



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE
ÁCIDOS NUCLEICOS SID-1 EN CÉLULAS DE
MAMÍFERO**

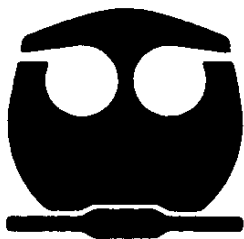
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

GUSTAVO ANTONIO URRUTIA



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: CARMEN GIRAL BARNES

VOCAL: Profesor: JOSE PEDRAZA CHAVERRI

SECRETARIO: Profesor: LUIS ALFONSO VACA DOMINGUEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: MIREYA RODRIGUEZ PENAGOS

2° SUPLENTE: Profesor: LEON PATRICIO MARTINEZ CASTILLA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Fisiología Celular,
Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Laboratorio 126N. Ciudad
Universitaria, México, D.F.

ASESOR DEL TEMA: DR. LUIS ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ

SUPERVISOR TÉCNICO: VÍCTOR JULIÁN VALDEZ RODRÍGUEZ

SUSTENTANTE: GUSTAVO ANTONIO URRUTIA

Agradecimientos

Académicos

A la **UNAM**, por haber moldeado mi vida durante la última década.

Al **Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICYT)**, por su valioso apoyo a este proyecto.

A la **Secretaría de Educación Pública (SEP)**, por la beca de titulación, gracias a la cual, este documento se ha hecho materia.

A la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA)**, por su patrocinio.

Al Dr. **Luis Vaca**, por la oportunidad de estar en su laboratorio, y por sus excelentes consejos y oportuna guía.

A **Julián**, por el simple hecho de hacer posible esta tesis.

A los integrantes del laboratorio 126N del IFC: **Alex, Yólik, Ricardo, Alicia, Israel, Chucho, Mariana, Adriana, Claudia y Jhonatan**. Por su invaluable ayuda y compañía.

Personales

A mi **Familia** por su eterno e incondicional apoyo.

A **Alejandra**. *Ab imo pectore*.

A los jóvenes del grupo 1 generación 2005: **Fernando, Jorge, Daniela, Liliana, Lupita, Huicho, Araceli**; y a los que advinieron en solaz durante camino: **Guadalupe, Mau, Gabi, Rocío, Arturo**. Por todo el jolgorio, desavenencias y comidillas.

**“Una serie de bellos experimentos
es uno de los goces más teatrales.”**

F. Nietzsche

Est deus un nobis

CONTENIDO

Datos del Jurado	i
Agradecimientos	ii
1. RESUMEN	1
2. ABREVIATURAS	3
3. MARCO TEÓRICO	4
3.1 RNA de interferencia	4
3.2 RNAi sistémico	8
3.2.1 RNAi sistémico en <i>C. elegans</i>	8
3.2.2 Proteínas y genes involucrados en el RNAi sistémico de <i>C. elegans</i>	11
3.2.3 SID-1	12
3.2.4 RNAi sistémico en otros organismos	15
3.3 Internalización de ácidos nucleicos mediada por endocitosis	17
3.4 Endocitosis	20
3.4.1 Macropinocitosis	25
3.4.2 Endocitosis mediada por clatrina	25
3.4.3 Endocitosis mediada por caveolina	27
4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
4.1 Producción de vectores virales para expresar a la proteína SID-1 de <i>C. elegans</i> en células de mamífero	31
4.1.1 Clonación del gen SID-1 de <i>C. elegans</i> en el sistema pLlox 3.7	33
4.1.2 Protocolo 1. Producción de lentivirus en células HEK 293-FT	35
4.2 Síntesis de ácidos nucleicos	38
4.2.1 Síntesis de dsRNA	38
4.2.2 Síntesis de ssRNA y siRNA	39
4.2.3 Síntesis de dsDNA	39
4.2.4 Síntesis de ssDNA	39
4.2.5 Protocolo 2. Purificación de ácidos nucleicos de Gel	40

CONENIDO

4.2 Determinación del Mecanismo de Internalización de dsRNA en células HEK-293 FT mediado por Sid-1	42
4.3.1 Generalidades	42
4.3.2 Protocolo 3. Experimentos de Temperatura	43
4.3.3 Protocolo 4. Experimentos en presencia de fármacos	44
4.3.4 Protocolo 5. Ensayos con Radioactividad	45
4.3.5 Protocolo 6. Silenciamiento génico mediado por dsRNA	45
4.3.6 Protocolo 7. Localización intracelular de la proteína SID-1::GFP	47
5. RESULTADOS	49
5.1 Generación de una línea celular que expresa a SID-1 de manera estable	49
5.2 Internalización de dsRNA en células de mamífero mediada por SID-1.	50
5.2.1 Internalización a concentraciones crecientes de dsRNA	50
5.2.2 Internalización de dsRNA a distintos tiempos	53
5.3 RNA de interferencia mediado por SID-1	54
5.4 Selectividad de SID-1	59
5.5 Mecanismo de internalización de dsRNA mediado por SID-1	60
5.6 Localización de la proteína de fusión SID-1::GFP	63
6. DISCUSIÓN	69
7. CONCLUSIONES	81
8. PERSPECTIVAS	82
9. BIBLIOGRAFÍA	84

1. RESUMEN

La célula ha desarrollado complejos sistemas que regulan su expresión genética a distintos niveles. En la última década, se ha puesto especial interés en un mecanismo de silenciamiento genético post-transcripcional: el RNA de interferencia (RNAi, por sus siglas en inglés). Este fenómeno consiste en la degradación de RNA mensajero mediada por RNA de doble cadena (dsRNA, por sus siglas en inglés) de manera secuencia específica. El sistema encargado de silenciar genes vía dsRNA se ha observado en prácticamente todos los *phyla*: desde plantas y hongos hasta insectos y mamíferos. Ya que el RNAi permite silenciar genes de manera específica sin modificar directamente el genoma de la célula, su importancia como fenómeno biológico y herramienta biotecnológica ha crecido vertiginosamente; en la actualidad diversos grupos de investigación e industrias farmacéuticas estudian su aplicación en distintos campos. En mamíferos, el estudio del RNAi está limitado por la introducción de dsRNA al interior de las células, por lo que se han desarrollado metodologías como la transfección lipídica y la electroporación para introducir el dsRNA al citoplasma e iniciar un fenómeno de RNAi. Sin embargo estas técnicas sólo pueden ser aplicadas en ciertas líneas celulares susceptibles y son prácticamente imposibles de implementar en organismos completos.

En el nematodo *C. elegans* se observó un fenómeno muy interesante llamado RNAi sistémico, gracias al cual el dsRNA entra a casi todas las células del organismo y desata en ellas una respuesta de RNAi. Recientemente se han caracterizado algunos de los genes responsables de dicha sistemicidad, uno de los más importantes es *sid-1*. Este gen codifica para una proteína de 776 aminoácidos con 11 segmentos transmembranales; se cree que esta proteína es un canal que permite la difusión pasiva de dsRNA al interior de la célula, aunque hasta el momento no se ha caracterizado a detalle su mecanismo de acción y existe controversia sobre su supuesta función como canal, en especial porque las vías de endocitosis parecen jugar un papel muy importante en el RNAi sistémico

de *C. elegans*. Por otro lado, diversos grupos han observado que la expresión ectópica de SID-1 en células de insecto es suficiente para promover la entrada de dsRNA a la célula y desatar el fenómeno de RNAi.

Por lo anterior, el propósito de este trabajo fue expresar a la proteína de SID-1 de *C. elegans* en células de mamífero de manera estable, tal que la simple exposición de éstas células al dsRNA desencadene un efecto de RNAi. Para ello, se produjo un vector lentiviral capaz de transducir eficientemente células de mamífero. Con este vector se generaron líneas celulares de HEK 293-FT que expresaban a SID-1 y/o a la proteína verde fluorescente. Estas células se incubaron en presencia de dsRNA y, mediante citometría de flujo y microscopía confocal, se evaluó tanto la entrada de este ácido nucleico como su capacidad para inducir RNAi. Por otro lado, para determinar el mecanismo mediante el cual SID-1 promueve la entrada de dsRNA a la célula, se evaluó su comportamiento en diferentes condiciones de temperatura, tiempo, ATP, concentración de dsRNA en el medio y en presencia de compuestos que alteran distintas vías de internalización.

En este trabajo se observó que la expresión de SID-1 en células de mamífero es suficiente para promover la internalización de dsRNA y la participación de este ácido nucleico en el RNA de interferencia. Además, la internalización de dsRNA vía SID-1 depende de la temperatura, del ATP, de la polimerización de la actina y de la caveolina, lo que en conjunto sugiere que el proceso de internalización en células de mamífero es endocitosis mediada por caveolina.

La caracterización de la proteína SID-1 ayudará a ampliar nuestro conocimiento sobre el fenómeno de RNAi sistémico y brindará las bases para sus posibles aplicaciones a nivel biotecnológico.

2. ABREVIATURAS

AAV	Virus Adeno Asociado
ATP	Trifosfato de adenosina
GFP	Proteína Verde Fluorescente
HEK	Células de Riñón de Embrión Humano
RIG-1	Gen inducible por ácido retinoico
TLR-3	Receptor Tipo Toll 3
nt	Nucleótidos
pb	Pares de bases
dsRNA	RNA de doble hebra
ssRNA	RNA de hebra sencilla
siRNA	RNA pequeño interferente
dsDNA	DNA de doble hebra
ssDNA	DNA de hebra sencilla
RNAi	RNA de interferencia
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensajero

3. MARCO TEÓRICO

3.1 RNA DE INTERFERENCIA

El RNA de interferencia (RNAi) es un mecanismo biológico que inhibe específicamente la expresión de genes a nivel post-transcripcional, en respuesta a un RNA de doble hebra (dsRNA, del inglés “*double stranded RNA*”) que proviene de la propia célula (microRNA o miRNA) o de su exterior (RNAs de interferencia pequeños o siRNAs, “*small interfering RNAs*”) [1-4].

El RNAi fue caracterizado por primera vez en 1998, cuando Fire y Mello demostraron que la introducción de dsRNA en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* inducía la degradación del RNA mensajero (mRNA) cuya secuencia era complementaria al dsRNA [5]. Este fenómeno de silenciamiento de genes en respuesta a dsRNA exógeno fue observado previamente en plantas y hongos, al igual que en algunos invertebrados [6]. Estudios posteriores demostraron que este fenómeno está ampliamente distribuido en eucariotes, encontrándose en prácticamente todos los phyla [3].

Los estudios para determinar los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo el RNAi fueron realizados principalmente en el nemátodo *C. elegans* y en la mosca de fruta *Drosophila melanogaster*, mediante la introducción de dsRNA largos (~500pb) [5, 7-8]. En el citoplasma el dsRNA es reconocido por una RNasa específica llamada Dicer, que lo corta en fragmentos de aproximadamente 21nt (siRNAs) [9]. Estos pequeños fragmentos son reconocidos por un complejo multiprotéico denominado RISC (del inglés *RNA “induced silencing complex”*) [10-12]. El complejo RISC abre al siRNA y conserva la hebra cuyo extremo 5' sea energéticamente menos estable [13-14]. Cuando RISC, cargado con una hebra del siRNA, encuentra un RNA mensajero homólogo al siRNA, una proteína llamada Argonata 2 media el corte del mensajero en la región homóloga [12]. El resultado

final es la degradación del mensajero, lo que evita la traducción de la proteína. Sólo unas cuantas moléculas de dsRNA por célula son necesarias para iniciar una respuesta RNAi en el *C. elegans* [5]. Otro punto notable es la especificidad con la que actúa este sistema, puesto que la degradación del mensajero depende de una complementariedad perfecta entre el siRNA y el mRNA [15].

En 2001, Elbashir [16-17] y Caplen [18] demostraron que las células de mamífero poseen la maquinaria necesaria para desencadenar el RNAi. En estos trabajos, los dsRNAs “largos” fueron sustituidos por dsRNAs sintéticos de 21-25 nucleótidos con extremos protruyentes, imitando la estructura de los siRNAs generados por Dicer. La introducción de los RNAs pequeños indujo el silenciamiento específico de genes sin activar la respuesta mediada por interferón. Los hallazgos de Elbashir y Caplen son la base del desarrollo del RNAi como herramienta de experimentación para el silenciamiento de genes específicos en mamíferos mediada por dsRNA exógeno. Estudios posteriores demostraron la existencia de RNAs pequeños de doble hebra (19-25 pb) de origen endógeno denominados micro RNAs (miRNAs) [19], estructuralmente similares a los siRNAs. A diferencia de los siRNAs generados por dsRNA exógeno, estos miRNAs provienen del procesamiento de precursores de dsRNA transcritos en el núcleo de la propia célula (pri-miRNAs) [20]. Estos precursores son cortados por el “complejo Drosha”, formado por una enzima de la familia de la RNasa tipo III, Drosha, y una proteína de unión a dsRNA, DGCR8 [21]. Los productos de este procesamiento (pre-miRNAs) son exportados del núcleo al citoplasma por el complejo exportina-5-RanGTP, en donde son procesados por Dicer para producir los miRNAs maduros [Figura 1]. Las evidencias demostraron rápidamente que los miRNAs constituyen una nueva vía de regulación genética en distintas especies, donde el miRNA reconoce secuencias parcialmente complementarias en la región 3' no traducida del mRNA correspondiente, lo que provoca la inhibición de la traducción [18].

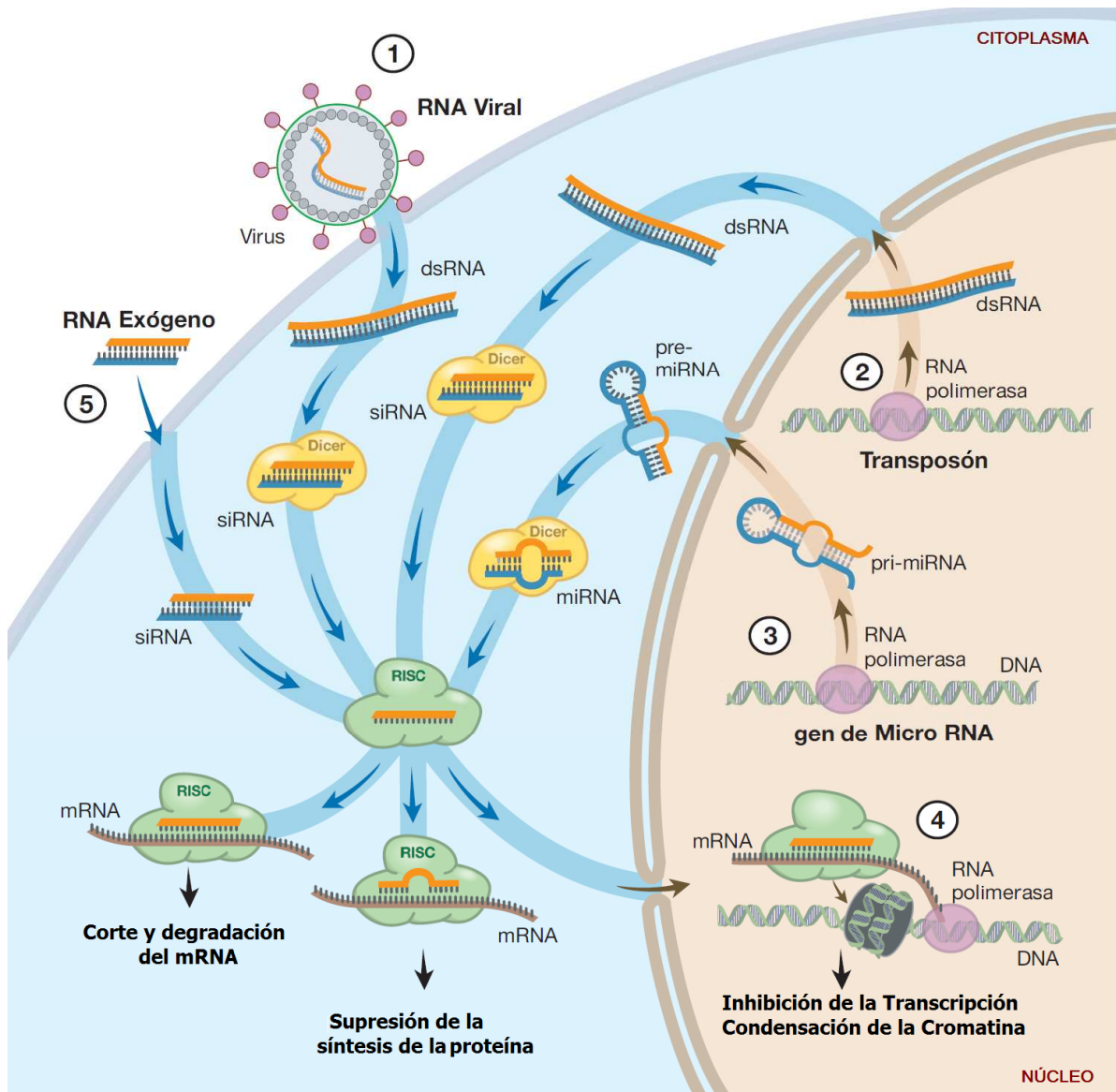


Figura 1. Silenciamiento post-transcripcional mediado por dsRNA. Los complejos Dicer y RISC juegan un papel central en la destrucción de RNA viral (1), la eliminación de transcritos provenientes de transposones (2), el bloqueo de la síntesis de proteínas mediado por miRNAs (3), o la supresión de la transcripción mediada por RNAi (4). La misma maquinaria es utilizada cuando se introducen siRNAs de manera experimental para inhibir la actividad de genes específicos (5). Modificado de [22].

