

**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**"Caracterización funcional de potenciales RNA largos no codificantes
(lncRNAs) y su participación en la diferenciación muscular"**

Tesis que presenta

Lic. Lawrence Christopher López Méndez

para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

en la Especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de la Tesis

Dr. José Manuel Hernández Hernández

México, D.F.

Noviembre 2020

**Este trabajo fue realizado gracias al apoyo del
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(CONACyT) durante el período de septiembre
del año 2018 a agosto del año 2020**

CVU: 917109

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a todas y cada una de las personas que influyeron en su desarrollo, de una a u otra forma:

Al Dr. José Manuel, por aceptarme en su laboratorio y darme un lugar para materializar mis ideas, a Leti por sus consejos y todas esas platicas. Al los Doctores Bulmaro y Efraín, que a pesar de las pocas charlas siempre me aconsejaron de la mejor manera, A Gaby por siempre apoyarme y preocuparse por nosotros.

A mi familia, mis padres y mis hermanos, por siempre tener un tiempo para escucharme, por contraponerme y enseñarme, a mi tío Concepción y mi tía flor, por aceptarme y hacerme sentir en casa, a mis primas, por mostrarme otro lado de la realidad. A Elizabeth por todo el tiempo que ha estado ahí, aun a pesar de la distancia.

A mis amigos, a Arlene, mi amiga y cómplice, con quien compartí más tiempo en todo este proceso, a mis roomies, Karla y Edwin, de las mejores personas que he conocido, a quienes nunca les faltó un mal consejo para mí, a Alejandra y Daniel, por acompañarnos y hacer tantos días interesantes y divertidos, A Jairo, Víctor, ángeles y Charlie, quienes siempre fueron increíble compañía y con quienes también pase bastantes buenos momentos.

A mis viejos amigos, Josema, Mijael, Oso, Ivonne, Zaii y Sofia, por seguir influyendo en mí y guiándome por el camino más divertido.

Al universo, por seguir repartiendo manos, porque aún queda a que apostarle.

"The perfection of the lotus reminds me of my hopes for this world... and my failures. I will not rest until I've atoned for them."

—Karn

Contenido

Lista de abreviaturas.....	1
índice de figuras.....	2
índice de tablas.....	2
Abstract.....	3
Resumen.....	3
Introducción.....	4
Antecedentes.....	5
El músculo esquelético.....	5
RNAs no codificantes.....	9
miRNAs.....	9
LncRNAs.....	11
Justificación.....	16
Objetivos.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos Específicos.....	16
Hipótesis.....	16
Metodología.....	17
Análisis <i>in silico</i>	17
Cultivos celulares.....	17
Extracción de RNA.....	17
RT-PCR.....	18
Amplificación rápida de extremos de cDNA (RACE).....	20
RACE 5´.....	20
RACE 3´.....	23
Resultados.....	25
Obtención de candidatos.....	25

Análisis <i>in silico</i>	27
Determinación del potencial de codificación.....	27
Evaluación de interacción con factores de transcripción	27
Evaluación de interacción con factores de transcripción	28
Comprobación de la presencia de transcritos en cultivos celulares	30
Caracterización de los LncRNA	31
Discusión	32
Perspectivas.....	34
Referencias.....	35

Lista de abreviaturas

ATP - Adenosine triphosphate, siglas en ingles.

cDNA - Complementary DNA, siglas en ingles

ceRNA - Competing endogenous RNA, siglas en ingles.

DNA - Deoxyribonucleic acid, siglas en ingles

eRNA – Enhancer RNA, siglas en ingles

H3k27ac - Acetilacion en la lisina 27 de la histona 3.

H3K4me1 – Monometilacion en la lisina 4 de la histona 3.

H3K4me3 – Trimetilacion en la lisina 4 de la histona 3.

lncRNAs - long non-coding RNAs , siglas en ingles

MHC - Myosin Heavy Chain, siglas en ingles

miRNAs – microRNAs, siglas en ingles

MRF - Myogenic regulatory factors, siglas en ingles.

Myhs – Myosin, siglas en ingles

ncRNA – No-coding RNAs, siglas en ingles.

PCR – Polymerase chain reaction, siglas en ingles

RACE - Rapid amplification of cDNA ends, siglas en ingles

RNA - Ribonucleic acid, siglas en ingles

tRNA - Transfer RNA, siglas en ingles

UTR - Untranslated región, siglas en ingles

índice de figuras

Figura 1 Representación esquemática de una fibra muscular.....	6
Figura 2 Representación esquemática del proceso de diferenciación muscular.	7
Figura 3 Representación esquemática de las principales funciones de LncRNA.....	12
Figura 4 Representación esquemática de la regulación por parte de los eRNA cercanos a MyoD.	14
Figura 5 Representación esquemática del proceso de RACE para la obtención del extremo 5´	20
Figura 6 Representación esquemática de eRNAs y las marcas epigénéticas que los regulan.	25
Figura 7 Presencia de los transcritos en el genoma de ratón.	26
Figura 8 Resultados análisis de unión de miRNAs.....	29
Figura 9 Presencia de los LncRNA en la línea celular C2C12.	30
Figura 10 Resultados RACE.....	31

índice de tablas

Tabla 1 Mezcla A.....	18
Tabla 2 Mezcla B.....	18
Tabla 3 Mezcla PCR.....	19
Tabla 4 Ciclo de Amplificación para PCR.....	19
Tabla 5 Mezcla Retro-Transcripción -RACE 5´	21
Tabla 6 Mezcla PCR-RACE 5´	22
Tabla 7 Ciclo de Amplificación para PCR-RACE 5´	22
Tabla 8 Mezcla Retro-Transcripción -RACE 3´	23
Tabla 9 Mezcla PCR-RACE 3´	23
Tabla 10 Ciclo de Amplificación para PCR-RACE 3´	24
Tabla 11 Resultados Potencial de codificación.....	27
Tabla 12 Resultados Evaluación de interacción con factores de transcripción.....	28

Abstract

The appearance of non-coding RNAs has added new control elements to biological phenomena: Within this group we can find the long non-coding, transcripts that share the characteristic of having a length greater than 200 nucleotides and perform a diverse class of functions. In this work we present the determination of the presence of two transcripts by end-point PCR in mouse muscle cells and their subsequent characterization by RACE, as well as an evaluation of their possible functions in the muscle differentiation process using informatic tools.

Resumen

La aparición de los RNA no codificantes ha agregado nuevos elementos de control a los fenómenos biológicos: Dentro de este grupo podemos encontrar a los largos no codificantes, transcritos que comparten la característica de tener una longitud mayor a 200 nucleótidos y realizan una diversa clase de funciones. En este trabajo presentamos la determinación de la presencia de dos transcritos por medio de PCR de punto final en células musculares de ratón y su posterior caracterización por medio de RACE, así como una evaluación de sus posibles funciones en el proceso de diferenciación muscular mediante herramientas informáticas.

Introducción

El movimiento existe dentro de la vida de los seres en este plantea y condiciona diversos aspectos de su interacción con su medio, inclusive a nosotros los humanos, acciones que consideramos tan básicas como el respirar, comer o desplazarnos son generadas a partir del movimiento mediante los músculos. Los músculos son un tejido blando especializado en la conversión de energía química a mecánica mediante el acortamiento de sus fibras, con lo cual permiten la realización de diversas funciones dentro del organismo, como el mantenimiento postural, la circulación sanguínea, el movimiento intestinal, entre otros. Dentro de los vertebrados se reconocen tres tipos musculares, el musculo esquelético cuya función principal es realizar movimientos voluntarios y mantener la postura, mientras que el musculo liso se encuentra íntimamente ligado a las paredes de órganos o estructuras y se encarga principalmente de movimientos inconscientes, y finalmente, el musculo cardiaco el cual a pesar de compartir características comunes con el musculo esquelético, se diferencia en presentar movimientos inconscientes además de presentar un acople de excitación-contracción que permite su contracción rítmica y constante hasta el final de la vida. Es así, como su uso diario, aunado a diversas patologías y daño llevan a la degradación de los músculos, por lo cual se requieren procesos de diferenciación celular para la regeneración y mantenimiento de las fibras. A pesar de los avances en los últimos 30 años, empezando por el descubrimiento del primer factor de trans-diferenciación celular, la aparición de nuevos elementos de control sobre los fenómenos biológicos como son los RNA no codificantes que debido a sus características químicas presentan una gran variedad de funciones. Es por ello por lo que en este trabajo evaluamos y caracterizamos dos candidatos de RNA no codificantes seleccionados de resultados obtenidos previamente por nuestro laboratorio en base a características reportadas en trabajos previos, además de especular acerca del papel que desempeñan el en proceso de diferenciación muscular.

Antecedentes

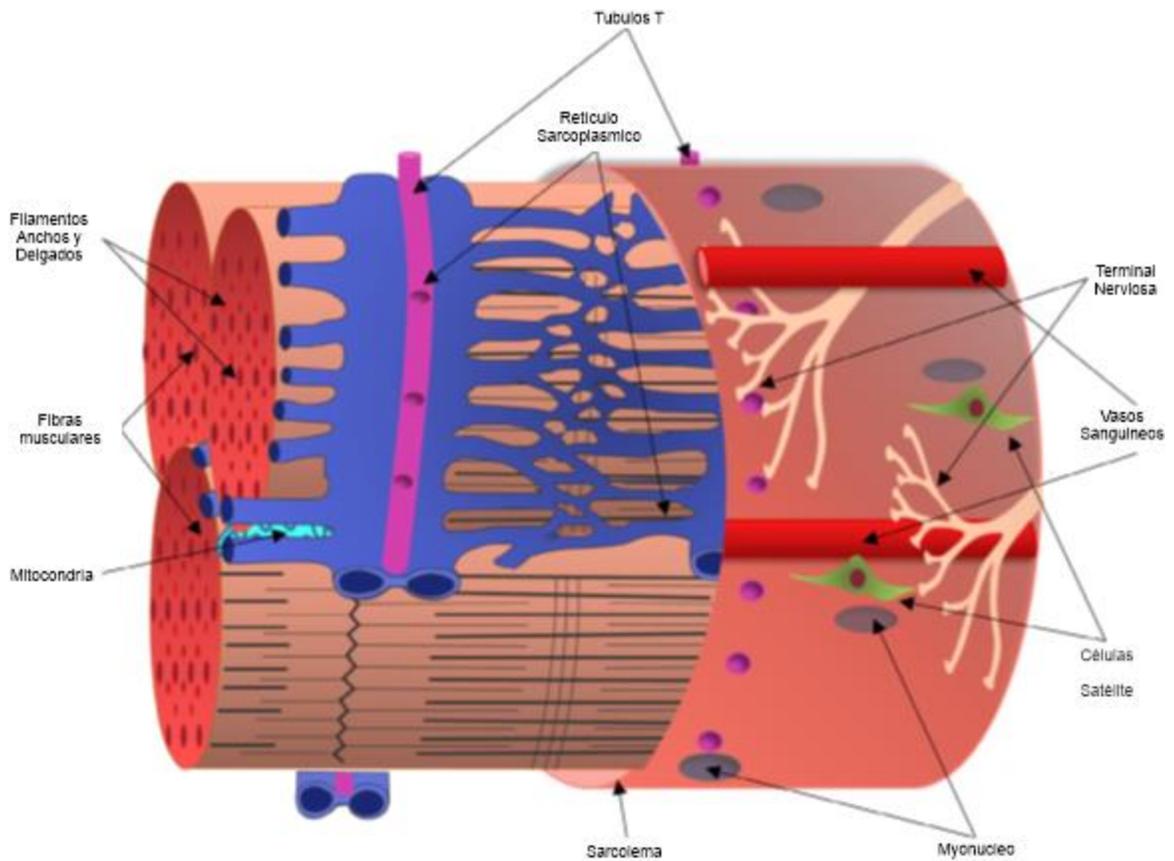
El músculo esquelético

Dentro de los diversos tipos musculares se encuentra el esquelético, siendo el órgano más abundante, constituyendo alrededor del 35% del peso de un organismo adulto (Janssen et al., 2000). Su integridad condiciona múltiples aspectos del funcionamiento del organismo; desde el mantenimiento postural, la transducción de fuerza y el movimiento, hasta la regulación de procesos metabólicos que permiten el mantenimiento de un estado energético adecuado (Ghamkhar & Kahlaee, 2019; Hood et al., 2019).

El músculo esquelético está compuesto por grupos de fascículos encapsulados por matriz extracelular, los cuales contienen haces de fibras musculares multinucleadas organizadas de forma lineal para la transformación eficiente de energía química en energía mecánica. Esto provoca el acortamiento de la longitud de las fibras generando fuerza para la realización de trabajo mecánico, el cual se traduce funcionalmente en movimiento (Brooks, 2003). Además de un citoesqueleto especializado también requiere una alta vascularización e inervación, que, junto con componentes de la maquinaria regulatoria y metabólica, permiten la producción energética adecuada y un estado de homeostasis para el individuo (Mukund & Subramaniam, 2020). La perturbación de este sistema suele resultar en el deterioro de la masa y la actividad muscular, principalmente por la pérdida de fibras, lo cual reduce la capacidad motriz e inclusive puede comprometer la vida del individuo (Cohen et al., 2014).

