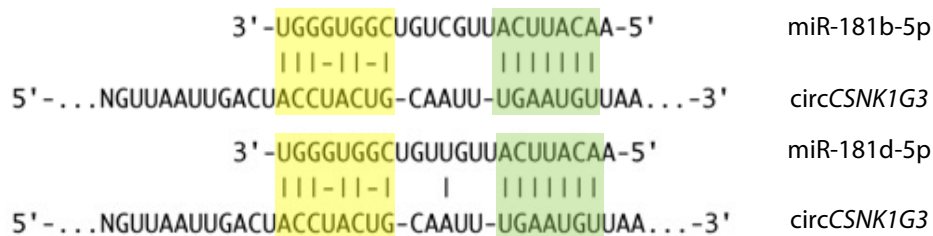


Figura D1:

(A) Modelo de la regulación ejercida sobre miR-7, estudiada en este trabajo. A la izquierda, el *lncRNA Cyrano*, capaz de degradar a miR-7 por TDMD de manera muy eficiente (Kleaveland et al., 2018). A la derecha, las dos versiones de *Cdr1as* evaluadas aquí, una circular y capaz de estabilizar a miR-7, y una lineal capaz de desestabilizarlo.

(B) Esquema ilustrativo de los sitios para miR-181b/d en *circCSNK1G3*. Se destaca que tienen una arquitectura de interacción tipo TDMD.

Efectos río abajo sobre los target canónicos regulados por los miRNAs

Aunque no haya sido el foco de este trabajo, el eje de la relevancia de lo estudiado surge de la función canónica de silenciamiento de transcritos de los *microRNAs*. En definitiva, el estudio de la síntesis, estabilidad, “esponjeo” o degradación de los *miRNAs* cobra importancia, mayormente, a partir de lo que estos hacen río abajo sobre sus *targets*, regulando incontables funciones biológicas (Bartel, 2018).

En este sentido, la predicción de lo que sucede con los *targets* río debajo de un dado *miRNA*, cuando se remueve a un *circRNA* que lo regulaba río arriba, puede no ser tan trivial. De hecho, cuando reanalizamos los datos de secuenciación de los trabajos publicados sobre *Cdr1as* (Piwecka et al., 2017) y *circCSNK1G3* (Chen et al., 2019), encontramos fenómenos contradictorios (**Figura D2**). Para el primer caso, se observa que, frente al *knockout* del círculo endógeno, los transcriptos predichos como regulados por miR-7 tienden a aumentar su nivel (**Figura D2A**). Pareciera entonces que, en este ejemplo, remover el *circRNA* produce una desestabilización del *miRNA*, que, subsecuentemente, al bajar sus niveles, deja de reprimir múltiples transcriptos. Cuando se analizaron cuatro de estos *targets* en muestras propias por RT-qPCR, se obtuvo un resultado similar con el *knockdown* de *Cdr1as* (**Figura D2B**). En cambio, para el segundo caso -*circCSNK1G3*-, la tendencia parece ser opuesta: los *targets* canónicos de miR-181b/d disminuyen frente al *knockdown* del *circRNA*, aun cuando el *miRNA* también decae (**Figura D2C**). Esto parece sugerir que, para este ejemplo, la acción de “esponjeo” del *circRNA* primaba por encima de su estabilización del *miRNA*. Para todos los casos analizados, utilizamos a Targetscan (Agarwal et al., 2015) como predictor de los *targets* de los *miRNAs*.

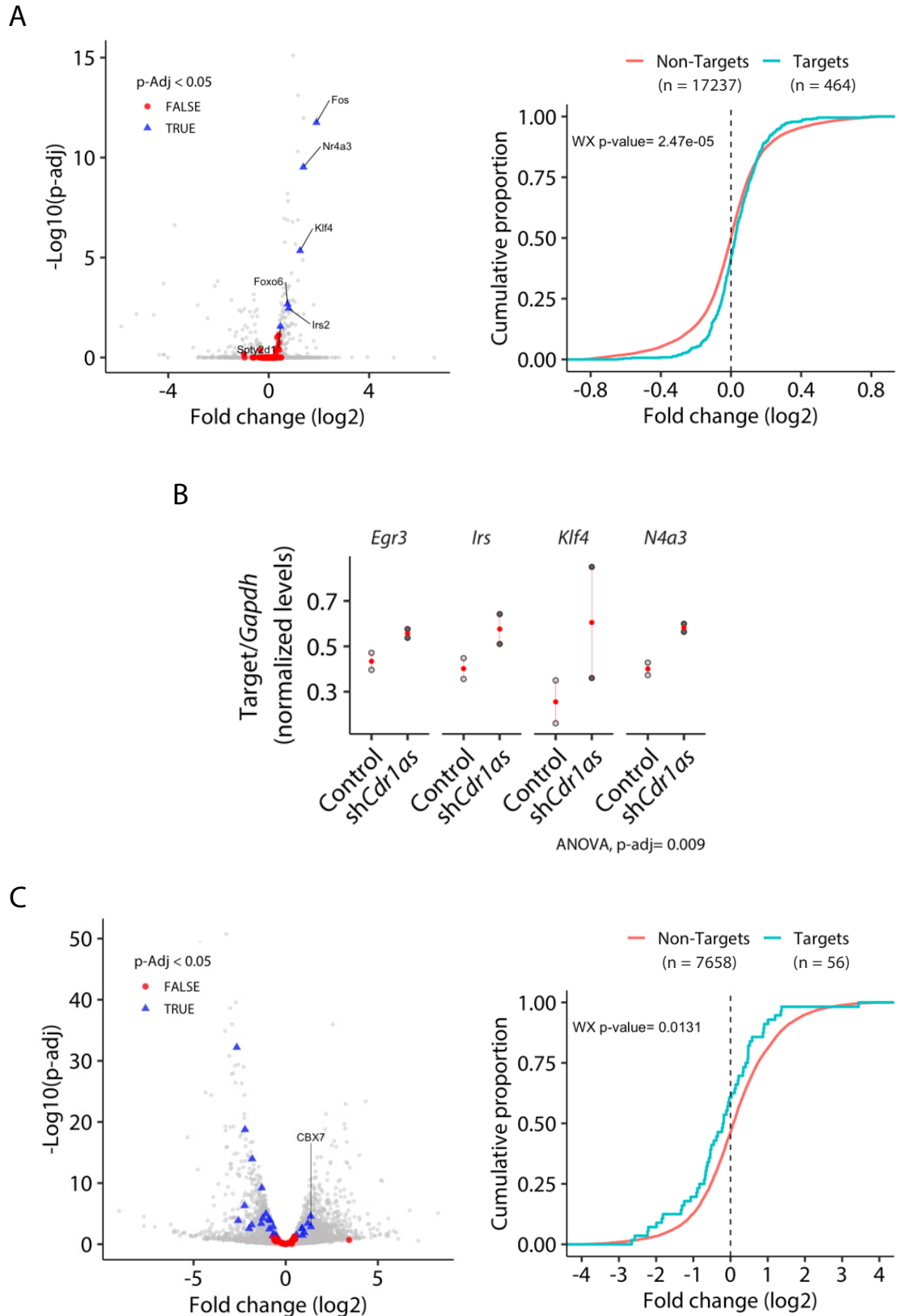


Figura D2:

