



**Universidad
Europea**

Máster en Bioinformática

**Análisis integrado de los perfiles de
expresión miRNA-mRNA en tejido
cardíaco de ratón**

Autor: Isabel Rodríguez Valle

Tutor: Pablo Gómez del Arco

Curso 2022-23

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a Apolonia Novillo Villajos por su atención y ayuda en este trabajo. Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Salud Carlos III y financiado con los proyectos SAF2016-77816 y PID2020-114773GBI100 cuyo Investigador Principal es el Dr. Pablo Gómez del Arco.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Miocardio.....	7
1.2. Chd4 y la remodelación de la cromatina	7
1.3. Factor de transcripción ThPOK.....	9
1.4. Regulación por miRNAs	9
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. Análisis bioinformático	12
3.1.1. mirnaQC.....	12
3.1.2. sRNAbench.....	13
3.1.3. R.....	13
3.1.4. miRTarVis y miRTarVis+	13
3.1.5. g:Profiler, DAVID, Enrichr y miEAA	14
4. RESULTADOS	16
4.1. Análisis bioinformático de los datos de miRNAseq.....	16
4.2. Expresión diferencial de miRNAs entre las distintas condiciones	17
4.3. Genes diana de los miRNA expresados diferencialmente	19
4.4. Análisis de enriquecimiento	19
4.5. Rutas de señalización	23
4.6. Identificación de miRNA y genes diana de interés biológico	29
5. DISCUSIÓN	33
6. CONCLUSIONES	35
ABREVIATURAS	37
ÍNDICE DE FIGURAS	38
BIBLIOGRAFÍA	39
ANEXO I	44
ANEXO II	48

RESUMEN

El mantenimiento de la identidad del músculo estriado y el correcto funcionamiento del corazón dependen de las proteínas contráctiles que forman el sarcómero de los cardiomiocitos, cuya expresión está regulada por mecanismos transcripcionales y epigenéticos. En esta regulación interviene el complejo remodelador de la cromatina Chd4/NuRD, que coopera con factores de transcripción para regular la transcripción. En el presente trabajo de fin de máster se estudia el papel de los microRNAs en este proceso, analizando si la desregulación de su expresión está relacionada con la existencia de transcritos expresados de forma diferencial en el corazón de ratones knockout para *Chd4* y el factor de transcripción *ThPOK* que puedan explicar las arritmias, miocardiopatías y muerte súbita observada en los ratones mutantes.

En el estudio se utilizaron distintas plataformas web y paquetes de R, incluyendo mirnaQC y sRNABench para el análisis de calidad, filtrado, conteo y expresión diferencial de los miRNAs secuenciados para ratones silvestres, knockout para *Chd4* y doble knockout para *Chd4* y *ThPOK*. Los resultados se comparan con los genes expresados diferencialmente para estas condiciones, usando multiMiR y miRTarVis para la definición de interacciones y la visualización. Por último, mediante análisis de enriquecimiento usando g:Profile, DAVID y Enrichr se han definido las interacciones miRNA/mRNA que podrían explicar los fenotipos observados.

Este análisis demuestra diferencias en la expresión de miRNAs entre las distintas condiciones, algunos con interacciones validadas con genes implicados en la contracción muscular, que podrían provocar los fenotipos de los ratones estudiados, como las parejas *Atp1b4* y mmu-miR-149-5p, *Ryr1* y mmu-miR-378a-3p o *Kcnf1* y miR-335-3p. El estudio permite confirmar también que la regulación positiva de *Spr1a* está relacionada con una downregulación de mmu-miR-150, corroborando los resultados obtenidos por el equipo del Dr. Gómez del Arco.

Los resultados indican, por tanto, que *Chd4* y *ThPOK* influyen en la expresión de miRNAs que regulan la expresión de genes que forman parte de rutas de interés en el corazón de ratón, explicando cómo una desregulación de estas rutas podría provocar arritmias cardíacas.

Palabras clave: *Chd4*, corazón, regulación génica, miRNA, miocardiopatía, *ThPOK*

ABSTRACT

The maintenance of striated muscle identity and the correct functioning of the heart depend on the contractile proteins that form the sarcomere of cardiomyocytes, the expression of which is regulated by transcriptional and epigenetic mechanisms. This regulation involves the chromatin remodelling complex Chd4/NuRD, which cooperates with transcription factors to regulate transcription. This MSc's thesis studies the role of microRNAs in this process, analysing whether the deregulation of their expression is related to the existence of differentially expressed transcripts in the heart of knockout mice for *Chd4* and the transcription factor *ThPOK* that may explain the arrhythmias, cardiomyopathies and sudden death observed in the mutant mice.

The study used different web platforms and R packages, including mirnaQC and sRNAbench for quality analysis, filtering, counting and differential expression of miRNAs sequenced for wild-type, *Chd4* knockout and double knockout mice for *Chd4* and *ThPOK*. Results are compared with differentially expressed genes for these conditions, using multiMiR and miRTarVis for interaction definition and visualisation. Finally, enrichment analysis using g:Profile, DAVID and Enrichr defined miRNA/mRNA interactions that could explain the observed phenotypes.

This analysis demonstrates differences in the expression of miRNAs between the different conditions, some with validated interactions with genes involved in muscle contraction, which could cause the phenotypes of the mice studied, such as the pairs *Atp1b4* and mmu-miR-149-5p, *Ryr1* and mmu-miR-378a-3p or *Kcnf1* and miR-335-3p. The study also confirms that the positive regulation of *Sprr1a* is related to a downregulation of mmu-miR-150, corroborating the results obtained by Dr. Gómez del Arco's team.

The results indicate, therefore, that Chd4 and ThPOK influence the expression of miRNAs that regulate the expression of genes that form part of pathways of interest in the mouse heart, explaining how deregulation of these pathways could lead to cardiac arrhythmias.

Keywords: cardiomyopathy, Chd4, gene regulation, heart, miRNA, ThPOK

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (CVD) representan la principal causa de mortalidad en todo el mundo, habiendo aumentado el número de muertes por CVDs en unos 7 millones entre 1990 y 2019, además de contribuir de forma negativa en la economía de los países debido a la discapacidad que conllevan. Existen muchos factores que son impulsores y participan en la incidencia de estas enfermedades, incluyendo cardiometabólicos, conductuales, ambientales y sociales; aunque se puede estimar que la mitad de la incidencia puede atribuirse a factores genéticos (Roth et al., 2020; Tada et al., 2022). Por su complejidad, impacto y carga económica, no hay duda de que la investigación en CVDs es de gran importancia.

El presente proyecto está enmarcado dentro del trabajo del grupo de investigación del Dr. Pablo Gómez del Arco en la Unidad de Epigenética y Regulación Génica del Instituto de Investigación de Enfermedades Raras del Instituto de Salud Carlos III (IIER-ISCI). Dicho equipo ha estudiado la relación del complejo remodelador de la cromatina Chd4/NuRD con la conservación (“homeostasis”) de la identidad del músculo estriado y la estabilidad electrofisiológica del corazón, habiendo probado que la delección de *Chd4* en cardiomiocitos de ratón conduce al desarrollo de arritmias, miocardiopatías y muerte súbita, en parte debido a una expresión aberrante del programa sarcomérico esquelético (Gómez-del Arco et al., 2016; El Abdellaoui-Soussi et al., 2022). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual este remodelador epigenético pleiotrópico interviene en esta regulación no está del todo claro.

Abdellaoui-Soussi et al., 2022 estudiaron los factores de transcripción (TFs) que podrían interaccionar y reclutar Chd4/NuRD a los promotores de los genes de músculo esquelético en el miocardio para mantenerlos reprimidos. Describieron en concreto su relación con el TF Znf219, que interacciona física y genéticamente con Chd4. Esta interacción regula la diferenciación y contracción de los cardiomiocitos y, en concreto, el silenciamiento (knockdown) de Znf219 en ratones resultó en una expresión aberrante en el corazón de proteínas del sarcómero de músculo esquelético, que condujo al desarrollo de arritmias, como ocurría en los ratones *Chd4*^{KO}.

Otro TF de interés estudiado por el grupo es ThPOK, que se ha demostrado que también se asocia al complejo NuRD (Gao et al., 2022), aunque en el corazón no se ha

visto que ambas proteínas se asocien físicamente. En proyectos anteriores (Hidalgo Estévez, 2022) se estudió la expresión génica diferencial en ratones silvestres, knockout condicionales para *Chd4* y para *ThPOK*, comparando los tejidos de músculos cardíaco y esquelético. Tras el análisis se observó un aumento de la expresión de las pequeñas proteínas ricas en prolinas *Sprr1a* y *Sprr2f* en los corazones de ratones modificados genéticamente, lo cual concuerda con la hipótesis propuesta, ya que son proteínas que forman parte del proceso de cornificación del epitelio y su expresión aberrante en los cardiomiocitos, aumentaría la rigidez de los mismos.

Además, en pacientes con infarto de miocardio se ha visto que *Sprr1a* se sobreexpresa en los corazones y, por este motivo, los resultados obtenidos a través de esta investigación podrían proporcionar oportunidades para explorar nuevos caminos terapéuticos en el ámbito de las enfermedades cardíacas y musculoesqueléticas, impulsando así la investigación básica en esta área.

1.1. Miocardio

El corazón de los mamíferos es uno de los primeros órganos en desarrollarse debido a que el embrión, al crecer en tamaño, necesita aporte de oxígeno y nutrientes en los primeros estadios del desarrollo. Por ello, obtiene también pronto su estructura tetracameral mientras mantiene el flujo sanguíneo del embrión (Akerberg & Pu, 2020). Este tejido muscular o miocardio es el responsable de la contracción del corazón, a través de células llamadas cardiomiocitos.

Los cardiomiocitos están compuestos de miofibrillas, que a su vez están formadas por miofilamentos, que tienen isoformas específicas de proteínas sarcoméricas que se diferencian de las expresadas en el músculo esquelético (Keepers et al., 2020). Esto da diferentes características contráctiles que, por ejemplo, diferencian fibras rápidas de lentas. La regulación transcripcional de estas isoformas es crucial para asegurar un funcionamiento correcto del corazón y esta regulación es llevada a cabo por TFs y modificadores epigenéticos.

1.2. Chd4 y la remodelación de la cromatina

Uno de estos reguladores epigenéticos es el remodelador de la cromatina *Chd4* (*Chromatin Helicase DNA binding protein 4* o Mi-2 β), que regula la expresión de los genes sarcoméricos correspondientes a los cardiomiocitos, para asegurar el correcto

ensamblaje de los sarcómeros. Chd4/NuRD regula la expresión de dichos genes mediante unión directa a sus regiones promotoras en los cardiomiocitos. Chd4 es la subunidad con capacidad helicasa del complejo NuRD (*Nucleosome Remodeling and Deacetylase*) (Fig. 1) que se ha visto que se une al promotor del gen que codifica para la cadena pesada de miosina del músculo liso (Myh11), así como en la α -actina del músculo esquelético rápido y en su complejo de genes de troponina, reprimiendo estos parálogos durante el desarrollo embrionario del corazón (Fig. 2). Si este tipo erróneo de miofibrillas fuera activado en los cardiomiocitos, provocaría una desorganización mortal del sarcómero, ya que impediría su correcta contracción (Wilczewski et al., 2018). Chd4/NuRD también mantiene reprimidos estos genes en el corazón adulto (Gómez-del Arco et al., 2016).

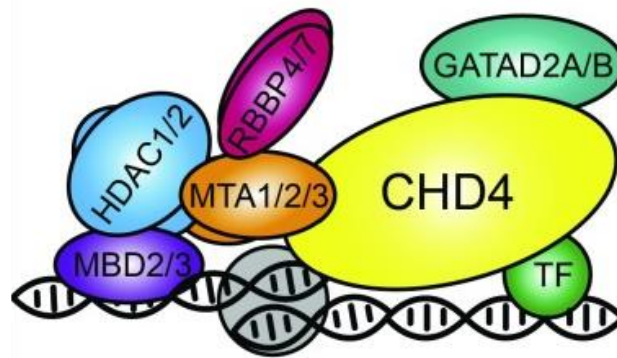


Figura 1. Partes del complejo NuRD. Tomada de Wilczewski et al., 2018.

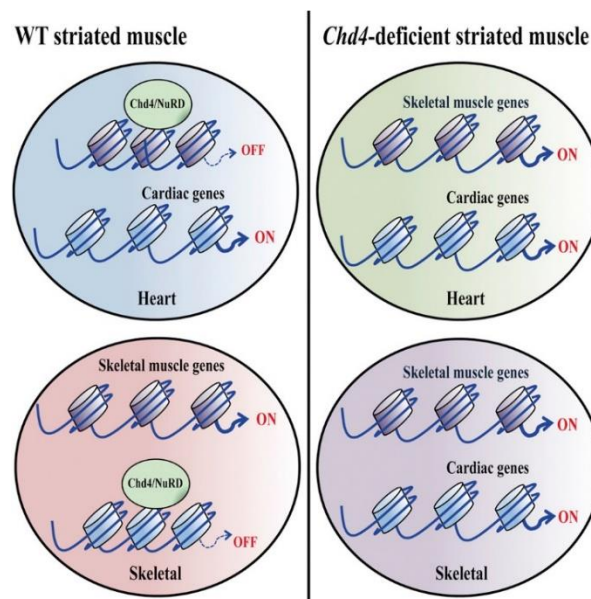


Figura 2. Comparación de la regulación génica en músculo cardíaco y esquelético en presencia y ausencia de Chd4. Imagen tomada de Gómez-del Arco et al., 2016.

1.3. Factor de transcripción ThPOK

Se ha demostrado que el complejo NuRD necesita ser reclutado por TFs para poder unirse al DNA. Como se ha mencionado, este reclutamiento sucede con Znf219 (El Abdellaoui-Soussi et al., 2022), y también con ThPOK (El Abdellaoui-Soussi et al., manuscrito en preparación).

ThPOK (*T helper-inducing POZ Krüppel factor*, también llamado ZBTB7B) interacciona con distintos remodeladores de cromatina, teniendo un papel importante en procesos como la activación y represión génica y el bloqueo de potenciadores (Srivastava & Mishra, 2020). La unión como cofactores de este TF con NuRD se ha demostrado por espectrometría de masas y co-inmunoprecipitación en células T, en las cuáles es necesario para la diferenciación de las células CD4⁺. De este modo, se pudieron identificar los aminoácidos en el dominio de dedos de zinc del factor en su dominio BTB requeridos para este vínculo y para llevar a cabo sus funciones (Gao et al., 2022).

Se cree que ThPOK podría estar reclutando también al complejo para controlar la regulación génica cardíaca, ya que los promotores de varios de los genes regulados por Chd4/NuRD tienen sitios de unión al TF (GAGA binding sites). Por tanto, en el grupo se ha probado esta hipótesis investigando las consecuencias de una doble delección de ambos cofactores.

1.4. Regulación por miRNAs

Los microRNAs (miRNA o miR) son moléculas de RNA endógeno no codificante de entre 19 y 25 nucleótidos que regulan la expresión génica de forma postranscripcional mediante el silenciamiento de genes diana por inhibición de la traducción o degradación de sus mRNAs (Fig. 3). Se ha estudiado que tienen gran relevancia en el desarrollo del corazón y en diversas enfermedades cardíacas. Algunos ejemplos incluirían miR-1, miR-208, miR-133 o miR-499, involucrados en la diferenciación celular en tejido cardíaco, proliferación y apoptosis. La desregulación de estos miRNAs puede resultar en hipertrofia, arritmias e infartos de miocardio (Siddeek et al., 2018). La sobreexpresión de miR-22 también provoca hipertrofia cardíaca (Huang et al., 2013), mientras que miR-25 y miR-22 regulan la contractilidad de los cardiomiocitos, las familias miR-302–367 y miR-99/100 regulan la regeneración (Gurha, 2016) y miR-122 está asociado con la falta

de mejora en la función ventricular izquierda después de un reemplazo en la válvula aórtica, además de regular la viabilidad de cardiomiocitos (Hosen et al., 2022).

En estudios previos del equipo, se ha descrito que una disminución en el miR-150-5p tiene como consecuencia el incremento en la expresión de *Sprr1a* (*small proline-rich protein 1A*), una proteína expresada por los queratinocitos y que es fundamental en la cornificación de la piel. Esto ocurrió tanto en los ratones KO para *Chd4* como dKO para *Chd4/ThPOK* (El Abdellaoui-Soussi, 2023).

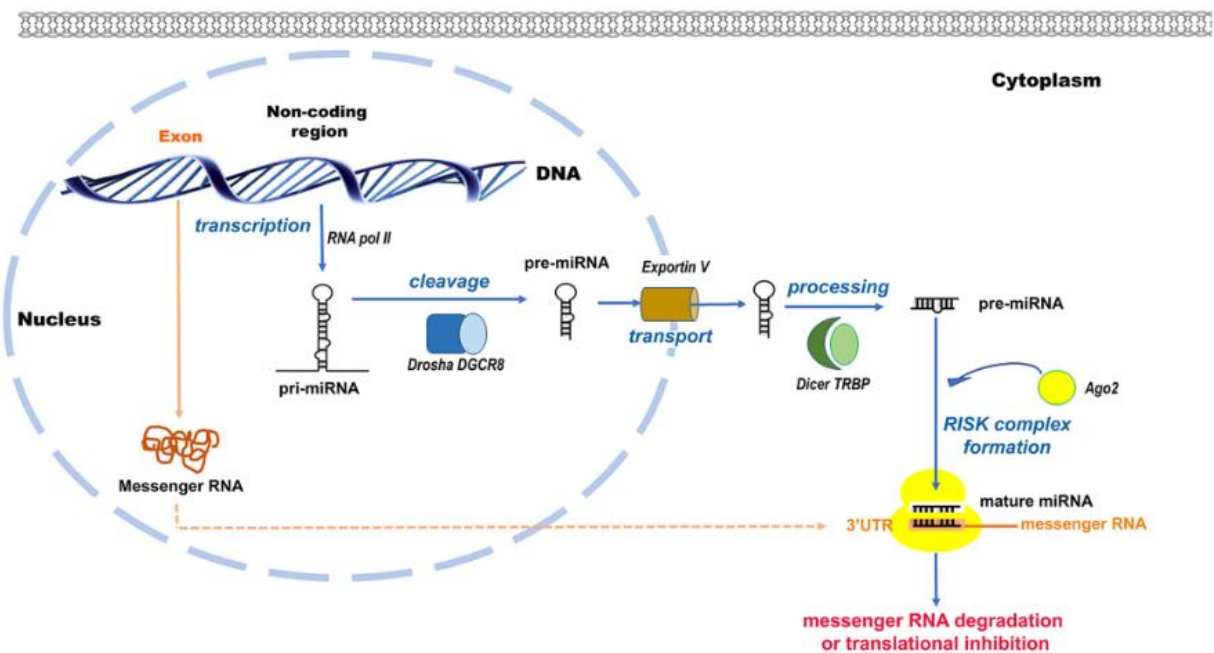


Figura 3. Biogénesis de los miRNAs. La RNA polimerasa II transcribe DNA a pri-miRNAs, que son recortadas aún en el núcleo por la enzima DROSHA, formando el pre-miRNA. Este es transportado al citoplasma, donde la enzima Dicer termina el procesamiento, resultando en dúplex de la longitud adecuada. El miRNA maduro se incorpora a RISC, que actúa de guía para la unión a mRNA permitiendo su regulación. Imagen tomada de Siddeek et al., 2018.

Para continuar con el trabajo realizado en el laboratorio del Dr. Pablo Gómez del Arco, se planteó por tanto el análisis de la expresión diferencial de microRNAs (miRNAs) y sus genes diana (mRNA) en el corazón de ratones silvestres, knockout condicionales para *Chd4* y dobles knockout (*Chd4/ThPOK*) para poder determinar a nivel fisiológico su importancia como reguladores de la diferenciación y la función cardíaca.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra **hipótesis** plantea que la desregulación de ciertos miRNAs podría ser uno de los mecanismos moleculares responsables de que existan transcritos que se expresan de forma diferencial en el corazón de los ratones knockout estudiados que serían, asimismo, responsables de los fenotipos descritos.

Por ello, el **objetivo** general de este trabajo es descifrar la relación a nivel molecular entre los miRNAs y mRNAs secuenciados obtenidos de las muestras en las tres condiciones biológicas distintas: ratones silvestres, knockout condicionales para *Chd4* y dobles knockout para *Chd4* y *ThPOK* (*dKO*).

Los **objetivos específicos** son:

- Analizar bioinformáticamente los datos de miRNA-seq e identificar los miRNAs diferencialmente expresados en los corazones de los ratones modificados genéticamente (mutantes) con respecto a los silvestres.
- Describir e identificar los genes diana de los miRNAs diferencialmente expresados en los corazones de los ratones mutantes.
- Realizar un análisis de enriquecimiento de las rutas de señalización identificadas en el análisis bioinformático.
- Describir y visualizar las rutas de señalización resultantes.
- Identificar los miRNA y sus genes diana responsables de los fenotipos descritos en los ratones mutantes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el análisis deseado, se utilizaron, como se ha comentado, datos provenientes de tres tipos de ratones: silvestres (WT), knockout condicionales para *Chd4* (*Chd4^{KO}*) y dobles knockout para *Chd4* y *ThPOK* (*dKO*); con tres réplicas para cada condición (unos 5 corazones por condición), sumando un total de unos 45 ratones.

Los datos de partida provienen de estudios anteriores y fueron generados en el laboratorio de Pablo Gómez del Arco (proyecto: PID2020-114773GB-I00). Los RNAs fueron obtenidos realizando un protocolo estándar de extracción y purificación en columna de RNA total de corazones enteros de ratón. La secuenciación fue realizada en la Unidad de Genómica del CNIC utilizando el *Genome Analyzer IIX System* de Illumina.

3.1. Análisis bioinformático

Se parte de los archivos FASTq resultantes de la secuenciación de miRNAs para cada condición, con tres réplicas, y se cuenta también con el archivo resultante del análisis de expresión génica diferencial en corazón obtenido en Hidalgo Estévez, 2022 (El Abdellaoui-Soussi et al., manuscrito en preparación).