La capacidad de regeneración es una propiedad característica del músculo esquelético en la etapa adulta, la cual depende en su mayoría de la presencia y funcionalidad de células troncales músculo-específicas descendientes de células embrionarias PAX-3+/PAX-7+, denominadas células satélite (Kassar-Duchossoy et al., 2005; Relaix et al., 2005), las cuales tras un estímulo del medio entran al programa de diferenciación muscular, mediado principalmente por los Factores Reguladores Miogénicos (MRFs), proteínas pertenecientes a la clase II de los factores de transcripción Hélice-bucle-hélice, uniéndose preferentemente en Cajas E (CANNTG) (Rudnicki & Jaenisch, 1995), siendo el más conocido MyoD, el cual es también el primer factor transcripcional relacionado con la transdiferenciación celular (Lassar, 2017), además estableciendo una estructura de cromatina abierta para regular este proceso (Berkes & Tapscott, 2005); funciones similares son llevadas a cabo por otros miembros de esta familia como MyoG, por lo cual su presencia es requerida para la activación, proliferación, diferenciación y

mantenimiento de las poblaciones de células musculares (Ganassi et al., 2018; Meadows et al., 2008). Las células satélite se ubican entre la membrana de las fibras musculares y su matriz extracelular, las cuales se encuentran en estado quiescente con bajos niveles metabólicos y transcripcionales, hasta la aparición del estímulo de activación, que lleva a las células satélite a migrar al sitio donde son requeridas para proliferar y diferenciarse, además de autorrenovarse para reestablecer el reservorio de células satélite para eventos posteriores de regeneración (Forcina et al., 2019; LaBarge & Blau, 2013; Mashinchian et al., 2018; Tierney & Sacco, 2016; Verdijk et al., 2014; W. Yang & Hu, 2018).



*Figura 1 Representación esquemática de una fibra muscular.
Obtenida de (Mukund & Subramaniam, 2020)*

Las células satélite en estado quiescente se caracterizan principalmente por la expresión del factor transcripcional Pax-7 y ausencia de MyoD y MyoG (Relaix et al., 2006), siendo Pax-7 el principal factor de transcripción para el mantenimiento de la quiescencia a través de diversas vías de señalización como NOTCH y WNT (Bjornson et al., 2012; Olguin & Olwin, 2004; Oustanina et al., 2004). Tras una señal de activación controlada por diversas moléculas como el

factor de crecimiento hepático, el factor de necrosis tumoral alfa o el óxido nítrico sobre las células satélite se desencadena la expresión rápida de Myf-5 promoviendo proliferación (S. E. Chen et al., 2007; J. Li et al., 2009; Sheehan et al., 2000; Tatsumi et al., 2002; Van Mater et al., 2015), seguido de la expresión de MyoD, iniciando la cascada transcripcional que marca el ingreso irreversible al programa de diferenciación muscular, autorregulando su propia expresión, seguido de la inducción la expresión de MyoG, con la cual Myf-5 disminuye sus niveles, lo cual coincide con la salida del ciclo celular (Deato et al., 2008; Hu et al., 2008). La presencia de MyoD y MyoG llevan a la expresión de MRF-4 junto con otros genes como Mef-2 que permiten la formación de las fibras multinucleadas (Black et al., 1998; Hinterberger et al., 1991). Una vez completamente desarrolladas las fibras musculares solamente predomina la expresión de MRf-4 para el mantenimiento de los genes estructurales (Moretti et al., 2016).

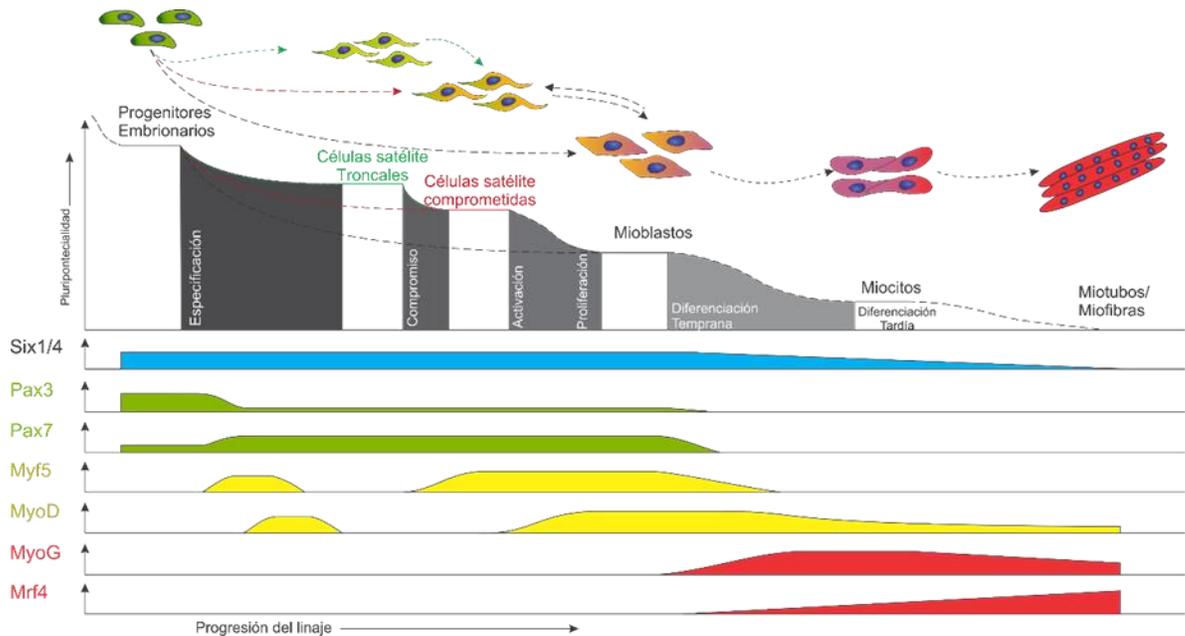


Figura 2 Representación esquemática del proceso de diferenciación muscular.

Una vez terminado el programa de diferenciación muscular tenemos como resultado fibras musculares maduras de distintas clases, las cuales son determinadas principalmente con la isoforma expresada de la Cadena pesada de miosina (MHC), la cual es una proteína hexamérica, compuesta de distintas cadenas codificadas por un familia de genes de los cuales se conocen 11 isoformas, siendo algunas de ellas expresadas de forma específica en ciertos músculos, mientras que otras presentan una distribución más amplia. Las fibras musculares pueden contener una sola isoforma, denominado a estas fibras puras, o presentar dos o más dando pie a fibras híbridas; dentro de las fibras puras tenemos 4 tipos de fibras, “Lenta” a la única perteneciente al Tipo I y “rápidas” las tres pertenecientes al tipo II, determinadas principalmente por sus propiedades contráctiles y sus requerimientos energéticos, por lo cual, aun cuando todas estas subclases presentan características diferentes, es necesario un control sobre la biogénesis mitocondrial que les permita llevar a cabo sus funciones de forma correcta (Pette & Staron, 2000; Schiaffino & Reggiani, 2011).

Las mitocondrias son organelos celulares cuya función principal es la oxidación de metabolitos para la obtención de energía en forma química, siendo las reguladoras primarias del metabolismo celular siendo su abundancia un marcador directo de la demanda de energía del tejido, impactando directamente sobre el metabolismo del individuo. Para la mantención de la homeostasis es necesario un equilibrio entre la generación y degradación de mitocondrias, proceso que se encuentra regulado en la biogénesis por la familia de factores de transcripción PPAR y la familia de receptores ERR, participando también en la determinación del tipo de fibras, mientras en el proceso de degradación las metaloproteinasas ATP-23 y HTRA-2 actúan como sensores en respuesta al daño causado por el estrés oxidativo, proteínas mal plegadas o daños la cadena de transporte de electrones que comprometen la función y estructura de las mitocondrias (Gan et al., 2018; Hood et al., 2019; Islam et al., 2018; Lee et al., 2017; Ramamoorthy et al., 2015).

Los factores de transcripción suelen ser los principales reguladores de estos procesos, sin embargo, en la última década se han investigado otros mecanismos dentro de los que se incluyen modificaciones postraduccionales de histonas, que a través de un código común controlan la remodelación de la cromatina, la metilación del DNA y la participación de RNAs no codificantes (ncRNAs) encontrados dentro del genoma, los cuales han incrementado su importancia en el desarrollo, homeostasis y procesos patológicos.

RNAs no codificantes

En años recientes, la identificación y caracterización de regiones del genoma con capacidad de generar transcritos en regiones intergenicas e intrónicas, sentó los precedentes de un nuevo nivel de control en los procesos celulares. Se ha reportado que, en mamíferos, la gran mayoría de los transcritos corresponden a secuencias de ncRNAs, y únicamente el 2% del total del genoma codifica para proteínas (Hatje et al., 2019). Así, un gran número de evidencias han mostrado la existencia de ncRNAs cuya participación como reguladores esenciales del funcionamiento celular reside en su capacidad intrínseca como ligandos proteínicos, como componentes de complejos reguladores de RNAs de doble cadena, como andamios moleculares y como co-factores enzimáticos (Derrien et al., 2012; Franchini & Pollard, 2017).

Estos nuevos elementos de control originalmente se clasifican de acuerdo con su tamaño determinado por el número de nucleótidos, como cortos no codificantes y largos no codificantes, sin embargo, se definen más clases principalmente por su origen y características dentro de los cuales se incluyen los microRNAs (miRNAs), *piwi-interacting RNAs*, *transcription initiation RNAs*, *small nucleolar RNAs*, *long non-coding RNAs* and *circular RNAs* (Quinn & Chang, 2016).

En particular, dos clases de ncRNAs han recibido particular atención en los últimos años; los miRNAs y los lncRNAs. Su versatilidad funcional les ha conferido propiedades que les permiten controlar diversos aspectos de la función celular; desde la regulación de la homeostasis de células pluripotenciales hasta el establecimiento de la identidad celular y el proceso de diferenciación hacia los diversos tipos celulares del organismo. Con base en este conocimiento, se han identificado las redes de regulación mediadas por ncRNAs en diferentes patologías y su relevancia como posibles blancos terapéuticos.

miRNAs

Los miRNAs son una familia de RNAs pequeños no codificantes que son transcritos por la RNA polimerasa II, los cuales requieren un procesamiento para alcanzar su longitud característica de 21 a 22 nucleótidos. Se ha propuesto que los miRNAs regulan la expresión de aproximadamente el 60% de los genes en mamíferos (Ha & Kim, 2014) a través de su asociación con el complejo multiproteico de silenciamiento inducido por RNA (RISC), el miRNA es dirigido específicamente a las secuencias 3'-UTR de sus mRNAs blanco para ser degradados e inhibir la síntesis de proteínas. Además de tener complementariedad con RNAs mensajeros (mRNAs)

blanco, algunos miRNAs tienen la capacidad de reconocer secuencias reguladoras como promotores o “enhancers”, propiedad que los sitúa también como mediadores de la actividad transcripcional y no únicamente como moduladores post-transcripcionales (Ha & Kim, 2014).

Reportes dentro de la literatura han establecido un papel funcional de los miRNA dentro del proceso de diferenciación muscular, miR-31 ha sido relacionado con la inhibición de Myf5, mientras que la Myf5 y MyoD inducen la activación del locus miR-133, el cual previene la diferenciación a adipocitos de las CS. Por otra parte, se ha demostrado la participación del miRNA 1 en el proceso de diferenciación muscular, manteniendo un control sobre la temporalidad de esta al inhibir el factor transcripcional YY1, un represor de la miogénesis (S. E. Chen et al., 2007; Crist et al., 2012; Huang et al., 2011; Yin et al., 2013; Zhou et al., 2012).

Asimismo, la culminación del programa de diferenciación muscular está acompañada por la formación de fibras musculares con capacidad de contracción (Canepari et al., 2010). La identidad de las fibras musculares maduras está definida en gran medida por la composición de proteínas tipo miosinas (Myhs). Las Myhs son proteínas motoras que convierten la energía química derivada de la hidrólisis de ATP en la fuerza mecánica necesaria para los procesos celulares de locomoción, citocinesis y transporte celular y cuya capacidad de contracción determina el tipo de metabolismo celular; oxidativo para el caso de las fibras musculares ricas en Miosinas tipo I y glicolítico en el caso de las Miosinas tipo II (Dyck et al., 2017; Schiaffino & Reggiani, 2011). Trabajos recientes han mostrado que la expresión de miRNAs contenidos en intrones de los diferentes genes de Myhs permiten la regulación de genes que inciden en la función muscular. Así, los miRNA-208a y 208b son procesados desde un RNA intrónico contenido en los genes Myh6 y Myh7, respectivamente; mientras que un tercer miRNA, el 499 es procesado desde un RNA intrónico del gen Myh7b. En este contexto, la expresión de Myh-7 y Myh-7b correlaciona con la síntesis de los miRNAs 208b y 499, los cuales inhiben la expresión de los factores transcripcionales Sox6, Purb, Sp3 y HP1b, encargados de reprimir la transcripción de Myh-7 y Myh-7b. Lo anterior representa un sistema de autorregulación transcripcional que asegura la funcionalidad de las fibras musculares en la etapa final de la diferenciación (van Rooij et al., 2009). Estos son algunos ejemplos del papel funcional de los miRNA en el proceso de diferenciación muscular.