(A) Reanálisis de los datos de secuenciación de Piwecka *et al*, 2017 (Piwecka *et al*, 2017). A la izquierda, un gráfico de volcán mostrando el p-valor ajustado en

función de las veces de cambio ($\log_2$), para todos los transcriptos, frente al *knockout* de *Cdr1as* en neuronas de cortex de ratón. En rojo, los *targets* de miR-7 predichos por *Targetscan* con p-valor mayor a 0,05; en azul, aquellos con p-valor menor a 0,05. Se observa que los *targets* que cambian significativamente, lo hacen en forma positiva.

A la derecha, se graficó la proporción acumulada en función de las veces de cambio ($\log_2$) de *targets* (celeste) o transcriptos (rojo) no relacionados de miR-7. Aquí también se observa una tendencia de cambio positiva para los *targets* regulados por el *miRNA*. Se incluye el p-valor para un test de Wilcoxon–Mann–Whitney (WX).

(B) Niveles de cuatro *targets* previamente descriptos de miR-7 frente al *knockdown* de *Cdr1as* en neuronas corticales de ratón, medido por RT-qPCR. Se observa un aumento para los cuatro transcriptos. Se incluye el p-valor para un test de Anova, donde se comparó al tratamiento contra el control para el conjunto de los genes analizados.

(C) Reanálisis de los datos de secuenciación de Chen *et al*, 2019 (Chen et al., 2019). A la izquierda, un gráfico de volcán mostrando el p-valor ajustado en función de las veces de cambio ($\log_2$), para todos los transcriptos, frente al *knockdown* de *circCSNK1G3* en células de cáncer de próstata. En rojo, los *targets* de miR-181b/d predichos por *Targetscan* con p-valor mayor a 0,05; en azul, aquellos con p-valor menor a 0,05. Se observa que los *targets* que cambian significativamente, lo hacen mayormente en forma negativa.

A la derecha, se graficó la proporción acumulada en función de las veces de cambio ($\log_2$) de *targets* (celeste) o transcriptos (rojo) no relacionados de miR-181b/d. Aquí también se observa una tendencia de cambio negativa para los *targets* regulados por el *miRNA*. Se incluye el p-valor para un test de Wilcoxon–Mann–Whitney (WX).

Alcance y limitaciones de este estudio

En este trabajo se generaron múltiples construcciones destinadas a la expresión de ARNs circulares artificiales con reducida cantidad de “escape” de su isoforma lineal. Este objetivo se alcanzó con bastante éxito en células HEK293T, aunque la expresión total alcanzada de la construcción circular no haya sido tan alta como la del control lineal (para las construcciones de mayor tamaño). En particular, en los experimentos en neuronas, el uso de los intrones ZKSCAN1 probablemente produjo niveles más altos de isoforma lineal, aunque no lo pudimos demostrar fehacientemente por las dificultades técnicas para hacer *Northern blots* con el poco material extraído de este tipo de tejido. Asimismo, la intrínseca heterogeneidad de los cultivos primarios de neuronas no permite determinar exactamente la eficacia de nuestro sistema de expresión (además de neuronas, un porcentaje de las células de estos cultivos son células gliales que no expresan niveles altos de miR-124, el cual fue aprovechado en este estudio para reducir los niveles de RNA lineal). Por esto, se intentó a lo largo del trabajo no sobre-concluir por encima de lo que los controles realizados pudieran apoyar con evidencia.

Es importante destacar que propiedades adicionales de diferentes circRNAs podrían determinar su capacidad para desencadenar, o no, TDMD, incluyendo pero no limitándose a, modificaciones del *circRNA* (tales como metilación del ARN) y estructuras secundarias específicas, ninguna de las cuales se han abordado sistemáticamente en este trabajo. Se necesitarán más estudios a futuro para determinar si la inducción de TDMD o su ausencia por parte de los *circRNAs* son fenómenos generalizados.

Bibliografía

- Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.W., Bartel, D.P., 2015. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* 4, 1–38. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2014. *Molecular Biology of the Cell* 6e.
- Ameres, S.L., Horwich, M.D., Hung, J.H., Xu, J., Ghildiyal, M., Weng, Z., Zamore, P.D., 2010. Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science* 328, 1534–1539. <https://doi.org/10.1126/science.1187058>
- Bail, S., Swerdel, M., Liu, H., Jiao, X., Goff, L.A., Hart, R.P., 2010. Differential regulation of microRNA stability 1032–1039. <https://doi.org/10.1261/rna.1851510>. First
- Bartel, D.P., 2018. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173, 20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
- 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* 409, 363–366. <https://doi.org/10.1038/35053110>
- Bitetti, A., Mallory, A.C., Golini, E., Carrieri, C., Carreño Gutiérrez, H., Perlas, E., Pérez-Rico, Y.A., Tocchini-Valentini, G.P., Enright, A.J., Norton, W.H.J., Mandillo, S., O’Carroll, D., Shkumatava, A., 2018. MicroRNA degradation by a conserved target RNA regulates animal behavior. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25, 244–251. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0032-x>
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., Gorlich, D., 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA N. Y. N* 10, 185–191. <https://doi.org/10.1261/rna.5167604>
- Bosson, A.D., Zamudio, J.R., Sharp, P.A., 2014. Endogenous miRNA and target concentrations determine susceptibility to potential ceRNA competition. *Mol. Cell* 56, 347–359. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.018>
- Buck, A.H., Perot, J., Chisholm, M.A., Kumar, D.S., Tuddenham, L., Cognat, V., Marcinowski, L., Dolken, L., Pfeffer, S., 2010. Post-transcriptional regulation of miR-27 in murine cytomegalovirus infection. *RNA* 16, 307–315.