La actividad de los RNAs pequeños no se limita únicamente a la regulación postranscripcional, se han reportado casos en los que los miRNAs inhiben la traducción de sus mensajeros blanco o, al contrario, la promueven [23]. A la fecha se han reportado más de 14,197 secuencias de miRNAs expresados en más de 70 especies distintas, lo que indica que el RNAi es un proceso evolutivamente

conservado [24]. En mamíferos, los miRNAs han sido relacionados en la expresión de genes involucrados con desarrollo, hematopoyesis y muerte celular, entre muchos otros [25]. También están implicados en la regulación de transposones [26] y últimamente se han identificado en genomas virales [27]. Se sabe que hay miRNAs codificados en intrones (Mirtrones) [28]. Cabe decir que los fenómenos biológicos relacionados con el RNA de interferencia y los RNAs pequeños son tan vastos, que la revisión de cada uno de ellos está fuera del alcance de este trabajo, por tanto, sugerimos las referencias 2 y 8 como punto de partida en el estudio de este fenómeno biológico. En la Figura 1 se resumen los principales procesos en los que participa la maquinaria del RNAi.

Es importante mencionar que, en contraste con lo que ocurre en invertebrados, la introducción de dsRNAs “largos” (mayores a 30pb) en células somáticas de mamíferos induce la activación de la respuesta antiviral mediada por interferón (IFN) [29]. El interferón activa la transcripción del gen de la Proteína-Cinasa dependiente de RNA (PKR). PKR reconoce dsRNAs “largos”, luego de lo cual fosforila e inactiva al Factor de Iniciación 2 (eIF2- α), inhibiendo así la traducción de mRNA en forma generalizada [30-31]. Por otro lado, se ha observado que si se emplean siRNAs con extremos romos serán reconocidos por la proteína RIG-I, un sensor de dsRNA en citoplasma que induce la respuesta mediada por IFN, a diferencia de los siRNAs con extremos protruyentes, quienes son reconocidos como propios [32]. Todos estos procesos son parte integral de la inmunidad innata de las células y constituyen un tipo de respuesta antiviral que la célula ha desarrollado para defenderse de retrovirus y transposones que son la principal fuente fisiológica de dsRNA mayores a 30nt.

En lo que respecta al uso del RNAi como herramienta biotecnológica, desde el primer artículo de Fire y Mello, la comunidad científica ha quedado fascinada con ella. Actualmente, los tamizajes (*screenings*) masivos de genes son una rutina para *C. elegans* y células de *Drosophila* en cultivo, e incluso, están empezando a serlo también para células de mamífero [33-35]. Gracias al RNAi, el efecto en una

vía metabólica, la morfología de una célula o el fenotipo de un organismo puede ser investigado en pocas semanas prácticamente para cada gen conocido. En lo que respecta a sus aplicaciones terapéuticas, los estudios en los que se investiga su uso para tratar el cáncer [36], infecciones virales [37] y otras enfermedades son innumerables.

3.2 RNAi SISTÉMICO

3.2.1 RNAi sistémico en *C. elegans*

Existen diversas estrategias para iniciar un efecto RNAi en *C. elegans* [Figura 2] [38]; una de ellas es la expresión de un dsRNA en determinadas células o tejidos del nematodo. Esto se logra generando animales transgénicos que expresan RNA de doble hebra bajo un promotor determinado. La expresión de este dsRNA resulta en la degradación del mensajero homólogo y la consecuente ausencia de la proteína para la cual codificaba. Otra estrategia es la inyección dsRNA sintetizado *in vitro* en la cavidad pseudocolematida o en la gónada del nemátodo. La inyección de dsRNA en la gónada provoca que éste llegue a la línea germinal haciendo que el efecto del RNAi sea observado en los embriones. Este hecho tan particular ha sido especialmente útil para estudiar genes involucrados en etapas tempranas del desarrollo de este organismo [39]. Por otro lado, una de las metodologías más ampliamente utilizadas consiste en alimentar al gusano con bacterias *Escherichia coli* modificadas genéticamente para expresar dsRNAs [40]. A esta metodología se le conoce como “*feeding*” del inglés “alimentar”. En el sistema digestivo del gusano las bacterias son digeridas y el dsRNA es absorbido del lumen del intestino y distribuido de célula a célula por todo el organismo. De igual manera que la inyección, el efecto de RNAi no sólo es observado en el animal que ingirió las bacterias sino también en la progenie de éste.

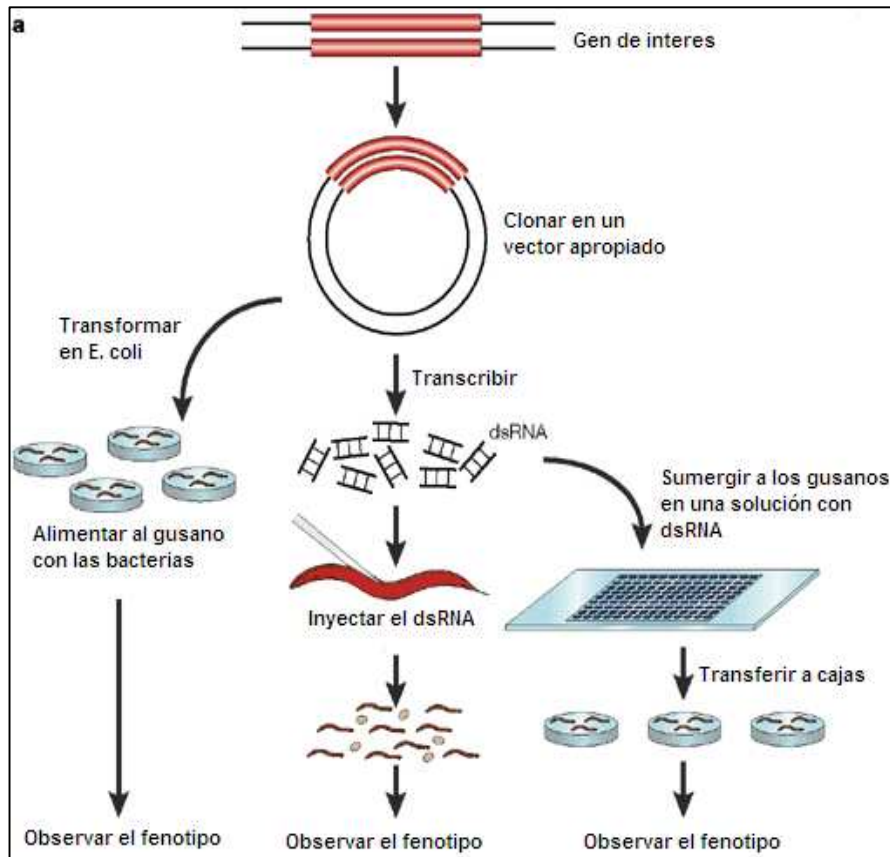


Figura 2. Estrategias experimentales para producir RNAi en *C. elegans*. Modificado de [38]

La sistemicidad del RNAi en *C. elegans* es tan potente que incluso el simple hecho de sumergirlo en una solución con dsRNA es capaz de iniciar un efecto RNAi en todo el organismo (RNAi ambiental) [41-43]. Esto llevó a pensar que *C. elegans* tiene un sistema para tomar dsRNA del medio en el que vive y posteriormente distribuirlo (ya sea en forma de dsRNA o siRNAs) por todo el organismo. Es importante mencionar que no todas las células del gusano son igualmente sensibles al RNAi sistémico, ejemplo de ello son las neuronas que parecen ser resistentes a este efecto [44]

La cantidad de dsRNA necesaria para iniciar un efecto sistémico de silenciamiento vía micro-inyección es de apenas de 0.5 ng/ μ l por gusano[38], esta cantidad ni siquiera puede ser rastreada célula a célula utilizando dsRNA fluorescente. Esto da pie a pensar que el dsRNA inyectado inicialmente no es el responsable de viajar célula a célula, sino que es otra señal la que desencadena el RNAi

sistémico. Se ha propuesto que en el nematodo existe un sistema de amplificación de la señal [45] que involucra sintetizar nuevo dsRNA a partir del que es inyectado y es este “nuevo” dsRNA el que viaja por todo el organismo. Dicho sistema sería muy similar al que se encuentra en plantas, donde una RNA Polimerasa dependiente de RNA es la responsable de amplificar la señal de una sola molécula dsRNA mediante la síntesis de nuevas copias [46].

En resumen, se define que el RNAi en *C. elegans* es **sistémico**, es decir: la administración, exposición o expresión local de un dsRNA inicia un efecto de silenciamiento génico postranscripcional en tejidos y células distantes a la zona o células inicialmente expuestas al dsRNA. En la Figura 3 se explican de manera breve las diferencias y particularidades que existen entre los tres principales tipos de RNAi: sistémico, ambiental y autónomo en *C. elegans*.

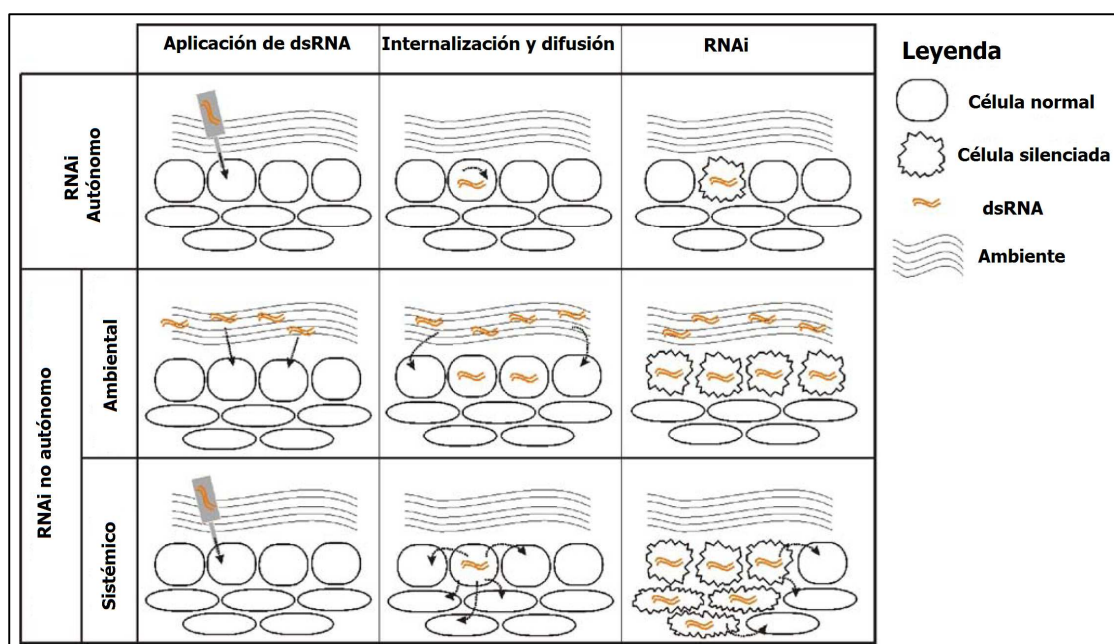


Figura 3. Una revisión esquemática de los diferentes tipos de RNAi. En la figura, el silenciamiento de un gen hipotético se traduce en cambios en la morfología de la célula. La primera fila representa al RNAi autónomo. dsRNA de un gen esencial para la morfología es internalizado, aplicado o expresado en una célula sana. El efecto de silenciamiento está limitado a la célula expuesta. En el caso del RNAi ambiental, el dsRNA es tomado del medio y el efecto de silenciamiento es observado en todas las células que sean capaces de internalizar al dsRNA. Esto puede ocurrir en organismos uni- y pluricelulares. De hecho, este es el fenómeno que ocurre en el intestino de *C. elegans*. Por su parte, el RNAi sistémico comprende todos los procesos mediante los cuales la señal de silenciamiento es transportada a partir de la primera célula expuesta hacia las células vecinas, hasta extenderse a otros órganos e incluso a la progenie. modificado de [41].

3.2.2 Proteínas y genes involucrados en el RNAi sistémico de *C. elegans*

Actualmente se han caracterizado varios de los genes involucrados en el efecto sistémico del RNAi en *C. elegans*. Estos fueron identificados buscando animales mutantes que no presentaran RNAi sistémico pero que fueran capaces de llevar a cabo RNAi a nivel celular. Al conjunto de genes mutados en dichos animales se les denominó “*rsd*” por “*RNAi spreading defective*” (deficientes en RNAi sistémico) [43].

Los genes *rsd* se dividen en dos grupos: los que al estar mutados imposibilitan el efecto sistémico en todos los tejidos del gusano (*rsd-4* y *-8*) y aquellos genes que sólo están involucrados en la sistemicidad del RNAi en la gónada pero no así en el resto de los tejidos (*rsd-2*, *-3* y *-6*). El primer grupo son genes involucrados con la entrada de dsRNA proveniente del ambiente, por ejemplo, del intestino al resto del cuerpo, mientras que el segundo grupo está involucrado sólo con en el paso o la entrada de dsRNA a las células germinales una vez que éste se ha distribuido por todo el organismo [47].

De los genes involucrados en línea germinal, *rsd-3* codifica para una proteína con un dominio ENTH (epsin N-terminal homology), el cual se sabe que une fosfoinosítidos y que frecuentemente está involucrado en el transporte vesicular de proteínas y la endocitosis dependiente de clatrina [48]. Si *rsd-3* está involucrado en alguna de las vías de endocitosis, esta puede ser una vía específica de entrada de dsRNA en células de línea germinal [8].