Por otra parte, se ha encontrado la presencia de miRNA dentro de las mitocondrias, la cual inicialmente se propuso como un reservorio de miRNAs (Kren et al., 2009), posteriores estudios demostraron la presencia de diversos MyomiRs dentro de las mitocondrias, inclusive en tejido muscular, dentro de los que se encuentran miRNA-133a, miRNA 133b, miRNA-23a, miRNA-206 y miRNA-1, sin embargo, solo se especuló sobre la función regulatoria de estos en el genoma mitocondrial (Bandiera et al., 2011; Barrey et al., 2011). No obstante, ha sido confirmada la participación de miRNA-1 con el metabolismo y la diferenciación muscular, incrementando su presencia en la mitocondria con la diferenciación de las fibras, inclusive promoviendo la transcripción de los genes Cox-1, Nd-1, Cytb, Cox-3 y Atp-8 en asociación con AGO-2 (Zhang et al., 2014)

LncRNAs

Los RNA largos no codificantes son la clase de transcritos más numerosos y funcionalmente distintivos, con la característica primordial de presentar una longitud mayor a 200 nucleótidos (Derrien et al., 2012), sin embargo comparten características con otros transcritos, como los mRNAs al ser transcritos por la RNA Polimerasa II de loci genómicos con características epigenéticas similares (H3K4me3, H3K9ac y H3K27ac) (Guttman et al., 2009). Además, los LncRNA también pueden presentar el capuchón en el extremo 5' (Fejes-Toth et al., 2009), una cola de poli-A en el extremo 3' (Derrien et al., 2012), o ser procesados por la maquinaria de Splicing (Chew et al., 2013). Sin embargo, también existen diferencias entre ellos, como la posibilidad de ser generados en dirección antisentido a partir de un mismo promotor, encontrarse codificados en regiones intrónicas de locus, presentar una longitud menor de los LncRNA comparados a los mRNAs, menor número de exones de mayor longitud en su loci, la expresión en menores niveles, la presencia de marcos de lectura abiertos crípticos para la traducción solo de péptidos pequeños secuencias poco conservadas entre especies, entre otros (Gascoigne et al., 2012; Sigova et al., 2013).

Es por ello por lo que debido a sus diferencias y la diversidad de funciones que presentan lo que ha fijado la atención sobre ellos para la investigación para describir su participación en los procesos biológicos. Por una parte, podemos encontrar estos LncRNA dentro del núcleo, donde pueden activar o reprimir la transcripción a través del reclutamiento de factores remodeladores de la cromatina, modulando así la actividad de un loci o inclusive u cromosoma entero (Herzing et al., 1997), los cuales pueden ser subdivididos en *cis*, si actúan dentro de la proximidad de sitios de

donde se encuentran codificados, o en trans si estos actúan a distancia del sitio donde fueron transcritos (Rinn et al., 2007; Yap et al., 2010); También podemos encontrar los RNA potenciadores (eRNA), los cuales se encuentran codificados principalmente en regiones potenciadoras extragénicas los cuales al ser transcritos promueven también la transcripción de diversos genes (Ding et al., 2018; Yap et al., 2010), además, podemos encontrar estos LncRNA participando en eventos de splicing para guiar la aparición de isoformas específicas regulando así diversas etapas de la producción y procesamiento de los mRNA (Romero-Barrios et al., 2018) . Por otra parte, también podemos encontrar estos LncRNA regulando la estructura del núcleo modificando las interacciones cromosomales, o actuando como andamios para la formación y regulación de sub-organelos (Hacisuleyman et al., 2014; Naganuma et al., 2012). Asimismo, la participación en los procesos de regulación de mRNAs por parte de estos LncRNA es descrita principalmente mediante la regulación de su decaimiento competidores endógenos (ceRNA) los cuales regulan tanto la traducción como la degradación secuestrando miRNAs para modular su naturaleza represiva dirigida contra los mRNA o interactuando directamente con los transcritos, sin embargo estos pueden competir por blancos más diversos, además de encontrar otros competidores endógenos no pertenecientes a los LncRNA (Ala, 2020; Kumar et al., 2014; Tay et al., 2014; J. Yang et al., 2014).

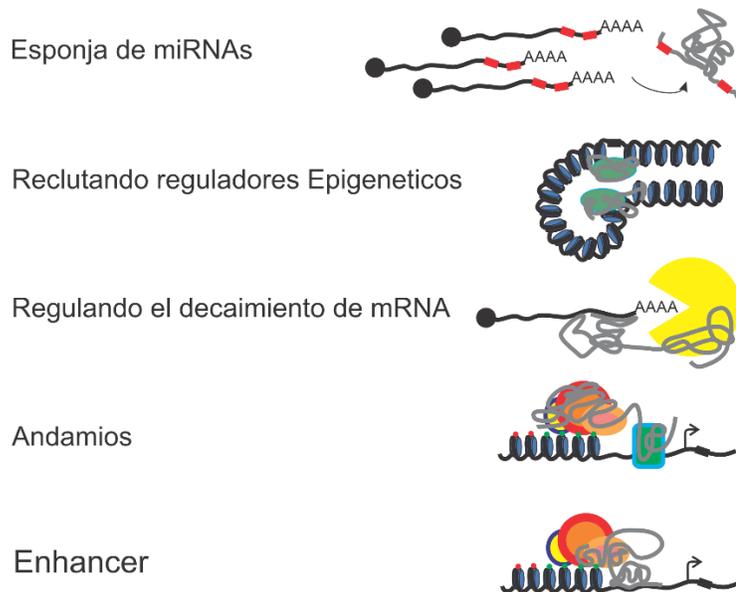


Figura 3 Representación esquemática de las principales funciones de LncRNA.

En años recientes estas funciones antes descritas han sido ampliamente estudiadas en los procesos de diferenciación celular, participando en músculos como reguladores de la proliferación, diferenciación y mantenimiento del tejido muscular; uno de los principales blancos a ser regulado en tiempo y espacio es miR-125, el cual participa en la regulación de los transcritos de otros factores claves en este proceso, siendo Lnc-231 el encargado de secuestrar a miR-125a en mioblastos para permitir su proliferación y fusión mediante la sobre expresión del factor E2F3, sin embargo, su sobre expresión inhibe la diferenciación a miotubos por mecanismos aun no determinados (R. Li et al., 2020); Por otra parte, la variante miR-125b es secuestrada para evitar su actividad represora sobre los mRNA mensajeros de los factores de transcripción IGF2 y Smad7 por los transcritos Linc-smad7 y Lnc-mg para promover la diferenciación a miotubos (Song et al., 2018); Bajo el mismo mecanismo, linc-MD1, el cual a pesar de estar codificado en el mismo loci genómico que contiene también a los miR-206 y miR-133b se transcribe de forma independiente en la etapa de diferenciación, secuestrando a miR-135 y 133b para evitar que repriman a sus blancos, MEF2C y MAML1, respectivamente, para de esta forma promover la transición de las células musculares (Cesana et al., 2011); finalmente, LncRNA AK017368 ha demostrado regular la proliferación y suprimir la diferenciación al secuestrar a miR-30, promoviendo la expresión de Tnrc6a, proteína relacionada con el splicing alternativo (Liang et al., 2018).

De igual manera, se han clasificado más LncRNA con participación en los procesos de diferenciación muscular que regulan este fenómeno de forma distinta, Linc-RAM actúa como andamio molecular asociándose directamente con MyoD, interacción requerida para la formación del complejo MyoD-Baf60c-Brg1 el cual promueve la transcripción de genes miogénicos mediante la interacción con remodeladores de la cromatina como SWI/SNF (Yu et al., 2017); Asimismo, Neat1 recluta a Ezh2 para remodelar la cromatina incrementando los niveles de H3k27me3 en promotores génicos por medios aun desconocidos, teniendo como blanco a P21 lo cual lleva a una represión de su expresión y promueve la diferenciación de mioblastos, sin embargo Neat1 también inhibe genes musculo específicos como Myog, Myh4, and Tnni2 reprimiendo su expresión génica y con ello suprimiendo la diferenciación miogénica (Wang et al., 2019); También, Myolinc es un transcrito generado en las cercanías del gen Filip1, el cual se ha demostrado interactúa con la proteína TDP-43 para modular la actividad de diversos genes participantes en la diferenciación muscular, por una parte, reprime a Myf5, factor clave durante la proliferación de los mioblastos a la vez que activa la transcripción de los genes MyoD y Acta1 los cuales participan en el proceso

de diferenciación y mantenimiento de miotubos musculares además de regular positivamente otros genes cercanos como Filip1 mediante la unión con su promotor (Militello et al., 2018). Finalmente, se ha observado que las regiones *core enhancer* (CE) y *Región de Regulación Distal* (DRR) localizados a -25kb y 5kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de MyoD, son activamente transcritas por la RNA polimerasa II, generando los lncRNAs CE-eRNA y DRR-eRNA, las cuales inducen la expresión de su blanco, CE-eRNA actúa *en cis* para inducir la expresión de MyoD, mientras que DRR-eRNA funciona *en trans* para activar la expresión de Miogenina lo cual asegura la culminación del programa de diferenciación (Mousavi et al., 2013; Mueller et al., 2015).

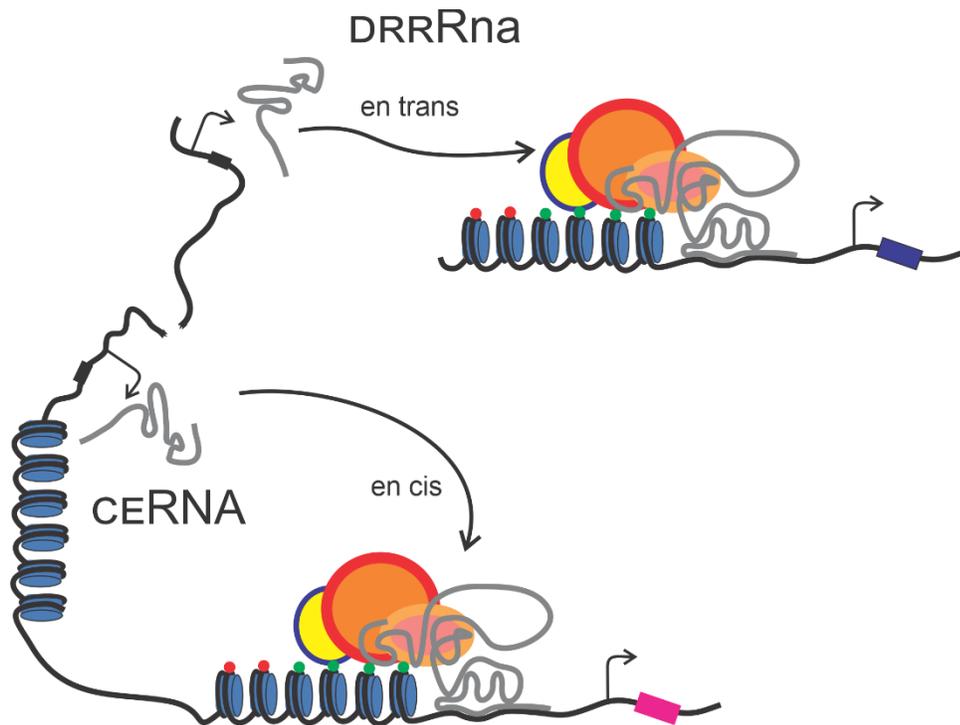


Figura 4 Representación esquemática de la regulación por parte de los eRNA cercanos a MyoD.

Por otra parte, hemos hablado también de la importancia de las mitocondrias en el mantenimiento de la homeostasis del musculo esquelético y el estado metabólico de los individuos procesos donde también se ven involucrados los lncRNA. SRA es un lncRNA cuya presencia ha sido demostrada en musculo esquelético y cuya función ha sido relacionada con los procesos de diferenciación muscular mediante su interacción con MyoD regulando la expresión de otros genes (Caretti et al., 2006; Lanz et al., 1999), asimismo se ha demostrado su participación en la actividad metabólica modulando entre otros elementos la actividad del factor transcripcional PPAR γ (Xu et al., 2010). De igual manera, el lncRNA Tug1 incrementa la expresión de PGC1 α actuando como ceRNA de miR-377 además de interactuar con PGC1 α para potenciar su propia transcripción interactuando con su promotor, mecanismo que podría también regular la expresión de Miosinas (Duan et al., 2017; Jianyin et al., 2016). Finalmente, es conocida la presencia de un genoma mitocondrial circular de doble cadena el cual apenas codifica para 13 proteínas, 2 rRNAs y 22 tRNAs, sin embargo, se ha demostrado la presencia de al menos 3 lncRNAs, ncND5, lncND6, and lncCyt b, los cuales demostraron una expresión diferencial tejido específica, especulando con una funcionalidad en la regulación de la expresión génica mitocondrial dependiente de los requerimientos energéticos de cada tejido (Rackham et al., 2011).

Tras los antecedentes presentados aquí, los cuales presentan evidencias del importante papel que desempeñan los lncRNA en el papel de la diferenciación muscular es que proponemos la selección e identificación de candidatos para su posterior caracterización, en busca de nuevos actores dentro de este proceso y su impacto en la evolución de las CS hasta la conformación de nuevas fibras musculares.

Justificación.

Un creciente cuerpo de evidencias muestra el papel fundamental que los ncRNAs juegan durante el proceso de regeneración del músculo esquelético adulto, desde la regulación de la quiescencia de células satélite, su activación y proliferación hasta el control del compromiso celular a la diferenciación terminal y su maduración en fibras musculares funcionales. Con base en estos antecedentes y en nuestros datos genómicos preliminares, creemos de suma importancia caracterizar estructural y funcionalmente lncRNAs que participen dentro del proceso de diferenciación muscular

Objetivos

Objetivo general

Confirmar la expresión de lncRNA seleccionados asociados a los loci *Actc1* y *Pparg1b* en la línea celular C2C12

Objetivos Específicos

- Determinar por medio de PCR de punto final la presencia de los transcritos de los candidatos seleccionados en la línea celular C2C12.
- Determinar por medio de RACE las características del transcrito seleccionado en línea celular C2C12.

Hipótesis

Existe la presencia de lncRNA asociados a los loci *Actc1* y *Pparg1b*.