3.1.1. mirnaQC

Se utiliza la herramienta mirnaQC (Aparicio-Puerta et al., 2020) para comprobar, de forma comparativa y visual, la calidad de las secuencias de las distintas réplicas. Se trata de un servidor web que facilita la realización del control de calidad calculando 34 métricas distintas de los miRNAs introducidos, divididas en las categorías de rendimiento de la secuenciación, complejidad de la librería, su calidad, posible contaminación, distribución de la longitud de las lecturas y calidad de la secuenciación basada en la puntuación Phred. Los valores se comparan con los disponibles en el conjunto de referencia seleccionado, siendo las opciones muestras del mismo reino o de la misma especie, para las que se haya seguido o no el mismo protocolo. Para detectar la contaminación, no sólo se mapean las lecturas contra el genoma de la especie, sino que también se compara con una colección de virus, bacterias y datos de otros tipos de RNA.

El programa que realiza este análisis usa a su vez las herramientas de sRNAbench (Aparicio-Puerta et al., 2019), Bowtie (Langmead et al., 2009) y MySQL, así como Plotly y multiQC (Ewels et al., 2016) para la representación de los resultados.

3.1.2. sRNAbench

Para el filtrado de muestras y realización del análisis de expresión diferencial, se utiliza la herramienta en versión web sRNAbench (Aparicio-Puerta et al., 2019). El filtrado se realiza según los valores Phred calculados, y las secuencias seleccionadas son comparadas con la base de datos elegida por el usuario para su mapeo, conteo y anotación.

Para el estudio de la expresión diferencial entre distintas condiciones, se procesan a la vez haciendo uso de edgeR (Robinson et al., 2010), DESeq (Anders & Huber, 2010), DESeq2 (Love et al., 2014), NOISeq (Tarazona et al., 2015) y la prueba de la t de Student.

3.1.3. R

Con el fin de manipular los datos obtenidos se utiliza el lenguaje R (versión 4.1.1) junto con RStudio como interfaz (V2022.07.2 + 576, R Core Team, 2021), empleando funciones base, así como de diversos paquetes:

- dplyr (Wickham et al., 2023a) y tidyr (Wickham et al., 2023b) para la manipulación de los conjuntos de datos y archivos.
- gplots (Warnes et al., 2022) para la creación de gráficos *heatmap*.
- AnnotationDbi (Pagès et al., 2023) y org.Mm.eg.db (Carlson, 2019) para el procesado de IDs génicos de ratón.
- multiMiR (Ru et al., 2014) con el objetivo de estudiar las interacciones entre miRNAs y genes. Este paquete permite consultar 14 bases de datos distintas, diferenciando además entre predicciones e interacciones validadas.
- igraph (Csárdi et al., 2023) para la visualización de gráficas de interacciones.

3.1.4. miRTarVis y miRTarVis+

La herramienta miRTarVis (Jung et al., 2015) y el formato web de la misma, miRTarVis+ (L'Yi et al., 2017), fueron utilizadas para descifrar más interacciones entre los miRNAs y los genes, sirviendo para la consulta de bases de datos de miRNAs no incluidas en los paquetes de datos mencionados con anterioridad.

3.1.5. g:Profiler, DAVID, Enrichr y miEAA

La herramienta usada para el análisis de enriquecimiento funcional de los genes con los que interactúan con los miRNAs fue el servidor web g:Profiler (Kolberg et al., 2023). Este utiliza g:GOST para, tomando una lista de genes, devolver las funciones biológicas consideradas como estadísticamente significativas tras consultar distintas bases de datos, incluyendo KEGG (Kanehisa et al., 2022) y Gene Ontology (Gene Ontology Consortium et al., 2023).

También se utilizaron con este fin DAVID (Sherman et al., 2022), ya que permite el *clustering* de los términos en la anotación funcional, y una mejor representación de los resultados encontrados en KEGG; así como Enrichr (Xie et al., 2021) en especial por su función para relacionar los términos enriquecidos con enfermedades. Ambas facilitan una interfaz web que permiten la consulta, recopilación y visualización de información obtenidas de miles de datos de genes anotados.

Por último, se prueba también la herramienta miEAA (Aparicio-Puerta et al., 2023), que permite realizar un *Gene set Enrichment Analysis* (GSEA) adaptado para su uso con miRNAs.

El flujo de trabajo seguido puede verse en la Figura 4. Para la elección de herramientas y pasos a seguir se realizó una lectura previa de la bibliografía disponible, basándose las elecciones en estudios como el de Thomas et al., 2022 y Santacruz-Roco, 2022.

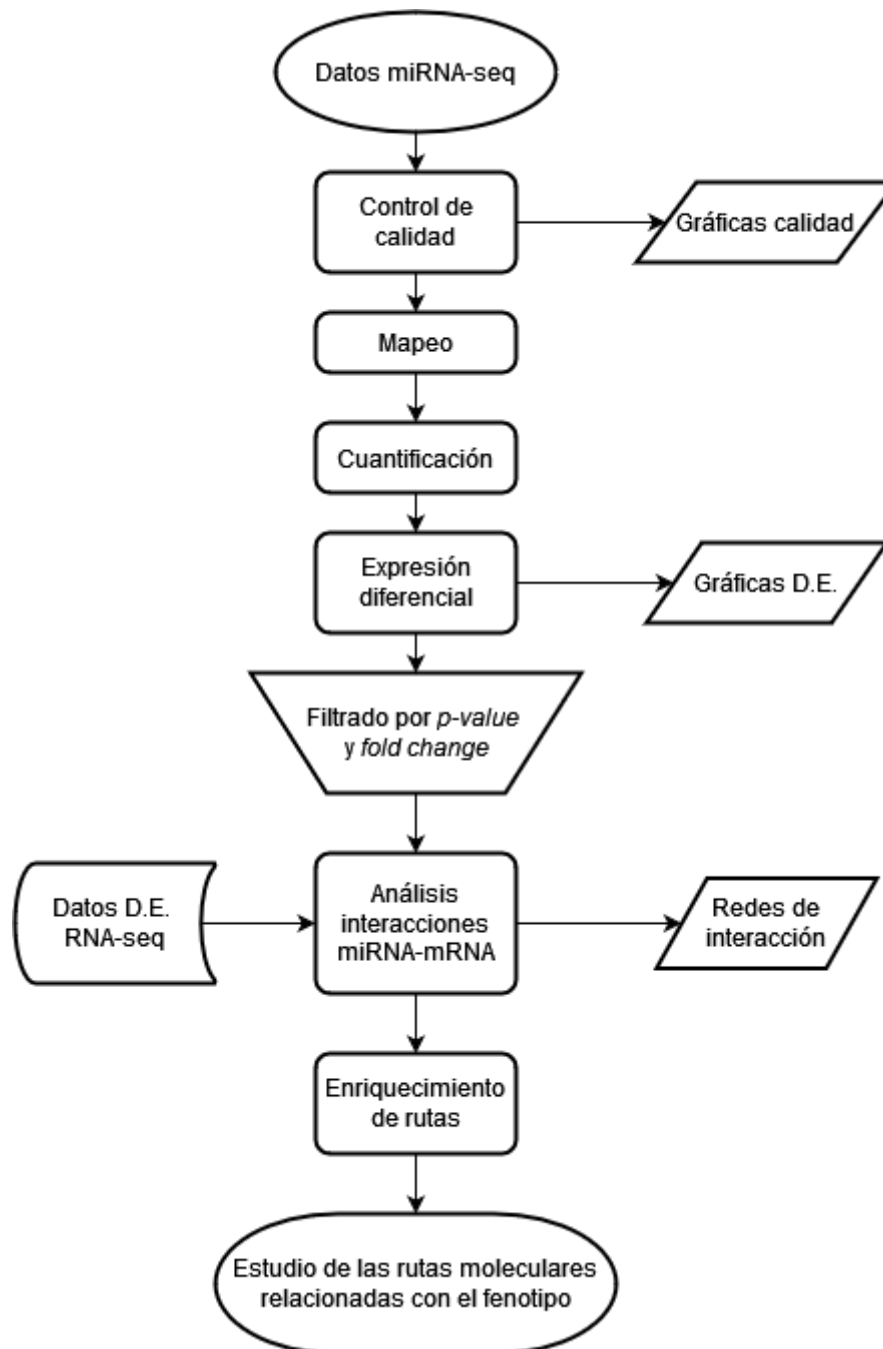


Figura 4. Diagrama representando el flujo de trabajo seguido para el análisis de los datos de miRNA-seq. Realización propia en draw.io (<https://app.diagrams.net>).

4. RESULTADOS

4.1. Análisis bioinformático de los datos de miRNA-seq

Se comienza con la realización del control de calidad utilizando la herramienta mirnaQC para los FASTQs proporcionados para las réplicas de las tres condiciones. Esta herramienta muestra en qué cuartil están las distintas métricas calculadas al compararse con distintos conjuntos de datos, en este caso se estudian comparadas con muestras del mismo reino también con los adaptadores ya recortados. En la Figura 5 pueden verse las estadísticas básicas de los miRNAs secuenciados.

Sample Name	Raw reads	% Reads	% Dimers	% short reads	miRNA "peak"	Phred score
Chd4KO1_trimmed	3721209	71.2%	0.0%	3.9%	81.3%	34.0
Chd4KO2_trimmed	3286233	76.0%	0.0%	2.4%	81.9%	34.0
Chd4KO3_trimmed	2880506	76.2%	0.0%	2.8%	82.1%	34.0
DKO1_trimmed	2791269	67.0%	0.0%	4.1%	81.1%	34.0
DKO2_trimmed	3097405	67.8%	0.0%	2.8%	81.6%	34.0
DKO3_trimmed	3430034	72.3%	0.0%	2.9%	82.9%	34.0
WT1_trimmed	3280437	72.9%	0.0%	3.4%	81.7%	34.0
WT2_trimmed	3366850	74.2%	0.0%	2.5%	81.8%	34.0
WT3_trimmed	3529044	74.3%	0.0%	2.3%	81.9%	34.0

Figura 5. Tabla obtenida de mirnaQC que recoge las características principales de los *reads* subidos a la herramienta. Las columnas incluyen las lecturas en crudo, el porcentaje usado para el análisis después del filtrado, el porcentaje de lecturas menores a 2 nucleótidos, los *reads* entre 15 y 17 nucleótidos y en “*miRNA peak*” se ven aquellos con 21, 22 o 23 nucleótidos. La última indica la puntuación Phred media.

Los colores representan el cuartil al que perteneces los resultados al compararlo con otras muestras estudiadas que pertenecen también al reino animal procesadas sin adaptadores.

Se comprueba así que se obtienen resultados similares para las distintas réplicas, y estas se distribuyen de manera correcta al realizar un análisis de componentes principales (Fig. 14 en Anexo I), por lo que se mantuvieron todas ellas para realizar el estudio. A pesar de no encontrarse en el primer cuartil al ser comparados con otros experimentos, y de que se pierda un 30% de las lecturas; los porcentajes y conteos son correctos para proceder a su uso, con más de un 80% de secuencias con la longitud indicada y una puntuación Phred de 34, que significa que la base secuenciada es la correcta con una probabilidad del 99,96%.

En la Figura 15 del Anexo I pueden verse también el resto de gráficas obtenidas con mirnaQC, que confirman que las métricas de complejidad de la librería se encuentran en su mayoría en el primer cuartil y que no existen secuencias de menor longitud a 15

nucleótidos. También puede verse que tan sólo entre el 10-15% de *reads* no han sido mapeadas, y que la contaminación génica por virus y bacterias es muy baja.

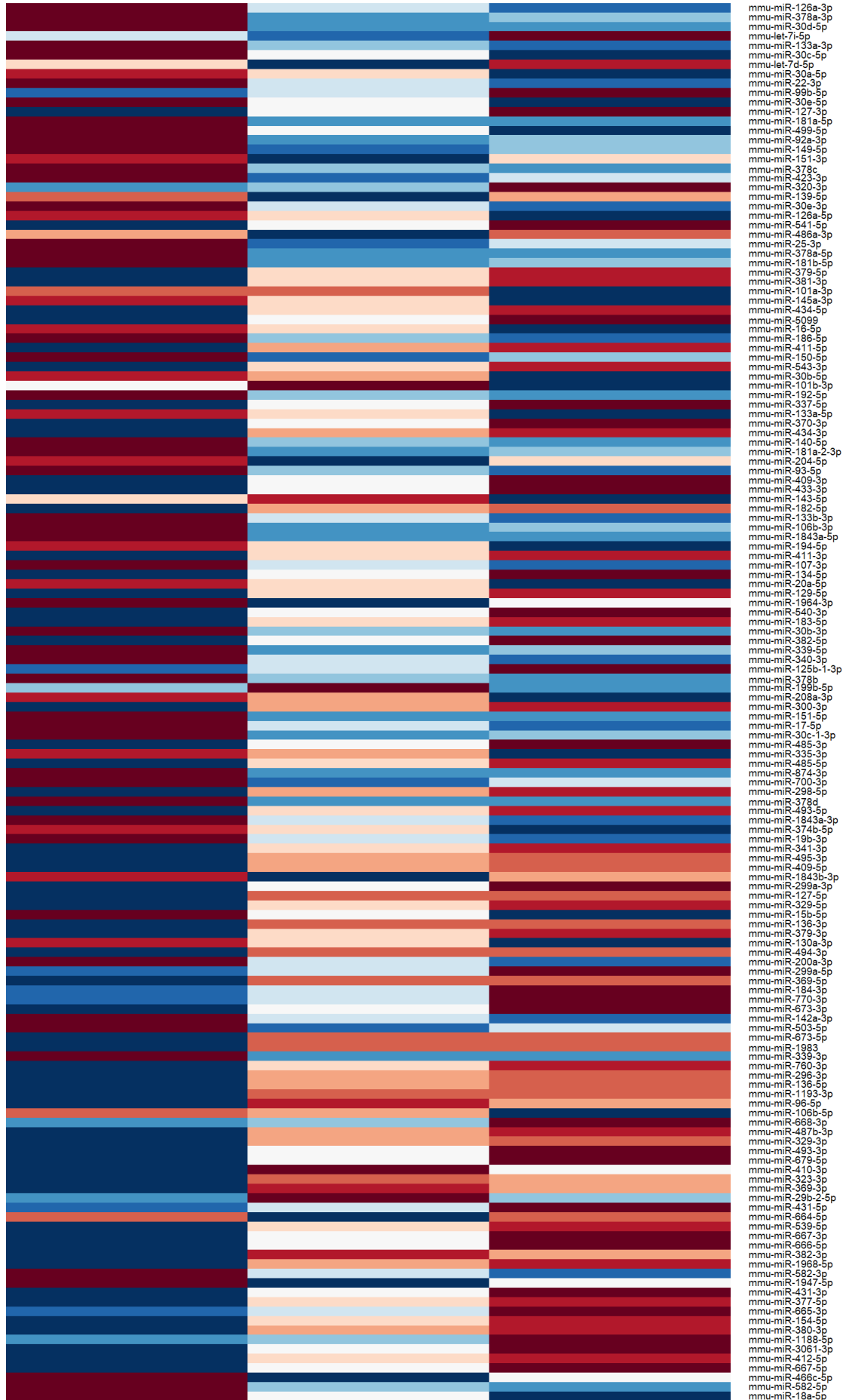
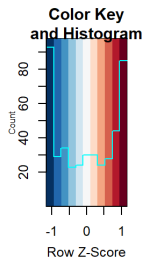
4.2. Expresión diferencial de miRNAs entre las distintas condiciones

Una vez comprobada la calidad e idoneidad de los datos obtenidos de la secuenciación, siguiendo el flujo de trabajo, se utiliza sRNAbench para realizar un análisis de expresión diferencial entre las distintas condiciones.

Como parámetros, se seleccionan los FASTQs, *Mus musculus* como especie e Illumina TrueSeq™ como protocolo. Para el filtrado por calidad, se utiliza un límite de una puntuación Phred de 20 filtrando por la puntuación mínima media. Se utiliza miRBase (Kozomara et al., 2019) como referencia y se alinea con bowtie, con un conteo mínimo de 2 lecturas.

Se obtienen los resultados de las distintas herramientas usadas por sRNAbench, y se seleccionan los de DESeq2, ya que contienen todos los miRNAs detectados por el resto. Después, se guarda el archivo que indica los miRNAs anotados junto con su p-valor y *fold change* (FC). Se filtran por su significancia, siendo el p-valor de todos los seleccionados de <0,05. El FC indica cómo de diferente es la expresión entre las dos condiciones estudiadas, y para este estudio se seleccionan FC superiores a 1,1 para la comparación entre *Chd4^{KO}* y WT y *dKO* y WT. Con FC negativo, indicando down-regulación, se seleccionan todos aquellos significativos, ya que filtrando por un FC < -1,1 se perdían miRNAs de interés estudiados con anterioridad. En el caso de *Chd4^{KO}* contra *dKO* se seleccionan todos aquellos significativos, ya que se obtienen muchos menos antes del filtrado.

En la Figura 6 puede verse el *heatmap* con todos los miRNAs seleccionados en cualquiera de las comparaciones. Puede verse que la expresión de los miRNA en los ratones *Chd4^{KO}* y *dKO* son más similares, y que existen diferencias significativas.



- mmu-miR-126a-3p
- mmu-miR-378a-3p
- mmu-miR-30d-5p
- mmu-let-7f-5p
- mmu-miR-133a-3p
- mmu-miR-30c-5p
- mmu-let-7d-5p
- mmu-miR-30a-5p
- mmu-miR-22-3p
- mmu-miR-99b-5p
- mmu-miR-30e-3p
- mmu-miR-127-3p
- mmu-miR-181a-5p
- mmu-miR-499-5p
- mmu-miR-92a-3p
- mmu-miR-149-5p
- mmu-miR-151-3p
- mmu-miR-378c
- mmu-miR-423-3p
- mmu-miR-332-3p
- mmu-miR-139-5p
- mmu-miR-30e-3p
- mmu-miR-126a-5p
- mmu-miR-541-5p
- mmu-miR-489a-3p
- mmu-miR-25-3p
- mmu-miR-378a-5p
- mmu-miR-181b-5p
- mmu-miR-379-5p
- mmu-miR-381-3p
- mmu-miR-101a-3p
- mmu-miR-145a-3p
- mmu-miR-434-5p
- mmu-miR-5099
- mmu-miR-16-3p
- mmu-miR-186-5p
- mmu-miR-411-5p
- mmu-miR-150-5p
- mmu-miR-543-3p
- mmu-miR-30b-5p
- mmu-miR-101b-3p
- mmu-miR-192-5p
- mmu-miR-337-5p
- mmu-miR-1338a-5p
- mmu-miR-370-3p
- mmu-miR-434-3p
- mmu-miR-140-5p
- mmu-miR-181a-2-3p
- mmu-miR-204-5p
- mmu-miR-93-5p
- mmu-miR-409-3p
- mmu-miR-433-3p
- mmu-miR-143-5p
- mmu-miR-182-5p
- mmu-miR-133b-3p
- mmu-miR-106b-3p
- mmu-miR-1843a-5p
- mmu-miR-194-5p
- mmu-miR-411-3p
- mmu-miR-107-3p
- mmu-miR-134-5p
- mmu-miR-208a-5p
- mmu-miR-129-5p
- mmu-miR-1964-3p
- mmu-miR-540-3p
- mmu-miR-193-5p
- mmu-miR-30b-3p
- mmu-miR-382-5p
- mmu-miR-339-5p
- mmu-miR-340-3p
- mmu-miR-125b-1-3p
- mmu-miR-378b
- mmu-miR-199b-5p
- mmu-miR-208a-3p
- mmu-miR-300-3p
- mmu-miR-151-5p
- mmu-miR-17-5p
- mmu-miR-30c-1-3p
- mmu-miR-485-3p
- mmu-miR-336-3p
- mmu-miR-485-5p
- mmu-miR-874-3p
- mmu-miR-700-3p
- mmu-miR-298-5p
- mmu-miR-378d
- mmu-miR-493-5p
- mmu-miR-1843a-3p
- mmu-miR-374b-5p
- mmu-miR-19b-3p
- mmu-miR-341-3p
- mmu-miR-495-3p
- mmu-miR-409-5p
- mmu-miR-1843b-3p
- mmu-miR-289a-3p
- mmu-miR-127-5p
- mmu-miR-329-5p
- mmu-miR-15b-5p
- mmu-miR-136-3p
- mmu-miR-379-3p
- mmu-miR-130a-3p
- mmu-miR-494-3p
- mmu-miR-2008-3p
- mmu-miR-289a-5p
- mmu-miR-369-5p
- mmu-miR-184-3p
- mmu-miR-770-3p
- mmu-miR-673-3p
- mmu-miR-142a-3p
- mmu-miR-503-5p
- mmu-miR-673-5p
- mmu-miR-1983
- mmu-miR-339-5p
- mmu-miR-760-3p
- mmu-miR-298-3p
- mmu-miR-136-5p
- mmu-miR-1193-3p
- mmu-miR-96-5p
- mmu-miR-106b-5p
- mmu-miR-668-3p
- mmu-miR-487b-3p
- mmu-miR-329-3p
- mmu-miR-493-3p
- mmu-miR-679-5p
- mmu-miR-410-3p
- mmu-miR-323-3p
- mmu-miR-362-3p
- mmu-miR-29b-2-5p
- mmu-miR-431-5p
- mmu-miR-664-5p
- mmu-miR-539-5p
- mmu-miR-667-3p
- mmu-miR-666-5p
- mmu-miR-382-3p
- mmu-miR-1969-5p
- mmu-miR-582-3p
- mmu-miR-1947-5p
- mmu-miR-431-3p
- mmu-miR-377-5p
- mmu-miR-665-3p
- mmu-miR-154-5p
- mmu-miR-380-3p
- mmu-miR-1188-5p
- mmu-miR-306-3p
- mmu-miR-412-5p
- mmu-miR-667-5p
- mmu-miR-466c-5p
- mmu-miR-582-5p
- mmu-miR-18a-5p

Figura 6. *Heatmap* de la media de los conteos normalizados para las distintas condiciones para los miRNAs seleccionados como significativos. En azul se indica una expresión menor a la media y en rojo mayor, correlacionando esta medida con la intensidad del color. Elaboración propia en R con *gplot*.