Por otro lado, *rsd-2* no tiene motivos proteicos conocidos o proteínas homólogas en otros organismos que puedan dar indicios de su función. Por su parte, *rsd-6* tiene un dominio *Tudor* que es frecuentemente encontrado en proteínas que unen RNA [49], aunque se cree que no está directamente involucrado en la unión de éste.

En el caso de las proteínas que al ser mutadas imposibilitan el RNAi sistémico en todo el organismo, una de las mejor caracterizadas es *rsd-8* a quién también se le conoce como SID-1 por “Systemic RNA Interference Defective” [43]. Animales mutantes o deficientes en SID-1 son resistentes al RNAi inducido por alimentación pero no muestran ningún otro fenotipo, los gusanos son aparentemente normales tanto en tamaño, morfología, fertilidad o vida media.

3.2.3 SID-1

El gen de *sid-1* no contiene dominios conservados conocidos que puedan señalar su función [43]. En cambio posee un péptido señal de 10 aminoácidos que lo dirigiría hacia membrana plasmática. Se ha demostrado bioquímicamente que tiene once segmentos transmembranales con un amino terminal extracelular que abarca 400 de sus 776 amino ácidos [1] (Figura 4). Este amino terminal carece de dominios conocidos de unión a RNA, sin embargo no se descarta que pueda estar jugando un papel importante en su reconocimiento. A pesar de que se predice una localización membranar y en el nematodo la fusión SID-1::GFP se observa en la periferia celular, SID-1 también presenta una importante expresión en el retículo endopásmico y en el aparato de Golgi [1].

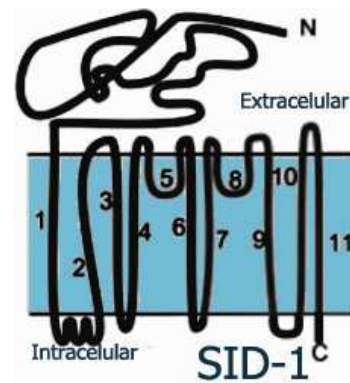


Figura 4. Esquema representativo de la topología de SID-1. Modificado de [1]

Un gusano transgénico que expresa a la proteína GFP bajo el promotor de SID-1 demostró que este gen es expresado desde etapas embrionarias y que su expresión continua hasta ser detectado en prácticamente todos los tejidos adultos exceptuando las neuronas [43]. La ausencia de expresión de SID-1 en estas células es consistente con lo reportado en la literatura respecto a que las neuronas son resistentes al RNAi sistémico. Es notable que la mayor expresión de SID-

1::GFP en adultos se observa en células y tejidos que están en contacto directo con el ambiente.

Al ser expresado en distintas líneas celulares, SID-1 media la entrada de dsRNA al interior de las células [1, 50]. El dsRNA internalizado vía SID-1 es capaz de silenciar genes mediante RNAi. Al ser expresado en células S2 de *Drosophila*, se observó que esta entrada era dependiente del tamaño y que SID-1 transportaba preferentemente dsRNAs “largo”. De igual manera se observó que mientras más grande era el dsRNA la respuesta de RNAi era más potente; se requiere de hasta 1000 veces más dsRNA de 100 nt que uno de 500nt para lograr los mismos niveles de inhibición y se requiere 100,000 veces más siRNA (21nt) que un dsRNA de 100nt para silenciar a niveles similares un gen reportero. Sin embargo, posteriormente se demostró que en realidad SID-1 no discrimina el tamaño del dsRNA, y que transporta molarmente la misma cantidad de siRNAs que de dsRNAs de hasta 1000pb. Se cree que el hecho de que los siRNAs no tengan la misma potencia que los dsRNAs de 1000pb para inducir RNAi se debe a que los siRNAs exógenos no son reconocidos por RISC y consecuentemente no son tan eficientes [1].

Hasta el momento, se ha sugerido que SID-1 funciona como una especie de canal que deja pasar al dsRNA por difusión pasiva, ya que la depleción de ATP usando oligomicina o la disminución de temperatura no afectan de manera importante la actividad de esta proteína cuando es expresada en células S2 [1]. Además se ha observado que la entrada por SID-1 es extremadamente rápida; aproximadamente el 90% de dsRNA entra en los primeros 5 minutos de exposición en células de *Drosophila*, lo que parecería ser compatible con el modelo de canal [51]. Aun falta por determinar si SID-1 es la única proteína que forma este supuesto canal. El que la expresión exógena de SID-1 en distintas líneas celulares tanto de insecto (S2, cl-8) como de mamífero [50] (epiteliales HEK 293, células madre de ratón; ES) sea suficiente para sensibilizarlas y permitir la entrada de dsRNA a las mismas, sugiere que SID-1 funciona solo.

De ser un canal, SID-1 no puede estar abierto todo el tiempo, ya que el hecho de que permita el paso de una molécula tan grande como un RNA de doble hebra (3.2 nm de diámetro), significa que genera un poro por el cual moléculas más pequeñas podrían atravesar la membrana de manera masiva e inespecífica y promover un desbalance en la homeostasis osmótica de la célula. Para explicar por qué las células que expresan a SID-1 no presentan dichos desbalances, se ha postulado que la apertura del supuesto canal está regulada, ya sea por la formación de multímeros en respuesta a dsRNA [51] o por una señal proveniente de otra proteína que una a este ácido nucleico y luego active a SID-1 [41, 52]. Así mismo, de ser SID-1 un canal o poro, no sólo permitiría la entrada sino también la salida de dsRNA, dependiendo de las diferencias de concentración de esta molécula dentro y fuera de la célula. Sin embargo, se ha observado que SID-1 no participa en la exportación de dsRNA [53]. Se cree que el proceso de exportación está regulado por otras señales en las que podría estar regulado el sistema de endo- y exocitosis [41]. Tomando en cuenta lo anterior se podría pensar que SID-1 no es un canal sino que este modificando la función de otras proteínas endógenas y que transporte al dsRNA por otro tipo de mecanismos.

Otro gen encontrado en el grupo de proteínas necesarias para llevar a cabo RNAi en todo el organismo es sid-2 [54]. Este gen codifica para una proteína de un sólo dominio transmembranal con un carboxilo terminal intracelular. Su expresión esta limitada al intestino, específicamente a la parte apical (lumen) lo que sugiere que esta proteína esta involucrada con la entrada del dsRNA a través del intestino del gusano. Los mutantes de SID-2 se identificaron buscando animales que podían genera una respuesta RNAi sistémica si el dsRNA provenía del núcleo de las células o era inyectado, pero no si este provenía del exterior. Esto contrasta con las mutantes de SID-1 que no pueden llevar a cabo ningún tipo de RNAi sistémico. Es interesante que SID-1 también se requiera para llevar a cabo RNAi en las células del intestino, lo que sugiere que la sola expresión de SID-2 no es suficiente para internalizar dsRNA en dichas células [54]. Esto apunta a que tal vez SID-2 no media directamente la entrada del dsRNA al citoplasma de las células intestinales

sino que la entrada vía SID-2 esta acoplada a SID-1. Se han sugerido tres alternativas en cuanto a la relación entre dichas proteínas: (i) SID-2 modifica a SID-1 para activar el transporte, o (ii) SID-2 se une al dsRNA del medio y lo presenta a SID-1 para que éste lo transporte, o (iii) SID-2 induce la endocitosis del dsRNA, luego de lo cual SID-1 lo transporta desde el endosoma hacia el citoplasma [41].

Al igual que otras mutantes afectadas en la sistemicidad del RNAi, las mutantes SID-2 muestran fenotipos normales en lo que se refiere a tamaño, desarrollo, fertilidad o longevidad y no muestran decremento en la endocitosis basal o en la morfología del intestino [54].

Además de las mutantes “*rde*”, existe otro tipo de mutantes denominadas “*fed*” del inglés “feeding”. Estas mutantes pueden montar una respuesta sistémica cuando el dsRNA es inyectado o si este proviene de un transgen pero no si viene del ambiente, lo que quizás se deba a que estas mutantes están implicadas en la salida, más que en la entrada, del dsRNA de las células [40].

3.2.4 RNAi sistémico en otros organismos

Hay pocos ejemplos en donde un ácido nucleico sea exportado de una célula a otra. La translocación de ácidos nucleicos había sido asociada principalmente a infecciones virales [55], conjugación bacteriana [56] y el transporte de tRNA a mitocondria en eucariontes inferiores [57]. El RNAi sistémico en *C. elegans* parece ser un nuevo tipo de translocación de ácidos nucleicos en donde un sistema específico es responsable de tomarlo del ambiente y distribuirlo célula a célula. Esta sistemicidad del RNAi ha sido observada en otros organismos invertebrados como grillos [58], planarias [59], polillas, garrapatas[60] y otros nemátodos parásitos de plantas [6, 60], sugiriendo que muchos invertebrados poseen sistemas similares a los de *C. elegans*. En dichos organismos se han identificado ortólogos de SID-1, pero no en todos se ha probado su función y en aquellos en

los que se hizo se obtienen resultados contradictorios (el ortólogo no promueve el transporte de dsRNA ni su silenciamiento afecta al RNAi) [60]. En este sentido, se creía que la razón por la que diversos insectos sólo presentaban RNAi autónomo y no sistémico era que no tenían genes homólogos a *sid-1* [61]. Sin embargo, recientemente se han caracterizado insectos que son capaces de presentar RNAi sistémico sin tener genes homólogos a *sid-1* [60], lo que sugiere que *sid-1* o sus homólogos no son indispensables para que un organismo tenga RNAi sistémico.

En plantas también se ha observado un efecto sistémico del RNAi utilizando *agrobacterium* o vectores virales [62], aunque este caso tiene sus particularidades; ya que las plantas cuentan con estructuras especializadas para intercambiar macromoléculas entre células (*plasmodesmos*). Incluso se ha reportado que RNAs mensajeros pueden viajar grandes distancias a través de estas estructuras [46].

Un hecho interesante es que no en todos los *Caenorhabditis* se observa sistemicidad del RNAi. Por ejemplo, *Caenorhabditis brenneri*, un nematodo filogenéticamente cercano a *C. elegans*, es incapaz de iniciar un efecto RNAi sistémico sin importar cual sea la fuente del dsRNA. En lo que respecta al RNAi ambiental, mientras *C. elegans* es capaz de hacerlo, especies filogenéticamente hermanas como *C. alicata*, *C. japonica*, *C. brebberii*, *C. remanei* o *C. briggsae* no. Esto indica que la capacidad de llevar a cabo RNAi sistémico ambiental es una rareza en *C. elegans* o que su activación está determinada por algún factor ambiental que hasta ahora se desconoce. Tal vez en *C. elegans* esta regulación se ha perdido, generándose un organismo que es sensible constitutivamente al RNAi sistémico ambiental. Incluso se ha dicho que *sid-1* es exclusivo de *C. elegans*, puesto que sus supuestos ortólogos tienen más homología con otros genes cuya función todavía no se ha identificado [60, 63].

Sí sólo los dsRNA grandes (>100nt) pueden viajar de célula a célula, esto tiene importantes connotaciones fisiológicas ya que los únicos dsRNA grandes que se podría encontrar el nematodo en su ambiente natural son los provenientes de virus

o transposones. Se ha sugerido que el RNAi tiene un papel importante como un sistema inmune adaptativo en contra de virus y secuencias genómicas invasivas en diversos organismos [26]. Por lo que la sistemicidad de éste podría jugar un papel fundamental distribuyendo el dsRNA de célula a célula para montar una defensa sistémica. en apoyo a esta teoría, se ha observado que en *D. melanogaster*, mutantes en genes relacionados con el transporte de dsRNA no presentan respuesta antiviral [64]. Por otro lado, que el RNAi sistémico pueda discriminar entre los miRNA endógenos y los exógenos dsRNA grandes (Ej. dsRNAs virales) permite al organismo utilizar estos últimos como una defensa al mismo tiempo que limita espacial y temporalmente el papel regulador de los miRNAs a las células que los expresan.

3.3 INTERNALIZACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIADA POR ENDOCITOSIS

El otro organismo ampliamente usado para estudios de RNAi, *D. melanogaster*, no presenta RNAi sistémico, pero sí RNAi autónomo y ambiental, y sus células son capaces de internalizar dsRNA por medio de endocitosis dependiente de clatrina mediada por unos receptores tipo “scavenger” llamados SR-CI e Eater [65], los cuales permiten que el dsRNA sea liberado de los endosomas tempranos al citoplasma cuando estos se acidifican.

Mediante un tamizaje masivo en el genoma de *D. melanogaster*, Saleh y colaboradores [65] encontraron 23 genes relacionados con la entrada dsRNA a la célula. Dichos genes están implicados directa o indirectamente en el proceso de endocitosis y codifican para proteínas que median el transporte de vesículas y proteínas, la organización del citoesqueleto, o están presentes en el aparato de Golgi y se encargan de maduración de vesículas. En el mismo trabajo, Saleh y colaboradores silenciaron los ortólogos de estos genes en *C. elegans*, lo que produjo la inactivación del RNAi sistémico en el gusano. Así mismo, en otros estudios de los genes relacionados con RNAi sistémico en *C. elegans*, se identificaron componentes de las vías endocíticas [6, 39, 41, 47, 52, 63, 66-67],

tales como la ATPasa vacuolar (relacionada con la acidificación del endosoma). Ello indica que el mecanismo de endocitosis de dsRNA presente en insectos puede estar evolutivamente conservado.

Se han realizado en otros insectos tamizajes similares a los de *D. melanogaster*, en particular, un estudio hecho en *Tribolium castaneum* reveló una lista muy larga de genes implicados en la internalización de dsRNA que participan en el transporte de endosomas y lisosomas, al igual que en procesos de exo- y endocitosis (específicamente la mediada por clatrina), y otros que intervienen en la respuesta inmune del insecto [6, 61]. En estudios menos ambiciosos (pero igual de informativos), hechos en otros insectos, de entre los genes cuyo silenciamiento redujo considerablemente el RNAi, cabe destacar a la Subunidad A de la ATPasa vacuolar y a la α -tubulina (parte de los microtúbulos, necesarios para el transporte de vesículas cubiertas con caveolina).

A diferencia de los insectos y otros invertebrados, los mecanismos de internalización de ácidos nucleicos están pobremente caracterizados en vertebrados [68]. Diversos estudios sugieren que la endocitosis mediada por receptores y la pinocitosis de fase fluida (en el caso de concentraciones altas del ácido nucleico) son los principales sistemas de transporte de ácidos nucleicos en células de mamífero [69]. El hecho de que la degradación por tripsina de proteínas de superficie inhiba la internalización de ácidos nucleicos [70] indica que la unión entre ambas moléculas es indispensable para que los ácidos nucleicos sean internalizados a la célula. Las principales proteínas implicadas en este proceso son citoqueratinas, integrinas, receptores “scavenger” y moesinas [71].

Como regla general, se sabe que los oligodeoxunucleotidos son transportados por endocitosis mediada por clatrina [70] y que el DNA se transporta vía macropinocitosis mediada por proteoglicanos [72-73]. También se ha reportado la entrada de mRNA exógeno en organismos completos. En este caso, se observó que la entrada es dependiente de cationes, lo que sugiere que pueda estar

mediada por un sim-transportador de cationes y RNA [74]. Mecanismos si similares han sido observados en bacterias [68].

En el caso del dsRNA se ha observado que en células dendríticas (mDC) y células epiteliales (HEK 293) en cultivo, la entrada de dsRNA que interviene en la respuesta mediada por IFN está mediada por clatrina, aunque el receptor específico no se ha identificado [75]. Las vesículas que contienen al dsRNA se fusionan con otras en las cuales están presentes los receptores tipo RIG-I (RLR) y TLR3.