Metodología

Análisis in silico

En base a resultados previos del laboratorio de Secuenciación del transcriptoma (RNA-Seq) en células musculares (Satélites, mioblastos y miotubos primarios de ratón) e Inmunoprecipitación de cromatina acoplada a secuenciación (ChiP-Seq) de los factores de transcripción Pax7, MyoD y Marcas de histonas (H3K4me1 y me3) en células musculares, fueron obtenidas diversas secuencias de candidatos para su valoración, tras una evaluación basada en características previamente reportadas de otros LncRNA (Mousavi et al., 2013; Quinn & Chang, 2016). Las secuencias seleccionadas fueron obtenidas a través del UCSC Genome Browser (Haeussler et al., 2019; Kent et al., 2002), tomando 100 nucleótidos extra a cada extremo de la señal del transcrito. Posterior a esto cada secuencia obtenida fue evaluada con diversas herramientas bioinformáticas para determinar propiedades características de LncRNA, como su potencial codificante (CPC2) (Kang et al., 2017), la unión con factores de transcripción (PROMO) (Farré et al., 2003; Messeguer et al., 2002) o sitios de unión a miRNAs (miRDB) (Farré et al., 2003; Messeguer et al., 2002).

Cultivos celulares

Para los experimentos funcionales, se utilizó la línea celular comercial derivada de músculo esquelético de ratón C2C12, la cual es ampliamente empleada en estudios de regulación transcripcional y epigenética debido entre otras ventajas, a que es posible inducir la diferenciación celular y analizar la dinámica de activación de genes de interés a determinados tiempos de la diferenciación celular. La línea celular C2C12 (ATCC CRL-1772) y los mioblastos se mantuvieron en condiciones de proliferación en medio DMEM (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 15% y antibióticos. Para inducir su diferenciación a miotubos, se reemplazó el medio con DMEM suplementado con suero de caballo al 1% y antibióticos. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37C en una atmósfera de CO₂ al 5.0%.

Extracción de RNA

Se obtuvo las células de cultivo celular, retirando el medio de cultivo, para luego añadir 1ml de trizol a una caja Petri de 10cm e incubar por 5 min, posteriormente con ayuda de la pipeta se recuperaron las células y se colocaron en una jeringa de insulina para asegurar la lisis celular. Se centrifugo el lisado celular por 10 min a 15000 rpm a 4°C recuperando la fase acuosa. Se añadió a la fase acuosa 200µl de cloroformo, se mezcló e incubo por 3 min para posteriormente centrifugar

por 15 min a 15000 rpm a 4°C, se recuperó nuevamente la fase acuosa. Se añadió a la nueva fase acuosa 500µl de isopropanol, incubando en el congelador a -20°C por 15 min y posteriormente se centrifugó por 20 min a 15000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue removido y se lavó la pastilla con un mililitro de Etanol frío al 75% centrifugando por 10 min a 15000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue descartado y se dejó secar la pastilla para finalmente re-suspenderla en 50µl de agua libre de RNAsas y DNAsas (agua free). La integridad y pureza del RNA fue verificada mediante un gel de agarosa 1.5%

RT-PCR

La retrotranscripción fue llevada a cabo a partir del RNA extraído previamente. Para la amplificación de fragmentos mediante PCR dos juegos de primers fueron diseñados por medio de herramientas bioinformáticas (Primer-BLAST) (Ye et al., 2012) dirigidos para cada transcrito, cada uno dirigido contra diferentes regiones. Como control interno se diseñaron primers dirigidos contra el RNA ribosomal S18, además de primers adicionales contra los mRNA de MyoG y Myh4 como control de diferenciación pues estos ven favorecida su expresión en relación con la diferenciación de las células musculares.

Se prepararon las siguientes Mezclas:

Tabla 1 Mezcla A

Componente	Cantidad
Oligo dT (500 µg/mL)	1 µL
RNA Total	1 µg
Mezcla de dNTP (2.5 mM de cada dNTP)	1 µL
Agua libre de nucleasas	Aforado a 12 µL

Tabla 2 Mezcla B

Componente	Cantidad
Buffer First-Strand 5X	4 µL
DTT 0.1 M	2 µL
Agua libre de nucleasas	1 µL

Posteriormente se calentó la mezcla A a 65°C por 5 min y luego de ello se colocó en hielo, seguido a esto fue añadida la mezcla B, se mezcló y se incubó por 2 min. Se añadió 1µM-MLV RT, incubando por 50 min a 37°C. Finalmente se inactivó la reacción elevando la temperatura a 70°C por 15 min.

Seguido a esto, se llevó a cabo la amplificación de fragmentos por medio de PCR, utilizando la siguiente mezcla:

Tabla 3 Mezcla PCR

Componente	Cantidad
Buffer PCR 10X, -Mg	2.5 µL
Mezcla de dNTP (2.5 mM de cada dNTP)	0.5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	0.75 µL
Polimerasa <i>Taq</i> (5 U/µL)	0.1 µL
<i>Primer Forward</i> (10 µM)	0.75 µL
<i>Primer Reverse</i> (10 µM)	0.75 µL
cDNA	1 µL
Agua libre de nucleasas	Aforado a 25 µL

Esta fue sometida al siguiente ciclo de amplificación:

Tabla 4 Ciclo de Amplificación para PCR

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización Inicial	94	3 min
Ciclos de PCR 35	Desnaturalización	45 seg
	Alineamiento	30 Seg
	Extensión	90 seg
Extensión Final	72	7 min
Enfriamiento	4	Indefinidamente

Finalmente, los productos fueron analizados mediante un gel de agarosa 1.5% sembrando 5µl de producto de PCR por carril.

Amplificación rápida de extremos de cDNA (RACE)

RACE es una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa que nos permite obtener la secuencia completa de un transcrito, sin embargo, por las características de la técnica también nos provee información acerca de las características de un transcrito como la presencia de un Capuchon en el extremo 5', y de la poliadenilación en el extremo 3', por lo cual se llevan a cabo dos metodologías dependiendo del extremo de interés a evaluar. Ambos experimentos fueron realizados con el Kit FirstChoice™ RLM-RACE (InvitroGen) a partir del RNA extraído anteriormente de mioblastos y miotubos del cultivo celular.

RACE 5'

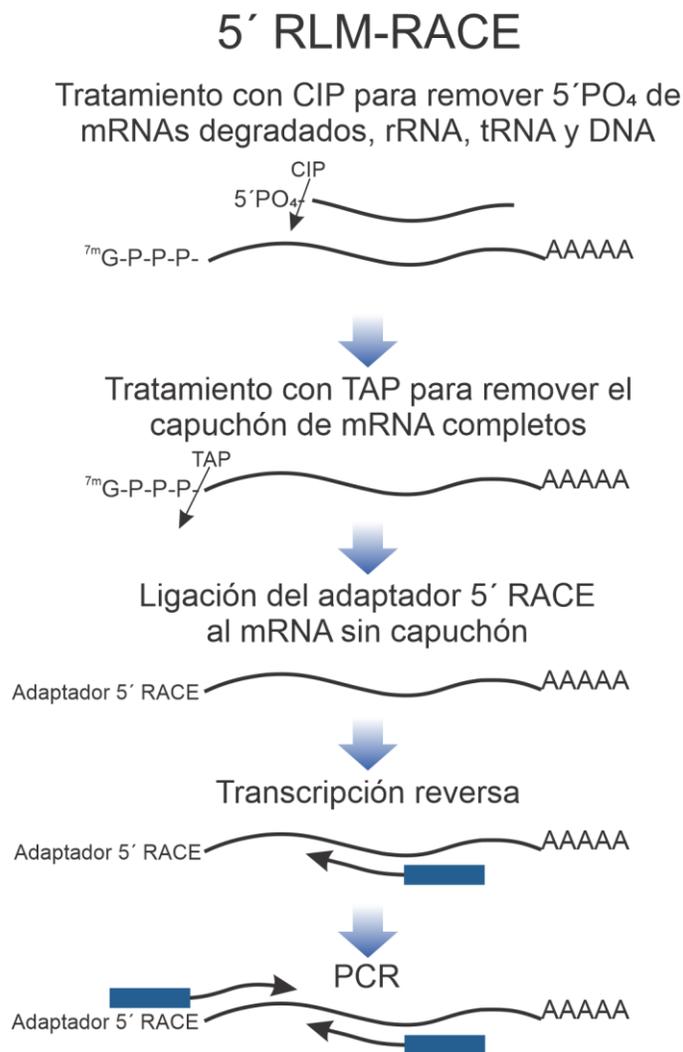


Figura 5 Representación esquemática del proceso de RACE para la obtención del extremo 5'

Para comprobar la presencia del capuchón en el extremo 5' se trató 10µg de RNA total con Fosfatasa alcalina de intestino de becerro, mezclando el RNA total con 2µl de la enzima más 2µl de su buffer 10x, aforando la reacción a 20µl con agua libre de DNAsas y RNAsas, para posteriormente incubarla por una hora a 37°C. Una vez terminado el tiempo de incubación se procedió a detener la reacción añadiendo 15 µl de Acetato de amonio e inmediatamente agregando 115µl de Agua free, finalmente se mezcló con 150 µl con fenol-cloroformo. Fue centrifugada la mezcla por 5 min a 15000 rpm a 4°C. Finalizada la centrifugación se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo. Fue añadido 150 µl de isopropanol a la fase acuosa y se dejó reposar por 20 min a -20°C, posteriormente se centrifugo a 15000 rpm por 20 min a 4°C, descartando el sobrenadante y lavando la pastilla con etanol 75%. El pellet fue resuspendido en 11 µl de Agua Free. Se trataron 5 µl de CIP'dRNA(Obtenido en el paso anterior) con 2 µl de Pirofosfatasa acida de tabaco más 1 µl de 10xTAP buffer y 2 µl de Agua free, incubado a 37°C por una hora. El CIP/TAP RNA (Obtenido de el paso anterior) fue tratado para ligar un adaptador al extremo 5', utilizando 2 µl del CIP/TAP RNA, 1 µl del Adaptador 5'RACE, 1 µl 10 RNA ligase buffer, 2 µl T4 RNA ligasa y 4 µl de Agua free, la reacción fue mezclada con ayuda de la pipeta e incubada a 37°C por una hora.

Una vez obtenido el RNA ligado con el adaptador la retro-transcripción fue realizada con la siguiente mezcla, incubando 42°C por una hora:

Tabla 5 Mezcla Retro-Transcripción -RACE 5'

Componente	Cantidad
RNA Ligado	2 µL
Mezcla de dNTP (2.5 mM de cada dNTP)	4 µL
Decameros aleatorios (50 µM)	2 µL
Buffer RT 10X	2 µL
Inhibidor de RNAsas (10 U/µL)	1 µL
Reversa transcriptasa M-MLV (200 U/µL)	1 µL
Agua libre de nucleasas	Aforado a 20 µL

Seguido a esto, fue llevado a cabo la amplificación de fragmentos por medio de PCR, utilizando la siguiente mezcla:

Tabla 6 Mezcla PCR-RACE 5'

Componente	Cantidad
Buffer PCR 10X, -Mg	2.5 μ L
Mezcla de dNTP (2.5 mM de cada dNTP)	0.5 μ L
MgCl ₂ (50 mM)	0.75 μ L
Polimerasa <i>Taq</i> (5 U/ μ L)	0.1 μ L
<i>Primer</i> RACE 5' Externo (10 μ M)	0.75 μ L
<i>Primer</i> diseño propio (10 μ M)	0.75 μ L
cDNA	1 μ L
Agua libre de nucleasas	Aforado a 25 μ L

Esta fue sometida al siguiente ciclo de amplificación:

Tabla 7 Ciclo de Amplificación para PCR-RACE 5'

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización Inicial	94	3 min
Ciclos de PCR 35	Desnaturalización	45 seg
	Alineamiento	30 Seg
	Extensión	90 seg
Extensión Final	72	7 min
Enfriamiento	4	Indefinidamente

Posterior a esto, fue preparada una segunda PCR con las mismas condiciones, cambiando el primer 5' Externo RACE por el primer 5' Interno RACE y utilizando como templado 2 μ l del producto de PCR de la reacción anterior en lugar de cDNA de la retro-transcripción. Finalmente se verificaron los resultados por medio de un gel de agarosa 1.5% en voltaje constante por 50min.

RACE 3'

Para comprobar la presencia de la cola de poliadenilación en el extremo 3' se preparó una reacción de retro-transcripción utilizando un adaptador dirigido contra la cola de poli A utilizando la siguiente mezcla, incubando a 42°C por una hora:

Tabla 8 Mezcla Retro-Transcripción -RACE 3'

Componente	Cantidad
RNA Total (1 µg)	2 µL
Mezcla de dNTP (2.5 mM de cada dNTP)	4 µL
Adaptador 3'RACE	2 µL
Buffer RT 10X	2 µL
Inhibidor de RNasas (10 U/µL)	1 µL
Reversa transcriptasa M-MLV (200 U/µL)	1 µL
Agua libre de nucleasas	Aforado a 20 µL

Seguido a esto, fue llevado a cabo la amplificación de fragmentos por medio de PCR, utilizando la siguiente mezcla:

Tabla 9 Mezcla PCR-RACE 3'

Componente	Cantidad
Buffer PCR 10X, -Mg	2.5 µL
Mezcla de dNTP (2.5 mM de cada dNTP)	0.5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	0.75 µL
Polimerasa <i>Taq</i> (5 U/µL)	0.1 µL
<i>Primer</i> RACE 3' Externo (10 µM)	0.75 µL
<i>Primer</i> diseño propio (10 µM)	0.75 µL
cDNA	1 µL
Agua libre de nucleasas	Aforado a 25 µL

Esta fue sometida al siguiente ciclo de amplificación:

Tabla 10 Ciclo de Amplificación para PCR-RACE 3'

Fase		Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización Inicial		94	3 min
Ciclos de PCR 35	Desnaturalización	94	45 seg
	Alineamiento	62	30 Seg
	Extensión	72	90 seg
Extensión Final		72	7 min
Enfriamiento		4	Indefinidamente

Posterior a esto, fue preparada una segunda PCR con las mismas condiciones, cambiando el primer 3' Externo RACE por el primer 3' Interno RACE y utilizando como templado 2 µl del producto de PCR de la reacción anterior en lugar de cDNA de la retrotranscripción. Finalmente se verificaron los resultados por medio de un gel de agarosa 1.5% en voltaje constante por 50min.