4.3. Genes diana de los miRNA expresados diferencialmente

Tras seleccionar los miRNAs a estudiar para cada condición según su FC y p-valor, se buscan las interacciones detectadas con los genes con un valor $p < 0,05$ y un FC $> 1,5$ o $< -1,5$ en el estudio de expresión diferencial génica realizado en Hidalgo Estévez, 2022 utilizando las herramientas mencionadas, el paquete de R *multiMiR*, así como *miRTarVis* y *miRTarVis+*.

Se incorporan a un mismo conjunto de datos las interacciones recogidas de todos ellos, seleccionando en *multiMiR* la opción de predicción tan solo para *Chd4^{KO}* vs *dKO* para poder estudiar más conexiones, aunque no estén aún validadas.

Para poder proseguir, se obtienen en R los identificadores Entrez de todos los genes a estudiar con los paquetes indicados previamente.

4.4. Análisis de enriquecimiento

Con el fin de identificar las interacciones relevantes para el fenotipo en estudio, se continúa con un análisis de enriquecimiento. Para ello, se introducen primero en *g:GOST* los identificadores de los genes que interactúan con los miRNAs seleccionados.

De los resultados detallados se seleccionan aquellos que se considera que tienen relación directa con el músculo cardíaco, aunque otros muchos estén involucrados en estos procesos, como los canales de sodio y potasio en la transmisión de impulsos eléctricos. En las siguientes gráficas pueden verse los términos elegidos para *Chd4^{KO}* vs WT (Fig. 7a), *dKO* vs WT (Fig. 7b) y *Chd4^{KO}* vs *dKO* (Fig. 7c); mientras que en el Anexo II pueden verse las listas completas de resultados también para *Chd4^{KO}* vs WT (Fig. 16), *dKO* vs WT (Fig. 17) y *Chd4^{KO}* vs *dKO* (Fig. 18).



a)



b)

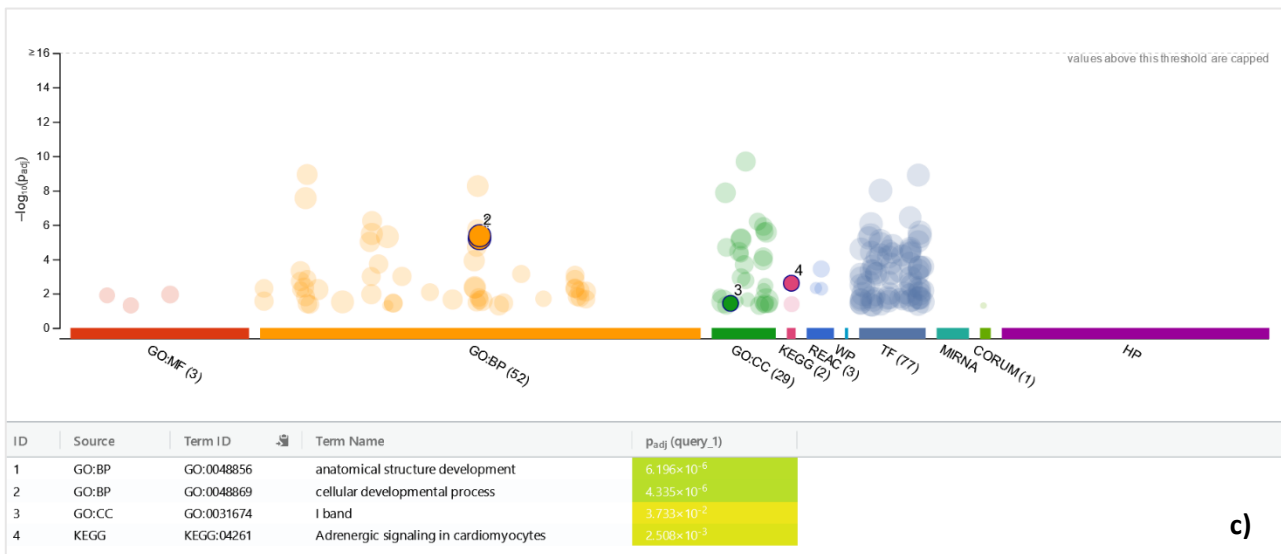
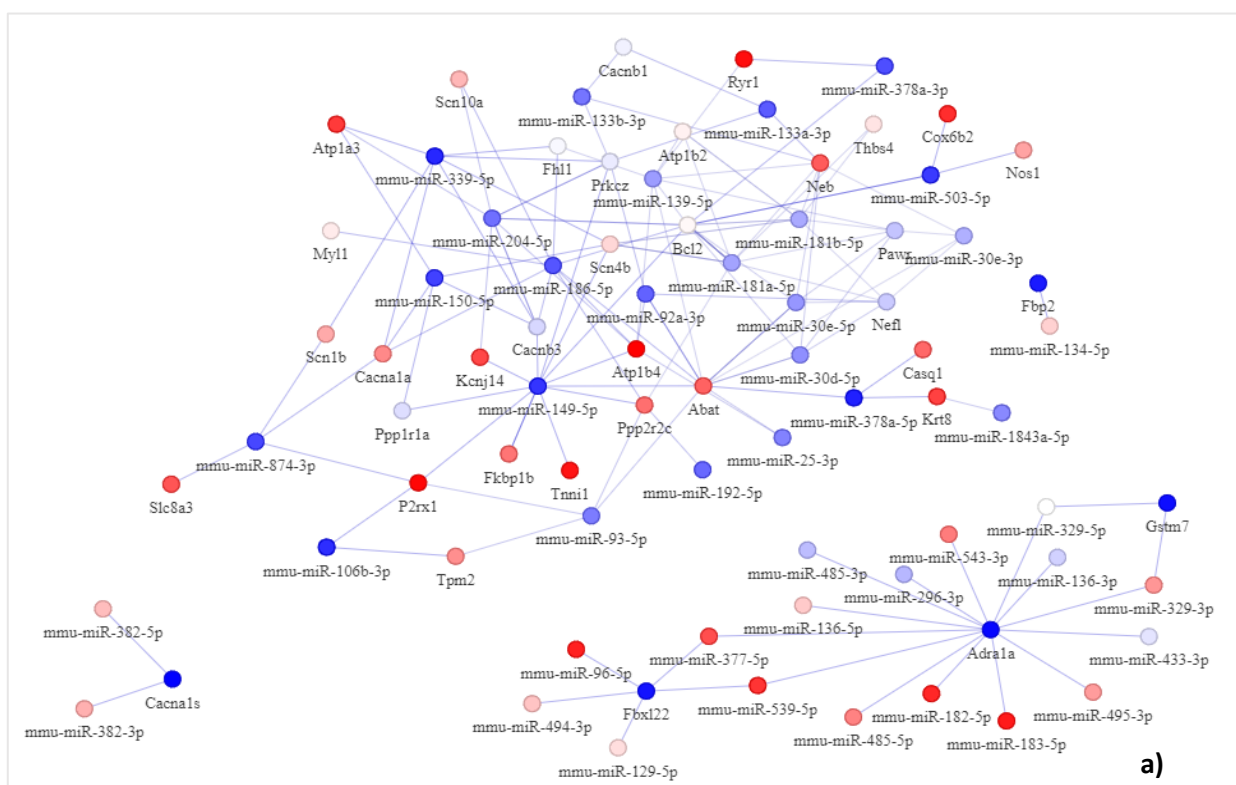


Figura 7. Gráficas creadas por gProfiler representando el logaritmo del p-valor de los distintos términos seleccionados como enriquecidos para los genes introducidos para *Chd4^{KO}* vs WT (a), *dKO* vs WT (b) y *Chd4^{KO}* vs *dKO* (c). Los puntos seleccionados son los listados en las tablas que las acompañan, junto con su p-valor y la base de datos de la que proceden: GO, KEGG, Reactome (REAC), WikiPathways (WP) y Human Phenotype Ontology (HP).

Se pueden descargar las listas de genes que apoyan cada uno de los términos enriquecidos, que se pasarán por R para volver a obtener el nombre de los genes para la representación con los miRNAs utilizando el paquete igraph (Fig. 8).



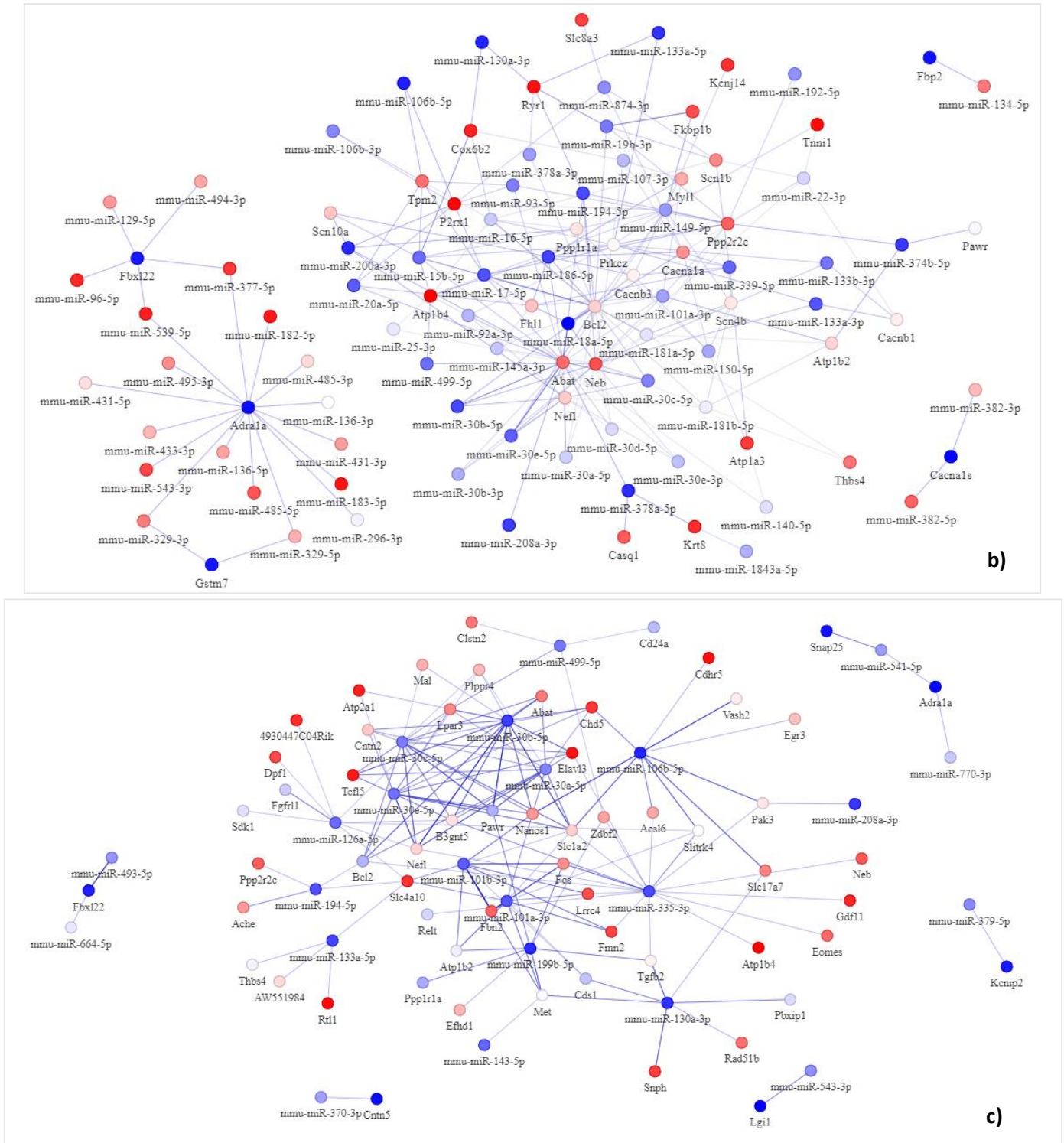


Figura 8. Redes de interacción para los miRNAs y genes significativos y enriquecidos en *Chd4*^{KO} vs WT (a), *dKO* vs WT (b) y *Chd4*^{KO} vs *dKO* (c), siendo el color de los nodos representativo del FC correspondiente, siendo los azules los más negativos y los rojos los más positivos. Elaboración propia usando el paquete igraph.

4.5. Rutas de señalización

Los conjuntos de genes significativos que interactúan con alguno de los miRNAs fueron también introducidos en la herramienta DAVID, que proporciona información de cuáles de ellos se ven alterados en las rutas detectadas como enriquecidas.

Al realizar un *clustering* de la anotación funcional de los genes, se obtienen los siguientes resultados para *Chd4^{KO}* vs WT (Fig. 9).

Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 3.87	G		Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	Adrenergic signaling in cardiomyocytes	RT		14	5.0E-7	1.2E-4
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	Cardiac muscle contraction	RT		9	4.2E-5	3.5E-3
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	cGMP-PKG signaling pathway	RT		6	1.2E-1	6.6E-1

Similarity Score: ■ Very High (0.75-1) ■ High (0.5-0.75) ■ Moderate (0.25-0.5) ■ Low (<0.25)

#	Category	Term	Kappa
1	KEGG_PATHWAY	Adrenergic signaling in cardiomyocytes	1.00
2	KEGG_PATHWAY	Cardiac muscle contraction	0.68
3	KEGG_PATHWAY	cGMP-PKG signaling pathway	0.59
4	KEGG_PATHWAY	Dilated cardiomyopathy	0.49
5	KEGG_PATHWAY	Hypertrophic cardiomyopathy	0.49
6	GOTERM_BP_DIRECT	sodium ion transport	0.46
7	KEGG_PATHWAY	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	0.43
8	GOTERM_BP_DIRECT	calcium ion transport into cytosol	0.43
9	KEGG_PATHWAY	Salivary secretion	0.41
10	KEGG_PATHWAY	Endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption	0.41
11	UP_KW_BIOLOGICAL_PROCESS	#	0.39
12	KEGG_PATHWAY	Aldosterone synthesis and secretion	0.38
13	KEGG_PATHWAY	Insulin secretion	0.38
14	UP_KW_BIOLOGICAL_PROCESS	#	0.38
15	GOTERM_BP_DIRECT	calcium ion transmembrane transport	0.38
16	UP_KW_LIGAND	#	0.38
17	KEGG_PATHWAY	Mineral absorption	0.36
18	KEGG_PATHWAY	Protein digestion and absorption	0.36
19	GOTERM_MF_DIRECT	protein heterodimerization activity	0.36
20	GOTERM_BP_DIRECT	calcium ion transport	0.36
21	GOTERM_CC_DIRECT	T-tubule	0.36
22	UP_KW_BIOLOGICAL_PROCESS	#	0.36
23	GOTERM_MF_DIRECT	voltage-gated ion channel activity	0.34
24	UP_KW_MOLECULAR_FUNCTION	#	0.34
25	GOTERM_BP_DIRECT	regulation of ion transmembrane transport	0.34

Figura 9. Resultados del programa DAVID para el enriquecimiento funcional de los genes que interactúan con los miRNAs significativos para *Chd4^{KO}* vs WT. Se muestra el *cluster* número 2, con una puntuación de enriquecimiento de 3,87 y p-valores significativos, y debajo la ampliación de este mismo incluyendo todos los términos agrupados.

Los resultados para esta comparación muestran ciertas rutas implicadas que tienen relación con el fenotipo que se desea explicar. Las dos primeras, señalización adrenérgica en cardiomiocitos y contracción del músculo cardíaco, con p-valor más bajo, pueden verse en detalle en la Figura 10, acompañadas por la tabla (Tabla 1) que indica los genes cuya expresión es distinta en una o ambas rutas, así como los miRNA que interactúan con los mismos.

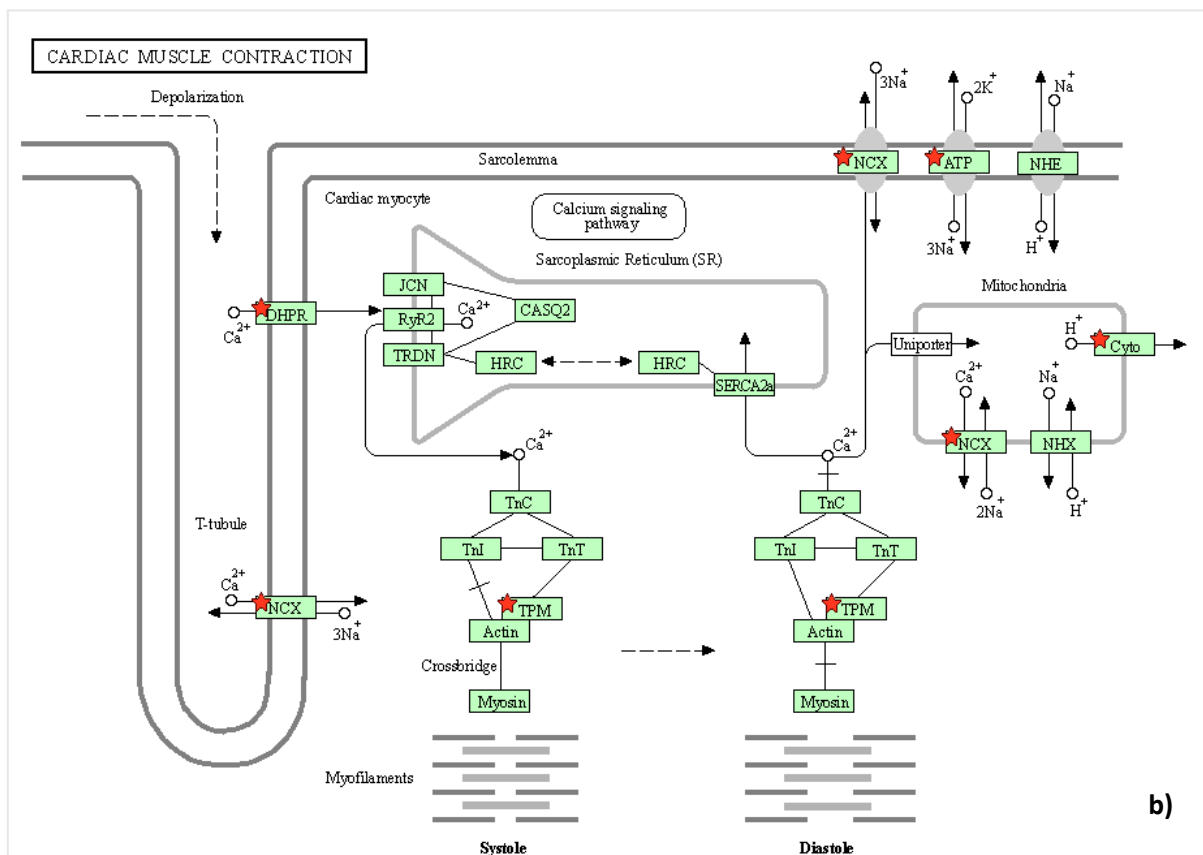
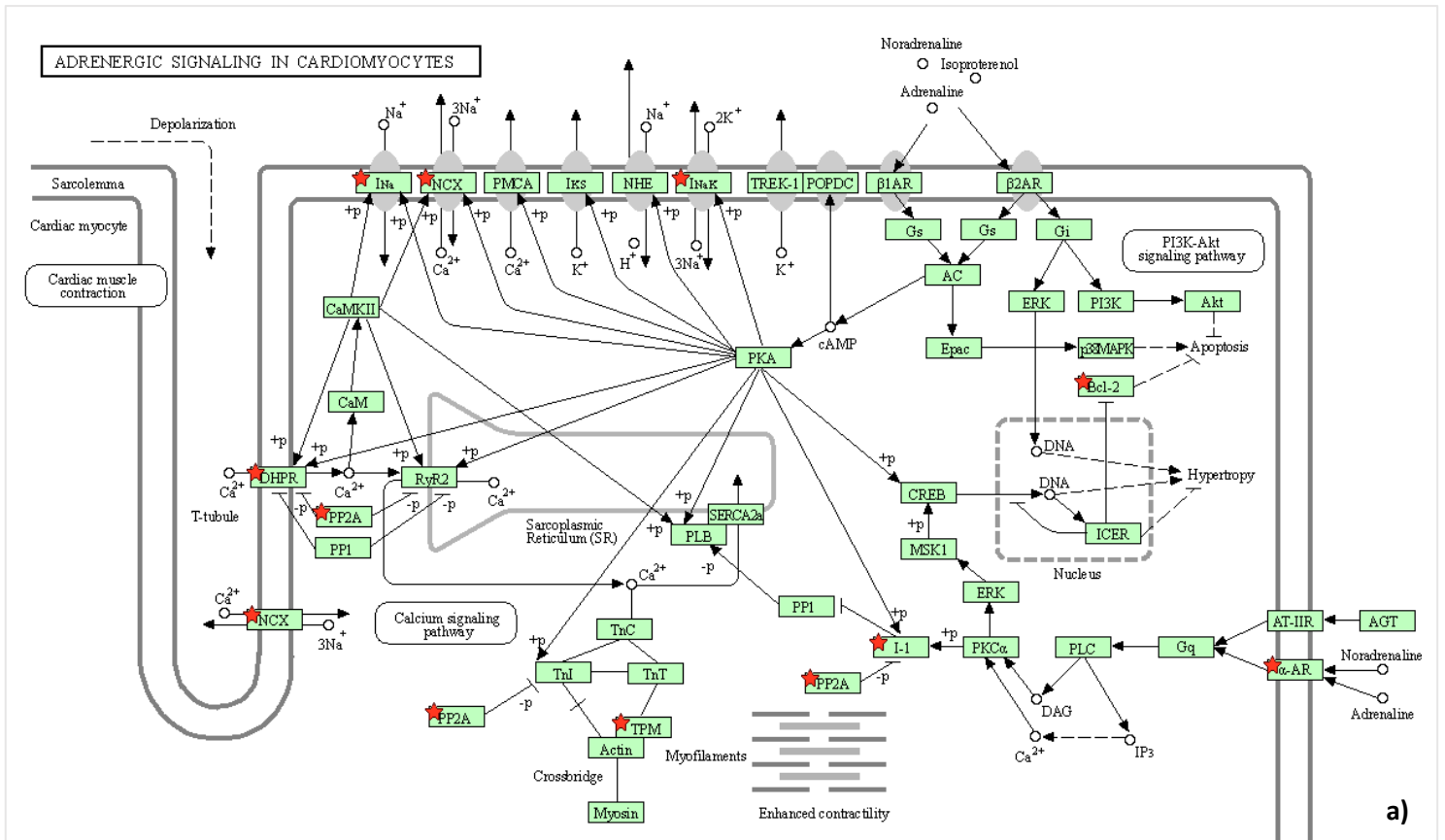


Figura 10. Rutas representadas en KEGG para a) la señalización adrenérgica en cardiomiocitos y b) la contracción del músculo cardíaco. En rojo se marcan los pasos que se están viendo alterados.