Por su parte, cuando la síntesis de ácidos nucleicos es inhibida en *C. elegans*, el nematodo tiene la capacidad de compensar la carencia de estos tomándolos del medio por sistemas similares a los antes descritos. Esto llevó a pensar que eran estas vías las responsables del RNAi sistémico. Sin embargo, los animales afectados en la sistemicidad del RNAi son capaces de transportar sin problemas ácidos nucleicos para su dieta, ello indica que en estas vías están implicadas maquinarias de translocación diferentes. Inclusive se ha sugerido que los procesos endocíticos generales en *C. elegans* no están relacionados con el RNAi sistémico, ya que mutaciones en distintos genes involucrados en estos procesos (*dyn-1*, *ehs-1*; endocitosis mediada por clatrina, *cav-1*, *cav-2*; caveolinas o *rme-1* y *rme-8*; endocitosis mediada por receptores) no presentan alteraciones en el RNAi sistémico [67]. Es importante mencionar que es difícil el estudio de genes relacionados con vías endocíticas ya que muchos de estos genes son esenciales para la célula y los estudios anteriores deben verse con reserva puesto que se hicieron en mutantes hipomórficas donde la expresión del gen no está totalmente suprimida, y aun es posible detectar la presencia de la proteína.

Resulta interesante el hecho de que en *C. elegans* el dsRNA expresado a partir de un transgen sea menos eficiente para inducir RNAi sistémico que el dsRNA presente en el medio o expresado por bacterias [39]. Tijsterman y colaboradores [47] han sugerido que dicha diferencia se puede deber a que el dsRNA es

transportado no por un canal sino por endocitosis; mientras que el dsRNA expresado endogenamente está libre en el citosol, el dsRNA internalizado por vías endocíticas se encuentra en endosomas, los cuales pueden ser cruciales para la diseminación de la señal de interferencia, puesto que pueden contener no sólo a proteínas que transporten al dsRNA fuera del endosoma, sino otras necesarias para que el dsRNA se copie y sea transportado a células vecinas o hacia organelos que contenga a la maquinaria de RNAi. En este contexto, la tercera hipótesis sobre la relación entre SID-1 y SID-2 resulta ser la más sólida: SID-2 internaliza al dsRNA por endocitosis y SID-1 se encarga de transportar al RNA hacia el citoplasma.

3.4 ENDOCITOSIS

La membrana plasmática es una estructura dinámica que aísla y define a la célula con respecto a su medio ambiente, a la vez que regula y coordina la entrada y salida de moléculas hacia y desde el citoplasma. Las moléculas pequeñas que son esenciales para la célula, como los aminoácidos, los azúcares y los iones, atraviesan la membrana plasmática a través de bombas o canales. En cambio, las macromoléculas deben ser transportadas a través de vesículas provenientes de invaginaciones en la membrana gracias a un proceso denominado endocitosis [76].

El transporte por canales es rápido, depende de la concentración de los solutos dentro y fuera de la célula, no es saturable y no requiere de energía. En cambio, la endocitosis por lo general requiere de energía y es más lenta que el transporte pasivo [76].

La endocitosis es utilizada por todas las células eucariotas. Además del transporte de macromoléculas y fluidos, también se requiere para funciones especializadas, tales como el control del crecimiento celular, el procesamiento de material exógeno por el sistema inmune, y el control de ciertas señales en el sistema

nervioso [77]. El sistema endosomal selecciona las moléculas internalizadas de tal manera que cada una pueda alcanzar un destino particular en el interior de la célula [78].

La endocitosis ocurre a través de múltiples mecanismos que pueden ser categorizados en dos tipos generales: (i) fagocitosis, que consiste en la toma de partículas grandes, tales como microorganismos o células muertas. Este fenómeno se da a través de vesículas con diámetro mayor a los 250 nm llamadas fagosomas; y (ii) pinocitosis, mediante la cual se internalizan fluidos y solutos a través de pequeñas vesículas de ~100 nm de diámetro.

La fagocitosis está típicamente restringida a células especializadas, tales como los macrófagos o las células dendríticas, en tanto que la pinocitosis ocurre en todas las células mediante cuatro mecanismos básicos: la macropinocitosis, la endocitosis mediada por clatrina, la endocitosis mediada por caveolina y la endocitosis independiente de clatrina y caveolina [Figura 5]. Estas vías funcionan como mecanismos de control de procesos fisiológicos muy complejos, tales como la transducción de señales hormonales, la vigilancia inmunológica, la presentación de antígenos, y la homeostasis tanto de la célula como del organismo [78].

La eficiencia del proceso endocítico se incrementa mediante interacciones no específicas entre los solutos y la membrana celular (pinocitosis absorptiva). La internalización más eficiente ocurre cuando los solutos diluidos son capturados por receptores específicos de alta afinidad (endocitosis mediada por receptor), los cuales, luego de la interacción con su ligando, se concentran en vesículas especializadas en el transporte. Las moléculas internalizadas de esta forma se distribuyen en vesículas de manera heterogénea en el citoplasma, concentrándose principalmente en la región perinuclear y cerca del aparato de Golgi [79]. En experimentos hechos con moléculas que se internalizan típicamente por vías endocíticas se ha demostrado que, en aproximadamente un minuto, la molécula se localiza debajo de la membrana plasmática en pequeñas vesículas llamadas

endosomas tempranos [80]. Después de 5-15 minutos, los endosomas se mueven hacia el aparato de Golgi y el núcleo, donde cambian su composición química haciéndose más ácidos; en este punto, las vesículas reciben el nombre de **endosomas tardíos**. El interior de los compartimentos endosomales se mantiene ácido (pH ~6) gracias a la ATPasa vacuolar, la cual bombea H^+ del citosol al interior de la vesícula. Es importante recalcar que los endosomas tardíos son más ácidos que los endosomas tempranos. Dicha acidez juega un papel crucial en la función de estos organelos. Como parte final del proceso de endocitosis, el endosoma tardío se fusiona con lisosomas (endolisosoma), los cuales contienen hidrolasas ácidas y otras enzimas que se encargan de degradar el contenido de los endosomas [77].

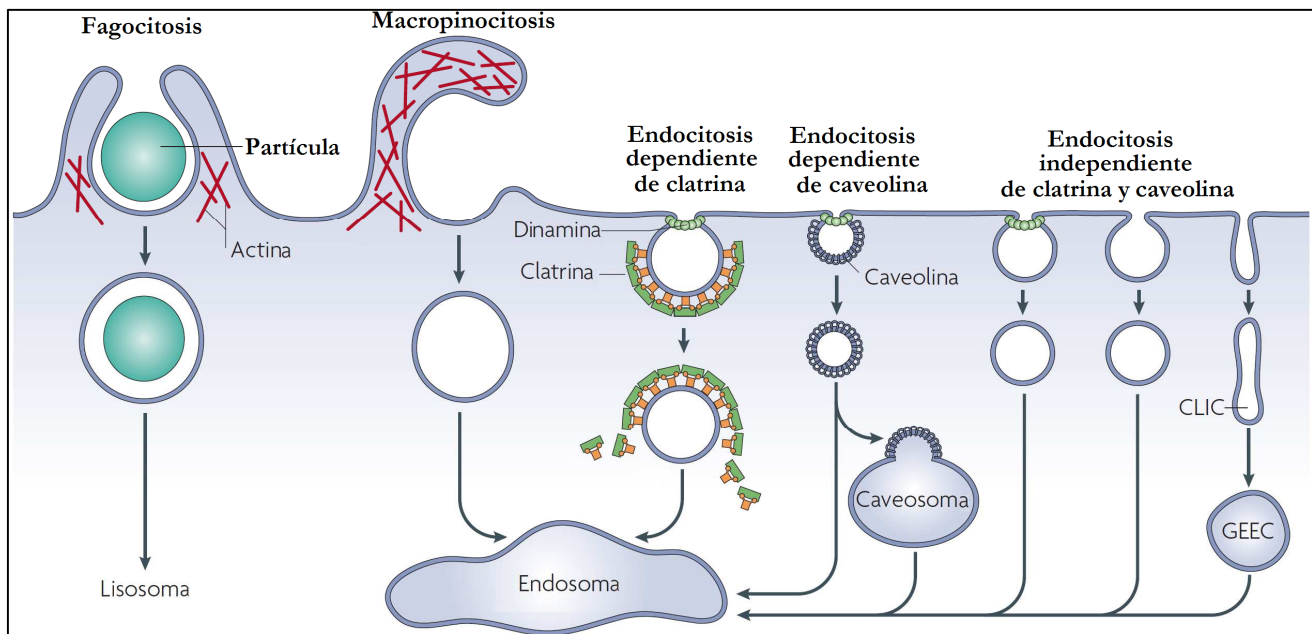


Figura 5. Endocitosis en células eucariontes. Partículas grandes son internalizadas mediante fagocitosis, mientras que en la macropinocitosis se internalizan moléculas y fluidos de manera inespecífica y a gran escala. Estos procesos son dependientes de actina, aunque también se ha demostrado que el resto de los mecanismos también la requieren. Comparados con las otras vías, las vesículas formadas en la macropinocitosis y la fagocitosis son mucho más grandes. Numerosas moléculas son endocitadas a través de clatras. Luego de la formación de la vesícula, ésta es transportada al citoplasma y pierde la cubierta de clatrina. Por su parte, las vesículas recubiertas de caveolina pueden perder a esta proteína de inmediato o formar estructuras con pH neutro llamadas caveosomas. La formación de vesículas de clatrina y caveolina depende de dinamina. Otros procesos de internalización generan intermediarios tubulares conocidos como acarreadores independientes de clatrina y caveolina (CLICs, “*clathrin- and dynamin- independent Carriers*”) derivados de la membrana plasmática. Similar al caveosoma, existe otro compartimento intermediario cubierto con GPI (GEEC, “*Glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein Enriched Early endosomal Compartment*”). En último término, todas las vesículas se dirigen hacia el endosoma temprano. Modificado de [76].

Muchas moléculas son capaces de escapar de este viaje hacia la destrucción. El endosoma temprano es la estación en la que principalmente ocurre la selección de moléculas que continuarán o no en la vía de reciclaje de receptores. En el ambiente ácido del endosoma temprano, muchas proteínas receptoras modifican su conformación y liberan a su ligando. Aquellos ligandos que son liberados dentro del endosoma usualmente están destinados a la degradación por acción de las proteasas lisosomales. En cambio, otros ligandos permanecen unidos a sus receptores todo el tiempo y, consecuentemente, comparten el destino de esa proteína [80]. Otras moléculas, en cambio, son capaces de escapar del endosoma tardío, este proceso es desatado por la acidificación del endosoma, que genera cambios conformacionales en el receptor tales que éste transloca a su ligando hacia el citoplasma o se separa del endosoma tardío mediante la formación de pequeñas vesículas de transporte [77].

El destino de las proteínas receptoras (y los ligandos unidos a ellas) varía de acuerdo al tipo de receptor. Algunos se reciclan y son transportados de vuelta a la membrana plasmática de la cual provienen; otros son transportados a una zona diferente de la célula (transcitosis) o a otros organelos; y, por último, algunos prosiguen en la vía hasta la fusión con el lisosoma, donde son degradados [77]. Así pues, el tipo de receptor al cual se una cierta molécula definirá la vía de endocitosis por la cual será internalizada.

Cabe resaltar la participación de la actina en los casi todos los procesos endocíticos. Los filamentos de actina se ensamblan de tal manera que generan fuerzas mecánicas que inducen la invaginación de la membrana y crean vesículas [Figura 6]. Especialmente en la endocitosis mediada por clatrina, los microfilamentos son indispensables para el movimiento de las vesículas en el citosol [81-82].

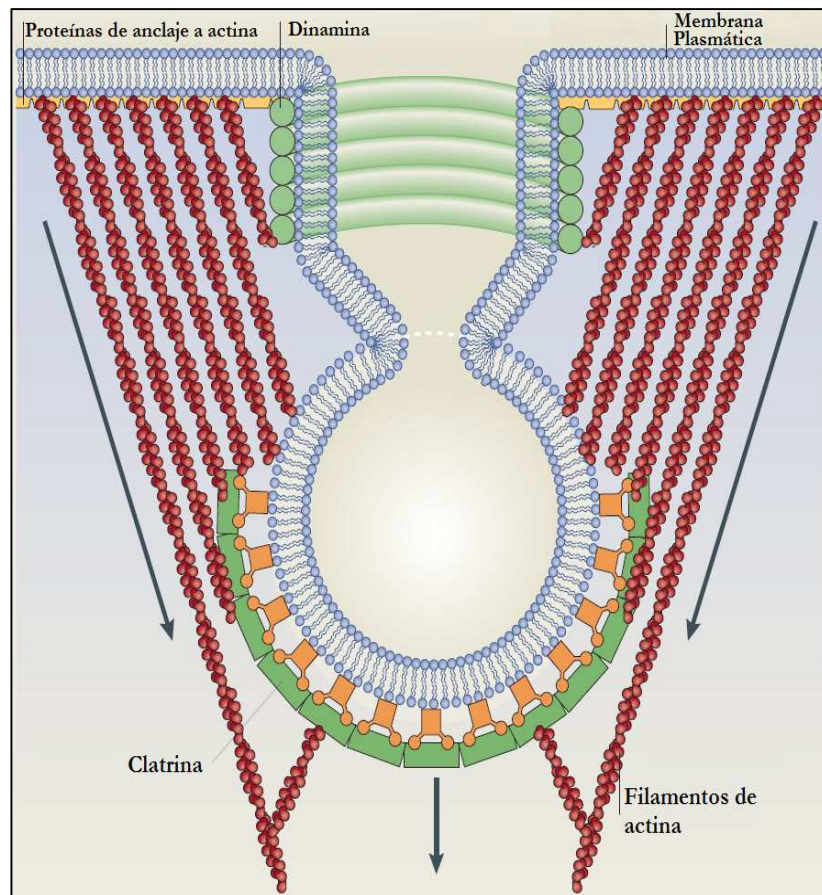


Figura 6. Actina y Endocitosis: la generación de vesículas endocíticas implica la deformación de la membrana, su invaginación y, finalmente, su escisión. La deformación e invaginación dependen de la polimerización de la actina, cuyos filamentos mueven a la vesícula mediante el anclaje a proteínas integrales de la membrana y a la cubierta de clatrina o caveolina. La escisión depende de la actividad de la proteína Dinamina. Modificado de [83].

Debido a que la endocitosis mediada por receptor depende de la concentración de éste en la membrana, el hecho de que sea endocitado junto con su ligando y necesite reciclarse es un factor limitante de este proceso. Esto explica el por que la entrada de una molécula por vías endocíticas es saturable y relativamente lenta; a diferencia de la cinética de entrada por un canal o una bomba. En este sentido, otra diferencia importante radica en la dependencia de ATP o temperatura; en general, los procesos endocíticos requieren ATP y son inhibidos a bajas temperaturas [77], en tanto que el transporte por canales o poros no requiere de energía y permanece activo aún a bajas temperaturas [76].

3.4.1 Macropinocitosis

La macropinocitosis abarca los procesos de internalización de moléculas a través de vesículas cuyo diámetro es mayor a 1 μm . La cascada de señalización que induce este proceso está mediada por una GTPasa de la familia Rho, quien promueve la formación de protrusiones en la membrana movilizadas por actina. Estas protrusiones engloban con un sólo brazo al conjunto de moléculas que se transportarán, para luego fusionarse con la membrana plasmática [Figura 5] y generar vesículas muy grandes, llamadas macropinosomas. Contrario a lo que se creía, que la macropinocitosis era caótica por el hecho de que ser poco selectiva, actualmente se sabe que este proceso está altamente regulado y ocurre en respuesta a señales específicas [84].