Resultados

Obtención de candidatos

Tras un análisis de datos obtenidos por experimentos previos de RNA-Seq y ChiP-Seq en células musculares de ratón realizados por el laboratorio, fueron seleccionados y evaluados una serie de candidatos con base en características previamente descritas en otros LncRNA (Mousavi et al., 2013; Quinn & Chang, 2016), como son su co-localización con factores de transcripción relacionados con la diferenciación muscular, además también de la co-localización de marcas epigenéticas H3K4me1, la cual se encuentra relacionada con las regiones enhancer y sitios transcripcionalmente activos y H3K4me3, presente en regiones promotoras de genes activos (Fig.6). Dos candidatos cumplieron con los criterios de selección, L-actc, un transcrito con una longitud aproximada de 4.2kb en las coordenadas chr2:113880330-113884577 en la cadena sentido, generado a 1.8kb rio arriba de su sitio de inicio de la transcripción del gen de Actc1; El segundo candidato, L-pparg es un transcrito localizado en las coordenadas chr18:61556330-61557579 con una longitud de 1.25kb codificado en el primer intrón del gen de Pparg1b (Fig. 8).

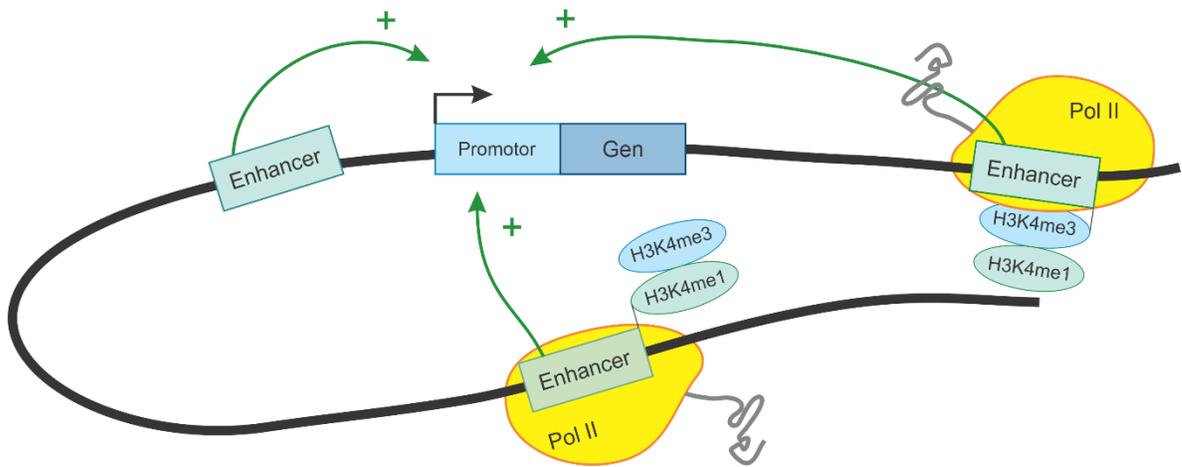


Figura 6 Representación esquemática de eRNAs y las marcas epigenéticas que los regulan.

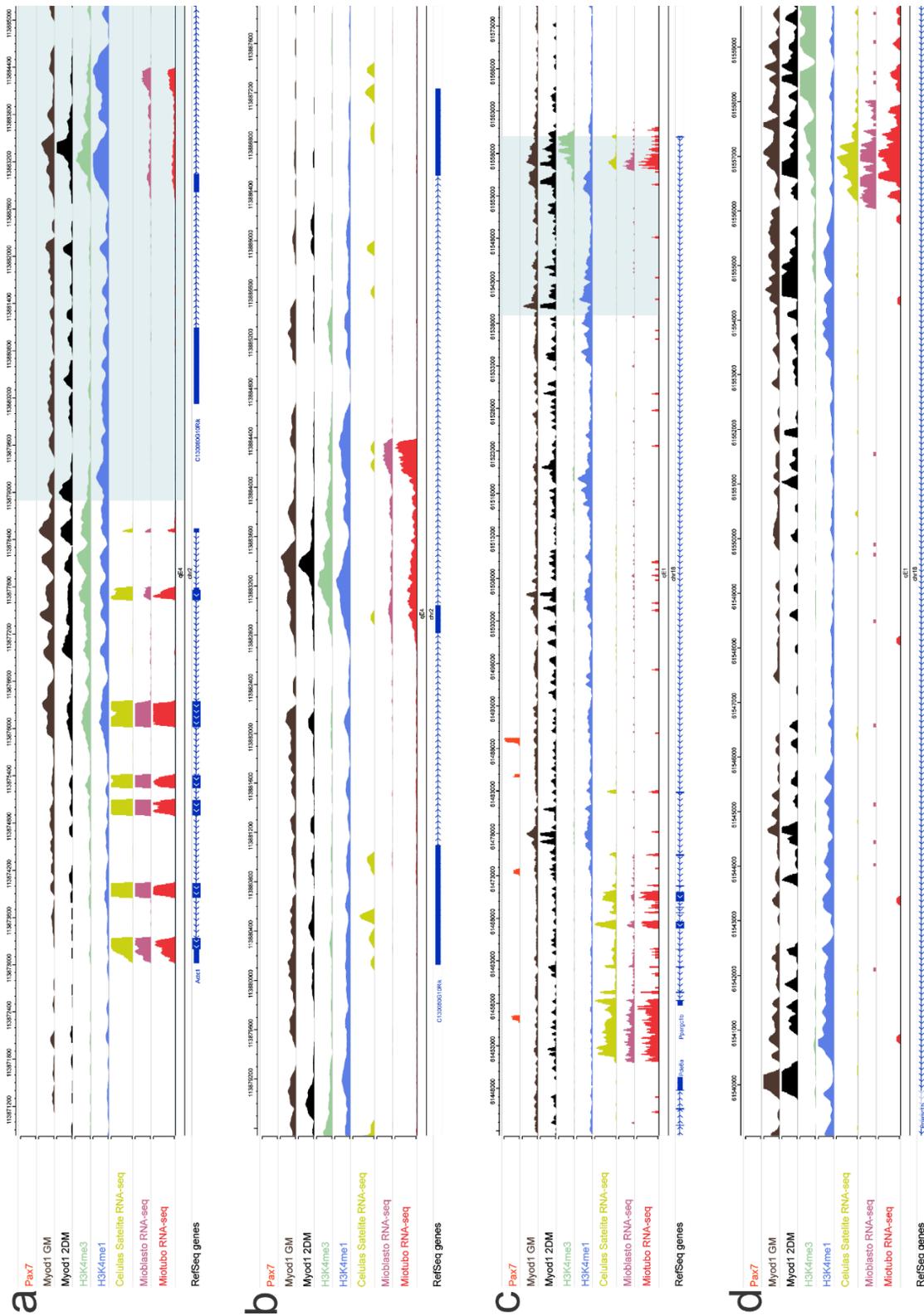


Figura 7 Presencia de los transcritos en el genoma de ratón.

Ocupancia de PAX7, MyoD, H3K4me1, H3K4me3 y presencia de RNA (a) Región cercana al Gen ACT1 (b) Acercamiento a transcrito L-actc en la región marcada en azul de las cercanías del Gen ACTC (c) Gen Pparg1b (d) Acercamiento a transcrito L-pparg en la región marcada en azul dentro de primer intrón del Gen Pparg1b

Análisis *in silico*

Determinación del potencial de codificación

Las secuencias de los candidatos seleccionados fueron obtenidas a través del UCSC Genome Browser (Haeussler et al., 2019; Kent et al., 2002) a partir de la alineación original con los datos previos, diversos análisis fueron realizados para intentar predecir su función dentro de la diferenciación muscular y de esta forma acotar los mecanismos por los cuales pueden participar dentro de este fenómeno. Como primer paso se evaluó el potencial de codificación de ambos transcritos por medio de la herramienta CPC2 (Kang et al., 2017) para determinar si estos podían dar lugar a la producción de proteínas lo cual en ambos casos fue negativo, como control fueron evaluados además un LncRNA perfectamente caracterizado, Hotair (NR_047528.1), así como de un transcrito con propiedades codificantes precursor de la proteína MyoD (NM_010866.2), ambos casos pertenecientes también a ratón (Tabla 11).

Tabla 11 Resultados Potencial de codificación.

ID	Probabilidad de Codificación	Resultado
Hotair	0.0825805	No codificante
Actc1_LncRNA	0.0271861	No codificante
Ppargc1b_Intron_1_LncRNA	0.0488999	No codificante
MyoD_Mouse_uc012fkv.1	0.999957	Codificante

Evaluación de interacción con factores de transcripción

El análisis de interacción de los transcritos con factores de transcripción fue realizado con la herramienta PROMO (Farré et al., 2003; Messeguer et al., 2002), la cual identifica dentro de la secuencia los sitios putativos de unión de los factores de transcripción. El análisis de L-actc arrojó 5469 sitios conservados para la posible unión de 600 factores de transcripción, mientras que para L-pparg fueron encontrados 3894 sitios conservados para la unión de 452 factores transcripcionales; sin embargo, debido a la diversidad de fenómenos dominados por la vastedad de estas proteínas se procedió a delimitar a grupos de factores relacionados con los fenómenos de diferenciación muscular y la regulación mitocondrial, evaluando finalmente la presencia de 12 sitios conservados. Los resultados se pueden observar en la tabla 12, donde podemos observar apenas diferencias con la presencia de los sitios MEF-2C/delta8 presentes solamente en L-actc.

Tabla 12 Resultados Evaluación de interacción con factores de transcripción.

Factor Transcripcional	L-actc	L-pparg
aMEF -2 [T01006]	13	13
FOXO3a [T02938]	8	8
MEF -2C/delta8 [T01769]	11	0
MEF -2DAB [T02505]	12	12
Myf -5 [T00521]	13	13
MyoD [T00525]	8	8
MyoD [T00526]	8	8
MyoD [T01128]	8	8
Myogenin [T00528]	7	7
PPAR -alpha [T00694]	7	7
PPAR -alpha:RXR -alpha [T05221]	11	11
PPAR -gamma:RXR -alpha [T05236]	12	12

Evaluación de interacción con factores de transcripción

El análisis de unión de miRNA con los transcritos fue llevado a cabo con la herramienta bioinformática miRDB (Y. Chen & Wang, 2020; Liu & Wang, 2019), esta realiza una búsqueda de secuencias dentro del transcrito con la capacidad para unirse con miRNAs. Fueron obtenidos 82 y 51 sitios blanco para miRNAs dentro de los transcritos previstos para L-actc y Lpparg. Consecuente con este análisis, se procedió a realizar la revisión de la literatura para determinar las funciones con las cuales se encuentran relacionados estos miRNAs, para ambos casos aproximadamente solo un tercio de los miRNAs que interaccionan teóricamente han sido caracterizados, encontrándose funciones como biogénesis, adipogénesis y osteogénesis entre los fenómenos relacionados con estos miRNAs (Fig.8).