Gen	miRNAs
<i>Adra1</i>	mmu-miR-136-3p mmu-miR-136-5p mmu-miR-182-5p mmu-miR-183-5p mmu-miR-296-3p mmu-miR-329-3p mmu-miR-329-5p mmu-miR-377-5p mmu-miR-433-3p mmu-miR-485-3p mmu-miR-485-5p mmu-miR-495-3p mmu-miR-539-5p mmu-miR-543-3p
<i>Atp1b4</i>	mmu-miR-139-5p mmu-miR-149-5p mmu-miR-186-5p mmu-miR-204-5p mmu-miR-25-3p mmu-miR-92a-3p
<i>Atp1a3</i>	mmu-miR-150-5p mmu-miR-204-5p mmu-miR-339-5p
<i>Atp1b2</i>	mmu-miR-139-5p mmu-miR-181a-5p mmu-miR-181b-5p
<i>Bcl2</i>	mmu-miR-139-5p mmu-miR-149-5p mmu-miR-181a-5p mmu-miR-181b-5p mmu-miR-186-5p mmu-miR-204-5p mmu-miR-30d-5p mmu-miR-30e-5p mmu-miR-378a-3p mmu-miR-503-5p
<i>Cacna1s</i>	mmu-miR-382-3p mmu-miR-382-5p
<i>Cacnb1</i>	mmu-miR-133a-3p mmu-miR-133b-3p
<i>Cacnb3</i>	mmu-miR-149-5p mmu-miR-150-5p mmu-miR-186-5p mmu-miR-204-5p mmu-miR-339-5p
<i>Cox6b2</i>	mmu-miR-503-5p
<i>Ppp1r1a</i>	mmu-miR-149-5p mmu-miR-150-5p

<i>Ppp2r2c</i>	mmu-miR-149-5p mmu-miR-181a-5p mmu-miR-186-5p mmu-miR-192-5p mmu-miR-93-5p
<i>Scn4b</i>	mmu-miR-149-5p mmu-miR-150-5p mmu-miR-181a-5p mmu-miR-181b-5p mmu-miR-339-5p
<i>Scn1b</i>	mmu-miR-339-5p mmu-miR-874-3p
<i>Slc8a3</i>	mmu-miR-874-3p
<i>Tpm2</i>	mmu-miR-106b-3p mmu-miR-93-5p

Tabla 1. Lista de genes que pertenecen a las rutas de señalización adrenérgica en cardiomiocitos y contracción del músculo cardíaco junto con los miRNAs estudiados con los que interaccionan para la condición de *Chd4^{KO}* vs WT. Se limita el estudio a aquellas parejas con regulación en dirección opuesta, para la cual la expresión del gen se vea aumentada y la del miRNA disminuida o viceversa.

A continuación, se comprueba esto mismo para la condición de *dKO* vs WT. El *cluster* seleccionado aparece en la Figura 11, pudiendo verse que también se encuentran en esta lista grupos de genes relacionados con la contracción muscular. El listado de genes que se incluyen se indica en la Tabla 2, de nuevo junto con los miRNAs relacionados.

Annotation Cluster 6	Enrichment Score: 2.79			Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_DIRECT	regulation of muscle contraction	RT		6	9.9E-5	2.3E-2
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_DIRECT	skeletal muscle contraction	RT		5	3.2E-3	2.5E-1
<input type="checkbox"/> GOTERM_CC_DIRECT	troponin complex	RT		3	1.3E-2	1.4E-1

Similarity Score: Very High (0.75-1) High (0.5-0.75) Moderate (0.25-0.5) Low (<0.25)

#	Category	Term	Kappa
1	GOTERM_BP_DIRECT	regulation of muscle contraction	1.00
2	GOTERM_CC_DIRECT	troponin complex	0.66
3	GOTERM_BP_DIRECT	skeletal muscle contraction	0.54
4	INTERPRO	Troponin	0.50
5	GOTERM_CC_DIRECT	terminal cisterna	0.50
6	GOTERM_CC_DIRECT	T-tubule	0.49
7	UP_KW_MOLECULAR_FUNCTION	#	0.49
8	GOTERM_CC_DIRECT	sarcoplasmic reticulum membrane	0.44
9	GOTERM_CC_DIRECT	I band	0.39
10	GOTERM_BP_DIRECT	muscle contraction	0.39
11	UP_KW_CELLULAR_COMPONENT	#	0.36
12	GOTERM_BP_DIRECT	sarcomere organization	0.36
13	KEGG_PATHWAY	Motor proteins	0.34
14	GOTERM_MF_DIRECT	calcium-dependent protein binding	0.33
15	UP_SEQ_FEATURE	DOMAIN:EF-hand	0.33
16	GOTERM_CC_DIRECT	Z disc	0.30

Figura 11. Resultados de la herramienta DAVID para el enriquecimiento funcional de la lista de genes que interaccionan con los miRNAs significativos en la comparación de *dKO* vs WT. Se selecciona el *cluster* número 6, con una puntuación de enriquecimiento de 2,79 y p-valores significativos. Después se amplían los términos pertenecientes a este grupo.

Gen	miRNAs
<i>Adra1</i>	mmu-miR-136-3p mmu-miR-136-5p mmu-miR-182-5p mmu-miR-183-5p mmu-miR-296-3p mmu-miR-329-3p mmu-miR-329-5p mmu-miR-377-5p mmu-miR-431-3p mmu-miR-431-5p mmu-miR-433-3p mmu-miR-485-3p mmu-miR-485-5p mmu-miR-495-3p mmu-miR-539-5p mmu-miR-543-3p
<i>Myh8</i>	mmu-miR-149-5p mmu-miR-150-5p mmu-miR-186-5p mmu-miR-18a-5p mmu-miR-192-5p mmu-miR-194-5p mmu-miR-25-3p mmu-miR-499-5p mmu-miR-92a-3p
<i>Stac2</i>	mmu-miR-133a-3p mmu-miR-133a-5p mmu-miR-133b-3p
<i>Ryr1</i>	mmu-miR-130a-3p mmu-miR-133a-5p mmu-miR-194-5p mmu-miR-19b-3p mmu-miR-378a-3p
<i>Casq1</i>	mmu-miR-378a-5p
<i>Tnnc2</i>	mmu-miR-22-3p
<i>Tnnt3</i>	mmu-miR-22-3p
<i>Tnni1</i>	mmu-miR-149-5p mmu-miR-22-3p

Tabla 2. Tabla que recoge los genes que se encuentran alterados con relación a los términos de la regulación de la contracción muscular, la contracción muscular esquelética y el complejo de troponina junto con los miRNA significativos regulados en dirección opuesta con los que interaccionan en el estudio de *dKO* vs *WT*.

Por último, se estudian también con DAVID los genes con interacciones predichas para los miRNAs significativos en la comparación de *Chd4^{KO}* vs *dKO*. En la Figura 12 puede verse el *cluster* que contiene términos relacionados con el músculo cardíaco que es además significativo.

Annotation Cluster 9	Enrichment Score: 1.47	G	Count	P_Value	Benjamini
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	Adrenergic signaling in cardiomyocytes	RT	7	3.2E-5	5.4E-3
<input type="checkbox"/> UP_KW_LIGAND	Sodium	RT	4	1.1E-2	1.3E-1
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_DIRECT	sodium ion transport	RT	4	1.1E-2	6.2E-1
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_DIRECT	potassium ion transport	RT	4	1.1E-2	6.2E-1
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	cGMP-PKG signaling pathway	RT	4	3.2E-2	5.8E-1
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	Salivary secretion	RT	3	4.6E-2	5.8E-1
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	Cardiac muscle contraction	RT	3	4.7E-2	5.8E-1
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	cAMP signaling pathway	RT	4	6.0E-2	5.9E-1
<input type="checkbox"/> GOTERM_MF_DIRECT	symporter activity	RT	3	6.8E-2	1.0E0
<input type="checkbox"/> UP_KW_BIOLOGICAL_PROCESS	Sodium transport	RT	3	6.9E-2	7.3E-1
<input type="checkbox"/> UP_KW_BIOLOGICAL_PROCESS	Symport	RT	3	7.1E-2	7.3E-1
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	Pancreatic secretion	RT	3	7.6E-2	5.9E-1
<input type="checkbox"/> KEGG_PATHWAY	Thyroid hormone signaling pathway	RT	3	8.3E-2	5.9E-1
<input type="checkbox"/> UP_KW_BIOLOGICAL_PROCESS	Ion transport	RT	6	8.4E-2	7.3E-1
<input type="checkbox"/> GOTERM_BP_DIRECT	ion transport	RT	5	1.5E-1	1.0E0
<input type="checkbox"/> UP_KW_BIOLOGICAL_PROCESS	Transport	RT	8	6.4E-1	1.0E0

Figura 12. Listado de términos relacionados con el fenotipo anotados por la herramienta DAVID para el conjunto de genes predichos para *Chd4^{KO}* vs *dKO*. Se muestran los significativos del *cluster* 9 que tiene una puntuación de enriquecimiento de 1,47.

Los genes por los que aparece la señalización adrenérgica en cardiomiocitos y la contracción cardíaca son los mismos que los listados anteriormente, pero los miRNAs que se listaron como significativamente expresados para la condición actual que tienen relación con ellos difieren (Tabla 3).

Gen	miRNAs
<i>Adra1</i>	mmu-miR-541-5p mmu-miR-770-3p
<i>Atp1b4</i>	mmu-miR-335-3p
<i>Atp1b2</i>	mmu-miR-101b-3p mmu-miR-101a-3p mmu-miR-199b-5p
<i>Bcl2</i>	mmu-miR-194-5p mmu-miR-335-3p mmu-miR-30a-5p mmu-miR-30b-5p mmu-miR-30c-5p mmu-miR-30e-5p
<i>Ppp1r1a</i>	mmu-miR-199b-5p
<i>Ppp2r2c</i>	mmu-miR-194-5p

Tabla 3. Genes y miRNAs con los que interaccionan cuya expresión aumenta o disminuye de forma opuesta para la condición de *Chd4^{KO}* vs *dKO* que pertenecen a las rutas de señalización adrenérgica en cardiomiocitos y contracción del músculo cardíaco.

De todos ellos, el único que aparece como validado en el programa multiMiR es mmu-miR-335-3p, cuyas interacciones confirmadas son con los genes *Dusp26*, *Tgfb2*, *Slc1a2*, *Mthfd2*, *Mgat3* y *Kcnf1*. Para todos ellos la validación se realizó mediante HITS-CLIP.

4.6. Identificación de miRNA y genes diana de interés biológico

Para poder concretar las parejas de posible interés relacionadas con el fenotipo estudiado en los ratones *knockout* se introducen las listas de genes creadas en Enrichr y las de miRNAs en miEAA.

Para los correspondientes a *Chd4^{KO}* vs WT destacan en la base de datos de ClinVar 2019 (Landrum et al., 2020) la miopatía congénita por desproporción del tipo de fibra y la miopatía nemalínica como términos enriquecidos. La base de datos OMIM Disease (Amberger & Hamosh, 2017) lista también la miopatía y en GeDiPNet 2023 (Kundu et al., 2022) tanto la miopatía congénita como la tubular agregada. Los genes que apoyan estos términos enriquecidos pueden verse en la Tabla 4 junto con los miRNAs con los que se han relacionado.

En miEAA destaca de la categoría de órganos de la base de datos de miRWalk (Sticht et al., 2018) la relación de mmu-miR-181a-5p, mmu-miR-133a-3p y mmu-miR-133b-3p con los mioblastos.

Gen	miRNAs
<i>Tpm2</i>	mmu-miR-106b-3p mmu-miR-93-5p
<i>Neb</i>	mmu-miR-133a-3p mmu-miR-133b-3p mmu-miR-139-5p mmu-miR-181a-5p mmu-miR-181b-5p mmu-miR-30d-5p mmu-miR-30e-3p mmu-miR-30e-5p
<i>Ryr1</i>	mmu-miR-139-5p mmu-miR-378a-3p
<i>Fhl1</i>	mmu-miR-139-5p mmu-miR-186-5p mmu-miR-339-5p
<i>Myl1</i>	mmu-miR-186-5p

Tabla 4. Genes obtenidos de las gráficas de *clusters* de Enrichr para los términos enriquecidos de las bases de datos ClinVar, OMIM y GeDiPNet al seleccionar la pestaña de enfermedades en *Chd4^{KO}* vs WT y miRNAs con regulación en dirección opuesta para los que se ha detectado una interacción.

Todos estos resultados también aparecen con el listado de genes de *dKO* vs WT, añadiendo infarto de miocardio en la base de datos dbGaP (Tryka et al., 2014) (Tabla 5). En miEAA no aparece ningún término enriquecido tan estrechamente relacionado, aunque sí es significativa la ruta en miRWalk de las uniones adherentes.

Gen	miRNAs
<i>Creb3l1</i>	mmu-miR-140-5p mmu-miR-18a-5p mmu-miR-19b-3p
<i>Dcst1</i>	mmu-miR-107-3p mmu-miR-192-5p
<i>Cdh8</i>	mmu-miR-101a-3p mmu-miR-106b-3p mmu-miR-106b-5p mmu-miR-130a-3p mmu-miR-140-5p mmu-miR-149-5p mmu-miR-17-5p mmu-miR-181a-5p mmu-miR-181b-5p mmu-miR-186-5p mmu-miR-192-5p mmu-miR-19b-3p mmu-miR-208a-3p mmu-miR-20a-5p mmu-miR-25-3p mmu-miR-30a-5p mmu-miR-30b-3p mmu-miR-30b-5p mmu-miR-30c-5p mmu-miR-30d-5p mmu-miR-30e-3p mmu-miR-30e-5p mmu-miR-92a-3p
<i>Arnt2</i>	mmu-miR-16-5p mmu-miR-181a-5p mmu-miR-181b-5p mmu-miR-19b-3p mmu-miR-22-3p mmu-miR-499-5p
<i>Sdk1</i>	mmu-miR-126a-5p mmu-miR-22-3p
<i>Cntn5</i>	mmu-miR-136-3p mmu-miR-136-5p mmu-miR-370-3p mmu-miR-381-3p mmu-miR-539-5p
<i>Grin2a</i>	mmu-miR-200a-3p mmu-miR-30b-3p

	mmu-miR-30b-5p mmu-miR-30c-5p
<i>Trpm3</i>	mmu-miR-129-5p mmu-miR-134-5p mmu-miR-154-5p mmu-miR-182-5p mmu-miR-183-5p mmu-miR-296-3p mmu-miR-379-3p mmu-miR-379-5p mmu-miR-410-3p mmu-miR-411-3p mmu-miR-411-5p mmu-miR-431-3p mmu-miR-431-5p mmu-miR-494-3p mmu-miR-495-3p mmu-miR-543-3p mmu-miR-96-5p

Tabla 5. Genes listados en la gráfica de *clusters* de Enrichr de los términos enriquecidos en dbGaP buscando en la sección de enfermedades para genes diferencialmente expresados en *dKO* vs WT.

Para los genes que interactúan con miR-335-3p, el único miRNA validado diferencialmente expresado entre *Chd4^{KO}* y *dKO*, aparecen enriquecidos en la base de datos de Orphanet Augmented 2021 (Orphanet, 2021) los términos destacables de miopatía congénita con oftalmoplejía o con inicio de tipo miasténico, miopatía congénita benigna del samaritano, fibrilación auricular familiar, miocardiopatía hipertrófica familiar aislada y aneurisma y disección aórtica torácica familiar.

Las interacciones de genes y miRNAs definidas como validadas por el programa multiMiR y seleccionadas en el análisis de enriquecimiento pueden observarse en las redes de interacción de la Figura 13. Sería de interés para descifrar los mecanismos estudiados validar estas interacciones en el laboratorio en los ratones mutados.

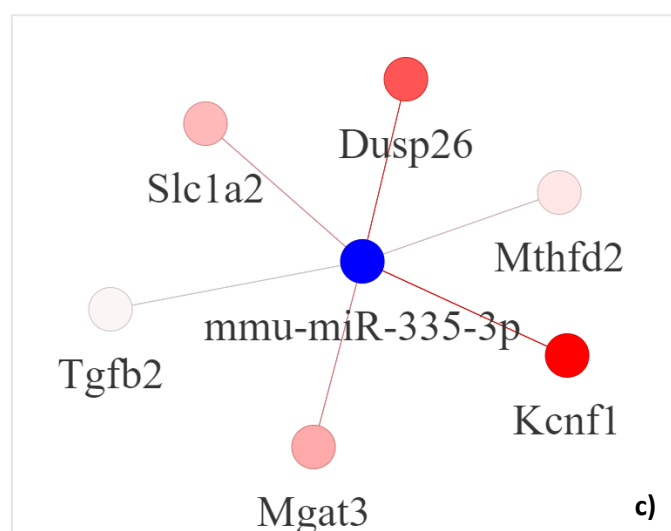
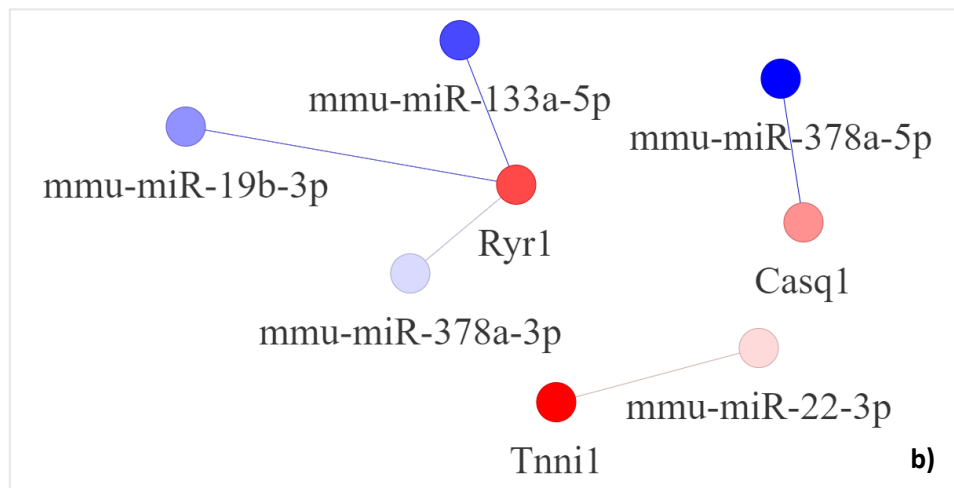
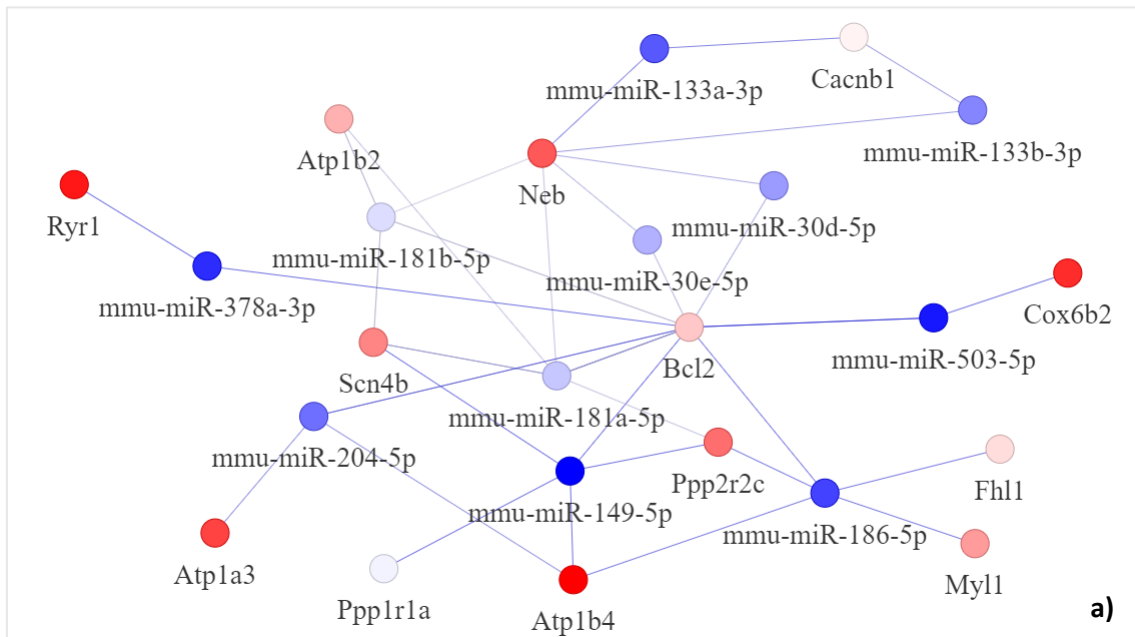


Figura 13. Gráficas de interacción que representan los miRNAs y genes significativos y enriquecidos con interacciones validadas en *Chd4^{KO}* vs WT (a), *dKO* vs WT (b) y *Chd4^{KO}* vs *dKO* (c), indicando el color de los nodos el FC correspondiente, representando los azules el extremo negativo de menor expresión y los rojos el positivo. Creado en R usando el paquete igraph.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se han estudiado los cambios en la expresión de miRNAs cardiacos en modelos de ratones KO condicionales, que presentan diferentes tipos de CVDs, tales como arritmias, fibrilación atrial, cardiomiopatías y muerte súbita. En particular, nos hemos centrado en estudiar qué papel tiene el remodelador de la cromatina Chd4, en cooperación con el TF ThPOK en estos procesos patológicos, haciendo hincapié en los miRNAs regulados por estas proteínas y el impacto transcripcional de su desregulación. Algunas de estas rutas, de hecho, han sido previamente validadas en determinados estudios en los últimos años (revisado en Siddeek et al., 2018).