<https://doi.org/10.1261/rna.1819210>

Cai, X., Hagedorn, C.H., Cullen, B.R., 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* N. Y. N 10, 1957–1966. <https://doi.org/10.1261/rna.7135204>

Cazalla, D., Yario, T., Steitz, J. a, Steitz, J., 2010. Down-regulation of a host microRNA by a Herpesvirus saimiri noncoding RNA. *Science* 328, 1563–6. <https://doi.org/10.1126/science.1187197>

Cech, T.R., Steitz, J.A., 2014. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell* 157, 77–94. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.008>

Cesana, M., Cacchiarelli, D., Legnini, I., Santini, T., Sthandier, O., Chinappi, M., Tramontano, A., Bozzoni, I., 2011. A Long Noncoding RNA Controls Muscle Differentiation by Functioning as a Competing Endogenous RNA. *Cell* 147, 358–369. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.028>

Chen, R., Wang, S.K., Belk, J.A., Amaya, L., Li, Z., Cardenas, A., Abe, B.T., Chen, C.-K., Wender, P.A., Chang, H.Y., 2023. Engineering circular RNA for enhanced protein production. *Nat. Biotechnol.* 41, 262–272. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01393-0>

Chen, S., Huang, V., Xu, X., Livingstone, J., Soares, F., Jeon, J., Zeng, Y., Hua, J.T., Petricca, J., Guo, H., Wang, M., Yousif, F., Zhang, Y., Donmez, N., Ahmed, M., Volik, S., Lapuk, A., Chua, M.L.K., Heisler, L.E., Foucal, A., Fox, N.S., Fraser, M., Bhandari, V., Shiah, Y.J., Guan, J., Li, J., Orain, M., Picard, V., Hovington, H., Bergeron, A., Lacombe, L., Fradet, Y., Têtu, B., Liu, S., Feng, F., Wu, X., Shao, Y.W., Komor, M.A., Sahinalp, C., Collins, C., Hoogstrate, Y., de Jong, M., Fijneman, R.J.A., Fei, T., Jenster, G., van der Kwast, T., Bristow, R.G., Boutros, P.C., He, H.H., 2019. Widespread and Functional RNA Circularization in Localized Prostate Cancer. *Cell* 176, 831-843.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.025>

Chen, T., Xiang, J.F., Zhu, S., Chen, S., Yin, Q.F., Zhang, X.O., Zhang, J., Feng, H., Dong, R., Li, X.J., Yang, L., Chen, L.L., 2015. ADAR1 is required for differentiation and neural induction by regulating microRNA processing in a catalytically independent manner. *Cell Res.* 25, 459–476. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.24>

Chi, S.W., Zang, J.B., Mele, A., Darnell, R.B., 2009. Argonaute HITS-CLIP decodes

microRNA-mRNA interaction maps. *Nature* 460, 479–486.
<https://doi.org/10.1038/nature08170>

De la Mata, M., Gaidatzis, D., Vitanescu, M., Stadler, M.B., Wentzel, C., Scheiffele, P., Filipowicz, W., Großhans, H., 2015. Potent degradation of neuronal miRNAs induced by highly complementary targets. *EMBO Rep.*

Demián Cazalla, Therese Yario, J.S., 2010. Down-Regulation of a Host MicroRNA by a Herpesvirus saimiri Noncoding RNA. *Science* 1563–1567.

Denzler, R., Agarwal, V., Stefano, J., Bartel, D.P., Stoffel, M., 2014. Assessing the ceRNA Hypothesis with Quantitative Measurements of miRNA and Target Abundance. *Mol. Cell* 54, 766–776. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.045>

Dodbele, S., Mutlu, N., Wilusz, J.E., 2021. Best practices to ensure robust investigation of circular RNAs: pitfalls and tips. *EMBO Rep.* 22, 1–12.
<https://doi.org/10.15252/embr.202052072>

Dubin, R.A., Kazmi, M.A., Ostrer, H., 1995. Inverted repeats are necessary for circularization of the mouse testis Sry transcript. *Gene* 167, 245–248.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00639-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00639-7)

Eulalio, A., Huntzinger, E., Izaurralde, E., 2008. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 346–353. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1405>

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., Sonenberg, N., 2009. Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol. Cell* 35, 868–880. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.08.004>

Fletcher, C.E., Deng, L., Orafidiya, F., Yuan, W., Lorentzen, M.P.G.S., Cyran, O.W., Varela-Carver, A., Constantin, T.A., Leach, D.A., Dobbs, F.M., Figueiredo, I., Gurel, B., Parkes, E., Bogdan, D., Pereira, R.R., Zhao, S.G., Neeb, A., Issa, F., Hester, J., Kudo, H., Liu, Y., Philippou, Y., Bristow, R., Knudsen, K., Bryant, R.J., Feng, F.Y., Reed, S.H., Mills, I.G., de Bono, J., Bevan, C.L., 2022. A non-coding RNA balancing act: miR-346-induced DNA damage is limited by the long non-coding RNA NORAD in prostate cancer.

Mol. Cancer 21, 82. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01540-w>

Fuchs Wightman, F., Giono, L.E., Fededa, J.P., de la Mata, M., 2018. Target RNAs Strike Back on MicroRNAs. *Front. Genet.* 9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00435>

Gantier, M.P., McCoy, C.E., Rusinova, I., Saulep, D., Wang, D., Xu, D., Irving, A.T., Behlke, M.A., Hertzog, P.J., Mackay, F., Williams, B.R.G., 2011. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res.* 39, 5692–5703. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr148>

Ghini, F., Rubolino, C., Climent, M., Simeone, I., Marzi, M.J., Nicassio, F., 2018. Endogenous transcripts control miRNA levels and activity in mammalian cells by target-directed miRNA degradation. *Nat. Commun.* 9, 3119. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05182-9>

Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., Smith, H.O., 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>

Giusti, S.A., Vogl, A.M., Brockmann, M.M., Vercelli, C.A., Rein, M.L., Trumbach, D., Wurst, W., Cazalla, D., Stein, V., Deussing, J.M., Refojo, D., 2014. MicroRNA-9 controls dendritic development by targeting REST. *Elife* 3. <https://doi.org/10.7554/eLife.02755>

Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., Mello, C.C., 2001. Genes and Mechanisms Related to RNA Interference Regulate Expression of the Small Temporal RNAs that Control *C. elegans* Developmental Timing. *Cell* 106, 23–34. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00431-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00431-7)

Guo, J.U., Agarwal, V., Guo, H., Bartel, D.P., 2014. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biol.* 15, 409. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0409-z>

Ha, M., Kim, V.N., 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>

Haas, G., Cetin, S., Messmer, M., Chane-Woon-Ming, B., Terenzi, O., Chicher, J., Kuhn, L., Hammann, P., Pfeffer, S., 2016. Identification of factors involved in target RNA-

directed microRNA degradation. *Nucleic Acids Res.* 44, 2873–2887.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw040>

Han, J., Han, Jaeil, Lavigne, C.A., Jones, B.T., Zhang, H., Gillett, F., Mendell, J.T., 2020. A ubiquitin ligase mediates target-directed microRNA decay independently of tailing and trimming. *Science* 9546, 1–17.