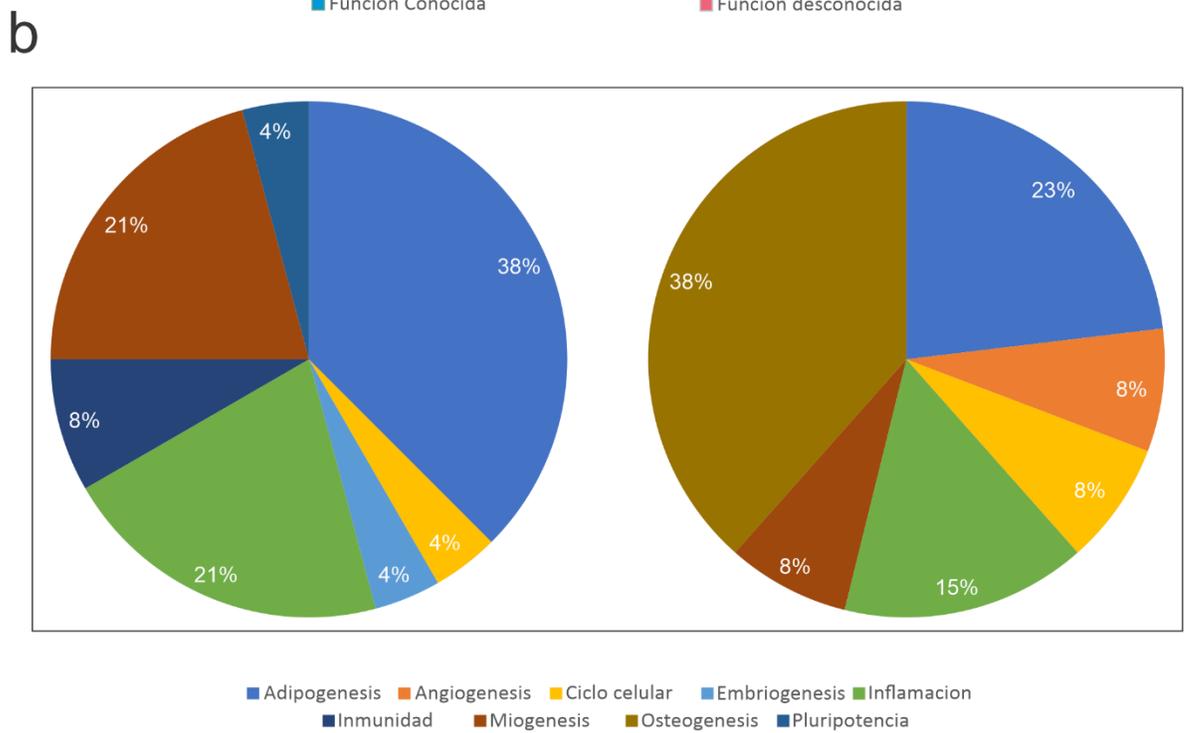
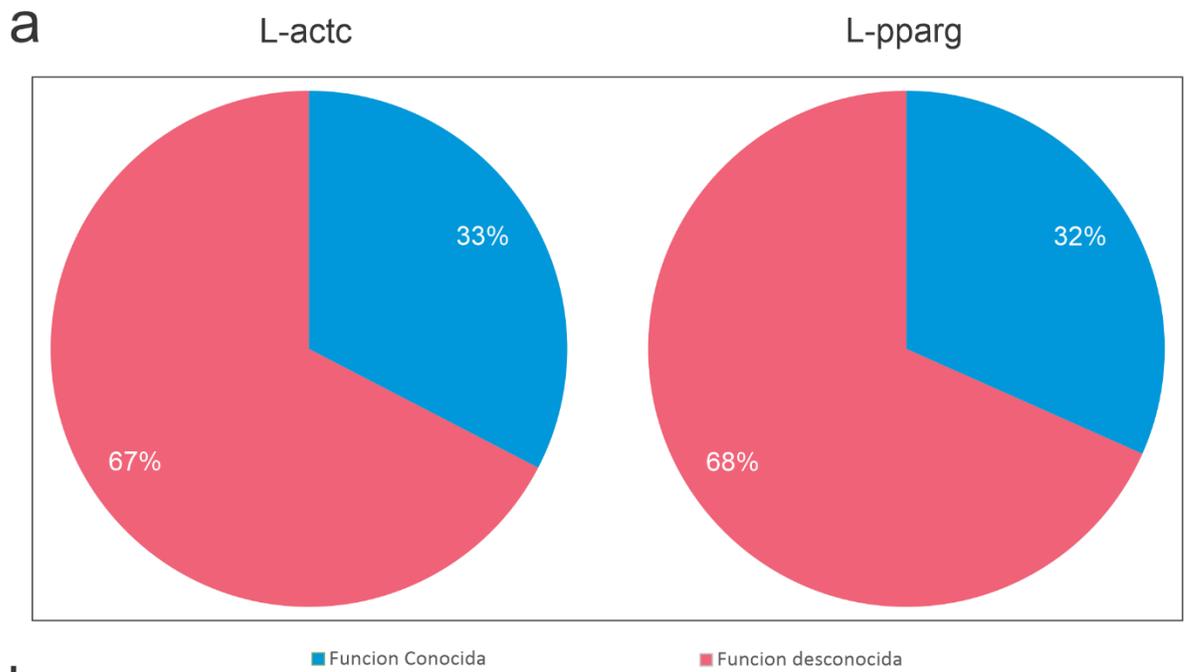


Figura 8 Resultados análisis de unión de miRNAs.

(a) Porcentaje de miRNAs caracterizados relacionados con los transcritos (b) Funciones representativas de los miRNAs relacionado con los transcritos.

Comprobación de la presencia de transcritos en cultivos celulares

Utilizando *primers* dirigidos contra las regiones determinadas por medio de RNA-Seq y Chip-Seq de ambos transcritos se procedió a verificar por medio de RT-PCR la presencia de ellos en cultivos de mioblastos y miotubos obtenidos a partir de la línea celular C2C12. Pudimos observar, además de la presencia de ambos transcritos en las dos condiciones experimentales, un patrón diferencial entre estas como se puede observar en la figura 6, con un aparente aumento en la expresión de los transcritos tras la diferenciación hacia miotubos más evidente en el transcrito L-ppar, lo cual sugiere una regulación por otros factores en este proceso.

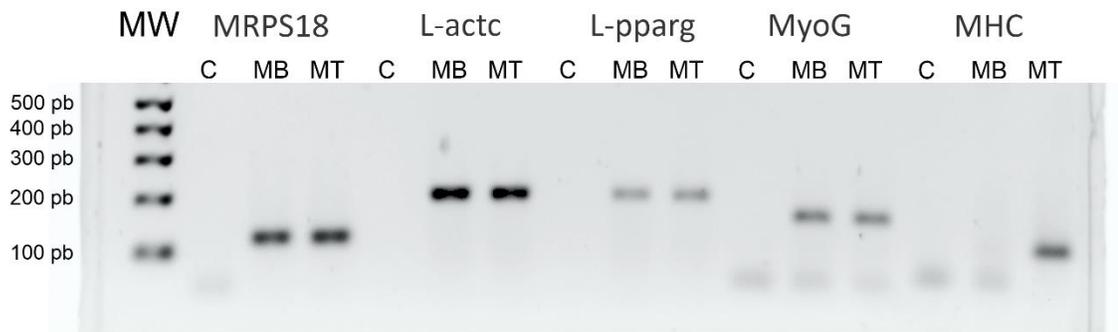


Figura 9 Presencia de los LncRNA en la línea celular C2C12.
(MW, marcador de peso moléculas, siglas en inglés, C, control, MB, Mioblastos, MT, Miotubos)

Caracterización de los LncRNA

Una vez comprobada la presencia de ambos transcritos en mioblastos y miotubos se procedió a determinar las características de estos por medio de la amplificación rápida de extremos de cDNA (RACE), utilizando los *primers* diseñados anteriormente además de dos *primers* dirigidos contra los adaptadores utilizados en ambas variantes de esta técnica. Los resultados mostraron la presencia de dos bandas para L-actc y tres bandas para L-pparg en la variante RACE del extremo 3' sin diferencias entre las diferentes condiciones, demostrando la presencia de la cola de poli A como era esperado. Para la variante RACE del extremo 5' mientras que el L-pparg presento una sola banda en la misma localización para ambas condiciones, se encontraron diferencias entre las bandas obtenidas para L-actc de las dos condiciones evaluadas siendo ligeramente más grande aquella que se encuentra en los miotubos, lo cual podría tratarse de variantes del transcrito. Con esto queda demostrado la presencia del capuchón en los extremos 5' de los transcritos, coincidiendo ambas modificaciones, la polidenilacion y el capuchón con los reportados en la literatura para LncRNAs (Fig.10).

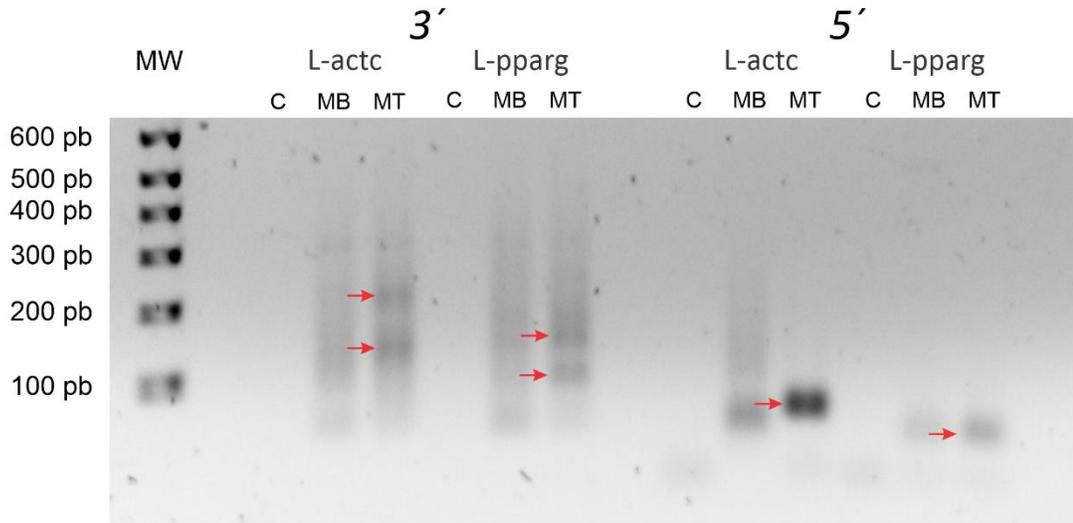


Figura 10 Resultados RACE
(MW, marcador de peso moléculas, siglas en inglés, C, control, MB, Mioblastos, MT, Miotubos)

Discusión

Los LncRNAs han emergido como nuevos elementos de control en las funciones biológicas, caracterizados principalmente por su tamaño mayor a 200 nucleótidos y su expresión de manera tejido específico, además de presentar pequeños marcos abiertos de lectura con la capacidad de codificar péptidos pequeños (Quinn & Chang, 2016)s. En este trabajo, confirmamos la presencia de dos transcritos que comparten las características descritas anteriormente con otros LncRNAs caracterizados, como son la presencia co-localización de marcas epigenéticas de sitios transcripcionalmente activos, así como la presencia del capuchón en el extremo 5' y la cola poli A en el extremo 3'. Como se discutió anteriormente, los LncRNA pueden llevar a cabo diferentes funciones dentro de las células regulando funciones en sus cercanías e inclusive a largas distancias (Quinn & Chang, 2016), algunas de las cuales podemos intentar predecir por elementos presentes dentro de los transcritos, por lo cual se procedió a realizar más análisis por medio de herramientas bioinformáticas.

L-actc es un transcrito generado río arriba del gen de ACTC1; este cercano gen codifica para la proteína Actina alfa del músculo cardíaco, proteína mayoritaria de los filamentos delgados durante el desarrollo y en las sarcómeros cardíacas, además ha sido reportada en músculo esquelético de pacientes con distrofia muscular, sugiriendo su rol en mecanismos compensatorios (Nowak et al., 2007). En nuestros datos podemos observar la presencia continua de transcrito de este gen en las diversas etapas de diferenciación muscular esquelética, sin embargo su presencia como proteína solo es detectable durante etapas tempranas de la vida, lo cual sugiere una regulación post-transcripcional sobre el mensajero de actc1, aunado a ello se ha demostrado una correlación entre la metilación de este gen en músculo esquelético y la disminución de la presencia de la actina cardíaca (Boutilier et al., 2017), lo cual nos sugiere que su regulación es mediada de forma tejido específica por factores transcripcionales a nivel de secuencia, sin embargo los mecanismos subyacentes detrás de ello permanecen sin dilucidar. Por su parte, L-actc no muestra presencia significativa hasta el inicio de la diferenciación, además de la presencia de los sitios MEF-2C/delta8, interacción ya demostrada anteriormente en su rol como región potenciadora (Lemonnier & Buckingham, 2004), sugiere su participación en el proceso de hipertrofia muscular, mientras que por otra parte la presencia de sitios para los factores de transcripción NKX podría tener tras de sí un mecanismo regulatorio diferente de este LncRNA en tejido cardíaco posiblemente afectando también al gen Actc1 en sus cercanías (Targoff et al., 2013). Igualmente,

la presencia de sitios de unión para el miRNA 133 en L-actc abre la posibilidad de su participación en el mantenimiento del fenotipo muscular secuestrando a miR-133 para permitir la función de SRF (Han et al., 2015). Finalmente, es necesario evaluar la regulación por parte de los factores transcripcionales del transcrito L-actc, pues en nuestros resultados es evidente la presencia de diversas isoformas obtenidas a partir del extremo 5', las cuales aparentemente cambian a través del proceso de diferenciación muscular posiblemente por la regulación temporal de este (Braun & Gautel, 2011; Morgan & Partridge, 2020).

Por otra parte, L-pparg es un transcrito localizado en el primer intrón del gen Pparg1b, el cual genera como producto al Coactivador gamma 1- β del receptor de peroxisoma activado por proliferación (PGC1 β), la cual es una proteína principal en la regulación del proceso de la biogénesis mitocondrial, además de regular positivamente la respiración mitocondrial (Scarpulla, 2011), sin embargo, la sobre-expresión de este gen puede ser perjudicial, pues regula la autofagia y apoptosis llevando a la pérdida de fibras (Sopariwala et al., 2017). Al analizar su patrón de expresión por medio de RT-PCR y RACE podemos observar que no existe un patrón diferencial entre las diversas condiciones evaluadas, además de no tener más isoformas, lo cual sugiere actuar como auto-regulador del mismo gen en el que se encuentra codificado. Por otra parte, la presencia del miR-378 abre la posibilidad de actuar como esponja de este mismo, mecanismo que ya ha sido reportado en otros LncRNA, a pesar de que este no haya aparecido en los resultados arrojados por miRDB. miR—378 no solo participa en la regulación del estado metabólico, sino también en la angiogénesis, por lo cual su regulación es necesaria a la terminación del proceso de diferenciación muscular (Krist et al., 2015).

En conclusión, la presencia de estos transcritos presenta nuevos actores en el proceso de diferenciación muscular, por una parte, L-actc parece un candidato viable para futuras aplicaciones terapéuticas regulando la presencia de Actc1 en etapas adultas en pacientes con distrofia muscular, mientras que L-pparg puede ser utilizado para modular el restablecimiento del estado metabólico sin comprometer a largo plazo las fibras musculares, y finalmente, ambos transcritos presentan la posibilidad de poder alterar el tipo de fibras musculares, sin embargo, mayor investigación es requerida para poder confirmar estas funciones y dilucidar los mecanismo subyacentes tras de estos.

Perspectivas

Para el seguimiento de este trabajo, es requerida la caracterización completa de estos transcritos mediante la secuenciación de las bandas obtenidas mediante RACE, para así poder determinar sus sitios de inicio y terminación, lo cual abre la posibilidad de clonar los candidatos en vectores de transición para posteriormente llevarlos hacia otros vectores, como por ejemplo vectores de sobre-expresión para poder analizar por medio de transfección su participación en los fenómenos de diferenciación muscular; de la misma manera, inhibir la presencia de estos transcritos en los cultivos celulares utilizando por ejemplo RNAs de interferencia también permitirá la obtención de información acerca de su participación en la diferencia celular. Finalmente, es preciso corroborar la participación de los transcritos en modelos animales, analizando el fenotipo obtenido tras la eliminación de la presencia del transcrito candidato, e inclusive su participación en etapas embrionarias y su importancia para la vida.