Utilizando diferentes herramientas bioinformáticas se han analizado los datos de expresión diferencial de miRNA y mRNA y estudiado las posibles interacciones entre genes y miRNAs diferencialmente expresados en los corazones de los ratones *Chd4* cKO y en *Chd4* y *ThPOK* dKO con respecto a los ratones WT, con el objeto de poder definir parejas para las que la delección de *Chd4* (+/- *ThPOK*) haga que el miRNA se vea upregulado y el gen downregulado o, al contrario, indicando causalidad fenotípica.

Las listas de interacciones resultantes son extensas, por lo que nos ceñiremos en esta discusión a aquellas rutas validadas por el programa multiMiR o predichas por más de una base datos que interaccionen con genes asociados a CVDs según alguno de los análisis de enriquecimiento por función llevados a cabo y, en un caso, basándonos en publicaciones previas.

Dentro de este conjunto, podrían considerarse de mayor interés aquellos genes o miRNAs con FCs más extremos, como sería en *Chd4*^{KO} vs WT la pareja de *Atp1b4* y mmu-miR-149-5p. *Atp1b4* (ATPase Na⁺/K⁺ Transporting Family Member Beta) forma parte de la familia de las bombas de sodio-potasio y expresada en la membrana plasmática de los mamíferos, siendo esencial para la contracción muscular (Blake et al., 2021). Variaciones en la expresión de este gen ha sido previamente relacionado con el desarrollo de fibrilación auricular en humanos (Zhang et al., 2020), por lo que podría contribuir a explicar el fenotipo observado en los ratones mutados para simple y doble KO.

Al comparar ambas condiciones mutadas con WT, también aparece upregulado el gen *Ryr1* y downregulado el miRNA mmu-miR-378a-3p. *Ryr1* (*type 1 ryanodine receptor*) es también un gen crucial para la contracción del músculo esquelético, siendo un canal

de liberación de calcio intracelular. Su sobreexpresión llevaría a una sobrecarga de calcio en el corazón, que podría también estar relacionada con arritmias y rigidez muscular (Lawal et al., 2020), ya que en este órgano se expresa el otro miembro Ryr2.

El gen de interés *Sprr2f* (El Abdellaoui-Soussi y Gómez-del Arco, datos no publicados), aunque sí aparece en la predicciones del paquete multiMiR, esta no está validada, prediciéndose una interacción con los miRNA mmu-miR-874-3p y mmu-miR-339-5p en la comparación de genes upregulados y miRNAs downregulados de las dos condiciones, pero ninguno de ellos está diferencialmente expresado al compararlas entre sí.

Como miRNA destacable al comparar *Chd4^{KO}* con *dKO*, podría seleccionarse miR-335-3p, como único gen de la lista enriquecida con interacciones validadas. De los genes con los que interacciona, *Dusp26* y *Kcnf1* parecen los más relevantes. *Dusp26* se ha visto relacionado con la calcificación de la válvula aórtica (Wang et al., 2021), lo que no explica el fenotipo *per se*, pero puede contribuir al mismo.

Por otra parte, *Kcnf1* (*potassium voltage-gated channel, subfamily F, member 1*) es, como su nombre indica, un canal de potasio dependiente de voltaje, que se expresa de forma significativa en el corazón (Blake et al., 2021). Los canales de potasio son esenciales para para la repolarización de los cardiomiocitos y, por lo tanto, para el mantenimiento de un ritmo cardíaco estable, pudiendo relacionarlos con la fibrilación auricular (Rahm et al., 2018).

Respecto a los genes *Sprr1a* y al ya mencionado *Sprr2f*, la expresión aberrante de estas proteínas en el corazón de ratones KO probablemente sea la causante de una rigidez excesiva de los cardiomiocitos, ya que estas proteínas participan en el proceso de cornificación y rigidez de los queratinocitos de la piel. En cuanto a *Sprr1a*, a pesar de no haber sido detectada por el análisis de interacciones realizado para hallar parejas miRNA/mRNA, sí se ha detectado su upregulación en el KO *Chd4* simple, con un logFC de 7,64 (200 FC). Considerando el *dKO*, este gen se encuentra más sobreexpresado que en el *Chd4^{KO}* (logFC de 9,23 (603 FC)), lo cual podría explicar por qué el *dKO* presenta un fenotipo arrítmico más exacerbado que el KO simple (El Abdellaoui-Soussi et al., datos no publicados). Teniendo en cuenta esta falta de pareja de miRNA que explicara la expresión ectópica de *Sprr1a* en los ratones mutantes, revisando en la bibliografía, sí

que se ha descrito que este gen se regula por mmu-miR-150-5p (Aonuma et al., 2021). Del mismo modo, en nuestro caso, se registra una downregulación de mmu-miR-150-5p, con un logFC de -0,84 para *Chd4*^{KO} vs WT. Este miRNA también se encuentra downregulado en el dKO vs WT, pero no se detecta diferencialmente expresado entre ambos mutantes, lo que sugiere que hay otro nivel de regulación adicional que hace que *Spr1a* se exprese más en el dKO. Aunque esta interacción no esté listada en las bases de datos consultadas ni haya sido predicha por el paquete multiMiR, el hecho de que se haya estudiado experimentalmente y que esta proteína también se encuentre sobreexpresada en pacientes con infarto de miocardio (Aonuma et al, 2021; Kawaguchi et al., 2023), hace que esta ruta sea considerada quizá la más importante para su estudio posterior.

En definitiva, cabe destacar que, a la hora de traducir estudios sobre expresión génica, siempre se ha de tener en cuenta que la correlación entre la sobreexpresión de mRNA y la abundancia de la proteína correspondiente no siempre es total, por lo que es posible que no se estén detectando todas las proteínas de interés que pudieran estar relacionadas con los fenotipos descritos. Estos estudios, por tanto, abren nuevas vías de investigación en el estudio de las CVDs, no solo a nivel básico, si no con implicaciones futuras en el desarrollo de posibles dianas terapéuticas para su tratamiento.

6. CONCLUSIONES

El knockout de *Chd4* en el corazón de ratón provoca alteraciones en la expresión génica del tejido, desconfigurando el patrón de expresión de las proteínas de músculo esquelético en el mismo. Al eliminar en conjunto la expresión de *Chd4* con *ThPOK* se observa en los ratones un fenotipo de miocardiopatía, fibrosis, arritmias, así como muerte súbita más exacerbada que en el *Chd4*^{KO}.

En este trabajo se ha podido comprobar que existe una relación entre genes diferencialmente expresados entre mutantes y WT que pueden provocar estos fenotipos cuya regulación puede explicarse por la expresión de distintos miRNAs. Destacan las parejas de *Atp1b4* y mmu-miR-149-5p y *Ryr1* y mmu-miR-378a-3p, diferencialmente expresadas en ambas comparaciones con WT y relacionadas con arritmias. También, la interacción entre *Kcnf1* y miR-335-3p, único miRNA significativo

validado entre ambos mutantes, que podría causar fibrilación auricular. Además, el tándem miR-150-5p/Spr1a podría explicar el fenotipo más deletéreo en el caso del dKO, versus el Chd4^{ko}.

Las listas putativas obtenidas seguirán siendo estudiadas para, teniendo en cuenta lo descrito, realizar experimentos en el laboratorio que permitan confirmar las causalidades propuestas en los ratones de interés.

ABREVIATURAS

Chd4	<i>Chromatin Helicase DNA binding protein 4</i>
<i>Chd4^{KO}</i>	Knockout condicional, ratón con el gen para Chd4 eliminado solo en los cardiomiocitos.
cKO	Knockout condicional
CVD	Enfermedades cardiovasculares
<i>dKO</i>	Doble knockout, ratón con los genes para <i>Chd4</i> y <i>ThPOK</i> eliminados a la vez en los cardiomiocitos.
FC	<i>Fold Change</i>
GSEA	<i>Gene set Enrichment Analysis</i>
HITS-CLIP	<i>High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation</i>
Kcnf1	<i>Potassium voltage-gated channel, subfamily F, member 1</i>
miRNA	Micro-RNA
Sprr1a	<i>Small proline-rich protein 1A</i>
Sprr2f	<i>Small Proline Rich Protein 2F</i>
TF	Factor de transcripción
ThPOK	<i>T helper-inducing POZ Krüppel factor</i>
WT	<i>Wild type, silvestre</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes del complejo NuRD	7
Figura 2. Regulación génica dependiente de Chd4 en músculo	7
Figura 3. Biogénesis de los miRNAs	9
Figura 4. Flujo de trabajo del TFM	14
Figura 5. Métricas de calidad de los miRNAs	15
Figura 6. Heatmap de expresión de los miRNAs significativos	17
Figura 7. Gráficas g:Profiler para genes enriquecidos	19
Figura 8. Redes de interacción para los miRNAs y genes enriquecidos	20
Figura 9. Resultados DAVID enriquecimiento funcional para <i>Chd4^{KO}</i> vs WT	22
Figura 10. Rutas KEGG enriquecimiento funcional para <i>Chd4^{KO}</i> vs WT	23
Figura 11. Resultados DAVID enriquecimiento funcional para <i>dKO</i> vs WT	25
Figura 12. Resultados DAVID enriquecimiento funcional para <i>Chd4^{KO}</i> vs <i>dKO</i>	27
Figura 13. Redes de interacción para los miRNAs y genes validados	30
En anexos	
Figura 14. PCA para las réplicas	44
Figura 15. Gráficas de calidad para los miRNAs	44
Figura 16. Resultados completos de g:Profile para <i>Chd4^{KO}</i> vs WT	47
Figura 17. Resultados completos de g:Profile para <i>dKO</i> vs WT	53
Figura 18. Resultados completos de g:Profile para <i>Chd4^{KO}</i> vs <i>dKO</i>	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes y miRNA de rutas enriquecidas para <i>Chd4^{KO}</i> vs WT (DAVID)	24
Tabla 2. Genes y miRNA de rutas enriquecidas para <i>dKO</i> vs WT (DAVID)	26
Tabla 3. Genes y miRNA de rutas enriquecidas para <i>Chd4^{KO}</i> vs <i>dKO</i> (DAVID)	26
Tabla 4. Genes y miRNA de rutas enriquecidas para <i>Chd4^{KO}</i> vs WT (Enrichr)	28
Tabla 5. Genes y miRNA de rutas enriquecidas para <i>dKO</i> vs WT (Enrichr)	29

BIBLIOGRAFÍA

Akerberg, B. N., & Pu, W. T. (2020). Genetic and Epigenetic Control of Heart Development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 12(7), a036756. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036756>

Amberger, J. S., & Hamosh, A. (2017). Searching Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): A Knowledgebase of Human Genes and Genetic Phenotypes. *Current protocols in bioinformatics*, 58, 1.2.1–1.2.12. <https://doi.org/10.1002/cpbi.27>

Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology*, 11(10), R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>

Aonuma, T., Moukette, B., Kawaguchi, S., Barupala, N. P., Sepúlveda, M. N., Corr, C., Tang, Y., Liangpunsakul, S., Payne, R. M., Willis, M. S., & Kim, I. M. (2021). Cardiomyocyte microRNA-150 confers cardiac protection and directly represses proapoptotic small proline-rich protein 1A. *JCI insight*, 6(18), e150405. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.150405>

Aparicio-Puerta, E., Gómez-Martín, C., Giannoukacos, S., Medina, J. M., Marchal, J. A., & Hackenberg, M. (2020). miRNAQC: a webserver for comparative quality control of miRNA-seq data. *Nucleic acids research*, 48(W1), W262–W267. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa452>

Aparicio-Puerta, E., Hirsch, P., Schmartz, G. P., Kern, F., Fehlmann, T., & Keller, A. (2023). miEAA 2023: updates, new functional microRNA sets and improved enrichment visualizations. *Nucleic acids research*, 51(W1), W319–W325. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad392>

Aparicio-Puerta, E., Lebrón, R., Rueda, A., Gómez-Martín, C., Giannoukacos, S., Jaspez, D., Medina, J. M., Zubkovic, A., Jurak, I., Fromm, B., Marchal, J. A., Oliver, J., & Hackenberg, M. (2019). sRNAbench and sRNAtoolbox 2019: intuitive fast small RNA profiling and differential expression. *Nucleic acids research*, 47(W1), W530–W535. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz415>

Blake, J. A., Baldarelli, R., Kadin, J. A., Richardson, J. E., Smith, C. L., Bult, C. J., & Mouse Genome Database Group (2021). Mouse Genome Database (MGD): Knowledgebase for mouse-human comparative biology. *Nucleic acids research*, 49(D1), D981–D987. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1083>

Carlson, M. (2019). Org.Mm.eg.db: Genome wide annotation for Mouse. R package version 3.8.2. <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.org.Mm.eg.db>

Csárdi, G., Nepusz, T., Traag, V., Horvát, S., Zanini, F., Noom, D., Müller, K. (2023). Igraph: Network Analysis and Visualization in R. R package version 1.5.1, <https://doi.org/10.5281/zenodo.7682609>

El Abdellaoui-Soussi, F. (2023). Functional Characterization of the Cardiac Development of Arrhythmias and Dysfunction: Role of Chd4, Znf219 and ThPOK interaction [Tesis de doctorado aún no publicada]. Universidad Autónoma de Madrid.

El Abdellaoui-Soussi, F., Yunes-Leites, P. S., López-Maderuelo, D., García-Marqués, F., Vázquez, J., Redondo, J. M., & Gómez-Del Arco, P. (2022). Interplay between the Chd4/NuRD Complex and the Transcription Factor Znf219 Controls Cardiac Cell Identity. *International journal of molecular sciences*, 23(17), 9565. <https://doi.org/10.3390/ijms23179565>

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Källér, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(19), 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>

Gao, Y., Zamisch, M., Vacchio, M., Chopp, L., Ciucci, T., Paine, E. L., Lyons, G. C., Nie, J., Xiao, Q., Zvezdova, E., Love, P. E., Vinson, C. R., Jenkins, L. M., & Bosselut, R. (2022). NuRD complex recruitment to Thpok mediates CD4+ T cell lineage differentiation. *Science immunology*, 7(72), eabn5917. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abn5917>

Gene Ontology Consortium, Aleksander, S. A., Balhoff, J., Carbon, S., Cherry, J. M., Drabkin, H. J., Ebert, D., Feuermann, M., Gaudet, P., Harris, N. L., Hill, D. P., Lee, R., Mi, H., Moxon, S., Mungall, C. J., Muruganugan, A., Mushayahama, T., Sternberg, P. W., Thomas, P. D., Van Auken, K., ... Westerfield, M. (2023). The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics*, 224(1), iyad031. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad031>

Gómez-Del Arco, P., Perdiguero, E., Yunes-Leites, P. S., Acín-Pérez, R., Zeini, M., Garcia-Gomez, A., Sreenivasan, K., Jiménez-Alcázar, M., Segalés, J., López-Maderuelo, D., Ornés, B., Jiménez-Borreguero, L. J., D'Amato, G., Enshell-Seijffers, D., Morgan, B., Georgopoulos, K., Islam, A. B., Braun, T., de la Pompa, J. L., Kim, J., ... Redondo, J. M. (2016). The Chromatin Remodeling Complex Chd4/NuRD Controls Striated Muscle Identity and Metabolic Homeostasis. *Cell metabolism*, 23(5), 881–892. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.008>

Gurha P. (2016). MicroRNAs in cardiovascular disease. *Current opinion in cardiology*, 31(3), 249–254. <https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000280>

Hidalgo Estévez, A.M. (2022). Regulación transcripcional de la homeostasis del músculo estriado mediada por el complejo remodelador de la cromatina Chd4/NuRD. [Trabajo Final de Máster, Universidad de Europea de Madrid]. <https://hdl.handle.net/20.500.12880/5119>

Hosen, M. R., Goody, P. R., Zietzer, A., Xiang, X., Niepmann, S. T., Sedaghat, A., Tiyerili, V., Chennupati, R., Moore, J. B., 4th, Boon, R. A., Uchida, S., Sinning, J. M., Zimmer, S., Latz, E., Werner, N., Nickenig, G., & Jansen, F. (2022). Circulating MicroRNA-122-5p Is Associated With a Lack of Improvement in Left Ventricular Function After Transcatheter Aortic Valve Replacement and Regulates Viability of Cardiomyocytes Through Extracellular Vesicles. *Circulation*, 146(24), 1836–1854. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.122.060258>

Huang, Z. P., Chen, J., Seok, H. Y., Zhang, Z., Kataoka, M., Hu, X., & Wang, D. Z. (2013). MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress. *Circulation research*, 112(9), 1234–1243. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300682>

Jung, D., Kim, B., Freishtat, R. J., Giri, M., Hoffman, E., & Seo, J. (2015). miRTarVis: an interactive visual analysis tool for microRNA-mRNA expression profile data. *BMC proceedings*, 9(Suppl 6 Proceedings of the 5th Symposium on Biological Data), S2. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-9-S6-S2>

Kanehisa, M., Sato, Y., & Kawashima, M. (2022). KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 31(1), 47–53. <https://doi.org/10.1002/pro.4172>

Kawaguchi, S., Moukette, B., Sepúlveda, M. N., Hayasaka, T., Aonuma, T., Haskell, A. K., Mah, J., Liangpunsakul, S., Tang, Y., Conway, S. J., & Kim, I. M. (2023). SPRR1A is a key downstream effector of MiR-150 during both maladaptive cardiac remodeling in mice and human cardiac fibroblast activation. *Cell death & disease*, *14*(7), 446. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05982-y>

Keepers, B., Liu, J., & Qian, L. (2020). What's in a cardiomyocyte – And how do we make one through reprogramming? *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, *1867*(3), 118464. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.03.011>

Kolberg, L., Raudvere, U., Kuzmin, I., Adler, P., Vilo, J., & Peterson, H. (2023). G:Profiler-interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping (2023 update). *Nucleic acids research*, *51*(W1), W207–W212. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad347>

Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic acids research*, *47*(D1), D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>

Kundu, I., Sharma, M., Barai, R. S., Pokar, K., & Idicula-Thomas, S. (2022). GeDiPNet: Online resource of curated gene-disease associations for polypharmacological targets discovery. *Genes & diseases*, *10*(3), 647–649. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.05.034>

Landrum, M. J., Chitipiralla, S., Brown, G. R., Chen, C., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Jang, W., Kaur, K., Liu, C., Lyoshin, V., Maddipatla, Z., Maiti, R., Mitchell, J., O'Leary, N., Riley, G. R., Shi, W., Zhou, G., Schneider, V., Maglott, D., ... Kattman, B. L. (2020). ClinVar: improvements to accessing data. *Nucleic acids research*, *48*(D1), D835–D844. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz972>

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, *10*(3), R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>

Lawal, T. A., Wires, E. S., Terry, N. L., Dowling, J. J., & Todd, J. J. (2020). Preclinical model systems of ryanodine receptor 1-related myopathies and malignant hyperthermia: a comprehensive scoping review of works published 1990-2019. *Orphanet journal of rare diseases*, *15*(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01384-x>

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, *15*(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

L'Yi, S., Jung, D., Oh, M., Kim, B., Freishtat, R. J., Giri, M., Hoffman, E., & Seo, J. (2017). miRTarVis+: Web-based interactive visual analytics tool for microRNA target predictions. *Methods (San Diego, Calif.)*, *124*, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.06.004>

Orphanet: una base de datos en línea de enfermedades raras y medicamentos huérfanos. INSERM 1999. <http://www.orpha.net>. Acceso 28 de agosto de 2023.

Pagès, H., Carlson, M., Falcon, S., Li, N. (2023). AnnotationDbi: Manipulation of SQLite-based annotations in Bioconductor. R package version 1.62.2, <https://bioconductor.org/packages/AnnotationDbi>.

Rahm, A. K., Lugenbiel, P., Schweizer, P. A., Katus, H. A., & Thomas, D. (2018). Role of ion channels in heart failure and channelopathies. *Biophysical reviews*, *10*(4), 1097–1106. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0442-3>

R Core Team (2021). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>

Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M., Barengo, N. C., Beaton, A. Z., Benjamin, E. J., Benziger, C. P., Bonny, A., Brauer, M., Brodmann, M., Cahill, T. J., Carapetis, J., Catapano, A. L., Chugh, S. S., Cooper, L. T., Coresh, J., Criqui, M., ... GBD-NHLBI-JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group (2020). Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019: Update From the GBD 2019 Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 76(25), 2982–3021. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>

Santacruz-Roco, A. (2022). Estudio comparativo de pipelines de análisis de small non-coding RNAs. [Trabajo Final de Máster, Universidad Oberta de Catalunya]. <http://hdl.handle.net/10609/146510>

Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., Imamichi, T., & Chang, W. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic acids research*, 50(W1), W216–W221. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac194>

Siddeek, B., Mauduit, C., Zyzdorzcyk, C., Benahmed, M., & Simeoni, U. (2018). At the heart of programming: the role of micro-RNAs. *Journal of developmental origins of health and disease*, 9(6), 615–631. <https://doi.org/10.1017/S2040174418000387>

Srivastava, A., & Mishra, R. K. (2020). Interactome of vertebrate GAF/ThPOK reveals its diverse functions in gene regulation and DNA repair. *Journal of biosciences*, 45, 38.