3.4.2 Endocitosis mediada por clatrina

La clatrina es una proteína formada por tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras ordenadas en forma de tres pies. Esta estructura es llamada *trisquelion*. Las tres cadenas ligeras interactúan con las cadenas pesadas en el carbono terminal. Los trisqueliones unidos a la membrana conforman una caja poliédrica que provoca la invaginación de la membrana [Figura 7]. Esta caja está regulada por las cadenas de clatrina: las pesadas le dan la base estructural mientras que las ligeras regulan su formación y su rotura. En las cajas poliédricas, cada vértice está en el centro de un *trisquelion* y sus extremos están formados por las cadenas superpuestas de cuatro trisquelions [85]. La clatrina se encuentra alrededor de las vesículas que transportan proteínas transmembranales, ligadas al glicosilfosfatidilinositol (GPI) y secretadas desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática o viceversa.

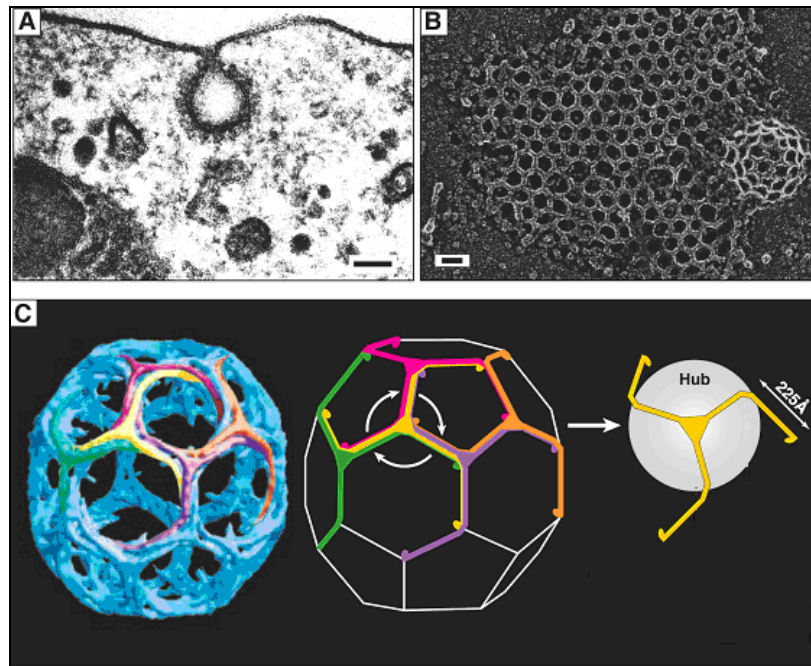


Figura 7. Estructuras de Clatrina. **A.** Micrografía en la cual se observa una vesícula envuelta en clatrina. **B.** Invaginación de la membrana envuelta en una malla poliédrica formada por *triskeliones*. **C.** Estructura de los triskeliones, cada cara está estructurada por cuatro clatrinas. Modificado de [85].

Luego de la unión de un ligando a su receptor en la membrana, se envía una señal que promueve su recubrimiento por clatrina y posteriormente su invaginación mediada por dinamina. La vesícula recubierta de clatrina es transportada hacia el citoplasma. Después de esto, la clatrina se despolimeriza para ser reciclada en la membrana plasmática. Por último, la vesícula desnuda se fusiona con otras vesículas para formar el endosoma temprano y continuar con su maduración hasta su fusión con el lisosoma [85].

El que un receptor sea transportado por esta vía depende de un péptido señal que promueve su interacción adaptinas (AP o “Adaptor Proteins”), que son proteínas mediadoras entre la clatrina y el receptor. Las adaptinas reconocen de manera específica una secuencia de péptidos en las regiones intracelulares de los receptores. Aunque su función es la misma, no existe una señal consenso de reconocimiento. Si embargo, se han podido encontrar ciertas secuencias de pocos aminoácidos que son reconocidas frecuentemente por las Adaptinas, estas son: (i) Y-X-X-Ψ, donde Y es Tirosina, X un aminoácido polar y Ψ un aminoácido

hidrofóbico; (ii) dileucina (L-L) en un entorno hidrofóbico; (iii) un dominio enriquecido en serina fosforilada en el extremo carboxilo; y, (iv) motivos que de fosforilación de serina inducida por la unión al ligando generalmente reconocidos por la maquinaria de ubiquitinación [86]

3.4.3 Endocitosis mediada por caveolina

Las caveolas son invaginaciones en la membrana plasmática con forma de “matraz” que fueron observadas por primera vez, hace más de 50 años, en la superficie de células endoteliales. Actualmente se sabe que las caveolas se pueden encontrar en una gran variedad de células, y que están demarcadas en microdominios en la membrana celular altamente ricos en colesterol, esfingolípidos y proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol. En las zonas ricas en caveolinas se forman microdominios membranales donde se concentran moléculas encargadas de la señalización y el transporte, por lo cual se ha dicho que las caveolas fungen como centros de concentración para actividades de señalización [87-89].

La molécula que le da forma y organización estructural a las caveolas es la caveolina, una proteína de 21 KDa que se asocia en dímeros que unen colesterol. La topología de las caveolinas es inusual, ya que sus extremos amino y carboxilo presentes en el citosol contienen una secuencia hidrofóbica embebida en sólo una capa de la membrana [Figura 8]. Las caveolinas están palmitoladas en el segmento C-terminal. Se pueden fosforilar en sus residuos de tirosina y auto-asociarse para formar una cubierta estriada de caveolinas en las invaginaciones de la membrana. Consistente con lo anterior, se sabe que la sola expresión de caveolina en células que no la expresan normalmente es suficiente para generar estructuras caveolares [89].

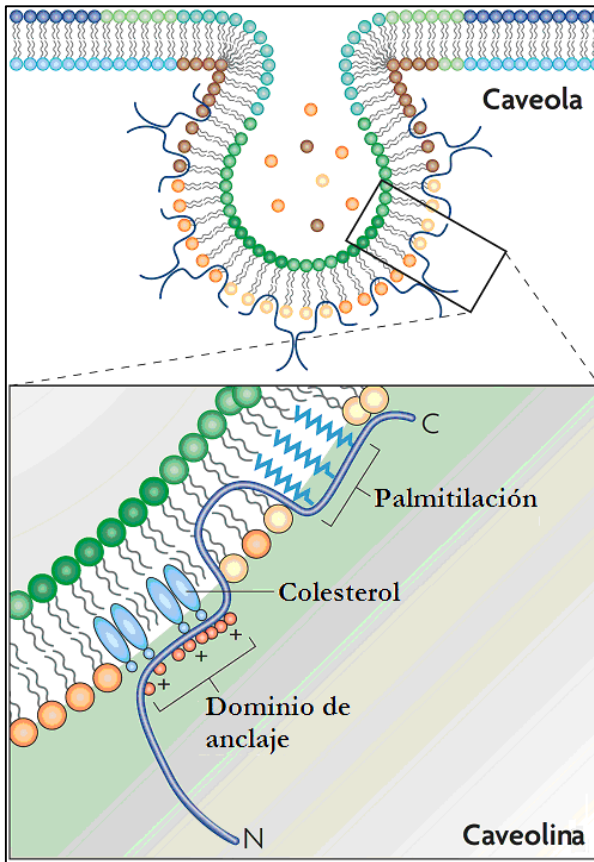


Figura 8. Los extremos amino y carboxilo de la caveolina ven hacia el citoplasma, mientras que el resto de la proteína está embebida en una capa de la membrana. El dominio de andamiaje, una región altamente conservada en la caveolina, interacciona con el colesterol mediante residuos básicos (+) y residuos hidrofóbicos (círculos rojos). El dominio C-terminal, más cercano a la membrana, está modificado con grupos palmitilo que están insertados en la cara interior de la bicapa. Modificado de [90]

Cuando un receptor es internalizado vía caveolina, el microdominio en el cual se encuentra se invagina y se genera una vesícula con propiedades distintas a las de el endosoma temprano. A estas estructuras se les conoce como caveosomas. Este compartimento tiene un pH neutro y funge como centro de selección de las moléculas que contiene. Eventualmente, el caveosoma se fusiona o adquiere las propiedades de un endosoma temprano, donde las moléculas unidas a receptores específicos pueden ser transportadas a otros organelos o liberadas para posteriormente ser degradadas en el endolisosoma [90].

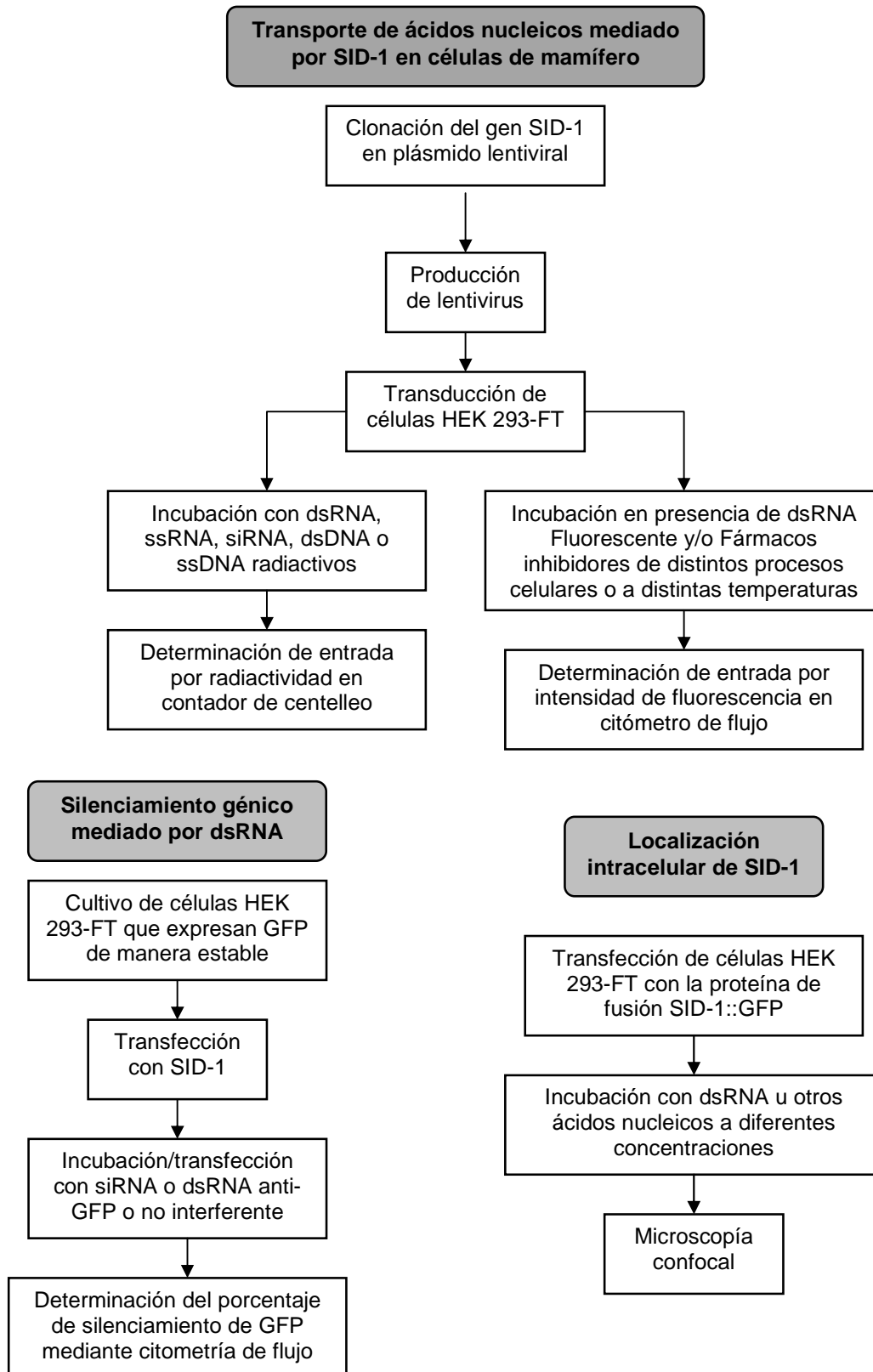
Las moléculas que son transportadas por esta vía son diversas, desde lípidos, proteínas y lipoproteínas hasta patógenos [87-89, 91]. Sin embargo, el estudio de la endocitosis vía caveola es complicado por el hecho de que ciertas moléculas pueden ser internalizadas por diferentes mecanismos dependiendo del tipo celular y las condiciones del medio. Por ejemplo, la albúmina es internalizada vía caveola

en fibroblastos y células endoteliales, en tanto que en células de ovario de ratón es internalizada por un mecanismo independiente de caveola y clatrina [89]. Esto sugiere que los mecanismos de internalización son redundantes para ciertas moléculas.

A diferencia de la endocitosis vía clatrina, se sabe poco al respecto de cómo se selecciona un receptor para ser internalizado por caveolas. Se ha postulado que los receptores se pueden seleccionar de acuerdo al tipo de microdominio en la membrana plasmática en el cual se localizan[90]. Por otro lado, tampoco se han identificado moléculas adaptadoras específicas de este tipo de endocitosis [89].

Por su composición rica en colesterol, para el estudio de las caveolas se han utilizado agentes que lo secuestran de la membrana, tales como filipina, nistatina y digitoxina, así como inhibidores de la síntesis del colesterol o de su metabolismo [92-94]. La reducción, redistribución o remoción del colesterol en caveolas promueve su desensamblaje, así como la dispersión de los receptores allí contenidos.

4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Los experimentos que fueron optimizados durante el desarrollo de este proyecto se describen como **Protocolos**, donde se especifican cantidades, tiempos y condiciones; en cambio, los experimentos en los que se usaron métodos o técnicas estandarizados por las compañías (kits) o que no se modificaron, se describen brevemente con su nombre genérico a lo largo del texto.

4.1 PRODUCCIÓN DE VECTORES VIRALES PARA EXPRESAR A LA PROTEÍNA SID-1 DE *C. ELEGANS* EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

Existen diferentes vectores virales, la elección de alguno de ellos depende tanto del tipo de célula a utilizar como del nivel de expresión que se desea. En el laboratorio, contamos con las herramientas adecuadas para la producción de dos tipos de vectores: lentivirus y virus adeno-asociados (AAVs). En la Figura 9 se resumen sus principales características.

Figura 9. Características generales de los virus adenoasociados y los lentivirus

Vector	Tropismo	Tamaño del inserto	Integración al genoma de la célula hospedera	Tiempo de expresión del transgen
Virus adeno-asociado	Prácticamente cualquier célula de mamífero	3 Kb	No	++
Lentivirus		10 Kb	Sí	++++

Para producir al vector AAVs se utilizó el sistema AAV Helper Free System® de Stratagen®, los protocolos de producción y titulación se siguieron de acuerdo al manual provisto por la compañía. Por su parte, el lentivirus se produjo con el sistema pLlox 3.7 desarrollado por Dull y colaboradores conforme a lo descrito en [95-96]. En este trabajo se optimizó este protocolo para obtener títulos virales mayores a 5×10^5 Unidades transductoras por mililitro.