Referencias

- Ala, U. (2020). Competing Endogenous RNAs, Non-Coding RNAs and Diseases: An Intertwined Story. *Cells*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/cells9071574>
- Bandiera, S., Rüberg, S., Girard, M., Cagnard, N., Hanein, S., Chrétien, D., Munnich, A., Lyonnet, S., & Henrion-Caude, A. (2011). Nuclear outsourcing of RNA interference components to human mitochondria. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020746>
- Barrey, E., Saint-Auret, G., Bonnamy, B., Damas, D., Boyer, O., & Gidrol, X. (2011). Pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria. *PLoS ONE*, 6(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020220>
- Berkes, C. A., & Tapscott, S. J. (2005). MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 16(4–5), 585–595. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2005.07.006>
- Bjornson, C. R. R., Cheung, T. H., Liu, L., Tripathi, P. V., Steeper, K. M., & Rando, T. A. (2012). Notch Signaling Is Necessary to Maintain Quiescence in Adult Muscle Stem Cells. *STEM CELLS*, 30(2), 232–242. <https://doi.org/10.1002/stem.773>
- Black, B. L., Molkenin, J. D., & Olson, E. N. (1998). Multiple Roles for the MyoD Basic Region in Transmission of Transcriptional Activation Signals and Interaction with MEF2. *Molecular and Cellular Biology*, 18(1), 69–77. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.1.69>
- Boutillier, J. K., Taylor, R. L., Ram, R., McNamara, E., Nguyen, Q., Goullée, H., Chandler, D., Mehta, M., Balmer, L., Laing, N. G., Morahan, G., & Nowak, K. J. (2017). Variable cardiac α -actin (Actc1) expression in early adult skeletal muscle correlates with promoter methylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(10), 1025–1036. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.08.004>
- Braun, T., & Gautel, M. (2011). Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(6), 349–361. <https://doi.org/10.1038/nrm3118>
- Brooks, S. V. (2003). Current topics for teaching skeletal muscle physiology. *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*, 27(1–4), 171–182. <https://doi.org/10.1152/advan.00025.2003>
- Canepari, M., Pellegrino, M. A., D'Antona, G., & Bottinelli, R. (2010). Skeletal muscle fibre diversity and the underlying mechanisms. *Acta Physiologica*, 199(4), 465–476. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02118.x>
- Caretti, G., Schiltz, R. L., Dilworth, F. J., Di Padova, M., Zhao, P., Ogryzko, V., Fuller-Pace, F. V., Hoffman, E. P., Tapscott, S. J., & Sartorelli, V. (2006). The RNA Helicases p68/p72 and the Noncoding RNA SRA Are Coregulators of MyoD and Skeletal Muscle Differentiation. *Developmental Cell*, 11(4), 547–560. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.08.003>

- 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*(2), 358–369. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.028>
- Chen, S. E., Jin, B., & Li, Y. P. (2007). TNF- α regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *292*(5), 1660–1671. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00486.2006>
- Chen, Y., & Wang, X. (2020). MiRDB: An online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D127–D131. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz757>
- Chew, G. L., Pauli, A., Rinn, J. L., Regev, A., Schier, A. F., & Valen, E. (2013). Ribosome profiling reveals resemblance between long non-coding RNAs and 5' leaders of coding RNAs. *Development (Cambridge)*, *140*(13), 2828–2834. <https://doi.org/10.1242/dev.098343>
- Cohen, S., Nathan, J. A., & Goldberg, A. L. (2014). Muscle wasting in disease: Molecular mechanisms and promising therapies. *Nature Reviews Drug Discovery*, *14*(1), 58–74. <https://doi.org/10.1038/nrd4467>
- Crist, C. G., Montarras, D., & Buckingham, M. (2012). Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules. *Cell Stem Cell*, *11*(1), 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.03.011>
- Deato, M. D. E., Marr, M. T., Sottero, T., Inouye, C., Hu, P., & Tjian, R. (2008). MyoD Targets TAF3/TRF3 to Activate Myogenin Transcription. *Molecular Cell*, *32*(1), 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.09.009>
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D. G., Lagarde, J., Veeravalli, L., Ruan, X., Ruan, Y., Lassmann, T., Carninci, P., Brown, J. B., Lipovich, L., Gonzalez, J. M., ... Guigó, R. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Research*, *22*(9), 1775–1789. <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>
- Ding, M., Liu, Y., Liao, X., Zhan, H., Liu, Y., & Huang, W. (2018). Enhancer RNAs (eRNAs): New insights into gene transcription and disease treatment. *Journal of Cancer*, *9*(13), 2334–2340. <https://doi.org/10.7150/jca.25829>
- Duan, L. J., Ding, M., Hou, L. J., Cui, Y. T., Li, C. J., & Yu, D. M. (2017). Long noncoding RNA TUG1 alleviates extracellular matrix accumulation via mediating microRNA-377 targeting of PPAR γ in diabetic nephropathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *484*(3), 598–604. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.145>
- Dyck, D. J., Peters, S. J., Glatz, J., Gorski, J., Keizer, H., Kiens, B., Liu, S., Richter, E. A., Spriet, L. L., van der Vusse, G. J., & Bonen, A. (2017). Functional differences in lipid metabolism in resting skeletal muscle of

- various fiber types. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 272(3), E340–E351.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1997.272.3.e340>
- Farré, D., Roset, R., Huerta, M., Adsuara, J. E., Roselló, L., Albà, M. M., & Messeguer, X. (2003). Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3651–3653. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg605>
- Fejes-Toth, K., Sotirova, V., Sachidanandam, R., Assaf, G., Hannon, G. J., Kapranov, P., Foissac, S., Willingham, A. T., Duttagupta, R., Dumais, E., & Gingeras, T. R. (2009). Post-transcriptional processing generates a diversity of 5'-modified long and short RNAs. *Nature*, 457(7232), 1028–1032.
<https://doi.org/10.1038/nature07759>
- Forcina, L., Miano, C., Pelosi, L., & Musarò, A. (2019). An Overview About the Biology of Skeletal Muscle Satellite Cells. *Current Genomics*, 20(1), 24–37. <https://doi.org/10.2174/1389202920666190116094736>
- Franchini, L. F., & Pollard, K. S. (2017). Human evolution: The non-coding revolution. *BMC Biology*, 15(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s12915-017-0428-9>
- Gan, Z., Fu, T., Kelly, D. P., & Vega, R. B. (2018). Skeletal muscle mitochondrial remodeling in exercise and diseases. *Cell Research*, 28(10), 969–980. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0078-7>
- Ganassi, M., Badodi, S., Ortuste Quiroga, H. P., Zammit, P. S., Hinitz, Y., & Hughes, S. M. (2018). Myogenin promotes myocyte fusion to balance fibre number and size. *Nature Communications*, 9(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-06583-6>
- Gascoigne, D. K., Cheetham, S. W., Cattenoz, P. B., Clark, M. B., Amaral, P. P., Taft, R. J., Wilhelm, D., Dinger, M. E., & Mattick, J. S. (2012). Pinstripe: a suite of programs for integrating transcriptomic and proteomic datasets identifies novel proteins and improves differentiation of protein-coding and non-coding genes. *Bioinformatics*, 28(23), 3042–3050. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts582>
- Ghamkhar, L., & Kahlaee, A. H. (2019). The effect of trunk muscle fatigue on postural control of upright stance: A systematic review. *Gait and Posture*, 72(October 2018), 167–174.
<https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2019.06.010>
- Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M. F., Feldser, D., Huarte, M., Zuk, O., Carey, B. W., Cassady, J. P., Cabili, M. N., Jaenisch, R., Mikkelsen, T. S., Jacks, T., Hacohen, N., Bernstein, B. E., Kellis, M., Regev, A., Rinn, J. L., & Lander, E. S. (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*, 458(7235), 223–227. <https://doi.org/10.1038/nature07672>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(8).
<https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Hacisuleyman, E., Goff, L. A., Trapnell, C., Williams, A., Henao-Mejia, J., Sun, L., McClanahan, P., Hendrickson,

- D. G., Sauvageau, M., Kelley, D. R., Morse, M., Engreitz, J., Lander, E. S., Guttman, M., Lodish, H. F., Flavell, R., Raj, A., & Rinn, J. L. (2014). Topological organization of multichromosomal regions by the long intergenic noncoding RNA Firre. *Nature Structural and Molecular Biology*, *21*(2), 198–206. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2764>
- Haeussler, M., Zweig, A. S., Tyner, C., Speir, M. L., Rosenbloom, K. R., Raney, B. J., Lee, C. M., Lee, B. T., Hinrichs, A. S., Gonzalez, J. N., Gibson, D., Diekhans, M., Clawson, H., Casper, J., Barber, G. P., Haussler, D., Kuhn, R. M., & Kent, W. J. (2019). The UCSC Genome Browser database: 2019 update. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D853–D858. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1095>
- Han, X., Yang, F., Cao, H., & Liang, Z. (2015). Malat1 regulates serum response factor through miR-133 as a competing endogenous RNA in myogenesis. *FASEB Journal*, *29*(7), 3054–3064. <https://doi.org/10.1096/fj.14-259952>
- Hatje, K., Mühlhausen, S., Simm, D., & Kollmar, M. (2019). The Protein-Coding Human Genome: Annotating High-Hanging Fruits. *BioEssays*, *41*(11), 1–14. <https://doi.org/10.1002/bies.201900066>
- Herzing, L. B. K., Romer, J. T., Horn, J. M., & Ashworth, A. (1997). Xist has properties of the X-chromosome inactivation centre. *Nature*, *386*(6622), 272–275. <https://doi.org/10.1038/386272a0>
- Hinterberger, T. J., Sassoon, D. A., Rhodes, S. J., & Konieczny, S. F. (1991). Expression of the muscle regulatory factor MRF4 during somite and skeletal myofiber development. *Developmental Biology*, *147*(1), 144–156. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(05\)80014-4](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(05)80014-4)
- Hood, D. A., Memme, J. M., Oliveira, A. N., & Triolo, M. (2019). Maintenance of Skeletal Muscle Mitochondria in Health, Exercise, and Aging. *Annual Review of Physiology*, *81*, 19–41. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114310>
- Hu, P., Geles, K. G., Paik, J.-H., DePinho, R. A., & Tjian, R. (2008). Codependent Activators Direct Myoblast-Specific MyoD Transcription. *Developmental Cell*, *15*(4), 534–546. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.08.018>
- Huang, M., Xu, H., Xie, S., Zhou, H., & Qu, L. (2011). Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Is Regulated by microRNA-133 during Skeletal Myogenesis. *PLoS ONE*, *6*(12), e29173. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029173>
- Islam, H., Edgett, B. A., & Gurd, B. J. (2018). Coordination of mitochondrial biogenesis by PGC-1 α in human skeletal muscle: A re-evaluation. In *Metabolism: Clinical and Experimental* (Vol. 79, pp. 42–51). <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.11.001>
- Janssen, I., Heymsfield, S. B., Wang, Z. M., & Ross, R. (2000). Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18–88 yr. *Journal of Applied Physiology*, *89*(1), 81–88. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.1.81>

- Jianyin, L., Badal, S. S., Zengchun, Y., Yin, W., Ayanga, B. A., Galvan, D. L., Green, N. H., Chang, B. H., Overbeek, P. A., & Danesh, F. R. (2016). Long noncoding RNA Tug1 regulates mitochondrial bioenergetics in diabetic nephropathy. *Journal of Clinical Investigation*, *126*(11), 4205–4218. <https://doi.org/10.1172/JCI87927>
- Kang, Y. J., Yang, D. C., Kong, L., Hou, M., Meng, Y. Q., Wei, L., & Gao, G. (2017). CPC2: A fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Research*, *45*(W1), W12–W16. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx428>
- Kassar-Duchossoy, L., Giacone, E., Gayraud-Morel, B., Jory, A., Gomès, D., & Tajbakhsh, S. (2005). Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes and Development*, *19*(12), 1426–1431. <https://doi.org/10.1101/gad.345505>
- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., & Haussler, a. D. (2002). The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Research*, *12*(6), 996–1006. <https://doi.org/10.1101/gr.229102>
- Kren, B. T., Wong, P. Y. P., Sarver, A., Zhang, X., Zeng, Y., & Steer, C. J. (2009). MicroRNAs identified in highly purified liver-derived mitochondria may play a role in apoptosis. *RNA Biology*, *6*(1), 65–72. <https://doi.org/10.4161/rna.6.1.7534>
- Krist, B., Florczyk, U., Pietraszek-Gremplewicz, K., Józkwicz, A., & Dulak, J. (2015). The role of miR-378a in metabolism, angiogenesis, and muscle biology. *International Journal of Endocrinology*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/281756>
- Kumar, M. S., Armenteros-Monterroso, E., East, P., Chakravorty, P., Matthews, N., Winslow, M. M., & Downward, J. (2014). HMGA2 functions as a competing endogenous RNA to promote lung cancer progression. *Nature*, *505*(7482), 212–217. <https://doi.org/10.1038/nature12785>
- LaBarge, M. A., & Blau, H. M. (2013). Skeletal Muscle Stem Cells. *Essentials of Stem Cell Biology: Third Edition*, 267–279. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409503-8.00020-2>
- Lanz, R. B., McKenna, N. J., Onate, S. A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., & O'Malley, B. W. (1999). A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell*, *97*(1), 17–27. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80711-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80711-4)
- Lassar, A. B. (2017). Finding MyoD and lessons learned along the way. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *72*, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.021>
- Lee, S., Leone, T. C., Rogosa, L., Rumsey, J., Ayala, J., Coen, P. M., Fitts, R. H., Vega, R. B., & Kelly, D. P. (2017). Skeletal muscle PGC-1 β signaling is sufficient to drive an endurance exercise phenotype and to counteract components of detraining in mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *312*(5), E394–E406. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00380.2016>