Hansen, T.B., Jensen, T.I., Clausen, B.H., Bramsen, J.B., Finsen, B., Damgaard, C.K., Kjems, J., 2013. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* 495, 384–388. <https://doi.org/10.1038/nature11993>

Hansen, T.B., Wiklund, E.D., Bramsen, J.B., Villadsen, S.B., Statham, A.L., Clark, S.J., Kjems, J., 2011. miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *EMBO J.* 30, 4414–4422.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.359>

Hausser, J., Zavolan, M., 2014. Identification and consequences of miRNA-target interactions--beyond repression of gene expression. *Nat. Rev. Genet.* 15, 599–612.
<https://doi.org/10.1038/nrg3765>

Ho-Xuan, H., Glažar, P., Latini, C., Heizler, K., Haase, J., Hett, R., Anders, M., Weichmann, F., Bruckmann, A., Van den Berg, D., Hüttelmaier, S., Rajewsky, N., Hackl, C., Meister, G., 2020. Comprehensive analysis of translation from overexpressed circular RNAs reveals pervasive translation from linear transcripts. *Nucleic Acids Res.* 48, 10368–10382. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa704>

Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, 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* 293, 834–838.
<https://doi.org/10.1126/science.1062961>

Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., Tomari, Y., 2010. Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol. Cell* 39, 292–299.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.015>

Jeck, W.R., Sorrentino, J.A., Wang, K., Slevin, M.K., Burd, C.E., Liu, J., Marzluff, W.F., Sharpless, N.E., 2013. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU

repeats. *RNA N. Y. N* 19, 141–157. <https://doi.org/10.1261/rna.035667.112>

Jonas, S., Izaurralde, E., 2015. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* 16, 421–433. <https://doi.org/10.1038/nrg3965>

Kertesz, M., Iovino, N., Unnerstall, U., Gaul, U., Segal, E., 2007. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat. Genet.* 39, 1278–1284. <https://doi.org/10.1038/ng2135>

Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., Plasterk, R.H., 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15, 2654–2659. <https://doi.org/10.1101/gad.927801>

Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D., 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209–216. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00801-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00801-8)

Kingston, E.R., Blodgett, L.W., Bartel, D.P., 2022. Endogenous transcripts direct microRNA degradation in *Drosophila*, and this targeted degradation is required for proper embryonic development. *Mol. Cell* 82, 3872–3884.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.08.029>

Kleaveland, B., Shi, C.Y., Stefano, J., Bartel, D.P., 2018. A Network of Noncoding Regulatory RNAs Acts in the Mammalian Brain. *Cell* 174, 350–362.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.022>

Kramer, M.C., Liang, D., Tatomer, D.C., Gold, B., March, Z.M., Cherry, S., Wilusz, J.E., 2015. Combinatorial control of *Drosophila* circular RNA expression by intronic repeats, hnRNPs, and SR proteins. *Genes Dev.* 29, 2168–2182. <https://doi.org/10.1101/gad.270421.115>

Kristensen, L.S., Andersen, M.S., Stagsted, L.V.W., Ebbesen, K.K., Hansen, T.B., Kjems, J., 2019. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nat. Rev. Genet.* 20, 675–691. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0158-7>

Krol, J., Busskamp, V., Markiewicz, I., Stadler, M.B., Ribi, S., Richter, J., Duebel, J., Bicker, S., Fehling, H.J.J., Schubeler, D., Oertner, T.G., Schratt, G., Bibel, M., Roska, B., Filipowicz, W., Schübeler, D., Oertner, T.G., Schratt, G., Bibel, M., Roska, B., Filipowicz, W., 2010. Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid

turnover as a common property of neuronal microRNAs. *Cell* 141, 618–631. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.039>

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853–858. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>

Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Bartel, D.P., 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858–862. <https://doi.org/10.1126/science.1065062>

Lee, S., Song, J., Kim, S., Kim, J., Hong, Y., Kim, Y., Kim, D., 2013. Selective Degradation of Host MicroRNAs by an Intergenic HCMV Noncoding RNA Accelerates Virus Production. *Cell Host Microbe* 13, 678–690. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.007>

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., Kim, V.N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>

Li, J.H., Liu, S., Zhou, H., Qu, L.H., Yang, J.H., 2014. StarBase v2.0: Decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1248>

Li, L., Sheng, P., Li, T., Fields, C.J., Hiers, N.M., Wang, Y., Li, J., Guardia, C.M., Licht, J.D., Xie, M., 2021. Widespread microRNA degradation elements in target mRNAs can assist the encoded proteins. *Genes Dev.* 1595–1609. <https://doi.org/10.1101/gad.348874.121>

Liang, D., Wilusz, J.E., 2014. Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production. *Genes Dev.* 28, 2233–2247. <https://doi.org/10.1101/gad.251926.114>

Libri, V., Helwak, A., Miesen, P., Santhakumar, D., Borger, J.G., Kudla, G., Grey, F., Tollervey, D., Buck, A.H., 2012. Murine cytomegalovirus encodes a miR-27 inhibitor disguised as a target. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 279–284. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114204109>

Liu, C.X., Li, X., Nan, F., Jiang, S., Gao, X., Guo, S.K., Xue, W., Cui, Y., Dong, K., Ding, H., Qu, B., Zhou, Z., Shen, N., Yang, L., Chen, L.L., 2019. Structure and

Degradation of Circular RNAs Regulate PKR Activation in Innate Immunity. *Cell* 177, 865–880.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.046>

Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.-E., Smith, D.P., Wang, X., 2003. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* 301, 1921–1925. <https://doi.org/10.1126/science.1088710>

Marcinowski, L., Tanguy, M., Krmpotic, A., Rädle, B., Lisnić, V.J., Tuddenham, L., Chane-Woon-Ming, B., Ruzsics, Z., Erhard, F., Benkartek, C., Babic, M., Zimmer, R., Trgovcich, J., Koszinowski, U.H., Jonjic, S., Pfeffer, S., Dölken, L., 2012. Degradation of cellular miR-27 by a novel, highly abundant viral transcript is important for efficient virus replication in vivo. *PLoS Pathog.* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002510>