Sticht, C., De La Torre, C., Parveen, A., & Gretz, N. (2018). miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS one*, 13(10), e0206239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206239>

Tada, H., Takamura, M., & Kawashiri, M. A. (2022). The Effect of Diet on Cardiovascular Disease, Heart Disease, and Blood Vessels. *Nutrients*, 14(2), 246. <https://doi.org/10.3390/un14020246>

Tarazona, S., Furió-Tarí, P., Turrà, D., Pietro, A. D., Nueda, M. J., Ferrer, A., & Conesa, A. (2015). Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic acids research*, 43(21), e140. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv711>

Thomas, J. P., Ölbei, M., Brooks-Warburton, J., Korcsmaros, T., & Modos, D. (2022). Analysing miRNA-Target Gene Networks in Inflammatory Bowel Disease and Other Complex Diseases Using Transcriptomic Data. *Genes*, 13(2), 370. <https://doi.org/10.3390/genes13020370>

Tryka, K. A., Hao, L., Sturcke, A., Jin, Y., Wang, Z. Y., Ziyabari, L., Lee, M., Popova, N., Sharopova, N., Kimura, M., & Feolo, M. (2014). NCBI's Database of Genotypes and Phenotypes: dbGaP. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), D975–D979. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1211>

Wang, Y., Han, D., Zhou, T., Chen, C., Cao, H., Zhang, J. Z., Ma, N., Liu, C., Song, M., Shi, J., Jin, X., Cao, F., & Dong, N. (2021). DUSP26 induces aortic valve calcification by antagonizing MDM2-mediated ubiquitination of DPP4 in human valvular interstitial cells. *European heart journal*, 42(30), 2935–2951. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab316>

Warnes, G. R., Bolker, Lodewijk, B. B., Gentleman, R., Huber, W., Liaw A., Lumley, T., Maechler, M., Magnusson, A., Moeller, S., Schwartz, M., Venables, B., Galili, T. (2022). Gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data. R package version 3.1.3, <https://github.com/talgalili/gplots>

Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., Vaughan, D. (2023a). Dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.3.3, <https://dplyr.tidyverse.org>, <https://github.com/tidyverse/dplyr>.

Wickham, H., Vaughan, D., Girlich, M. (2023b). Tidyr: Tidy Messy Data. R package version 1.1.3, <https://tidyr.tidyverse.org>, <https://github.com/tidyverse/tidyr>.

Wilczewski, C. M., Hepperla, A. J., Shimbo, T., Wasson, L., Robbe, Z. L., Davis, I. J., Wade, P. A., & Conlon, F. L. (2018). CHD4 and the NuRD complex directly control cardiac sarcomere formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(26), 6727–6732. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722219115>

Zhang, J., Huang, X., Wang, X., Gao, Y., Liu, L., Li, Z., Chen, X., Zeng, J., Ye, Z., & Li, G. (2020). Identification of potential crucial genes in atrial fibrillation: a bioinformatic analysis. *BMC medical genomics*, 13(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12920-020-00754-5>

ANEXO I

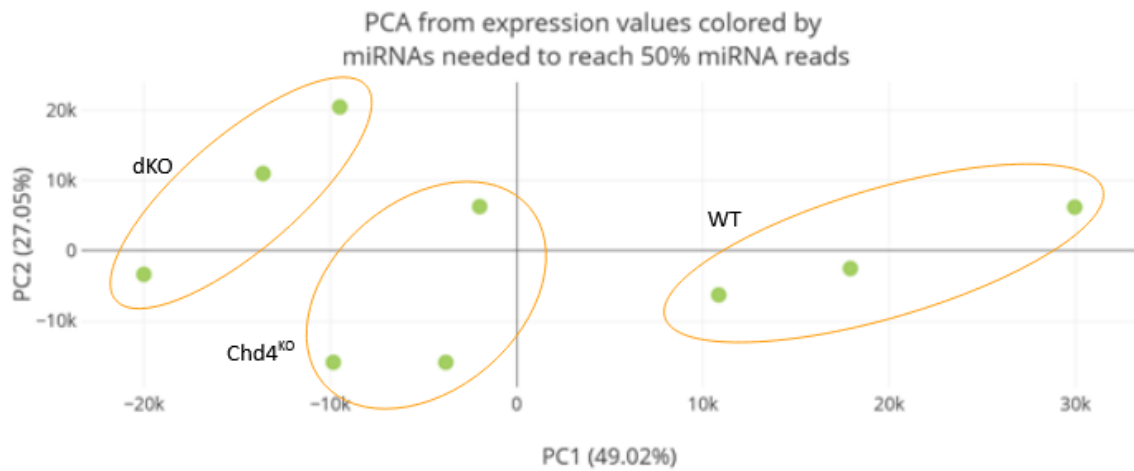


Figura 14. Gráfica de componentes principales para miRNAs necesarios para alcanzar un 50% de lecturas, agrupando las réplicas según su condición. Modificada de mirnaQC.

Library Complexity

Display values | Display percentiles ?

Copy table | Q1 Q2 Q3 Q4

Sample Name	Reads per unique	% top miRNA	% top5 miRNA	% top20 miRNA	#miRNA p50	#miRNA p75	#miRNA p95	miRNAs per 1000 reads
Chd4KO1_trimmed	8.4	11.0%	30.2%	72.5%	11	22	67	0.5
Chd4KO2_trimmed	5.8	18.5%	37.9%	75.8%	9	20	61	0.4
Chd4KO3_trimmed	6.6	16.2%	36.6%	74.6%	9	21	64	0.5
DKO1_trimmed	10.2	7.7%	25.7%	70.9%	12	23	71	0.6
DKO2_trimmed	7.7	9.0%	29.5%	71.5%	11	23	71	0.5
DKO3_trimmed	7.3	19.3%	37.2%	76.4%	9	20	62	0.4
WT1_trimmed	8.3	13.3%	33.7%	74.4%	10	21	56	0.4
WT2_trimmed	6.4	15.7%	36.7%	76.6%	9	19	54	0.4
WT3_trimmed	6.2	15.1%	34.7%	76.1%	9	20	57	0.4

a)

Putative Contamination

Display values | Display percentiles ?

Copy table | Q1 Q2 Q3 Q4

Sample Name	% ref.genome	% unmapped	% bacteria	% virus
Chd4KO1_trimmed	82.4%	13.8%	3.3%	0.5%
Chd4KO2_trimmed	85.3%	12.3%	2.1%	0.2%
Chd4KO3_trimmed	82.4%	14.8%	2.6%	0.3%
DKO1_trimmed	81.2%	14.7%	3.6%	0.5%
DKO2_trimmed	85.4%	11.7%	2.6%	0.3%
DKO3_trimmed	87.1%	10.0%	2.6%	0.3%
WT1_trimmed	81.5%	15.3%	2.9%	0.4%
WT2_trimmed	87.0%	10.7%	2.0%	0.3%
WT3_trimmed	85.9%	11.8%	2.0%	0.3%

b)

Library Quality

c)

Display values | Display percentiles ?

Copy table

Q1 Q2 Q3 Q4

Sample Name	% Dimers	% ultrashort	% short reads	% rRNA
Chd4KO1_trimmed	0.0%	0.0%	3.9%	20.5%
Chd4KO2_trimmed	0.0%	0.0%	2.4%	10.7%
Chd4KO3_trimmed	0.0%	0.0%	2.8%	14.5%
DKO1_trimmed	0.0%	0.0%	4.1%	23.2%
DKO2_trimmed	0.0%	0.0%	2.8%	15.2%
DKO3_trimmed	0.0%	0.0%	2.9%	14.3%
WT1_trimmed	0.0%	0.0%	3.4%	19.4%
WT2_trimmed	0.0%	0.0%	2.5%	12.8%
WT3_trimmed	0.0%	0.0%	2.3%	12.4%

Sequencing Yield

d)

Display values | Display percentiles ?

Copy table

Q1 Q2 Q3 Q4

Sample Name	Raw reads	Num. of reads	Unique reads	Trimmed reads	% Adapter trimmed reads
Chd4KO1_trimmed	3721209	2648959	222833	0	0.0%
Chd4KO2_trimmed	3286233	2496752	146036	0	0.0%
Chd4KO3_trimmed	2880506	2194316	143831	0	0.0%
DKO1_trimmed	2791269	1870332	190844	0	0.0%
DKO2_trimmed	3097405	2100528	161693	0	0.0%
DKO3_trimmed	3430034	2480226	181438	0	0.0%
WT1_trimmed	3280437	2392572	199332	0	0.0%
WT2_trimmed	3366850	2497073	158765	0	0.0%
WT3_trimmed	3529044	2621908	162787	0	0.0%

Reads length distribution

e)

Display values | Display percentiles ?

Copy table

Q1 Q2 Q3 Q4

Sample Name	miRNA "peak"	miRNA mean length	miRNA SD	miRNA length mode	skewness	skewness
Chd4KO1_trimmed	81.3%	21.9	1.3	22	-0.1	0.1
Chd4KO2_trimmed	81.9%	21.9	1.2	22	-0.1	0.1
Chd4KO3_trimmed	82.1%	21.9	1.2	22	-0.1	0.1
DKO1_trimmed	81.1%	22.0	1.3	22	-0.0	0.0
DKO2_trimmed	81.6%	21.9	1.3	22	-0.1	0.1
DKO3_trimmed	82.9%	21.9	1.2	22	-0.1	0.1
WT1_trimmed	81.7%	22.0	1.3	22	-0.0	0.0
WT2_trimmed	81.8%	21.9	1.3	22	-0.1	0.1
WT3_trimmed	81.9%	21.9	1.2	22	-0.1	0.1

Sequencing Quality

f)

Display values | Display percentiles ?

Copy table

Q1 Q2 Q3 Q4

Sample Name	Average mean Phred Score	Average median Phred Score	Average percentile 10 Phred Score	Average percentile 75 Phred Score	Average percentile 90 Phred Score
Chd4KO1_trimmed	33.2	34.0	32.4	34.0	34.0
Chd4KO2_trimmed	33.1	34.0	31.9	34.0	34.0
Chd4KO3_trimmed	33.1	34.0	32.4	34.0	34.0
DKO1_trimmed	33.3	34.0	32.4	34.0	34.0
DKO2_trimmed	33.3	34.0	32.4	34.0	34.0
DKO3_trimmed	33.3	34.0	32.4	34.0	34.0
WT1_trimmed	33.2	34.0	32.5	34.0	34.0
WT2_trimmed	33.3	34.0	32.7	34.0	34.0
WT3_trimmed	33.1	34.0	32.1	34.0	34.0

Figura 15. Gráficas de calidad obtenidas de mirnaQC al estudiar los miRNAs secuenciados, coloreadas según el cuartil al que pertenece la métrica al ser comparados con otras del mismo reino: a) complejidad de la librería, b) posible contaminación, c) calidad de la librería, d) rendimiento de la secuenciación, e) distribución de la longitud de las lecturas y f) calidad de la secuenciación basada en la puntuación Phred.

ANEXO II

GO:MF		stats		
<input type="checkbox"/> Term name	Term ID	<input type="checkbox"/> p _{adj}	<input type="checkbox"/> -log ₁₀ (p _{adj})	<input type="checkbox"/> s16
<input type="checkbox"/> protein binding	GO:0005515	2.278 × 10 ⁻¹¹		
<input type="checkbox"/> monoatomic cation transmembrane transporter ac...	GO:0008324	9.488 × 10 ⁻¹¹		
<input type="checkbox"/> metal ion transmembrane transporter activity	GO:0046873	3.396 × 10 ⁻¹⁰		
<input type="checkbox"/> monoatomic ion gated channel activity	GO:0022839	1.943 × 10 ⁻⁹		
<input type="checkbox"/> inorganic cation transmembrane transporter activity	GO:0022890	2.482 × 10 ⁻⁹		
<input type="checkbox"/> gated channel activity	GO:0022836	2.709 × 10 ⁻⁹		
<input type="checkbox"/> monoatomic ion transmembrane transporter activity	GO:0015075	4.752 × 10 ⁻⁹		
<input type="checkbox"/> salt transmembrane transporter activity	GO:1901702	1.448 × 10 ⁻⁸		
<input type="checkbox"/> inorganic molecular entity transmembrane transp...	GO:0015318	6.822 × 10 ⁻⁸		
<input type="checkbox"/> voltage-gated monoatomic ion channel activity	GO:0005244	8.662 × 10 ⁻⁸		
<input type="checkbox"/> voltage-gated channel activity	GO:0022832	9.405 × 10 ⁻⁸		
<input type="checkbox"/> monoatomic cation channel activity	GO:0005261	1.752 × 10 ⁻⁷		
<input type="checkbox"/> channel activity	GO:0015267	2.010 × 10 ⁻⁷		
<input type="checkbox"/> passive transmembrane transporter activity	GO:0022803	2.010 × 10 ⁻⁷		
<input type="checkbox"/> transmembrane transporter activity	GO:0022857	2.116 × 10 ⁻⁷		
<input type="checkbox"/> monoatomic ion channel activity	GO:0005216	3.433 × 10 ⁻⁷		
<input type="checkbox"/> transporter activity	GO:0005215	8.461 × 10 ⁻⁷		
<input type="checkbox"/> binding	GO:0005488	1.254 × 10 ⁻⁶		
<input type="checkbox"/> voltage-gated monoatomic cation channel activity	GO:0022843	4.541 × 10 ⁻⁶		
<input type="checkbox"/> sodium ion transmembrane transporter activity	GO:0015081	2.416 × 10 ⁻⁵		
<input type="checkbox"/> high voltage-gated calcium channel activity	GO:0008331	1.100 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> potassium ion transmembrane transporter activity	GO:0015079	1.713 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> ligand-gated monoatomic ion channel activity	GO:0015276	3.098 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> ligand-gated channel activity	GO:0022834	3.997 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> ligand-gated monoatomic cation channel activity	GO:0099094	9.849 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> calcium ion transmembrane transporter activity	GO:0015085	1.355 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> voltage-gated sodium channel activity involved in ...	GO:0086006	1.478 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> acidic amino acid transmembrane transporter acti...	GO:0015172	2.450 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> calcium channel activity	GO:0005262	2.802 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> growth factor activity	GO:0008083	4.130 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> voltage-gated potassium channel activity	GO:0005249	4.632 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> calmodulin binding	GO:0005516	4.672 × 10 ⁻²		

GO:BP		stats	
<input type="checkbox"/> Term name	Term ID	P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$
<input type="checkbox"/> nervous system development	GO:0007399	4.226 × 10 ⁻¹³	
<input type="checkbox"/> anterograde trans-synaptic signaling	GO:0098916	4.656 × 10 ⁻¹³	
<input type="checkbox"/> chemical synaptic transmission	GO:0007268	4.656 × 10 ⁻¹³	
<input type="checkbox"/> system development	GO:0048731	5.948 × 10 ⁻¹³	
<input type="checkbox"/> trans-synaptic signaling	GO:0099537	5.958 × 10 ⁻¹³	
<input type="checkbox"/> monoatomic cation transmembrane transport	GO:0098655	1.801 × 10 ⁻¹²	
<input type="checkbox"/> monoatomic ion transmembrane transport	GO:0034220	2.601 × 10 ⁻¹²	
<input type="checkbox"/> synaptic signaling	GO:0099536	3.039 × 10 ⁻¹²	
<input type="checkbox"/> inorganic cation transmembrane transport	GO:0098662	1.436 × 10 ⁻¹¹	
<input type="checkbox"/> monoatomic ion transport	GO:0006811	2.592 × 10 ⁻¹¹	
<input type="checkbox"/> monoatomic cation transport	GO:0006812	3.689 × 10 ⁻¹¹	
<input type="checkbox"/> inorganic ion transmembrane transport	GO:0098660	3.698 × 10 ⁻¹¹	
<input type="checkbox"/> multicellular organism development	GO:0007275	6.079 × 10 ⁻¹¹	
<input type="checkbox"/> metal ion transport	GO:0030001	6.950 × 10 ⁻¹¹	
<input type="checkbox"/> localization	GO:0051179	4.665 × 10 ⁻¹⁰	
<input type="checkbox"/> transmembrane transport	GO:0055085	5.506 × 10 ⁻¹⁰	
<input type="checkbox"/> neurogenesis	GO:0022008	8.325 × 10 ⁻¹⁰	
<input type="checkbox"/> cell-cell signaling	GO:0007267	1.230 × 10 ⁻⁹	
<input type="checkbox"/> cell differentiation	GO:0030154	1.913 × 10 ⁻⁹	
<input type="checkbox"/> cellular developmental process	GO:0048869	1.939 × 10 ⁻⁹	
<input type="checkbox"/> developmental process	GO:0032502	2.236 × 10 ⁻⁹	
<input type="checkbox"/> anatomical structure development	GO:0048856	2.257 × 10 ⁻⁹	
<input type="checkbox"/> generation of neurons	GO:0048699	3.894 × 10 ⁻⁹	
<input type="checkbox"/> regulation of membrane potential	GO:0042391	6.202 × 10 ⁻⁹	
<input type="checkbox"/> modulation of chemical synaptic transmission	GO:0050804	1.902 × 10 ⁻⁸	
<input type="checkbox"/> regulation of trans-synaptic signaling	GO:0099177	1.975 × 10 ⁻⁸	
<input type="checkbox"/> neuron differentiation	GO:0030182	2.191 × 10 ⁻⁸	
<input type="checkbox"/> neuron projection development	GO:0031175	3.305 × 10 ⁻⁸	
<input type="checkbox"/> neuron development	GO:0048666	4.186 × 10 ⁻⁸	
<input type="checkbox"/> cellular component morphogenesis	GO:0032989	1.397 × 10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/> cell projection morphogenesis	GO:0048858	1.408 × 10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/> cell development	GO:0048468	1.778 × 10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/> regulation of monoatomic ion transport	GO:0043269	2.782 × 10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/> regulation of transmembrane transport	GO:0034762	2.891 × 10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/> cell part morphogenesis	GO:0032990	4.096 × 10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/> axon development	GO:0061564	4.130 × 10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/> cell population proliferation	GO:0008283	4.191 × 10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/> plasma membrane bounded cell projection morph...	GO:0120039	4.878 × 10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/> plasma membrane bounded cell projection organi...	GO:0120036	6.285 × 10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/> regulation of monoatomic ion transmembrane tra...	GO:0034765	6.662 × 10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/> regulation of localization	GO:0032879	8.659 × 10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/> neuron projection morphogenesis	GO:0048812	1.268 × 10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/> regulation of postsynaptic membrane potential	GO:0060078	1.272 × 10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/> cell projection organization	GO:0030030	1.365 × 10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/> regulation of biological quality	GO:0065008	1.554 × 10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/> establishment of localization	GO:0051234	1.623 × 10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/> transport	GO:0006810	2.351 × 10 ⁻⁶	

<input type="checkbox"/>	calcium ion transmembrane import into cytosol	GO:0097553	2.774 × 10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	behavior	GO:0007610	2.948 × 10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	axonogenesis	GO:0007409	3.725 × 10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	chemical synaptic transmission, postsynaptic	GO:0099565	4.665 × 10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	cell morphogenesis	GO:0000902	7.285 × 10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	potassium ion transport	GO:0006813	7.630 × 10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	cell morphogenesis involved in neuron differentia...	GO:0048667	1.549 × 10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	cellular component organization	GO:0016043	1.980 × 10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	excitatory postsynaptic potential	GO:0060079	2.069 × 10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	regulation of signaling	GO:0023051	2.377 × 10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	regulation of cell communication	GO:0010646	2.466 × 10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	anatomical structure morphogenesis	GO:0009653	3.444 × 10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	regulation of transport	GO:0051049	3.618 × 10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	synapse organization	GO:0050808	3.822 × 10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	muscle contraction	GO:0006936	4.860 × 10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	cellular localization	GO:0051641	1.036 × 10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	regulation of cellular process	GO:0050794	1.077 × 10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	cellular component organization or biogenesis	GO:0071840	1.144 × 10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	import across plasma membrane	GO:0098739	1.529 × 10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	cell junction organization	GO:0034330	1.561 × 10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	striated muscle contraction	GO:0006941	2.509 × 10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	synaptic transmission, glutamatergic	GO:0035249	3.013 × 10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	sodium ion transmembrane transport	GO:0035725	3.064 × 10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	protein localization to synapse	GO:0035418	3.348 × 10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	neurotransmitter transport	GO:0006836	3.576 × 10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	potassium ion transmembrane transport	GO:0071805	4.766 × 10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	multicellular organismal process	GO:0032501	4.981 × 10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	learning	GO:0007612	5.117 × 10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	regulation of cell population proliferation	GO:0042127	5.387 × 10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	regulation of biological process	GO:0050789	5.680 × 10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	calcium ion transport	GO:0006816	8.786 × 10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	regulation of muscle contraction	GO:0006937	9.039 × 10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	regulation of neurotransmitter levels	GO:0001505	1.115 × 10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	regulation of system process	GO:0044057	1.138 × 10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	animal organ development	GO:0048513	1.576 × 10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	positive regulation of cellular process	GO:0048522	1.798 × 10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	regulation of monoatomic cation transmembrane ...	GO:1904062	1.894 × 10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	regulation of metal ion transport	GO:0010959	1.964 × 10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	inorganic cation import across plasma membrane	GO:0098659	1.979 × 10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	inorganic ion import across plasma membrane	GO:0099587	1.979 × 10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	localization within membrane	GO:0051668	2.033 × 10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	calcium ion transmembrane transport	GO:0070588	2.207 × 10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	learning or memory	GO:0007611	2.370 × 10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	synapse assembly	GO:0007416	2.682 × 10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	import into cell	GO:0098657	2.713 × 10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	cell communication	GO:0007154	2.789 × 10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	sodium ion transport	GO:0006814	2.899 × 10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	positive regulation of biological process	GO:0048518	3.044 × 10 ⁻³	