- Lemonnier, M., & Buckingham, M. E. (2004). Characterization of a cardiac-specific enhancer, which directs α -cardiac actin gene transcription in the mouse adult heart. *Journal of Biological Chemistry*, 279(53), 55651–55658. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411082200>
- Li, J., Reed, S. A., & Johnson, S. E. (2009). Hepatocyte growth factor (HGF) signals through SHP2 to regulate primary mouse myoblast proliferation. *Experimental Cell Research*, 315(13), 2284–2292. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.04.011>
- Li, R., Li, B., Shen, M., Cao, Y., Zhang, X., Li, W., Tao, J., Wu, W., & Liu, H. (2020). LncRNA 2310043L19Rik inhibits differentiation and promotes proliferation of myoblast by sponging miR-125a-5p. *Aging*, 12(7), 5625–5639. <https://doi.org/10.18632/aging.102905>
- Liang, T., Zhou, B., Shi, L., Wang, H., Chu, Q., Xu, F., Li, Y., Chen, R., Shen, C., & Schinckel, A. P. (2018). lncRNA AK017368 promotes proliferation and suppresses differentiation of myoblasts in skeletal muscle development by attenuating the function of miR-30c. *FASEB Journal*, 32(1), 377–389. <https://doi.org/10.1096/fj.201700560RR>
- Liu, W., & Wang, X. (2019). Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data. *Genome Biology*, 20(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1629-z>
- Mashinchian, O., Pisconti, A., Le Moal, E., & Bentzinger, C. F. (2018). The Muscle Stem Cell Niche in Health and Disease. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 126). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.08.003>
- Meadows, E., Cho, J. H., Flynn, J. M., & Klein, W. H. (2008). Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells. *Developmental Biology*, 322(2), 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.07.024>
- Messeguer, X., Escudero, R., Farré, D., Núñez, O., Martínez, J., & Albà, M. M. (2002). PROMO: Detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*, 18(2), 333–334. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.2.333>
- Militello, G., Hosen, M. R., Ponomareva, Y., Gellert, P., Weirick, T., John, D., Hindi, S. M., Mamchaoui, K., Mouly, V., Döring, C., Zhang, L., Nakamura, M., Kumar, A., Fukada, S. I., Dimmeler, S., & Uchida, S. (2018). A novel long non-coding RNA Myolinc regulates myogenesis through TDP-43 and Filip1. *Journal of Molecular Cell Biology*, 10(2), 102–117. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy025>
- Moretti, I., Ciciliot, S., Dyar, K. A., Abraham, R., Murgia, M., Agatea, L., Akimoto, T., Bicciato, S., Forcato, M., Pierre, P., Uhlénhaut, N. H., Rigby, P. W. J., Carvajal, J. J., Blaauw, B., Calabria, E., & Schiaffino, S. (2016). MRF4 negatively regulates adult skeletal muscle growth by repressing MEF2 activity. *Nature Communications*, 7(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms12397>
- Morgan, J., & Partridge, T. (2020). Skeletal muscle in health and disease. *Disease Models & Mechanisms*, 13(2), dmm042192. <https://doi.org/10.1242/dmm.042192>

- Mousavi, K., Zare, H., Dell'Orso, S., Grontved, L., Gutierrez-Cruz, G., Derfoul, A., Hager, G. L., & Sartorelli, V. (2013). ERNAs Promote Transcription by Establishing Chromatin Accessibility at Defined Genomic Loci. *Molecular Cell*, *51*(5), 606–617. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.022>
- Mueller, A. C., Cichewicz, M. A., Dey, B. K., Layer, R., Reon, B. J., Gagan, J. R., & Dutta, A. (2015). MUNC, a Long Noncoding RNA That Facilitates the Function of MyoD in Skeletal Myogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, *35*(3), 498–513. <https://doi.org/10.1128/mcb.01079-14>
- Mukund, K., & Subramaniam, S. (2020). Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, *12*(1), 1–46. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>
- Naganuma, T., Nakagawa, S., Tanigawa, A., Sasaki, Y. F., Goshima, N., & Hirose, T. (2012). Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles. *EMBO Journal*, *31*(20), 4020–4034. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.251>
- Nowak, K. J., Sewry, C. A., Navarro, C., Squier, W., Reina, C., Ricoy, J. R., Jayawant, S. S., Childs, A. M., Dobbie, J. A., Appleton, R. E., Mountford, R. C., Walker, K. R., Clement, S., Barois, A., Muntoni, F., Romero, N. B., & Laing, N. G. (2007). Nemaline myopathy caused by absence of α -skeletal muscle actin. *Annals of Neurology*, *61*(2), 175–184. <https://doi.org/10.1002/ana.21035>
- Olguin, H. C., & Olwin, B. B. (2004). Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: A potential mechanism for self-renewal. *Developmental Biology*, *275*(2), 375–388. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.015>
- Oustanina, S., Hause, G., & Braun, T. (2004). Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO Journal*, *23*(16), 3430–3439. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600346>
- Pette, D., & Staron, R. S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique*, *50*(6), 500–509. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000915\)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7)
- Quinn, J. J., & Chang, H. Y. (2016). Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nature Reviews Genetics*, *17*(1), 47–62. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.10>
- Rackham, O., Shearwood, A. M. J., Mercer, T. R., Davies, S. M. K., Mattick, J. S., & Filipovska, A. (2011). Long noncoding RNAs are generated from the mitochondrial genome and regulated by nuclear-encoded proteins. *Rna*, *17*(12), 2085–2093. <https://doi.org/10.1261/rna.029405.111>
- Ramamoorthy, T. G., Laverny, G., Schlagowski, A. I., Zoll, J., Messaddeq, N., Bornert, J. M., Panza, S., Ferry, A., Geny, B., & Metzger, D. (2015). The transcriptional coregulator PGC-1 β controls mitochondrial function and anti-oxidant defence in skeletal muscles. *Nature Communications*, *6*. <https://doi.org/10.1038/ncomms10210>
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumano,

- A., & Buckingham, M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *Journal of Cell Biology*, *172*(1), 91–102. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508044>
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., & Buckingham, M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*, *435*(7044), 948–953. <https://doi.org/10.1038/nature03594>
- Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Bruggmann, S. A., Goodnough, L. H., Helms, J. A., Farnham, P. J., Segal, E., & Chang, H. Y. (2007). Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. *Cell*, *129*(7), 1311–1323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.022>
- Romero-Barrios, N., Legascue, M. F., Benhamed, M., Ariel, F., & Crespi, M. (2018). Survey and summary Splicing regulation by long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Research*, *46*(5), 2169–2184. <https://doi.org/10.1093/nar/gky095>
- Rudnicki, M. A., & Jaenisch, R. (1995). The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *BioEssays*, *17*(3), 203–209. <https://doi.org/10.1002/bies.950170306>
- Scarpulla, R. C. (2011). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1813*(7), 1269–1278. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.019>
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011). Fiber types in Mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*, *91*(4), 1447–1531. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>
- Sheehan, S. M., Tatsumi, R., Temm-Grove, C. J., & Allen, R. E. (2000). HGF is an autocrine growth factor for skeletal muscle satellite cells in vitro. *Muscle & Nerve*, *23*(2), 239–245. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4598\(200002\)23:2<239::AID-MUS15>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4598(200002)23:2<239::AID-MUS15>3.0.CO;2-U)
- Sigova, A. A., Mullen, A. C., Molinie, B., Gupta, S., Orlando, D. A., Guenther, M. G., Almada, A. E., Lin, C., Sharp, P. A., Giallourakis, C. C., & Young, R. A. (2013). Divergent transcription of long noncoding RNA/mRNA gene pairs in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(8), 2876–2881. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221904110>
- Song, C., Wang, J., Ma, Y., Yang, Z., Dong, D., Li, H., Yang, J., Huang, Y., Plath, M., Ma, Y., & Chen, H. (2018). Linc-smad7 promotes myoblast differentiation and muscle regeneration via sponging miR-125b. *Epigenetics*, *13*(6), 591–604. <https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1481705>
- Sopariwala, D. H., Yadav, V., Badin, P. M., Likhite, N., Sheth, M., Lorca, S., Vila, I. K., Kim, E. R., Tong, Q., Song, M. S., Rodney, G. G., & Narkar, V. A. (2017). Long-term PGC1 β overexpression leads to apoptosis, autophagy and muscle wasting. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10238-9>
- Targoff, K. L., Colombo, S., George, V., Schell, T., Kim, S. H., Solnica-Krezel, L., & Yelon, D. (2013). Nkx genes

- are essential for maintenance of ventricular identity. *Development (Cambridge)*, 140(20), 4203–4213. <https://doi.org/10.1242/dev.095562>
- Tatsumi, R., Hattori, A., Ikeuchi, Y., Anderson, J. E., & Allen, R. E. (2002). Release of Hepatocyte Growth Factor from Mechanically Stretched Skeletal Muscle Satellite Cells and Role of pH and Nitric Oxide. *Molecular Biology of the Cell*, 13(8), 2909–2918. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-01-0062>
- Tay, Y., Rinn, J., & Pandolfi, P. P. (2014). The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. *Nature*, 505(7483), 344–352. <https://doi.org/10.1038/nature12986>
- Tierney, M. T., & Sacco, A. (2016). Satellite Cell Heterogeneity in Skeletal Muscle Homeostasis. *Trends in Cell Biology*, 26(6), 434–444. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.02.004>
- Van Mater, D., Añó, L., Blum, J. M., Webster, M. T., Huang, W. Q., Williams, N., Ma, Y., Cardona, D. M., Fan, C. M., & Kirsch, D. G. (2015). Acute tissue injury activates satellite cells and promotes sarcoma formation via the HGF/c-MET signaling pathway. *Cancer Research*, 75(3), 605–614. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2527>
- van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B. A., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Kelm, R. J., & Olson, E. N. (2009). A Family of microRNAs Encoded by Myosin Genes Governs Myosin Expression and Muscle Performance. *Developmental Cell*, 17(5), 662–673. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.10.013>
- Verdijk, L. B., Snijders, T., Drost, M., Delhaas, T., Kadi, F., & Van Loon, L. J. C. (2014). Satellite cells in human skeletal muscle; From birth to old age. *Age*, 36(2), 545–557. <https://doi.org/10.1007/s11357-013-9583-2>
- Wang, S., Zuo, H., Jin, J., Lv, W., Xu, Z., Fan, Y., Zhang, J., & Zuo, B. (2019). Long noncoding RNA Neat1 modulates myogenesis by recruiting Ezh2. *Cell Death and Disease*, 10(7). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1742-7>
- Xu, B., Gerin, I., Miao, H., Vu-Phan, D., Johnson, C. N., Xu, R., Chen, X. W., Cawthorn, W. P., MacDougald, O. A., & Koenig, R. J. (2010). Multiple roles for the non-coding RNA SRA in regulation of adipogenesis and insulin sensitivity. *PLoS ONE*, 5(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014199>
- Yang, J., Li, T., Gao, C., Lv, X., Liu, K., Song, H., Xing, Y., & Xi, T. (2014). FOXO1 3'UTR functions as a ceRNA in repressing the metastases of breast cancer cells via regulating miRNA activity. *FEBS Letters*, 588(17), 3218–3224. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.07.003>
- Yang, W., & Hu, P. (2018). Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. *Journal of Orthopaedic Translation*, 13, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2018.01.002>
- Yap, K. L., Li, S., Muñoz-Cabello, A. M., Raguz, S., Zeng, L., Mujtaba, S., Gil, J., Walsh, M. J., & Zhou, M. M. (2010). Molecular Interplay of the Noncoding RNA ANRIL and Methylated Histone H3 Lysine 27 by Polycomb CBX7 in Transcriptional Silencing of INK4a. *Molecular Cell*, 38(5), 662–674.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.021>

- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, *13*(1), 134.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Yin, H., Pasut, A., Soleimani, V. D., Bentzinger, C. F., Antoun, G., Thorn, S., Seale, P., Fernando, P., Van Ijcken, W., Grosveld, F., Dekemp, R. A., Boushel, R., Harper, M. E., & Rudnicki, M. A. (2013). MicroRNA-133 controls brown adipose determination in skeletal muscle satellite cells by targeting Prdm16. *Cell Metabolism*, *17*(2), 210–224. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.01.004>
- Yu, X., Zhang, Y., Li, T., Ma, Z., Jia, H., Chen, Q., Zhao, Y., Zhai, L., Zhong, R., Li, C., Zou, X., Meng, J., Chen, A. K., Puri, P. L., Chen, M., & Zhu, D. (2017). Long non-coding RNA Linc-RAM enhances myogenic differentiation by interacting with MyoD. *Nature Communications*, *8*, 1–12.
<https://doi.org/10.1038/ncomms14016>
- Zhang, X., Zuo, X., Yang, B., Li, Z., Xue, Y., Zhou, Y., Huang, J., Zhao, X., Zhou, J., Yan, Y., Zhang, H., Guo, P., Sun, H., Guo, L., Zhang, Y., & Fu, X. D. (2014). MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation. *Cell*, *158*(3), 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.047>
- Zhou, L., Wang, L., Lu, L., Jiang, P., Sun, H., & Wang, H. (2012). A Novel Target of MicroRNA-29, Ring1 and YY1-binding Protein (Rybp), Negatively Regulates Skeletal Myogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(30), 25255–25265. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.357053>