McCaskill, J., Praihrunkit, P., Sharp, P.M., Buck, A.H., 2015. RNA-mediated degradation of microRNAs: A widespread viral strategy? *RNA Biol.* 12, 579–585. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1034912>

Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S.D., Gregersen, L.H., Munschauer, M., Loewer, A., Ziebold, U., Landthaler, M., Kocks, C., le Noble, F., Rajewsky, N., 2013. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* 495, 333–338. <https://doi.org/10.1038/nature11928>

Miranda, K.C., Huynh, T., Tay, Y., Ang, Y.-S., Tam, W.-L., Thomson, A.M., Lim, B., Rigoutsos, I., 2006. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 126, 1203–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.031>

Miyoshi, T., Takeuchi, A., Siomi, H., Siomi, M.C., 2010. A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in *Drosophila*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1024–1026. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1875>

Moore, M.J., Scheel, T.K.H., Luna, J.M., Park, C.Y., Fak, J.J., Nishiuchi, E., Rice, C.M., Darnell, R.B., 2015. miRNA-target chimeras reveal miRNA 3'-end pairing as a major determinant of Argonaute target specificity. *Nat. Commun.* 6, 8864. <https://doi.org/10.1038/ncomms9864>

Nielsen, A.F., Bindereif, A., Bozzoni, I., Hanan, M., Hansen, T.B., Irimia, M., Kadener,

- S., Kristensen, L.S., Legnini, I., Morlando, M., Jarlstad Olesen, M.T., Pasterkamp, R.J., Preibisch, S., Rajewsky, N., Suenkel, C., Kjems, J., 2022. Best practice standards for circular RNA research. *Nat. Methods* 19, 1208–1220. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01487-2>
- Pawlica, P., Moss, W.N., Steitz, J.A., 2016. Host miRNA degradation by Herpesvirus saimiri small nuclear RNA requires an unstructured interacting region. *RNA* 22, 1181–1189. <https://doi.org/10.1261/rna.054817.115>
- Petkovic, S., Graff, S., Feller, N., Berghaus, J., Ruppert, V.-P., Dülfer, J., Sczakiel, G., 2021. Circular versus linear RNA topology: different modes of RNA-RNA interactions in vitro and in human cells. *RNA Biol.* 1–10. <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1978214>
- Pinzon, N., Li, B., Martinez, L., Sergeeva, A., Presumey, J., Apparailly, F., Seitz, H., 2017. microRNA target prediction programs predict many false positives. *Genome Res* 27, 234–245. <https://doi.org/10.1101/gr.205146.116>
- Piwecka, M., Glažar, P., Hernandez-Miranda, L.R., Memczak, S., Wolf, S.A., Rybak-Wolf, A., Filipchuk, A., Klironomos, F., Cerda Jara, C.A., Fenske, P., Trimbuch, T., Zywitzka, V., Plass, M., Schreyer, L., Ayoub, S., Kocks, C., Kühn, R., Rosenmund, C., Birchmeier, C., Rajewsky, N., 2017. Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function. *Science* 8526, eaam8526. <https://doi.org/10.1126/science.aam8526>
- Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W.J., Pandolfi, P.P., 2010. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* 465, 1033–1038. <https://doi.org/10.1038/nature09144>
- Rajasethupathy, P., Fiumara, F., Sheridan, R., Betel, D., Puthanveetil, S.V., Russo, J.J., Sander, C., Tuschl, T., Kandel, E., 2009. Characterization of small RNAs in Aplysia reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. *Neuron* 63, 803–817. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.05.029>
- Rissland, O.S., Hong, S.J., Bartel, D.P., 2011. MicroRNA Destabilization Enables Dynamic Regulation of the miR-16 Family in Response to Cell-Cycle Changes. *Mol. Cell* 43, 993–1004. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.021>

Rybak-Wolf, A., Stottmeister, C., Glažar, P., Jens, M., Pino, N., Hanan, M., Behm, M., Bartok, O., Ashwal-Fluss, R., Herzog, M., Schreyer, L., Papavasileiou, P., Ivanov, A., Öhman, M., Refojo, D., Kadener, S., Rajewsky, N., Glazar, P., Jens, M., Pino, N., Giusti, S., Hanan, M., Behm, M., Bartok, O., Ashwal-Fluss, R., Herzog, M., Schreyer, L., Papavasileiou, P., Ivanov, A., Ohman, M., Refojo, D., Kadener, S., Rajewsky, N., Glažar, P., Jens, M., Pino, N., Hanan, M., Behm, M., Bartok, O., Ashwal-Fluss, R., Herzog, M., Schreyer, L., Papavasileiou, P., Ivanov, A., Öhman, M., Refojo, D., Kadener, S., Rajewsky, N., 2015. Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed. *Mol. Cell* 58, 870–885. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.027>

Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., Pandolfi, P.P., 2011. A ceRNA hypothesis: The rosetta stone of a hidden RNA language? *Cell* 146, 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.014>

Sanjana, N.E., Shalem, O., Zhang, F., 2014. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3047>

Sethi, P., 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. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.04.052>

Shalem, O., Sanjana, N.E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D.A., Mikkelsen, T.S., Heckl, D., Ebert, B.L., Root, D.E., Doench, J.G., Zhang, F., 2014. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1247005>

Sheng, P., Li, L., Li, T., Wang, Y., Hiers, N.M., Mejia, J.S., Sanchez, J.S., Zhou, L., Xie, M., 2022. A conserved sequence in *Drosophila* Argonaute1 mRNA contributes to stress response via inducing miR-999 degradation. <https://doi.org/10.1101/2022.11.16.515324>

Sheu-Gruttadauria, J., Pawlica, P., Klum, S.M., Wang, S., Yario, T.A., Schirle Oakdale, N.T., Steitz, J.A., MacRae, I.J., 2019. Structural Basis for Target-Directed MicroRNA Degradation. *Mol. Cell* 75, 1243-1255.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.019>

Shi, C.Y., Kingston, E.R., Kleaveland, B., Lin, D.H., Stubna, M.W., Bartel, D.P., 2020. The ZSWIM8 ubiquitin ligase mediates target-directed microRNA degradation. *Science* 370, eabc9359. <https://doi.org/10.1126/science.abc9359>