Tanto para producir como para transducir a estos vectores se utilizó la línea de células de mamífero HEK 293-FT (*Human Embryonic Kidney cells*). Estas células

son ideales para nuestros experimentos porque tienen disminuida la respuesta innata a dsRNA foráneo y a virus mediada por interferón [75].

Se insertó el gen de la proteína verde fluorescente en el vector AAV y en el Llox 3.7 para producir virus adeno asociados y lentivirus. Posteriormente se determinó el porcentaje de células transducidas a distintas concentraciones virales. En la Figura 10 se observa que la capacidad de transducción de las partículas lentivirales (70%) es mucho mayor al de las AAV (10%). Por ello, se decidió utilizarlo el sistema lentiviral para clonar el gen de sid-1 y expresarlo en células de mamífero.

Una vez elegido el sistema lentiviral, se decidió optimizar el protocolo de producción de partículas lentivirales. Se probaron distintos métodos para transfectar los plásmidos del sistema y diferentes tiempos de cosecha de los virus. De acuerdo a la Figura 11, se determinó que el mejor protocolo para transfectar era con cloruro de calcio 0.3M, y el tiempo ideal de cosecha 48 horas.

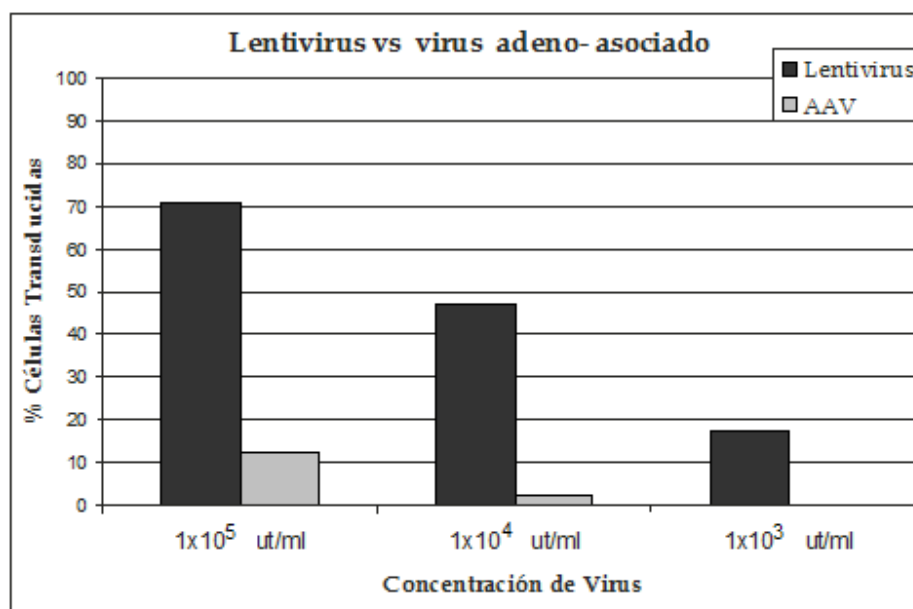


Figura 10. Eficiencia de transducción de AAV y lentivirus. Se utilizaron vectores con la proteína GFP a diferente concentración, en unidades transductoras por mililitro ($\mu\text{t/ml}$), para transducir células HEK 293-FT. A partir del porcentaje de células fluorescentes, determinado por citometría de flujo, se obtuvo el porcentaje de células transducidas. A cualquier concentración, el vector más eficiente es el lentiviral.

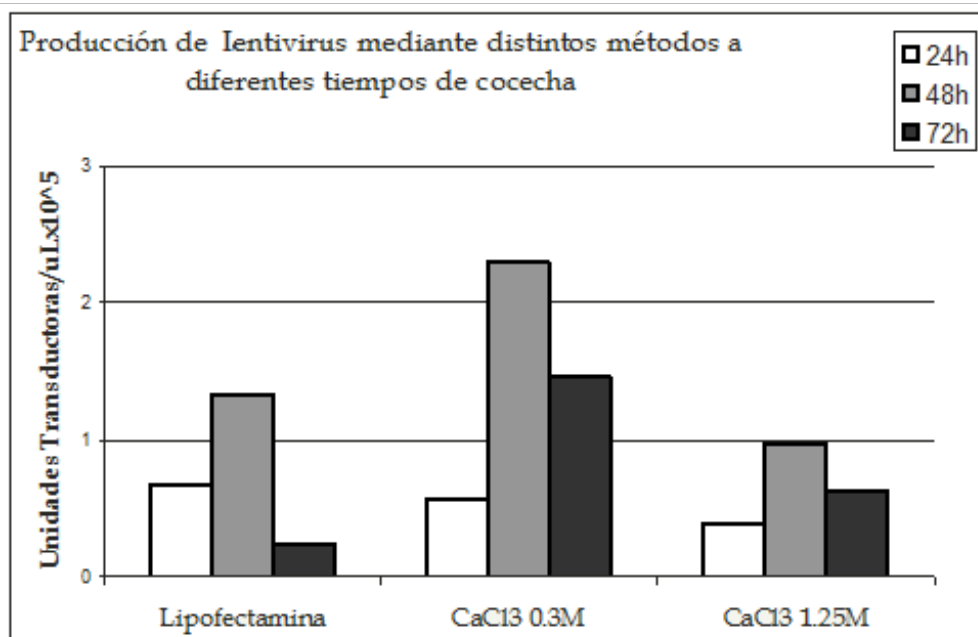


Figura 11. Producción de lentivirus con diferentes protocolos. Para transfectar a los diferentes componentes del sistema lentiviral se probó a la lipofectamina 2000® de Invitrogen® y al cloruro de calcio a dos concentraciones, 0.3 y 1.25M. Así mismo, se cosecharon los vectores en diferentes tiempos, 24, 48 y 72 horas.

4.1.1 Clonación del gen SID-1 de *C. elegans* en el sistema pLlox 3.7

Los componentes del sistema lentiviral (Figura 12) se amplificaron en la cepa de *E. coli* DH5α. Estas bacterias se hicieron competentes mediante un método químico que utiliza una alta concentración de sales y metales pesados (Mn y Mg), este medio desestabiliza la membrana de las bacterias y aumenta su permeabilidad. Las bacterias competentes se transformaron con cada plásmido por separado, este proceso consiste en someterlas a choque térmico, lo que promueve la internalización del material genético foráneo. Las bacterias se cultivaron en medio con ampicilina y se aislaron algunas colonias. Éstas se cultivaron por separado y se purificó el plásmido mediante minipreps. Este método consiste en la lisis de las bacterias por choque osmótico y detergentes, el material genético se libera al medio pero sólo los plásmidos permanecen estables en las condiciones del experimento. Los plásmidos se purifican por métodos de extracción con disolventes orgánicos y mediante precipitación con etanol.

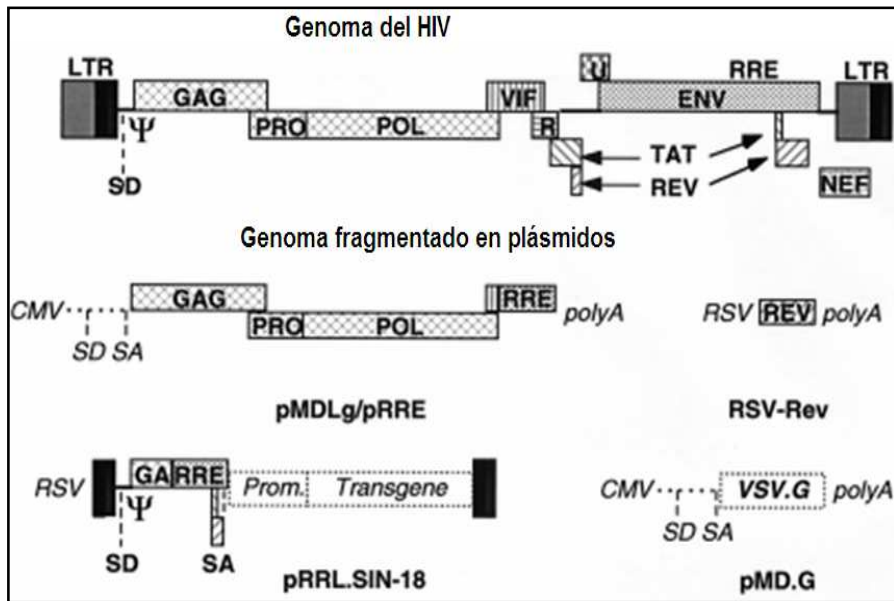


Figura 12. Sistema lentiviral 3.7. Los plásmidos del vector son una modificación del genoma del VIH, del cual se eliminaron genes de virulencia como NEF, TAT y VIF, y se fragmentó en cuatro componentes: pMDLg/pRRE, que contiene a la retrotranscriptasa y otras enzimas (POL) y a proteínas estructurales (GAG); pRSV-Rev, encargado de regular el transporte del genoma viral hacia y desde el núcleo de la célula; pRRL ó pLlox, donde se inserta el transgen; y pMD.G que contiene a la proteína del virus de estomatitis vesicular VSV G, encargada de conferir el tropismo. Modificada de [96].

La estrategia de clonación de SID-1 en pLlox fue la siguiente:

- 1.- Transformar bacterias con los plásmidos pLlox y pCDNA3.0; aislar colonias resistentes a ampicilina, purificar los plásmidos y cortar con enzimas de restricción para luego correr en un gel los productos y purificar los fragmentos requeridos.
- 2.- Rellenar los extremos tanto de sid-1 como de pLlox sin GFP con la enzima klenow.
- 3.- Desfosforilar los extremos del pLlox con la enzima CIAP (esto para evitar que el plásmido se religara).
- 4.- Ligar los fragmentos.
- 5.- Transformar bacterias con los productos de ligación. Aislar colonias resistentes a ampicilina, purificar los plásmidos y digerir con EcoRI para determinar cuáles tienen inserto.

6.- Digerir los plásmidos que tienen inserto con la enzima Apal para determinar la dirección en la que se insertó el gen.

7.- Secuenciar el gen insertado para determinar su completa integridad.

4.1.2 Protocolo 1. Producción de lentivirus en células HEK 293-FT

Preparación de células

- En cajas T-75, sembrar 4×10^6 células por caja en 10 mL de DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), e incubar a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$, durante 24 hrs.
- Verificar que las células se encuentren entre el 70-80% de confluencia para proceder con la transfección, de no ser así, incubar el tiempo necesario para llegar a la confluencia mínima requerida.
- Cuantificar los plásmidos, para cada transfección se necesitan 5 μg de cada plásmido accesorio: pVSG, pMDL-RRE y pRSV-REV, y 10 μg del plásmido con el inserto deseado: pLlox3.7.

Transfección

- En un tubo estéril de 1.5 mL, pipetear 1 mL de solución de CaCl_2 0.3 M estéril. Agregar los plásmidos: pVSG, pMDL-RRE y pRSV-REV, 5 μg de cada uno y 10 μg de pLlox3.7. Mezclar por inversión
- En un tubo estéril de 15 mL, pipetear 1 mL de HSB 2x estéril. Agregar a este tubo la solución de Ca-DNA, gota a gota y lentamente, tener especial cuidado en golpear la base del tubo entre cada gota para favorecer el mezclado.
- Agregar la mezcla anterior a las células gota a gota, agitar la caja cuidadosamente durante este proceso para favorecer el mezclado.
- Incubar de 5-7 hrs a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. En el microscopio se deben observar los precipitados de DNA-Ca.

- Transcurrido el tiempo de incubación, lavar las células dos veces con PBS estéril y agregar 10 mL de DMEM 10% SFB. Incubar durante 48 hrs a 37°C/5% CO₂.

Cosecha del Lentivirus

- 48 hrs después de la transfección, recuperar el sobrenadante y transferir a un tubo estéril de 15 mL, centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos en una centrifuga clínica.
- Recuperar el sobrenadante, éste ya se puede utilizar para transducir células. Si lo que se desea es utilizar volúmenes pequeños de concentrado viral, se debe centrifugar el sobrenadante en un rotor SW-40 a 170000 g (27000 rpm)/90 min/4 °C. Nota: el tubo de estar lleno al menos al 80% de su capacidad para evitar que colapse.
- Decantar el sobrenadante y dejar el tubo boca a bajo sobre papel absorbente durante 10 min. Aspirar el medio remanente con cuidado de no tocar el fondo del tubo ya que la mayoría de las veces no hay un pellet visible.
- Agregar de 15 a 100 µL de PBS estéril. El volumen dependerá de cuan concentrado se desee el virus. Sellar el tubo con parafilm y dejarlo a 4°C una noche sin agitación. Nota: el pH del PBS no debe estar por debajo de 7.2
- Resuspender por pipeteo, tener cuidado de no tocar el fondo del tubo. Si se observa un pellet, no tocarlo. Luego de 20-30 pipeteos se habrá resuspendido todo el virus, si se sigue observando pellet, este se puede descartar.
- Alicuotar el virus y congelar en N₂ líquido; almacenar a -80°C.

Transducción

- Se recomienda preparar a las células que se desean transducir en cajas de 6 pozos, aunque también se pueden cultivar en cajas de 12 o 24 pozos, en especial para la titulación del virus. Para ser transducidas, las células deben estar entre el 70-90% de confluencia.

- En un tubo estéril, hacer una mezcla de Polibreno a 2 µg/ml en DMEM 10% SFB. Adicionar a la mezcla la cantidad de virus deseada (2.3×10^4 Unidades Transductoras por mL de medio translucen a cerca del 40% de células).
- Lavar las células con PBS 1x. Agregar la mezcla de medio-polibreno-virus. Incubar a 37°C/5% CO₂.
- Renovar el medio de cultivo con DMEM 24 hrs después de la incubación,. Incubar otras 24 hrs a 37°C/5% CO₂, después de este tiempo las células están listas para ser congeladas o empleadas en cualquier experimento.

Determinación del título viral.

- Cultivar células en una caja de 12 pozos. Asegurarse que, para el momento de la transducción, las células se encuentren entre el 70-90% de confluencia.
- Preparar 20 mL de DMEM más polibreno a 2 µg/ml.
- En un volumen total de 1.5 mL por pozo, generar diluciones seriadas del Lentivirus-GFP en DMEM-polibreno, de tal manera que se tengan 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 y 0.00001 µL de virus por pozo. Agregar una dilución a cada pozo. Incubar 24 hrs a 37°C/5% CO₂.
- Luego de las primeras 24 hrs de incubación, renovar el medio de cultivo con DMEM. Incubar otras 24 hrs a 37°C/5% CO₂.
- Analizar la población de células fluorescentes mediante FACS.
- Para hacer cálculos, utilizar la dilución que haya generado entre el 0.1 y el 10% de células GFP positivas.
- Calcular el título viral como sigue:

$$(\%GFP+) \times 4 \times 10^5 = \# \text{ células positivas}$$

(el factor 4×10^5 corresponde al número de células por pozo, suponiendo el 100% de confluencia)

$$\# \text{ células positivas} \times \text{factor de dilución} = \text{Unidades transductoras}/\mu\text{L}$$

Las células se transdujeron con dos tipos de virus por separado. Uno con el gen sid-1 y otro vacío como control. A las primeras se les llamará SID+ y a las segundas SID-.