<input type="checkbox"/>	protein localization to membrane	GO:0072657	3.202×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	regulation of transmembrane transporter activity	GO:0022898	3.407×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	regulation of synaptic plasticity	GO:0048167	3.847×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	protein localization to membrane raft	GO:1903044	4.256×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	regulation of neuron projection development	GO:0010975	4.347×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	biological regulation	GO:0065007	4.665×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	protein localization to cell junction	GO:1902414	4.877×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	muscle system process	GO:0003012	5.169×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	regulation of transporter activity	GO:0032409	5.824×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	signaling	GO:0023052	6.619×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion ...	GO:0098742	8.416×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	cognition	GO:0050890	9.278×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	cell adhesion	GO:0007155	9.634×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	regulation of monoatomic ion transmembrane tra...	GO:0032412	9.937×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	adult behavior	GO:0030534	1.207×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	regulation of plasma membrane bounded cell pro...	GO:0120035	1.267×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	negative regulation of cellular process	GO:0048523	1.303×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	cell-cell adhesion	GO:0098609	1.618×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	regulation of cell projection size	GO:0032536	1.627×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	regulation of cell projection organization	GO:0031344	1.728×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	positive regulation of synaptic transmission	GO:0050806	1.743×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	associative learning	GO:0008306	1.778×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	protein localization to postsynaptic membrane	GO:1903539	1.803×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	regulation of cellular component organization	GO:0051128	1.824×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	protein localization to postsynapse	GO:0062237	2.001×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	positive regulation of cell communication	GO:0010647	2.420×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	transmission of nerve impulse	GO:0019226	2.915×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	positive regulation of developmental process	GO:0051094	3.241×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	negative regulation of biological process	GO:0048519	3.815×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	negative regulation of calcium ion transport	GO:0051926	3.953×10 ⁻²	

GO:CC		stats		
<input type="checkbox"/> Term name	Term ID	P_{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$	≤ 16
<input type="checkbox"/> synapse	GO:0045202	3.195×10^{-18}		
<input type="checkbox"/> cell junction	GO:0030054	3.614×10^{-17}		
<input type="checkbox"/> neuron projection	GO:0043005	1.351×10^{-13}		
<input type="checkbox"/> plasma membrane region	GO:0098590	1.470×10^{-12}		
<input type="checkbox"/> cytoplasm	GO:0005737	2.003×10^{-11}		
<input type="checkbox"/> plasma membrane bounded cell projection	GO:0120025	2.337×10^{-11}		
<input type="checkbox"/> synaptic membrane	GO:0097060	3.721×10^{-11}		
<input type="checkbox"/> cell projection	GO:0042995	1.608×10^{-10}		
<input type="checkbox"/> somatodendritic compartment	GO:0036477	3.155×10^{-10}		
<input type="checkbox"/> membrane	GO:0016020	4.995×10^{-10}		
<input type="checkbox"/> postsynapse	GO:0098794	8.636×10^{-10}		
<input type="checkbox"/> neuronal cell body	GO:0043025	9.433×10^{-10}		
<input type="checkbox"/> cell body	GO:0044297	1.048×10^{-9}		
<input type="checkbox"/> glutamatergic synapse	GO:0098978	2.925×10^{-9}		
<input type="checkbox"/> presynapse	GO:0098793	5.431×10^{-9}		
<input type="checkbox"/> cell periphery	GO:0071944	3.721×10^{-8}		
<input type="checkbox"/> axon	GO:0030424	1.015×10^{-7}		
<input type="checkbox"/> cellular anatomical entity	GO:0110165	1.100×10^{-7}		
<input type="checkbox"/> postsynaptic membrane	GO:0045211	8.851×10^{-7}		
<input type="checkbox"/> plasma membrane	GO:0005886	2.007×10^{-6}		
<input type="checkbox"/> transmembrane transporter complex	GO:1902495	2.701×10^{-6}		
<input type="checkbox"/> cation channel complex	GO:0034703	3.505×10^{-6}		
<input type="checkbox"/> presynaptic membrane	GO:0042734	4.210×10^{-6}		
<input type="checkbox"/> neuron to neuron synapse	GO:0098984	5.567×10^{-6}		
<input type="checkbox"/> monoatomic ion channel complex	GO:0034702	6.312×10^{-6}		
<input type="checkbox"/> supramolecular fiber	GO:0099512	7.923×10^{-6}		
<input type="checkbox"/> transporter complex	GO:1990351	7.932×10^{-6}		
<input type="checkbox"/> supramolecular polymer	GO:0099081	9.348×10^{-6}		
<input type="checkbox"/> postsynaptic density	GO:0014069	7.024×10^{-5}		
<input type="checkbox"/> perikaryon	GO:0043204	7.830×10^{-5}		
<input type="checkbox"/> postsynaptic specialization membrane	GO:0099634	1.309×10^{-4}		
<input type="checkbox"/> asymmetric synapse	GO:0032279	1.344×10^{-4}		
<input type="checkbox"/> main axon	GO:0044304	1.587×10^{-4}		
<input type="checkbox"/> T-tubule	GO:0030315	4.025×10^{-4}		
<input type="checkbox"/> sarcoplasm	GO:0016528	6.202×10^{-4}		
<input type="checkbox"/> dendrite	GO:0030425	6.326×10^{-4}		
<input type="checkbox"/> dendritic tree	GO:0097447	6.629×10^{-4}		
<input type="checkbox"/> sarcoplasmic reticulum	GO:0016529	7.024×10^{-4}		
<input type="checkbox"/> myofibril	GO:0030016	1.686×10^{-3}		
<input type="checkbox"/> plasma membrane protein complex	GO:0098797	1.957×10^{-3}		
<input type="checkbox"/> presynaptic active zone	GO:0048786	2.105×10^{-3}		
<input type="checkbox"/> sarcolemma	GO:0042383	2.158×10^{-3}		

<input type="checkbox"/>	contractile fiber	GO:0043292	2.639×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	sarcomere	GO:0030017	3.293×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	postsynaptic density membrane	GO:0098839	4.004×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	I band	GO:0031674	4.742×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	endomembrane system	GO:0012505	5.055×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	dendritic spine head	GO:0044327	6.029×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	photoreceptor inner segment	GO:0001917	9.947×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	neuron projection terminus	GO:0044306	1.120×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	myelin sheath	GO:0043209	1.396×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	polymeric cytoskeletal fiber	GO:0099513	2.509×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	dendritic spine	GO:0043197	2.604×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	neuron spine	GO:0044309	3.169×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	organelle membrane	GO:0031090	3.625×10 ⁻²	

KEGG		stats		
<input type="checkbox"/> Term name	Term ID	p _{adj}	$-\log_{10}(p_{adj})$	≤16
<input type="checkbox"/>	Adrenergic signaling in cardiomyocytes	KEGG:04261	7.120×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	Calcium signaling pathway	KEGG:04020	5.467×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	Cardiac muscle contraction	KEGG:04260	5.486×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	Mineral absorption	KEGG:04978	1.394×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	Proximal tubule bicarbonate reclamation	KEGG:04964	2.739×10 ⁻²	

REAC		stats		
<input type="checkbox"/> Term name	Term ID	p _{adj}	$-\log_{10}(p_{adj})$	≤16
<input type="checkbox"/>	Neuronal System	REAC:R-MMU-...	8.248×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	Transmission across Chemical Synapses	REAC:R-MMU-...	5.302×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	Muscle contraction	REAC:R-MMU-...	6.841×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	Neurotransmitter release cycle	REAC:R-MMU-...	5.049×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	Ion homeostasis	REAC:R-MMU-...	8.873×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	Glutamate Neurotransmitter Release Cycle	REAC:R-MMU-...	1.165×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	Cardiac conduction	REAC:R-MMU-...	1.209×10 ⁻²	

WP		stats		
<input type="checkbox"/> Term name	Term ID	p _{adj}	$-\log_{10}(p_{adj})$	≤16
<input type="checkbox"/>	Dravet syndrome: Scn1a-A1783V point mutation m...	WP:WP5298	3.479×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	Calcium regulation in cardiac cells	WP:WP553	3.875×10 ⁻²	

Figura 16. Resultados de g:Profiler para el enriquecimiento funcional de los genes seleccionados para *Chd4*^{KO} vs WT en distintas bases de datos: GO:MF (Gene Ontology: Molecular Function), BP (Biological Process) y CC (Cellular Component); KEGG, Reactome (REAC), WikiPathways (WP) y Human Phenotype Ontology (HP). Se muestra al lado el identificador del término y su p-valor, coloreado según el logaritmo del mismo.

GO:MF		stats		
<input type="checkbox"/> Term name	Term ID	<input type="checkbox"/> P _{adj}	<input type="checkbox"/> -log ₁₀ (P _{adj})	<input type="checkbox"/> <small>≤16</small>
<input type="checkbox"/> protein binding	GO:0005515	2.993 × 10 ⁻²¹		
<input type="checkbox"/> monoatomic ion transmembrane transporter activity	GO:0015075	5.231 × 10 ⁻¹⁶		
<input type="checkbox"/> transmembrane transporter activity	GO:0022857	1.064 × 10 ⁻¹⁵		
<input type="checkbox"/> monoatomic cation transmembrane transporter ac...	GO:0008324	1.286 × 10 ⁻¹⁵		
<input type="checkbox"/> inorganic cation transmembrane transporter activity	GO:0022890	8.726 × 10 ⁻¹⁵		
<input type="checkbox"/> metal ion transmembrane transporter activity	GO:0046873	2.155 × 10 ⁻¹⁴		
<input type="checkbox"/> transporter activity	GO:0005215	2.896 × 10 ⁻¹⁴		
<input type="checkbox"/> salt transmembrane transporter activity	GO:1901702	3.639 × 10 ⁻¹⁴		
<input type="checkbox"/> inorganic molecular entity transmembrane transp...	GO:0015318	4.813 × 10 ⁻¹⁴		
<input type="checkbox"/> channel activity	GO:0015267	1.714 × 10 ⁻¹²		
<input type="checkbox"/> passive transmembrane transporter activity	GO:0022803	1.714 × 10 ⁻¹²		
<input type="checkbox"/> monoatomic ion channel activity	GO:0005216	4.748 × 10 ⁻¹²		
<input type="checkbox"/> monoatomic ion gated channel activity	GO:0022839	8.125 × 10 ⁻¹²		
<input type="checkbox"/> gated channel activity	GO:0022836	1.169 × 10 ⁻¹¹		
<input type="checkbox"/> binding	GO:0005488	3.380 × 10 ⁻¹¹		
<input type="checkbox"/> monoatomic cation channel activity	GO:0005261	5.819 × 10 ⁻¹⁰		
<input type="checkbox"/> voltage-gated monoatomic ion channel activity	GO:0005244	1.663 × 10 ⁻⁸		
<input type="checkbox"/> voltage-gated channel activity	GO:0022832	1.844 × 10 ⁻⁸		
<input type="checkbox"/> sodium ion transmembrane transporter activity	GO:0015081	8.282 × 10 ⁻⁸		
<input type="checkbox"/> voltage-gated monoatomic cation channel activity	GO:0022843	5.305 × 10 ⁻⁵		
<input type="checkbox"/> cytoskeletal protein binding	GO:0008092	1.408 × 10 ⁻⁴		
<input type="checkbox"/> ligand-gated monoatomic ion channel activity	GO:0015276	2.547 × 10 ⁻⁴		
<input type="checkbox"/> ligand-gated channel activity	GO:0022834	3.329 × 10 ⁻⁴		
<input type="checkbox"/> calcium ion transmembrane transporter activity	GO:0015085	7.634 × 10 ⁻⁴		
<input type="checkbox"/> active monoatomic ion transmembrane transporte...	GO:0022853	7.651 × 10 ⁻⁴		
<input type="checkbox"/> active transmembrane transporter activity	GO:0022804	7.661 × 10 ⁻⁴		
<input type="checkbox"/> potassium ion transmembrane transporter activity	GO:0015079	1.338 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> ligand-gated monoatomic cation channel activity	GO:0099094	1.517 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> calcium channel activity	GO:0005262	6.266 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> sodium channel activity	GO:0005272	7.218 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> high voltage-gated calcium channel activity	GO:0008331	9.284 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> calmodulin binding	GO:0005516	1.221 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> ion binding	GO:0043167	1.329 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> monoatomic anion transmembrane transporter ac...	GO:0008509	1.376 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> extracellularly glutamate-gated ion channel activity	GO:0005234	1.623 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> inorganic anion transmembrane transporter activity	GO:0015103	1.692 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> actin binding	GO:0003779	1.809 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> neurotransmitter binding	GO:0042165	1.871 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> growth factor activity	GO:0008083	2.211 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> metal ion binding	GO:0046872	2.692 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> secondary active transmembrane transporter activity	GO:0015291	3.010 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> glutamate-gated calcium ion channel activity	GO:0022849	3.998 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> voltage-gated sodium channel activity involved in ...	GO:0086006	3.998 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> extracellular ligand-gated monoatomic ion chann...	GO:0005230	4.390 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> voltage-gated sodium channel activity	GO:0005248	4.811 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> cation binding	GO:0043169	4.817 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> calcium ion binding	GO:0005509	4.938 × 10 ⁻²		

GO:BP		stats		
<input type="checkbox"/> Term name	Term ID	P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$	<small>s16</small>
<input type="checkbox"/> system development	GO:0048731	4.948 × 10 ⁻²¹		
<input type="checkbox"/> transmembrane transport	GO:0055085	8.854 × 10 ⁻²⁰		
<input type="checkbox"/> multicellular organism development	GO:0007275	6.249 × 10 ⁻¹⁸		
<input type="checkbox"/> monoatomic ion transmembrane transport	GO:0034220	8.344 × 10 ⁻¹⁸		
<input type="checkbox"/> anatomical structure development	GO:0048856	4.677 × 10 ⁻¹⁷		
<input type="checkbox"/> nervous system development	GO:0007399	8.198 × 10 ⁻¹⁷		
<input type="checkbox"/> monoatomic ion transport	GO:0006811	1.523 × 10 ⁻¹⁶		
<input type="checkbox"/> developmental process	GO:0032502	1.808 × 10 ⁻¹⁶		
<input type="checkbox"/> localization	GO:0051179	6.386 × 10 ⁻¹⁶		
<input type="checkbox"/> monoatomic cation transmembrane transport	GO:0098655	2.223 × 10 ⁻¹⁵		
<input type="checkbox"/> inorganic ion transmembrane transport	GO:0098660	6.937 × 10 ⁻¹⁵		
<input type="checkbox"/> metal ion transport	GO:0030001	2.687 × 10 ⁻¹⁴		
<input type="checkbox"/> monoatomic cation transport	GO:0006812	2.793 × 10 ⁻¹⁴		
<input type="checkbox"/> regulation of biological quality	GO:0065008	3.853 × 10 ⁻¹⁴		
<input type="checkbox"/> cell-cell signaling	GO:0007267	1.255 × 10 ⁻¹³		
<input type="checkbox"/> inorganic cation transmembrane transport	GO:0098662	1.499 × 10 ⁻¹³		
<input type="checkbox"/> anterograde trans-synaptic signaling	GO:0098916	1.667 × 10 ⁻¹³		
<input type="checkbox"/> chemical synaptic transmission	GO:0007268	1.667 × 10 ⁻¹³		
<input type="checkbox"/> trans-synaptic signaling	GO:0099537	2.359 × 10 ⁻¹³		
<input type="checkbox"/> establishment of localization	GO:0051234	3.197 × 10 ⁻¹³		
<input type="checkbox"/> synaptic signaling	GO:0099536	3.808 × 10 ⁻¹³		
<input type="checkbox"/> transport	GO:0006810	4.526 × 10 ⁻¹³		
<input type="checkbox"/> neurogenesis	GO:0022008	2.146 × 10 ⁻¹²		
<input type="checkbox"/> cell differentiation	GO:0030154	6.533 × 10 ⁻¹²		
<input type="checkbox"/> cellular developmental process	GO:0048869	1.204 × 10 ⁻¹¹		
<input type="checkbox"/> generation of neurons	GO:0048699	2.493 × 10 ⁻¹¹		
<input type="checkbox"/> neuron development	GO:0048666	3.320 × 10 ⁻¹¹		
<input type="checkbox"/> neuron differentiation	GO:0030182	6.250 × 10 ⁻¹¹		
<input type="checkbox"/> neuron projection development	GO:0031175	1.432 × 10 ⁻¹⁰		
<input type="checkbox"/> multicellular organismal process	GO:0032501	1.846 × 10 ⁻¹⁰		
<input type="checkbox"/> regulation of signaling	GO:0023051	3.251 × 10 ⁻¹⁰		
<input type="checkbox"/> plasma membrane bounded cell projection organi...	GO:0120036	7.057 × 10 ⁻¹⁰		
<input type="checkbox"/> regulation of cell communication	GO:0010646	1.868 × 10 ⁻⁹		
<input type="checkbox"/> cell projection organization	GO:0030030	2.033 × 10 ⁻⁹		
<input type="checkbox"/> anatomical structure morphogenesis	GO:0009653	2.083 × 10 ⁻⁹		
<input type="checkbox"/> regulation of localization	GO:0032879	3.574 × 10 ⁻⁹		
<input type="checkbox"/> regulation of transmembrane transport	GO:0034762	3.591 × 10 ⁻⁹		
<input type="checkbox"/> modulation of chemical synaptic transmission	GO:0050804	3.853 × 10 ⁻⁹		
<input type="checkbox"/> regulation of trans-synaptic signaling	GO:0099177	4.039 × 10 ⁻⁹		
<input type="checkbox"/> regulation of monoatomic ion transport	GO:0043269	4.408 × 10 ⁻⁹		
<input type="checkbox"/> regulation of transport	GO:0051049	5.974 × 10 ⁻⁹		
<input type="checkbox"/> neqative regulation of cellular process	GO:0048523	6.162 × 10 ⁻⁹		
<input type="checkbox"/> cell development	GO:0048468	7.796 × 10 ⁻⁹		
<input type="checkbox"/> animal organ development	GO:0048513	1.115 × 10 ⁻⁸		
<input type="checkbox"/> import into cell	GO:0098657	1.351 × 10 ⁻⁸		
<input type="checkbox"/> regulation of membrane potential	GO:0042391	2.107 × 10 ⁻⁸		
<input type="checkbox"/> regulation of cellular process	GO:0050794	3.901 × 10 ⁻⁸		
<input type="checkbox"/> regulation of monoatomic ion transmembrane tra...	GO:0034765	6.067 × 10 ⁻⁸		

<input type="checkbox"/>	cellular component morphogenesis	GO:0032989	1.993×10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/>	neuromuscular process	GO:0050905	2.107×10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/>	biological regulation	GO:0065007	2.110×10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/>	regulation of neurotransmitter levels	GO:0001505	2.254×10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/>	behavior	GO:0007610	2.282×10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/>	muscle contraction	GO:0006936	2.421×10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/>	import across plasma membrane	GO:0098739	2.985×10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/>	positive regulation of biological process	GO:0048518	3.227×10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/>	regulation of biological process	GO:0050789	3.533×10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/>	muscle system process	GO:0003012	5.190×10 ⁻⁷	
<input type="checkbox"/>	cellular localization	GO:0051641	1.025×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	regulation of system process	GO:0044057	1.332×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	plasma membrane bounded cell projection morph...	GO:0120039	1.531×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	cell morphogenesis	GO:0000902	1.855×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	regulation of postsynaptic membrane potential	GO:0060078	1.860×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	cell projection morphogenesis	GO:0048858	1.942×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	cellular component organization	GO:0016043	2.035×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	positive regulation of cellular process	GO:0048522	2.101×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	regulation of multicellular organismal process	GO:0051239	2.855×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	neuron projection morphogenesis	GO:0048812	2.917×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	cell communication	GO:0007154	3.231×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	calcium ion transmembrane import into cytosol	GO:0097553	4.082×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	signaling	GO:0023052	4.477×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	cell part morphogenesis	GO:0032990	6.334×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	negative regulation of biological process	GO:0048519	7.430×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	neurotransmitter transport	GO:0006836	1.812×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	sodium ion transmembrane transport	GO:0035725	1.909×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	cellular component organization or biogenesis	GO:0071840	1.946×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	cell morphogenesis involved in differentiation	GO:0000904	2.325×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	cell surface receptor signaling pathway	GO:0007166	2.388×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	calcium ion transport	GO:0006816	2.857×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	cell population proliferation	GO:0008283	4.833×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	calcium ion transmembrane transport	GO:0070588	5.179×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	synapse organization	GO:0050808	7.207×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	programmed cell death	GO:0012501	7.990×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	axon development	GO:0061564	8.164×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	response to abiotic stimulus	GO:0009628	8.305×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	chemical synaptic transmission, postsynaptic	GO:0099565	8.754×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	regulation of molecular function	GO:0065009	9.533×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	central nervous system development	GO:0007417	9.798×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	response to endogenous stimulus	GO:0009719	1.002×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	cell junction organization	GO:0034330	1.011×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	cell death	GO:0008219	1.045×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	regulation of muscle contraction	GO:0006937	1.137×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	apoptotic process	GO:0006915	1.292×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	cell morphogenesis involved in neuron differentia...	GO:0048667	1.441×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	potassium ion transport	GO:0006813	1.671×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	response to stimulus	GO:0050896	1.795×10 ⁻⁴	