- Simeone, I., Rubolino, C., Noviello, T.M.R., Farinello, D., Cerulo, L., Marzi, M.J., Nicassio, F., 2022. Prediction and pan-cancer analysis of mammalian transcripts involved in target directed miRNA degradation. *Nucleic Acids Res.* 50, 2019–2035. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac057>
- Slack, F.J., Chinnaiyan, A.M., 2019. The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell* 179, 1033–1055. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.017>
- Soutschek, M., Gross, F., Schratt, G., Germain, P.-L., 2022. scanMiR: a biochemically based toolkit for versatile and efficient microRNA target prediction. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 38, 2466–2473. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac110>
- Szabo, L., Salzman, J., 2016. Detecting circular RNAs: bioinformatic and experimental challenges. *Nat. Rev. Genet.* 17, 679–692. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.114>
- Tatomer, D.C., Liang, D., Wilusz, J.E., 2017. Inducible Expression of Eukaryotic Circular RNAs from Plasmids. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1648, 143–154. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7204-3_11
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., Zamore, P.D., 2004. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306, 1377–1380. <https://doi.org/10.1126/science.1102755>
- Ulitsky, I., 2018. Interactions between short and long noncoding RNAs. *FEBS Lett.* 1–10. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13085>
- van Rooij, E., Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., Hill, J., Olson, E.N., 2007. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 316, 575–579. <https://doi.org/10.1126/science.1139089>
- Vogl, A.M., Brockmann, M.M., Giusti, S.A., Maccarrone, G., Vercelli, C.A., Bauder, C.A., Richter, J.S., Roselli, F., Hafner, A.S., Dedic, N., Wotjak, C.T., Vogt-Weisenhorn, D.M., Choquet, D., Turck, C.W., Stein, V., Deussing, J.M., Refojo, D., 2015. Neddylation inhibition impairs spine development, destabilizes synapses and deteriorates cognition. *Nat Neurosci* 18, 239–251. <https://doi.org/10.1038/nn.3912>
- Wahle, E., Winkler, G.S., 2013. RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 561–570. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.01.003>

- Wang, K., Long, B., Liu, F., Wang, J.-X., Liu, C.-Y., Zhao, B., Zhou, L.-Y., Sun, T., Wang, M., Yu, T., Gong, Y., Liu, J., Dong, Y.-H., Li, N., Li, P.-F., 2016. A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-223. *Eur. Heart J.* 37, 2602–2611. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv713>
- Wang, P.Y., Bartel, D.P., 2022. A statistical approach for identifying primary substrates of ZSWIM8-mediated microRNA degradation in small-RNA sequencing data. <https://doi.org/10.1101/2022.02.17.480958>
- Westholm, J.O., Miura, P., Olson, S., Shenker, S., Joseph, B., Sanfilippo, P., Celniker, S.E., Graveley, B.R., Lai, E.C., 2014. Genome-wide analysis of drosophila circular RNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation. *Cell Rep.* 9, 1966–1980. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.062>
- Wilusz, J.E., 2018. A 360° view of circular RNAs: From biogenesis to functions. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* e1478. <https://doi.org/10.1002/wrna.1478>
- Xiao, M.S., Wilusz, J.E., 2019. An improved method for circular RNA purification using RNase R that efficiently removes linear RNAs containing G-quadruplexes or structured 3' ends. *Nucleic Acids Res.* 47, 8755–8769. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz576>
- Xie, J., Ameres, S.L., Friedline, R., Hung, J.-H., Zhang, Y., Xie, Q., Zhong, L., Su, Q., He, R., Li, M., Li, H., Mu, X., Zhang, H., Broderick, J.A., Kim, J.K., Weng, Z., Flotte, T.R., Zamore, P.D., Gao, G., 2012. Long-term, efficient inhibition of microRNA function in mice using rAAV vectors. *Nat. Methods* 9, 403–409. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1903>
- Yamashita, A., Chang, T.-C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C.-Y.A., Shyu, A.-B., 2005. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 1054–1063. <https://doi.org/10.1038/nsmb1016>
- Yang, J.H., Li, J.H., Shao, P., Zhou, H., Chen, Y.Q., Qu, L.H., 2011. StarBase: A database for exploring microRNA-mRNA interaction maps from Argonaute CLIP-Seq and Degradome-Seq data. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1056>
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011–3016.

<https://doi.org/10.1101/gad.1158803>

You, X., Vlatkovic, I., Babic, A., Will, T., Epstein, I., Tushev, G., Akbalik, G.G.G., Wang, M., Glock, C., Quedenau, C., Wang, X., Hou, J., Liu, H., Sun, W., Sambandan, S., Chen, T., Schuman, E.M., Chen, W., 2015. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity. *Nat. Neurosci.* 18, 603–610. <https://doi.org/10.1038/nn.3975>

Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., Filipowicz, W., 2004. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.017>

Zhang, J., Hou, L., Zuo, Z., Ji, P., Zhang, X., Xue, Y., Zhao, F., 2021. Comprehensive profiling of circular RNAs with nanopore sequencing and CIRI-long. *Nat. Biotechnol.* 39, 836–845. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00842-6>

Zhang, X.O., Wang, H.B., Zhang, Y., Lu, X., Chen, L.L., Yang, L., 2014. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell* 159, 134–147. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.001>

Zhang, Y., Xue, W., Li, X., Zhang, J., Chen, S., Zhang, J.L., Yang, L., Chen, L.L., 2016. The Biogenesis of Nascent Circular RNAs. *Cell Rep.* 15, 611–624. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.058>

Zheng, Q., Bao, C., Guo, W., Li, S., Chen, J., Chen, B., Luo, Y., Lyu, D., Li, Y., Shi, G., Liang, L., Gu, J., He, X., Huang, S., 2016. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs. *Nat. Commun.* 7, 11215. <https://doi.org/10.1038/ncomms11215>