4.2 SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

4.2.1 Síntesis de dsRNA

Se utilizó el plásmido pPD129.36 [Figura 13], en el cual el inserto clonado está flanqueado por dos promotores T7. Mediante PCR se amplifica el fragmento flanqueado por los dos promotores T7. Dicho amplificado contiene la secuencia del promotor de T7 a cada extremo por lo que, por acción de la RNA polimerasa T7, se sintetizaron las dos hebras complementarias de RNA. Los productos de transcripción se trataron con DNasa para eliminar los restos de templado y se purificaron con columnas G-25 (Amersham BS©). Para sintetizar dsRNA fluorescente se adicionó a la reacción de transcripción UTP unido a fluoresceína o unido a Alexa 546 en proporción con respecto al UTP no marcado. Los templados consistieron en la secuencia del promotor de tirosinasa de ~720pb o el gen de la proteína GFP de ~700pb en pPD129.36.

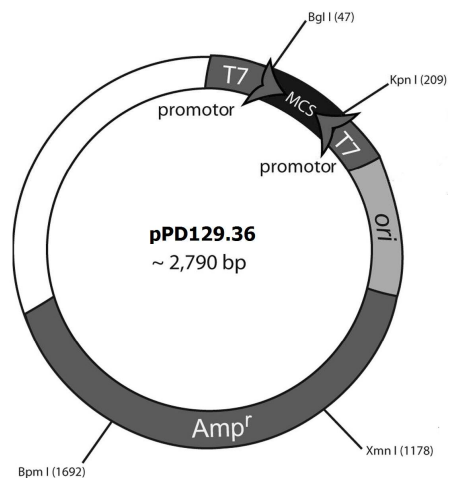


Figura 13. Plásmido pPD 129.36

La purificación con columnas G-25 elimina un gran porcentaje de nucleótidos no incorporados aunque el dsRNA no se obtiene 100% puro. En el caso del dsRNA fluorescente, la eliminación de los nucleótidos no incorporados es esencial para disminuir la fluorescencia de fondo. Para obtener un dsRNA fluorescente más puro, se desarrolló el protocolo de purificación de gel descrito a continuación.

4.2.2 Síntesis de ssRNA y siRNA

El ssRNA se sintetizó con el kit mMESSAGE mMACHINE® de Ambion ©. El templado consistió en el gen de la proteína GFP en el plásmido pDrive, ya que éste contiene al promotor de T7.

Los siRNAs se diseñaron y sintetizaron conforme a las especificaciones del kit Silencer ® de Ambion ©. La secuencia de uno de los siRNAs fue diseñada para silenciar la expresión de la proteína GFP. Del mismo modo, se diseñó un siRNA no interferente con la secuencia del promotor de tirosinasa.

4.2.3 Síntesis de dsDNA

Tanto el gen del promotor de tirosinasa como el de la proteína GFP contenidos en el plásmido pPD, fueron amplificados por separado mediante PCR con un oligo que reconoce a una parte de la secuencia del promotor de T7. Dado que los insertos están flanqueados por dicha secuencia, el producto de la reacción tendrá las dos hebras complementarias. El dsDNA así generado, se purificó con columnas G-25.

4.2.4 Síntesis de ssDNA

Entre los distintos métodos de síntesis de DNA de una hebra, el más eficiente y práctico es PCR asimétrico. En esta técnica, uno de los oligonucleótidos se encuentra de 100-1000 veces más concentrado en la reacción, gracias a lo cual se sintetiza en exceso una de las hebras. En nuestro caso, la proporción que generó más producto de una hebra fue 1:100. El molde consistió en el gen de la proteína GFP en el plásmido

Los productos de la reacción se corren en un gel nativo y se purifica la banda que corresponde al DNA de una hebra de acuerdo a lo descrito en el protocolo.

Aunque se probaron distintas proporciones de oligonucleótidos y condiciones de reacción, no se logró obtener un único producto. Para determinar cuál de las bandas correspondía a la del ssDNA, el producto de la reacción se digirió con la enzima Mung-Bean, la cual es una exonucleasa que degrada específicamente DNA de una hebra. Así, se determinó que la banda que desapareció por acción de correspondía al producto deseado [Figura 14].

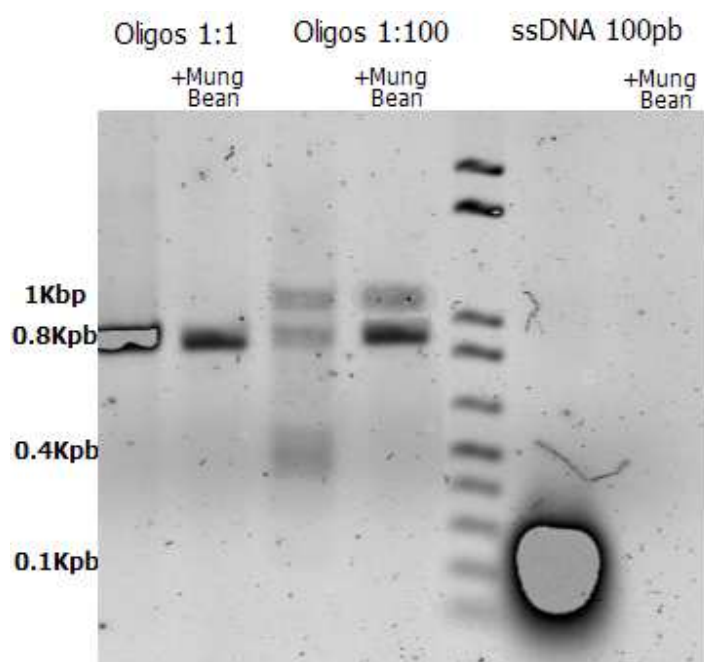


Figura 14. Identificación de la banda de ssDNA. Los primeros dos carriles corresponden al producto de PCR en cuya reacción se usaron oligos en proporción 1:1; al ser tratado con la enzima Mung Bean, el producto no sufre alteraciones, lo que indica que la enzima no corta dsDNA. Los carriles de en medio corresponden al PCR asimétrico (oligos 1:100), del cual se obtienen 3 bandas (1Kpb, 0.8Kpb y 0.4Kpb). El peso de la del producto del templado de doble hebra es de 0.8Kpb; por tanto el peso del ssDNA debería ser 0.4, aunque se observó esa banda, también apareció una banda de 1Kpb. Dado que el dsDNA puede adoptar formas caprichosas en geles nativos, existía la posibilidad de que la banda de 1Kpb pudiese corresponder a ssDNA. Al ser tratada con la enzima, en la mezcla de reacción permanecen únicamente las bandas de 1Kpb y 0.8Kpb, lo cual indica que la banda de 0.4Kpb es el DNA de una hebra. Para determinar que la exonucleasa sí cortara ssDNA, se adicionó a una muestra de oligonucleótidos de 100pb. En presencia de la enzima, desaparece por completo la banda de los oligonucleótidos (carriles de la derecha).

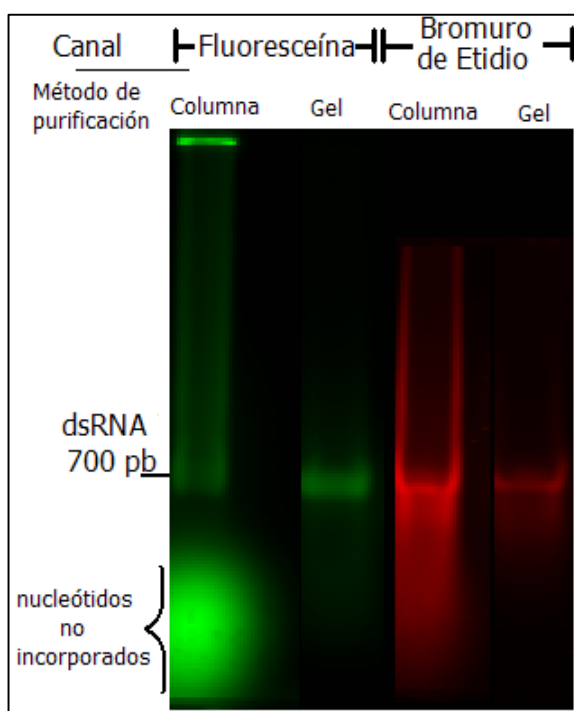
4.2.5 Protocolo 2. Purificación de ácidos nucleicos de gel.

- Correr un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 70 Volts en hielo.
- Cortar y pesar la banda deseada. Agregar 500 μ L de NaCl 0.3 mM.

- Congelar a -80°C durante 15 minutos.
- Incubar a 65°C hasta licuefacción.
- Agregar un volumen de fenol saturado y mezclar.
- Volver a congelar a $-70^{\circ}\text{C}/15$ min.
- Descongelar y centrifugar a 12 000 rpm/15 min/ 4°C .
- Recuperar la fase acuosa y lavar con fenol/cloroformo dos veces.
- Precipitar con Isopropanol toda la noche.
- Centrifugar a máxima velocidad durante 30 min a 4°C
- Lavar el pellet con etanol al 70%
- Resuspender en agua

En el dsRNA purificado por este método se eliminan por completo los nucleótidos no incorporados durante la transcripción, así como dsRNA degradado [Figura 15].

Figura 15. Métodos de purificación de dsRNA marcado con fluoresceína. En la imagen se muestran los carriles correspondientes al dsRNA purificado con columna o de gel. El dsRNA corresponde al promotor de tirosinasa y tiene un peso de $\sim 700\text{pb}$. En verde se presenta la señal de fluoresceína y en rojo la señal de bromuro de etidio. Nótese que en el canal de fluoresceína se observa una señal muy intensa en la parte inferior del gel en el carril de purificación por columna, ésta corresponde a los nucleótidos no incorporados. Dicha señal disminuye considerablemente cuando el dsRNA es purificado de gel. De igual forma, en el canal de bromuro de etidio, debajo de la banda de dsRNA de 700pb en el carril de la purificación por columna, hay un barrido que corresponde a dsRNA degradado, el cual disminuye cuando el dsRNA es purificado de gel.



4.3 DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE INTERNALIZACIÓN DE dsRNA EN CÉLULAS HEK 293-FT MEDIADO POR SID-1

Existen diferentes métodos para determinar cuál es la vía de transporte del sistema de interés; los más usuales son los farmacológicos, los que buscan la colocalización con marcadores específicos mediante microscopía y aquellos en los que se generan mutantes en vías específicas. Para determinar la vía mediante la cual SID-1 promueve la internalización de dsRNA, se emplearon distintos fármacos y se determinó el transporte a diferentes concentraciones de RNA y a diferentes tiempos de incubación. A continuación se describen las generalidades de los distintos protocolos para después puntualizar los detalles de cada uno.

4.3.1 Generalidades

- Las células empleadas fueron HEK 293-FT que expresaban (SID+) o no (SID-) a la proteína SID-1 de *C. elegans*.

- Luego de las incubaciones, las células se lavaron y prepararon para el citómetro como se señala a continuación:
 - Lavar los pozos con PBS
 - Agregar 100 μ l de tripsina, incubar durante 5min
 - Homogeneizar por pipeteo y agregar 1 ml de PBS
 - Transferir a un tubo Eppendorf de 1.5 ml
 - Centrifugar a 1.5×10^3 rpm durante 1 min.
 - Eliminar el sobrenadante y resuspender en 500 μ l de PBS+Azul tripano (1:1000)+RNAsa (1 μ g/ml) e incubar durante 5 min a 37°C.
 - Centrifugar a 1.5×10^3 rpm durante 1 min. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 300 μ l de PBS:FACS Flow (1:1). Transferir a tubos de citómetro.

- Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACS Calibur™ con el Software CellQuest™ Pro de la compañía BD Biosciences®. Con un control de células no tratadas se determinó hizo un filtro de tamaño y rugosidad tal que todas las células analizadas fueran células vivas. Los valores de Fluorescencia usados para el análisis de resultados corresponden a la media geométrica de 10 000 células cuyo tamaño y rugosidad eran equivalentes a los de las células sanas.

4.3.2 Protocolo 3. Experimentos de temperatura

- Cultivar a las células en cajas individuales de 35 mm hasta un 70-100% de confluencia.
- Preincubar las cajas durante 10min a la temperatura adecuada.
- Agregar dsRNA fluorescente (20 µg/ml) en 750 µl de Optimem.
- Incubar durante 2 horas a 37, 26 y 4 °C.
- Lavar y determinar la fluorescencia de las células en el citómetro.

4.3.3 Protocolo 4. Experimentos en presencia de fármacos

- Cultivar a las células en cajas de 24 pozos hasta un 70-100% de confluencia.
- Incubar durante 1 hora en presencia del fármaco a la concentración que se indica en la Figura 16 en un volumen total de 250 µL por pozo.
- Luego del tiempo de incubación arriba señalado, agregar al medio dsRNA fluorescente a una concentración de 20 µg/ml.
- Incubar durante 3 horas a 37°C.
- Lavar y determinar la fluorescencia de las células en el citómetro.

Para cada fármaco y tipo de célula, se deben tener los siguientes cuatro pozos:

Pozo	A	B	C	D
Contenido				
dsRNA	-	-	+	+
Fármaco	-	+	-	+

Los símbolos -/+ indican la adición (+) o la ausencia (-) del dsRNA o del fármaco

En el caso de – en la fila de fármaco, se usará el vehículo en el mismo volumen que el fármaco.

A: corresponde a la fluorescencia intrínseca de la célula

B: es el cambio de fluorescencia intrínseca debido a la presencia del fármaco

C: fluorescencia correspondiente al 100% de transporte

D: cambio en el % de transporte debido al fármaco

Los resultados se reportan como transporte relativo. El valor de 100% del control positivo (C+) se obtiene al normalizar la fluorescencia de C con respecto a la de A (dividir la media geométrica de fluorescencia). Del mismo modo, el transporte en presencia de el fármaco se obtiene al dividir la fluorescencia de D entre la de B para después normalizar este valor con el del C+. En la Figura 16 se describen los fármacos utilizados en este estudio.

¿Tipo de transporte?	Pasivo	Activo		Ref.
4°C	+	-		[1]
26°C	+	+/-		
37°C	+	+		
Oligomicina (5 µM)	+	-		
¿Depende de Actina?	No	Sí		[97]
Citocalacina D (0.4 µg/ml)	+	-		
¿Qué vía usa?	Clatrina	Caveolina	Macropinocitosis	
LY294002 (50 µM)	+	+	-	[98]
Wortmanina (300 nM)	+	+	-	[98]
Nistatina (25 µg/ml)	+	-	+	[92]
Clorpromazina (50 µg/ml)	-	+	+	[99]

Figura 16. Condiciones de incubación y fármacos utilizados para determinar mecanismo mediante el cual SID-1 promueve la internalización de dsRNA. Los símbolos se refieren al transporte relativo de células SID+ en las condiciones señaladas. (+) se refiere a que transporta significativamente más que el control negativo (células SID- sin tratamiento) y no menos que el control + (células SID+ sin tratamiento). (-) se refiere a que transporta significativamente menos que el control positivo, y puede transportar lo mismo, menos o más que el control negativo. La combinación de más o menos transporte en diferentes condiciones dictará el tipo de mecanismo implicado. Por ejemplo, si el transporte de dsRNA se inhibe (-) en presencia de Citocalacina D, ello implica que la actina juega un papel importante en el proceso.

4.3.4 Protocolo 4. Ensayos con Radiactividad

Los distintos ácidos nucleicos (dsDNA, ssDNA, dsRNA, ssRNA,) se marcaron en su extremo 5' con P³²-UTP con la enzima T4 cinasa, de acuerdo a las indicaciones de su manual. Las células empleadas fueron HEK 293-FT que expresaban (SID+) o no (SID-) a la proteína SID-1 de *C. elegans*. Los experimentos se llevaron a cabo conforme a lo descrito en el siguiente protocolo.