<input type="checkbox"/>	striated muscle contraction	GO:0006941	2.196×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	learning or memory	GO:0007611	2.258×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	regulation of metal ion transport	GO:0010959	2.312×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	regulation of transporter activity	GO:0032409	2.801×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	synaptic transmission, glutamatergic	GO:0035249	2.864×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	brain development	GO:0007420	2.891×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	sodium ion transport	GO:0006814	2.976×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	regulation of cell population proliferation	GO:0042127	3.108×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	cell adhesion	GO:0007155	3.148×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	organic substance transport	GO:0071702	3.165×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	cognition	GO:0050890	3.470×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	regulation of cellular component organization	GO:0051128	3.488×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	axonogenesis	GO:0007409	4.039×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	regulation of muscle system process	GO:0090257	4.053×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	regulation of neuron projection development	GO:0010975	4.700×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	head development	GO:0060322	5.032×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	cell-cell adhesion	GO:0098609	5.362×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	regulation of synaptic plasticity	GO:0048167	5.645×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	regulation of transmembrane transporter activity	GO:0022898	6.020×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	small molecule biosynthetic process	GO:0044283	6.326×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	learning	GO:0007612	6.375×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	potassium ion transmembrane transport	GO:0071805	6.376×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	inorganic cation import across plasma membrane	GO:0098659	6.383×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	inorganic ion import across plasma membrane	GO:0099587	6.383×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	regulation of monoatomic cation transmembrane ...	GO:1904062	8.951×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	cellular modified amino acid metabolic process	GO:0006575	9.305×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	intracellular monoatomic ion homeostasis	GO:0006873	1.026×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	intracellular signal transduction	GO:0035556	1.034×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	muscle tissue development	GO:0060537	1.243×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	regulation of monoatomic ion transmembrane tra...	GO:0032412	1.293×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	cellular homeostasis	GO:0019725	1.553×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	neurotransmitter secretion	GO:0007269	1.724×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	signal release from synapse	GO:0099643	1.724×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	excitatory postsynaptic potential	GO:0060079	2.064×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	musculoskeletal movement	GO:0050881	2.115×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	intracellular monoatomic cation homeostasis	GO:0030003	2.308×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	negative regulation of cell communication	GO:0010648	2.409×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	multicellular organismal movement	GO:0050879	2.449×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	carboxylic acid biosynthetic process	GO:0046394	2.469×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	supramolecular fiber organization	GO:0097435	2.513×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	regulation of neurotransmitter secretion	GO:0046928	2.823×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	anatomical structure formation involved in morph...	GO:0048646	2.828×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	organic acid biosynthetic process	GO:0016053	3.001×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	memory	GO:0007613	3.161×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	regulation of plasma membrane bounded cell pro...	GO:0120035	3.299×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	response to xenobiotic stimulus	GO:0009410	3.593×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	cell migration	GO:0016477	3.666×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	skeletal muscle organ development	GO:0060538	3.835×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	response to oxygen-containing compound	GO:1901700	4.530×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	muscle organ development	GO:0007517	4.532×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	organonitrogen compound metabolic process	GO:1901564	4.628×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	response to light stimulus	GO:0009416	4.817×10 ⁻³	

<input type="checkbox"/>	regulation of cell projection organization	GO:0031344	4.940 × 10 ⁻³
<input type="checkbox"/>	regulation of signal transduction	GO:0009966	4.980 × 10 ⁻³
<input type="checkbox"/>	negative regulation of signaling	GO:0023057	5.104 × 10 ⁻³
<input type="checkbox"/>	intracellular chemical homeostasis	GO:0055082	5.228 × 10 ⁻³
<input type="checkbox"/>	muscle structure development	GO:0061061	5.913 × 10 ⁻³
<input type="checkbox"/>	inorganic ion homeostasis	GO:0098771	6.131 × 10 ⁻³
<input type="checkbox"/>	monoatomic ion homeostasis	GO:0050801	6.676 × 10 ⁻³
<input type="checkbox"/>	cellular response to endogenous stimulus	GO:0071495	6.706 × 10 ⁻³
<input type="checkbox"/>	negative regulation of programmed cell death	GO:0043069	7.465 × 10 ⁻³
<input type="checkbox"/>	positive regulation of developmental process	GO:0051094	7.539 × 10 ⁻³
<input type="checkbox"/>	negative regulation of response to stimulus	GO:0048585	7.747 × 10 ⁻³
<input type="checkbox"/>	negative regulation of apoptotic process	GO:0043066	1.033 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	regulation of neuronal synaptic plasticity	GO:0048168	1.038 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	chemical homeostasis	GO:0048878	1.198 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	positive regulation of multicellular organismal pr...	GO:0051240	1.214 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	monoatomic cation homeostasis	GO:0055080	1.287 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	positive regulation of cell communication	GO:0010647	1.304 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	hindbrain development	GO:0030902	1.315 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	cell motility	GO:0048870	1.340 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	localization within membrane	GO:0051668	1.358 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	cell surface receptor signaling pathway involved i...	GO:1905114	1.380 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	signal release	GO:0023061	1.424 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	export from cell	GO:0140352	1.464 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	amino acid biosynthetic process	GO:0008652	1.470 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	regulation of developmental process	GO:0050793	1.483 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	regulation of neurotransmitter transport	GO:0051588	1.517 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	regulation of programmed cell death	GO:0043067	1.639 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	regulation of nervous system development	GO:0051960	1.665 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	apoptotic signaling pathway	GO:0097190	1.689 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	neuron cellular homeostasis	GO:0070050	1.837 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	carboxylic acid metabolic process	GO:0019752	1.884 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	regulation of apoptotic process	GO:0042981	1.939 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	response to toxic substance	GO:0009636	2.050 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	response to alkaloid	GO:0043279	2.286 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	response to purine-containing compound	GO:0014074	2.509 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	locomotion	GO:0040011	2.521 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	positive regulation of signaling	GO:0023056	2.529 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	regulation of anatomical structure size	GO:0090066	2.662 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	secretion	GO:0046903	2.720 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	regulation of response to stimulus	GO:0048583	2.766 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	pteridine-containing compound metabolic process	GO:0042558	2.853 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	protein localization to membrane	GO:0072657	2.936 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	oxoacid metabolic process	GO:0043436	2.946 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	cellular process	GO:0009987	2.974 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	skeletal muscle contraction	GO:0003009	3.064 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	sensory perception of pain	GO:0019233	3.206 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	adult behavior	GO:0030534	3.225 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	phenol-containing compound metabolic process	GO:0018958	3.373 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	regulation of cell death	GO:0010941	3.395 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	organic acid metabolic process	GO:0006082	3.433 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	tissue development	GO:0009888	3.572 × 10 ⁻²
<input type="checkbox"/>	response to radiation	GO:0009314	3.720 × 10 ⁻²

<input type="checkbox"/>	alpha-amino acid metabolic process	GO:1901605	3.810 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	response to organonitrogen compound	GO:0010243	3.913 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	intracellular calcium ion homeostasis	GO:0006874	4.068 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	establishment of localization in cell	GO:0051649	4.138 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	secretion by cell	GO:0032940	4.326 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	response to organic substance	GO:0010033	4.791 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	response to salt	GO:1902074	4.861 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	negative regulation of cell death	GO:0060548	4.979 × 10 ⁻²	

GO:CC		stats		
<input type="checkbox"/> Term name	Term ID	<input type="checkbox"/> P _{adj}	-log ₁₀ (P _{adj})	
<input type="checkbox"/> synapse	GO:0045202	4.448 × 10 ⁻²⁰	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> neuron projection	GO:0043005	1.305 × 10 ⁻¹⁸	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> cell junction	GO:0030054	3.914 × 10 ⁻¹⁸	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> plasma membrane bounded cell projection	GO:0120025	3.742 × 10 ⁻¹⁵	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> cell projection	GO:0042995	2.175 × 10 ⁻¹⁴	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> cytoplasm	GO:0005737	8.310 × 10 ⁻¹⁴	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> plasma membrane region	GO:0098590	1.415 × 10 ⁻¹³	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> neuronal cell body	GO:0043025	1.035 × 10 ⁻¹²	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> cell body	GO:0044297	1.177 × 10 ⁻¹²	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> somatodendritic compartment	GO:0036477	3.033 × 10 ⁻¹²	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> cellular anatomical entity	GO:0110165	1.049 × 10 ⁻¹¹	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> presynapse	GO:0098793	6.375 × 10 ⁻¹¹	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> postsynapse	GO:0098794	8.445 × 10 ⁻¹¹	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> membrane	GO:0016020	2.185 × 10 ⁻¹⁰	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> cell periphery	GO:0071944	3.423 × 10 ⁻¹⁰	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> synaptic membrane	GO:0097060	2.214 × 10 ⁻⁹	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> axon	GO:0030424	2.447 × 10 ⁻⁹	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> monoatomic ion channel complex	GO:0034702	2.654 × 10 ⁻⁸	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> transmembrane transporter complex	GO:1902495	8.149 × 10 ⁻⁸	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> glutamatergic synapse	GO:0098978	2.984 × 10 ⁻⁷	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> transporter complex	GO:1990351	3.421 × 10 ⁻⁷	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> plasma membrane	GO:0005886	3.691 × 10 ⁻⁷	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> presynaptic membrane	GO:0042734	4.097 × 10 ⁻⁷	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> postsynaptic membrane	GO:0045211	9.903 × 10 ⁻⁷	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> cation channel complex	GO:0034703	1.339 × 10 ⁻⁶	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> dendrite	GO:0030425	1.210 × 10 ⁻⁵	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> plasma membrane protein complex	GO:0098797	1.266 × 10 ⁻⁵	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> dendritic tree	GO:0097447	1.292 × 10 ⁻⁵	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> perikaryon	GO:0043204	2.662 × 10 ⁻⁵	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> neuron to neuron synapse	GO:0098984	3.425 × 10 ⁻⁵	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> myofibril	GO:0030016	3.544 × 10 ⁻⁵	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> supramolecular fiber	GO:0099512	4.410 × 10 ⁻⁵	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> supramolecular polymer	GO:0099081	5.461 × 10 ⁻⁵	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> contractile fiber	GO:0043292	6.701 × 10 ⁻⁵	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> neuron projection terminus	GO:0044306	7.400 × 10 ⁻⁵	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> postsynaptic density	GO:0014069	1.440 × 10 ⁻⁴	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> sarcomere	GO:0030017	2.029 × 10 ⁻⁴	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> postsynaptic specialization	GO:0099572	2.281 × 10 ⁻⁴	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> asymmetric synapse	GO:0032279	3.056 × 10 ⁻⁴	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> membrane protein complex	GO:0098796	3.450 × 10 ⁻⁴	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> postsynaptic specialization membrane	GO:0099634	3.457 × 10 ⁻⁴	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> supramolecular complex	GO:0099080	3.762 × 10 ⁻⁴	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> postsynaptic density membrane	GO:0098839	4.402 × 10 ⁻⁴	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> main axon	GO:0044304	5.679 × 10 ⁻⁴	[Bar chart]	
<input type="checkbox"/> dendritic spine head	GO:0044327	7.200 × 10 ⁻⁴	[Bar chart]	

<input type="checkbox"/>	sarcolemma	GO:0042383	1.272×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	excitatory synapse	GO:0060076	1.536×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	presynaptic active zone	GO:0048786	1.830×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	sodium channel complex	GO:0034706	1.933×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	I band	GO:0031674	2.032×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	voltage-gated sodium channel complex	GO:0001518	2.335×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	axon terminus	GO:0043679	2.763×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	transport vesicle	GO:0030133	3.170×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	endomembrane system	GO:0012505	5.513×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	parallel fiber to Purkinje cell synapse	GO:0098688	5.721×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	dendritic spine	GO:0043197	6.081×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	neuron spine	GO:0044309	8.271×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	distal axon	GO:0150034	1.269×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	striated muscle thin filament	GO:0005865	1.285×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	sarcoplasm	GO:0016528	1.816×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	cell body membrane	GO:0044298	1.924×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	synaptic cleft	GO:0043083	2.012×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	Z disc	GO:0030018	2.024×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	actin cytoskeleton	GO:0015629	2.031×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	neuron projection membrane	GO:0032589	2.162×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	myofilament	GO:0036379	3.022×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	cytoskeleton	GO:0005856	4.321×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	myelin sheath	GO:0043209	4.539×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	cell surface	GO:0009986	4.801×10 ⁻²	

KEGG stats [»](#)

<input type="checkbox"/> Term name	Term ID	<input type="checkbox"/>	p _{adj}	-log ₁₀ (p _{adj})
<input type="checkbox"/>	Adrenergic signaling in cardiomyocytes	KEGG:04261	2.638×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	Calcium signaling pathway	KEGG:04020	4.794×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	Mineral absorption	KEGG:04978	6.889×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	Cardiac muscle contraction	KEGG:04260	5.653×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	Amphetamine addiction	KEGG:05031	2.722×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	Nicotine addiction	KEGG:05033	4.357×10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	cAMP signaling pathway	KEGG:04024	4.393×10 ⁻²	

REAC stats [»](#)

<input type="checkbox"/> Term name	Term ID	<input type="checkbox"/>	p _{adj}	-log ₁₀ (p _{adj})
<input type="checkbox"/>	Neuronal System	REAC:R-MMU-...	2.432×10 ⁻⁶	
<input type="checkbox"/>	Muscle contraction	REAC:R-MMU-...	4.411×10 ⁻⁵	
<input type="checkbox"/>	Transmission across Chemical Synapses	REAC:R-MMU-...	1.178×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	Striated Muscle Contraction	REAC:R-MMU-...	7.953×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	Activation of NMDA receptors and postsynaptic ev...	REAC:R-MMU-...	9.856×10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	Neurotransmitter release cycle	REAC:R-MMU-...	1.214×10 ⁻²	

WP stats [»](#)

<input type="checkbox"/> Term name	Term ID	<input type="checkbox"/>	p _{adj}	-log ₁₀ (p _{adj})
<input type="checkbox"/>	Dravet syndrome: Scn1a-A1783V point mutation m...	WP:WP5298	1.176×10 ⁻⁴	
<input type="checkbox"/>	Calcium regulation in cardiac cells	WP:WP553	9.433×10 ⁻³	

HP		stats		
<input type="checkbox"/> Term name	Term ID	<input type="checkbox"/> p _{adj}	<input type="checkbox"/> -log ₁₀ (p _{adj})	<input type="checkbox"/> s16
<input type="checkbox"/> Muscle fiber cytoplasmatic inclusion bodies	HP:0100303	1.626 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> Muscle fiber inclusion bodies	HP:0100299	4.432 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> Nemaline bodies	HP:0003798	7.586 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> Focal motor seizure	HP:0011153	2.139 × 10 ⁻²		

Figura 17. Resultados de g:Profiler para el enriquecimiento funcional de los genes seleccionados para *dKO* vs WT en las distintas bases de datos usadas por la web: GO:MF (Gene Ontology: Molecular Function), BP (Biological Process) y CC (Cellular Component); KEGG, Reactome (REAC), WikiPathways (WP) y Human Phenotype Ontology (HP). Se muestra al lado el identificador del término y el p-valor que corresponde, coloreado según el logaritmo del mismo.

GO:MF		stats		
<input type="checkbox"/> Term name	Term ID	<input type="checkbox"/> p _{adj}	<input type="checkbox"/> -log ₁₀ (p _{adj})	<input type="checkbox"/> s16
<input type="checkbox"/> metal ion transmembrane transporter activity	GO:0046873	1.138 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> potassium ion transmembrane transporter activity	GO:0015079	1.270 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/> voltage-gated channel activity	GO:0022832	4.912 × 10 ⁻²		

GO:BP		stats		
<input type="checkbox"/> Term name	Term ID	<input type="checkbox"/> p _{adj}	<input type="checkbox"/> -log ₁₀ (p _{adj})	<input type="checkbox"/> s16
<input type="checkbox"/> nervous system development	GO:0007399	1.180 × 10 ⁻⁹		
<input type="checkbox"/> system development	GO:0048731	5.566 × 10 ⁻⁹		
<input type="checkbox"/> multicellular organism development	GO:0007275	2.801 × 10 ⁻⁸		
<input type="checkbox"/> neuron differentiation	GO:0030182	6.041 × 10 ⁻⁷		
<input type="checkbox"/> generation of neurons	GO:0048699	1.821 × 10 ⁻⁶		
<input type="checkbox"/> cell differentiation	GO:0030154	3.374 × 10 ⁻⁶		
<input type="checkbox"/> cellular developmental process	GO:0048869	4.335 × 10 ⁻⁶		
<input type="checkbox"/> developmental process	GO:0032502	4.932 × 10 ⁻⁶		
<input type="checkbox"/> anatomical structure development	GO:0048856	6.196 × 10 ⁻⁶		
<input type="checkbox"/> neurogenesis	GO:0022008	9.838 × 10 ⁻⁶		
<input type="checkbox"/> neuron development	GO:0048666	1.950 × 10 ⁻⁵		
<input type="checkbox"/> cell development	GO:0048468	1.229 × 10 ⁻⁴		
<input type="checkbox"/> neuron projection development	GO:0031175	1.924 × 10 ⁻⁴		
<input type="checkbox"/> monoatomic ion transport	GO:0006811	4.871 × 10 ⁻⁴		
<input type="checkbox"/> axon development	GO:0061564	7.303 × 10 ⁻⁴		
<input type="checkbox"/> inorganic cation transmembrane transport	GO:0098662	8.495 × 10 ⁻⁴		
<input type="checkbox"/> monoatomic ion transmembrane transport	GO:0034220	1.005 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> metal ion transport	GO:0030001	1.017 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> axonogenesis	GO:0007409	1.395 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> monoatomic cation transmembrane transport	GO:0098655	1.477 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> monoatomic cation transport	GO:0006812	1.976 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> positive regulation of cellular process	GO:0048522	4.309 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> cell adhesion	GO:0007155	4.459 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> animal organ development	GO:0048513	4.641 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> inorganic ion transmembrane transport	GO:0098660	4.852 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> cell morphogenesis involved in differentiation	GO:0000904	5.011 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> cell-cell adhesion	GO:0098609	5.218 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> anatomical structure morphogenesis	GO:0009653	5.885 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> potassium ion transport	GO:0006813	5.941 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> synaptic signaling	GO:0099536	6.753 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/> plasma membrane bounded cell projection organi...	GO:0120036	7.604 × 10 ⁻³		

<input type="checkbox"/>	regulation of membrane potential	GO:0042391	8.342 × 10 ⁻³	
<input type="checkbox"/>	cell projection organization	GO:0030030	1.090 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	chemical synaptic transmission	GO:0007268	1.533 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	anterograde trans-synaptic signaling	GO:0098916	1.533 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	neuron projection morphogenesis	GO:0048812	1.680 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	trans-synaptic signaling	GO:0099537	1.690 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	potassium ion transmembrane transport	GO:0071805	1.999 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	plasma membrane bounded cell projection morph...	GO:0120039	2.132 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	regulation of cell differentiation	GO:0045595	2.230 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	cell projection morphogenesis	GO:0048858	2.342 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	regulation of developmental process	GO:0050793	2.532 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	cell morphogenesis	GO:0000902	2.764 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	cellular component organization	GO:0016043	3.064 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	cell morphogenesis involved in neuron differentia...	GO:0048667	3.262 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	head development	GO:0060322	3.511 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	cellular component morphogenesis	GO:0032989	3.560 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	cell part morphogenesis	GO:0032990	3.741 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	central nervous system development	GO:0007417	3.920 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	behavior	GO:0007610	4.267 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	transmembrane transport	GO:0055085	4.932 × 10 ⁻²	
<input type="checkbox"/>	regulation of cell projection size	GO:0032536	4.956 × 10 ⁻²	

GO:CC stats »

<input type="checkbox"/>	Term name	Term ID	P_{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$	s_{16}
<input type="checkbox"/>	synapse	GO:0045202	2.079 × 10 ⁻¹⁰		
<input type="checkbox"/>	cell junction	GO:0030054	1.370 × 10 ⁻⁸		
<input type="checkbox"/>	synaptic membrane	GO:0097060	6.497 × 10 ⁻⁷		
<input type="checkbox"/>	presynapse	GO:0098793	1.245 × 10 ⁻⁶		
<input type="checkbox"/>	glutamatergic synapse	GO:0098978	2.451 × 10 ⁻⁶		
<input type="checkbox"/>	plasma membrane bounded cell projection	GO:0120025	2.690 × 10 ⁻⁶		
<input type="checkbox"/>	neuron projection	GO:0043005	6.073 × 10 ⁻⁶		
<input type="checkbox"/>	cell projection	GO:0042995	7.251 × 10 ⁻⁶		
<input type="checkbox"/>	axon	GO:0030424	2.055 × 10 ⁻⁵		
<input type="checkbox"/>	somatodendritic compartment	GO:0036477	3.675 × 10 ⁻⁵		
<input type="checkbox"/>	presynaptic membrane	GO:0042734	5.192 × 10 ⁻⁵		
<input type="checkbox"/>	postsynapse	GO:0098794	7.291 × 10 ⁻⁵		
<input type="checkbox"/>	plasma membrane region	GO:0098590	1.158 × 10 ⁻⁴		
<input type="checkbox"/>	cell body	GO:0044297	2.056 × 10 ⁻⁴		
<input type="checkbox"/>	neuronal cell body	GO:0043025	1.191 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/>	postsynaptic membrane	GO:0045211	1.749 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/>	postsynaptic specialization membrane	GO:0099634	3.558 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/>	postsynaptic density membrane	GO:0098839	6.806 × 10 ⁻³		
<input type="checkbox"/>	voltage-gated potassium channel complex	GO:0008076	1.343 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/>	excitatory synapse	GO:0060076	2.254 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/>	cellular anatomical entity	GO:0110165	2.627 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/>	potassium channel complex	GO:0034705	2.785 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/>	membrane	GO:0016020	2.884 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/>	postsynaptic specialization	GO:0099572	3.343 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/>	I band	GO:0031674	3.733 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/>	transmembrane transporter complex	GO:1902495	4.226 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/>	neuron to neuron synapse	GO:0098984	4.245 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/>	dendrite	GO:0030425	4.797 × 10 ⁻²		
<input type="checkbox"/>	dendritic tree	GO:0097447	4.916 × 10 ⁻²		

KEGG		stats	
<input type="checkbox"/> Term name	Term ID	p_{adj}	$-\log_{10}(p_{adj})$
<input type="checkbox"/> Adrenergic signaling in cardiomyocytes	KEGG:04261	2.508×10^{-3}	
<input type="checkbox"/> Cell adhesion molecules	KEGG:04514	4.147×10^{-2}	

REAC		stats	
<input type="checkbox"/> Term name	Term ID	p_{adj}	$-\log_{10}(p_{adj})$
<input type="checkbox"/> Neuronal System	REAC:R-MMU-...	3.710×10^{-4}	
<input type="checkbox"/> Glutamate Neurotransmitter Release Cycle	REAC:R-MMU-...	4.798×10^{-3}	
<input type="checkbox"/> Neurotransmitter release cycle	REAC:R-MMU-...	5.215×10^{-3}	

Figura 18. Resultados de g:Profiler para el enriquecimiento funcional de los genes seleccionados para *Chd4^{KO}* vs *dKO* en distintas bases de datos: GO:MF (Gene Ontology: Molecular Function), BP (Biological Process) y CC (Cellular Component); KEGG y REAC (Reactome). Se muestra al lado el identificador del término y su p-valor, coloreado según el logaritmo del mismo.