Apéndice

Tabla Suplementaria I

Oligo	Uso	Secuencia 5'->3'
CiRS7_lin_For	CDR1as lineal	gggtttccagtgggtgccagt
CiRS7_lin_Rev	CDR1as lineal	ctggatacggcagacaccag
ciRS7_lin_For_BamHI	CDR1as lineal sin sitio de miR-671	atccGGATCCgggtttccagtgggtgccagt
ciRS7_lin_Rev_Sall	CDR1as lineal sin sitio de miR-671	atccGTCGACTgaaggaagacacatgtact
rno-miR-671-gblock_mouse-Cir7-match	shCDR1as	atagccgattagtctcaggagatccggggcagattgaccgcgaggcatcagcagagggctgcttctacaacgcgtacta cctggcagcccgccggcctggctgggtgaactggcagggcaggaagaggaggaagccctggagatgctggaggtga tggatgttttcccggtgtcagggtccacacttttcgagccgtagagccagggctggtagagaagtttccctgaggga ctgcagcccccggctcagtgaggaaactgtaccaccgtgtgcctcagcaactggaggggctgtagctcgagcttttgg agaatat gagcgagctcagagagatcctttttttttgacggagttaacttctgtctccaggtaggaagtgcagtgccgtaactc ggctcactacaactccactcctgggttcaagcgttttctcctcagcttccgagtagctgggattacaggcgctgcc accatggcctgtgactttttagtatttttagtagagacggggttccaccatgttgccaggctggtcttgaactcctgaccgcag gcatgtggcctgctcggcctcccaagtgtgtagattacaggcgtgagccaccaccccgctcaggagcgtcttgata gtgctcgtatgtgctcctataaagtgttagcagcacagatcacttttgaaggtacgtactaatgacttttttatact tcaggaatagtaaaacaacatcataaaacctcccacggctgccaccatggtga
ZKSCAN1_Ups_intron	circRNA Artificial en vector lentiviral contra miR-132	
ZKSCAN1_Downs_intron	circRNA Artificial en vector lentiviral contra miR-132	taggggaagggaatgattcaggacgagagtctttgtgctgctgagtgctgtatgaagaagcatgttagtgaagaagaa ttaggctcgccagcgttagctcacactgtaatccagcactttgggaggctgagggcggcagatcacttgaggctcaggag ttgagaccagcctggcacaacatggtgaacctgtgtctactaaaaatgaaaattagccagcatggtggcacattctg taatccagctactcgggaggtgtagggcaggagaatcactgaaccaggaggtggaggttcagtaagccagagatcgt accactgtgcttagccttggtagacagcagcagactgtcttaaaaaaaaaaagtcgacaatcaacctctgga
gBlock_miR-92a_perf	Cambiar el sitio de miR-124 por miR-92a	TAAACGACCATGGCAAGGACTGTTATGTACAAGTAAAGCGGCCGCTCGGAAACCCCGCCTCTT ACAGTCACGAGGTAAGAAGCAAGGTTTCATTTAGGGGAAGGGAAATGATTACGAGCAGAGAGTC TTTGTGCTGCTGAGTGCCTGTGATGAAGAAGCATGTTAGTGAAAAGAATTAGGCTCGGCACGGT AGCTCACAACCTGTAATCCAGCAGCTTTGGGAGGCTGAGGCGGGCAGATCACTTGAGGTCAGGA GTTTGAGACGACCTGGCCAAACATGGTGAAACCTTGTCTACTAAAAATATGAAAATTAGCCA GGCATGGTGACATTCTGTAAATCCAGCTACTCGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGA ACCCAGGAGGTGGAGGTGACGTAAGCCGAGATCGTACCCTGTCTAGCCTTGGTGACAG AGCGAGACTGTCTTAAAAAAGTGCAGACAGGCCGGGACAAGTGAATAGTCGACAAT CAACCTCTGGAttacaaatt
gBlock_miR-92a_mut	Cambiar el sitio de miR-124 por miR-92a	TAAACGACCATGGCAAGGACTGTTATGTACAAGTAAAGCGGCCGCTCGGAAACCCCGCCTCTT ACAGTCACGAGGTAAGAAGCAAGGTTTCATTTAGGGGAAGGGAAATGATTACGAGCAGAGAGTC TTTGTGCTGCTGAGTGCCTGTGATGAAGAAGCATGTTAGTGAAAAGAATTAGGCTCGGCACGGT AGCTCACAACCTGTAATCCAGCAGCTTTGGGAGGCTGAGGCGGGCAGATCACTTGAGGTCAGGA GTTTGAGACGACCTGGCCAAACATGGTGAAACCTTGTCTACTAAAAATATGAAAATTAGCCA GGCATGGTGACATTCTGTAAATCCAGCTACTCGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGA ACCCAGGAGGTGGAGGTGACGTAAGCCGAGATCGTACCCTGTCTAGCCTTGGTGACAG AGCGAGACTGTCTTAAAAAAGTGCAGACAGGCCGGGATGGTAATCTAGTCGACAATC AACCTCTGGATTACAAAATT
miR-92a_perf oligo F	Adicionar sitio de miR-92a en pCDNA	ggccgcAGTCGAGACAGGCCGGGACAAAGTGCAATAGTCGACAgggcc
miR-92a_perf oligo R	Adicionar sitio de miR-92a en pCDNA	cTGTGCACTATTGCATTGTCCCGCCTGTCTCGACTgc
miR-92a_mut oligo F	Adicionar sitio de miR-92a en pCDNA	ggccgcAGTCGAGACAGGCCGGGATGGTAATCTAGTCGACAAAgggcc
miR-92a_mut oligo R	Adicionar sitio de miR-92a en pCDNA	CTTGTGCACTAGATTACATCCCGCCTGTCTCGACTgc
hPGKp_Mfel_For	Sustituir CMV por PGK	CAGTGCAATTGttgcgcttttccaaggcag
hPGKp_NheI_Rev	Sustituir CMV por PGK	CAGTGGCTAGCctggggagagaggtcgggtga
		CTACCCAATTGGATCCAGTTTGGTTAGTACC
TRep_Mfel_For	Sustituir CMV por TRE	
TRep_NheI_Rev	Sustituir CMV por TRE	cagtgGCTAGCCTAGGCGGCCTTAATTAAG
miR-7&16-5p_TDM site_For	Adicionar sitio de miR-7 a circRNA	actgctgtacaagtaaAATGTTACAAGTTGTTTAAG
miR-7&16-5p_TDM site_Rev	Adicionar sitio de miR-7 a circRNA	tcattgtgtacaAAACTATACATCTCAAAA
miR-7-5p_TDM site_Template	Adicionar sitio de miR-7 a circRNA	TTACAAGTTGTTTAAGAACAACAAATCACCAATGTCTTCCATTTTGAGATGTGTATA
miR-7-5p_TDM site_MUT_Template	Adicionar sitio de miR-7 a circRNA	TTACAAGTTGTTTAAGATGTTGTAATCACCAACAGAACCATTTTGAGATGTGTATA

miR-218-5p_TDM site_Template	Adicionar sitio de miR-218 a circRNA	CACCCTAAAATGCTTCACATGGTTAAAAACAAGCACAAATTTGAATCCTACAGC
miR-218-5p_TDM site_MUT_Template	Adicionar sitio de miR-218 a circRNA	CACCCTAAAATGCTTCAGTACCAAAAAAGTACGTCAATTTTGAATCCTACAGC
miR-218-5p_TDM site_For	Adicionar sitio de miR-218 a circRNA	actgctgtacaagtaaCAGTCACCCTAAAATGCTTC
miR-218-5p_TDM site_Rev	Adicionar sitio de miR-218 a circRNA	tcatgtgtacaCCTTGCTGTAGATTCAAAA
IRES_seq_2_SacII Rev	Generar circRNAs más pequeños	cgttgtCCGCGGcgctgcagcagaattcaga
IRES_seq_1_SacII Rev	Generar circRNAs más pequeños	cgatcgCCGCGGgaaggtcgctacagacgttg
IRES_seq_2_XbaI Rev	Generar circRNAs más pequeños	cctatgTCTAGAcgtgcagcagaattcaga
IRES_seq_1_XbaI Rev	Generar circRNAs más pequeños	ggcatgTCTAGAAaggtcgctacagacgttg
qGFP_AgeI_For	Generar circRNAs más pequeños	ggtcagACCGGTagaacggcatcaaggtgaac
qGFP_NheI_For	Generar circRNAs más pequeños	gtgcatGCTAGCagaacggcatcaaggtgaac
sgCIRS7-1_For	sgRNA para mutar CDR1as	CACCGATGAAACAACCTTCAATACC
sgCIRS7-1_Rev	sgRNA para mutar CDR1as	AAACGGTATTGAAAGTTGTTTCATC
sgCIRS7-2_For	sgRNA para mutar CDR1as	CACCGATGATGTTTCAATATCTAG
sgCIRS7-2_Rev	sgRNA para mutar CDR1as	AAACCTAGATATTGGAACATCATC

Tabla Suplementaria III

Nombre	Comentario	Secuencia 5'→3'
circ_Cdr1as F	Circular CDR1as divergente	cctacaactgccagtgctctc
circ_Cdr1as R	Circular CDR1as divergente	ggtactggcaccactggaaa
TO_Cdr1as F	Circular + linear CDR1as (total output)	tgtgtcttcttcacctccag
TO_Cdr1as R	Circular + linear CDR1as (total output)	ctggatagcggcagacaccag
qWPRE_For	Linear CDR1as/artificial linRNA control exclusivamente	actgtgtgtgtgcagcgaac
qWPRE_Rev	Linear CDR1as/artificial linRNA control exclusivamente	caacaccacggaattgtcag
Artificial_circ F	Circular artificial circRNA divergente	TACAAGTAAAGCGGCGCGTCG
Artificial_circ R	Circular artificial circRNA divergente	CTCGCCCTTGCTCACCATGGTG
Artificial_circ_TO F	Circular + linear artificial circRNA (Total output)	gtggaacagtacgaacgcgcc
Artificial_circ_TO R	Circular + linear artificial circRNA (Total output)	CTACTTGATACATGATTAGTGGTTTAAAAAT
Artificial_circ_lin F	Isoforma lineal artificial exclusivamente (combinado con Artificial_circ_For)	TGAGTACCCTGCGGAGCTCAA
mmu_pri-miR-132 F	pri-miR-132 qPCR (ratón)	GCACGCCTGTTCAAGGTCCTG
mmu_pri-miR-132 R	pri-miR-132 qPCR (ratón y rata)	CCCCGCCTCCTCTGCTCTGTA
mmu_pri-miR-7 F	pri-miR-7 qPCR (ratón)	GCCTGTAGAAAATGTAGAAGAGAC
mmu_pri-miR-7 R	pri-miR-7 qPCR (ratón y rata)	TATGGCAGACTGTGATTGTTG GTCTCCTCTGGTGACGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACC GACCA
hsa-miR-132-3p STEM	Conservado en ratón y rata	GGCGGUUACAGUCUACAGCC
hsa-miR-132-3p Fw	Conservado en ratón y rata	GTCTCCTCTGGTGACGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACT CATAC
hsa-miR-9-5p Stem	Conservado en ratón y rata	GGCGGUUUUGGUUUUACUAGC
hsa-miR-9-5p Fw	Conservado en ratón y rata	GTCTCCTCTGGTGACGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACA ACAAC
hsa-miR-7-5p Stem	Conservado en ratón y rata	GGCGGUUUAAGACUAGUGAUUU
hsa-miR-7-5p Fw	Conservado en ratón y rata	GTCTCCTCTGGTGACGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACT ATGGC
mmu-miR-7-1-3p Stem	Conservado en humano	GGCGGCAACAATCACAGTC
mmu-miR-7-1-3p Fw	Conservado en humano	GTCTCCTCTGGTGACGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACT GTGGC
rno-miR-7a-2-3p Stem	Conservado en ratón	GGCGGCAACAAGTCCAGTC
rno-miR-7a-2-3p Fw	Conservado en ratón	TGGTGACGGGTCCGAGGTATT
miR Rev Universal	-	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG
ActB F	Conservado en ratón y rata	ACCAGAGGCATACAGGGACA
ActB R	Conservado en ratón y rata	AAAagaacagccaccacac
Klf4f	miR-7 Target	tccagtcacagtggtaagg
Klf4r	miR-7 Target	cgcgctcaacctttctc
Egr3f	miR-7 Target	attgggcttctcggtgtc
Egr3r	miR-7 Target	gagtgtgtgggggtccag
Irs2f	miR-7 Target	aatgtagaattgtctccgttg
Irs2r	miR-7 Target	tgctgtgcagcactgagtatg
Nr4a3f	miR-7 Target	agagcgtgtcccttctgt
Nr4a3r	miR-7 Target	gtcacgaactccagcaggac
GFP (-41 to -60 nt from stop)	Sonda para circRNAs con GFP	

Tabla Suplementaria III

Custom-made qPCR Mix	μL per Reaction
10X Reaction Buffer *	2.5
MgCl ₂ 25 mM	4
Triton x-100 10%	0.06
dNTP mix 10mM	0.5
Glycerol 60%	1.67
DMSO 100%	0.25
Betaine 5M	1.25
Taq Polymerase (5 U/μL) **	0.1
SYBR Green (1/90) ***	0.03
Primer Forward 10 μM	0.5
Primers Reverse 10 μM	0.5
H ₂ O	8.64
cDNA	5
Final volume	25

* 10X TAS reaction buffer from INBIO Highway

** Taq Polymerase from INBIO Highway

***SYBR Green (Sigma S9430).

**qPCR program: 94°C-3'; (94°C-15"; 60°C-15"; 72°C-25") 40x,
melting curve. All reactions were run in either an ABI
Quantstudio 3 or an ABI StepOnePlus.