- Cultivar a las células en cajas de 24 pozos hasta un 70-100% de confluencia.
- Incubar durante 3 horas a 37°C en presencia de uno de los distintos ácidos nucleicos en concentraciones equimolares (la usada en este trabajo fue 100 nM).
- Lavar los pozos con PBS
- Agregar 100 ul de tripzina, incubar durante 5 min
- Homogeneizar por pipeteo y agregar 1 ml de PBS
- Transferir a un tubo Eppendorf de 1.5 ml
- Centrifugar a 1.5×10^3 rpm durante 1 min.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de agua
- Colocar los tubos en recipientes para contador de centelleo y determinar las cuentas por minuto

Para determinar la radiactividad de las muestras se utilizó un contador de centelleo (Beckman Coulter© modelo LS6500), además se determinó la radiactividad de 1 µL de cada ácido nucleico con la finalidad de transformar las cuentas por minuto en moléculas de dsRNA. Finalmente, los resultados se normalizaron con respecto a la concentración de proteínas, determinada por el método de Bradford (kit de Sigma-Aldrich©)

4.3.5 Protocolo 6. Silenciamiento génico mediado por dsRNA

Para determinar si el dsRNA transportado por la proteína SID-1 era capaz inducir RNA de interferencia, se montó el siguiente protocolo, en el cual se silencia el gen

de la proteína GFP y se determina el porcentaje de silenciamiento por citometría de flujo.

Se usaron células HEK 293-FT que expresan a la proteína GFP de manera estable. Estas células fueron transducidas con un lentivirus. Para que además expresaran a la proteína SID-1 se intentó volver a translucirlas con el virus apropiado, sin embargo las células murieron al poco tiempo, lo que parece indicar que no soportan una doble carga viral en su genoma. Por ello se decidió transfectarlas con Lipofectamina 2000® en complejo con el plásmido pLlox 3.7 con o sin gen sid-1, de acuerdo a lo descrito en el protocolo de la compañía.

Posteriormente, se probaron dsRNAs o siRNAs cuya secuencia es complementaria al RNAm de la proteína GFP o con una secuencia no interferente, que corresponde al promotor del gen de Tirosinasa. A continuación, se describe a detalle el protocolo de silenciamiento.

- Cultivar a las células en cajas de 12 pozos hasta un 70-100% de confluencia.
- Incubar o transfectar 4 µg del RNA apropiado en 700 µL de Optimem durante 5-7 horas a 37°C.
- Agregar 1 mL de DMEM suplementado con suero.
- Incubar durante 72 horas a 37°C.
- Transcurrido el tiempo de incubación, evaluar la fluorescencia de las células.
- Lavar los pozos con PBS
- Agregar 300 µl de tripsina, incubar durante 5min
- Homogeneizar por pipeteo y agregar 300 µL de FACS Flow
- Transferir el homogenizado a tubos para citómetro y determinar la media geométrica de fluorescencia de una población de células sanas por citometría de flujo.
- Determinar el porcentaje de fluorescencia respecto a células no tratadas.

4.3.6 Protocolo 6. Localización intracelular de la proteína de fusión SID-1::GFP

El gen *sid-1* se clonó en el plásmido pEGFP-N1, diseñado para generar proteínas de fusión con GFP en el extremo carboxilo terminal. El inserto clonado en este plásmido se mando a secuenciar y se determinó que no habría sufrido mutaciones. Además, se transfectó con Lipofectamina 2000® en células HEK 293-FT y, antes de realizar cualquier otro ensayo, se determinó su capacidad para transportar dsRNA. Para tener una mayor sensibilidad, se determinó el transporte de dsRNA radioactivo mediado por SID-1::GFP en comparación con células que expresaban a SID-1 por transfección o transducción. Conforme a la Figura 17, se determinó que la proteína de fusión es funcional, ya que transporta significativamente más que las células no transfectadas. y por ello se prosiguió a utilizarla ensayos de microscopía confocal.

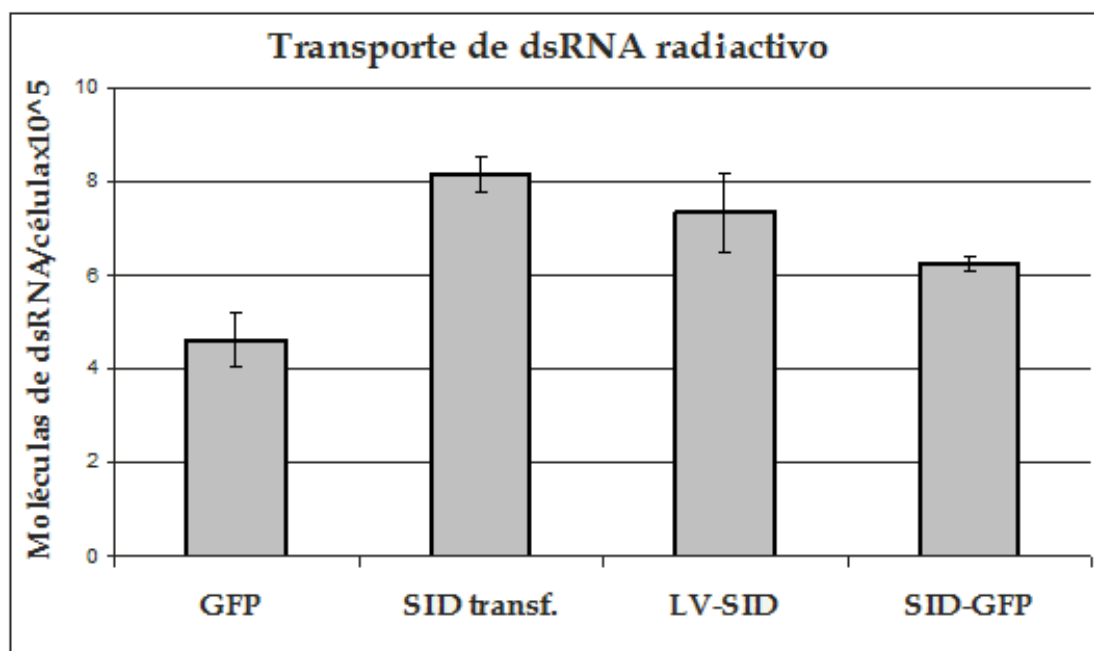


Figura 17. Transporte de dsRNA radiactivo por células transfectadas con el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), o de *sid-1* (SID Transf.) o de la proteína de fusión SID-1::GFP (SID-GFP), o por células transducidas con un lentivirus que contiene al gen la proteína SID-1 (LV-SID). En la figura se reportan medias de tres experimentos (\pm DE).

Para los experimentos de microscopía confocal, se utilizaron células HEK 293-FT que expresan a la proteína de fusión SID-1::GFP por transfección. Se utilizó dsRNA no marcado o marcado con alexa 546 a una concentración de 15µg/ml en Optimem. El procedimiento se describe a continuación.

- Cultivar las células en cajas de 12 pozos con dos cubreobjetos por pozo hasta una confluencia de 70-90%.
- Incubar a las células en presencia o ausencia de dsRNA durante 30 min o 3 horas.

Fijado

- Luego del tiempo requerido para el experimento, aspirar el medio y lavar cuidadosamente con 500uL de PBS.
- Agregar 300 uL de formaldehído al 4% en PBS a temperatura ambiente e incubar durante 25 min a temperatura ambiente
- Aspirar el paraformaldehído y agregar 300 uL de Glicina 50 mM en PBS, incubar a temperatura ambiente durante 25 min
- En este punto se pueden almacenar las células a 4°C

Montaje

- Aspirar la glicina
- Agregar 300 uL de DAPI 1:1000 en PBS, incubar a temperatura ambiente. durante 10 min
- Lavar con agua
- Agregar 6 uL de DAKO en el portaobjetos y colocar los cubreobjetos de manera que las células queden entre ambos.
- Dejar O/N
- Sellar con barniz
- Observar en el microscopio confocal

Las imágenes fueron tomadas con el microscopio FV10i™ de Olympus© y analizadas con el software FV10 ASW 2.0.

5. RESULTADOS

5.1 GENERACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR QUE EXPRESA A **SID-1** DE MANERA ESTABLE

El gen SID-1 del nematodo *Caenorhabditis elegans* fue clonado por técnicas convencionales de biología molecular a partir de RNA mensajero de gusanos adultos de la cepa Bristol N2. El producto amplificado fue clonado en el vector Lentilox 3.7 (ver Protocolo 1). Una vez estandarizada la producción de partículas lentivirales capaces de transducir células por arriba del 70%, se procedió a generar una línea que expresa SID-1 con base en la línea celular humana HEK 293-FT (*“Human Embryonic Kidney cells”*). Para asegurarnos que las células expresaban al transgen, se amplificó el RNA mensajero de la proteína SID-1 mediante RT-PCR. Además, para determinar si el genoma viral se insertó en el de las células, se purificó el DNA genómico de las células transducidas y a partir de éste se amplificó por PCR la secuencia Ψ (PSI), que es un marcador de la inserción del genoma viral. En la Figura 18 se muestra que tanto las células transducidas con el vector que contenía a SID-1 (células **SID+**) como las transducidas con el vector vacío (células **SID-**) contienen a la secuencia PSI en su genoma, lo cual indica que en ambas el virus insertó su material genético. Así mismo, las células SID+ expresan el mRNA de la proteína SID-1, en tanto que las células SID- no lo hacen.

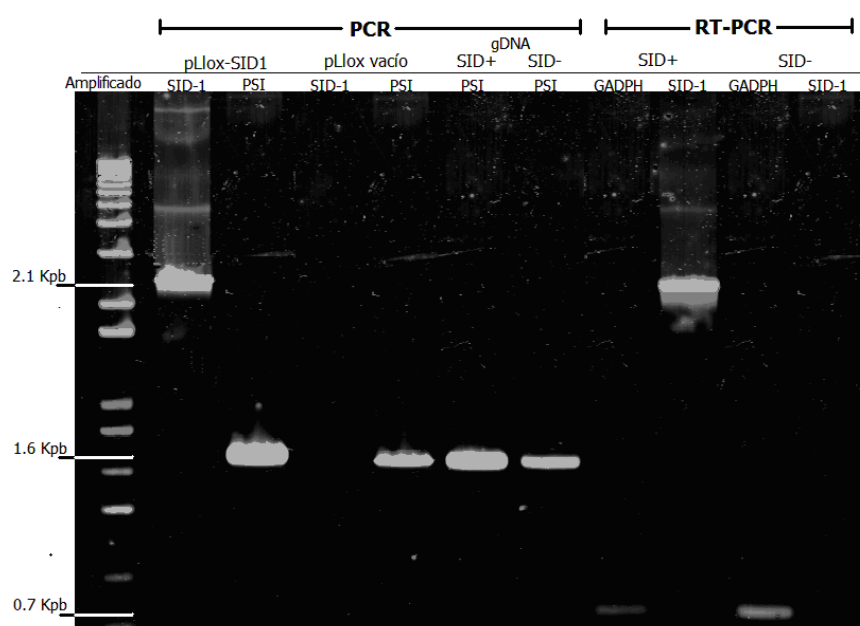


Figura 18. PCR y RT-PCR de células transducidas con un vector que contenía al gen de SID-1 (células SID+) o con un vector vacío (células SID-). En los primeros seis carriles se muestran los productos de PCR donde se amplificó la secuencia PSI (1.6 Kpb) a partir de DNA genómico (gDNA) y de los plásmidos pLlox con y sin SID-1 usados como control de las reacciones de amplificación. Además, mediante RT-PCR se amplificó el gen de SID-1 (2.1Kpb) y el gen de GAPDH (0.7Kpb) como control.

5.2 INTERNALIZACIÓN DE dsRNA EN CÉLULAS DE MAMÍFERO MEDIADA POR SID-1.

Con la finalidad de caracterizar la entrada de dsRNA mediada por la proteína SID-1 al ser expresada en células de mamífero, se realizaron ensayos de incubación con dsRNA marcado con fluoresceína en distintas condiciones de concentración y tiempo en las células transducidas con el lentivirus para expresar a SID-1 (SID+). Al término de los periodos de incubación las células se lavaron exhaustivamente con una solución de Tripsina en PBS para eliminar el dsRNA pegado inespecíficamente. La entrada del ácido nucleico fue cuantificada mediante citometría de flujo. Los resultados mostrados fueron adquiridos en escala logarítmica y corresponden al promedio de la media geométrica de por lo menos tres triplicados realizados en días distintos. Como control negativo se utilizaron células SID-. Adicionalmente a los lavados, se incubaron las células en presencia de RNasa A, para degradar el dsRNA no internalizado, y azul de tripano, para enmascarar la fluorescencia inespecífica en la superficie de las células. De esta manera nos aseguramos de solo cuantificar el dsRNA internalizado.

5.2.1 Internalización a concentraciones crecientes de dsRNA

Las células que expresan a SID-1 internalizan más dsRNA fluorescente que aquellas que no lo expresan [Figura 19]. Es importante notar que las células SID- también internalizan dsRNA, aunque estas lo hacen de manera lineal ($r^2=0.97$) con respecto a la concentración. La pendiente de su curva es de 0.022. En cambio, las células SID+ presentan dos secciones en su curva de internalización; los primeros cuatro puntos, que corresponden a concentraciones de dsRNA bajas, tienen un comportamiento lineal ($r^2=0.99$) cuya pendiente es 0.09, cuatro veces mayor a la de las células SID-. En el segundo segmento de la curva de SID+, que corresponde a los últimos tres puntos, la pendiente disminuye considerablemente y resulta muy similar (0.019) a la de las células SID-. Esto sugiere que en las células SID+ hay dos mecanismos de internalización implicados, los primeros cuatro puntos de la gráfica corresponden a la suma de las actividades de ambos

mecanismos; a altas concentraciones, uno de los mecanismos o sistemas se satura y sólo vemos la aportación del otro, que parece tener las mismas características que el mecanismo de internalización observado en las células SID- y que corresponde a la entrada basal de dsRNA.

Es de notar que a concentraciones de dsRNA muy bajas no parece haber diferencias de internalización entre ambos tipos de células. Esto quizá se deba a que el dsRNA utilizado en este experimento se purificó mediante una columna de exclusión molecular que puede dejar nucleótidos no incorporados además de un poco de dsRNA degradado que pudieran generar fluorescencia de fondo, lo que enmascararía la entrada a concentraciones bajas. Para esclarecer este punto se repitieron los experimentos de la figura 10 con dsRNA fluorescente purificado de gel. De esta manera se obtiene un dsRNA de alta pureza pues se elimina cualquier molécula que no corresponda al peso molecular esperado (Ver estrategia experimental, Figura 15). Al utilizar este dsRNA ultra-puro se observó que disminuye considerablemente la fluorescencia de fondo, lo que acentúa las diferencias en la internalización observada en cada tipo de células [Figura 20]. Dichas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a partir de $7 \mu\text{g/ml}$ de dsRNA en el medio; esta concentración es menos de la mitad de la que se requiere para observar diferencias significativas cuando se usa dsRNA purificado de columna. Sin embargo, cuando se hace un balance costo-beneficio entre usar uno y otro método de purificación, resulta más conveniente purificar el dsRNA de columna, ya que el tiempo y reactivos que requiere este método son menores y, sobre todo, se obtienen resultados muy similares a los observados en la Figura 19, aunque para ello se requiera una mayor concentración de dsRNA. Esto también nos indica que los contaminantes no causan mayores problemas en los ensayos más que el incremento de la fluorescencia de fondo. Por lo anterior, el resto de los experimentos se realizaron con dsRNA fluorescente purificado de columna a una concentración de $25 \mu\text{g/ml}$ en el medio de cultivo.

RESULTADOS

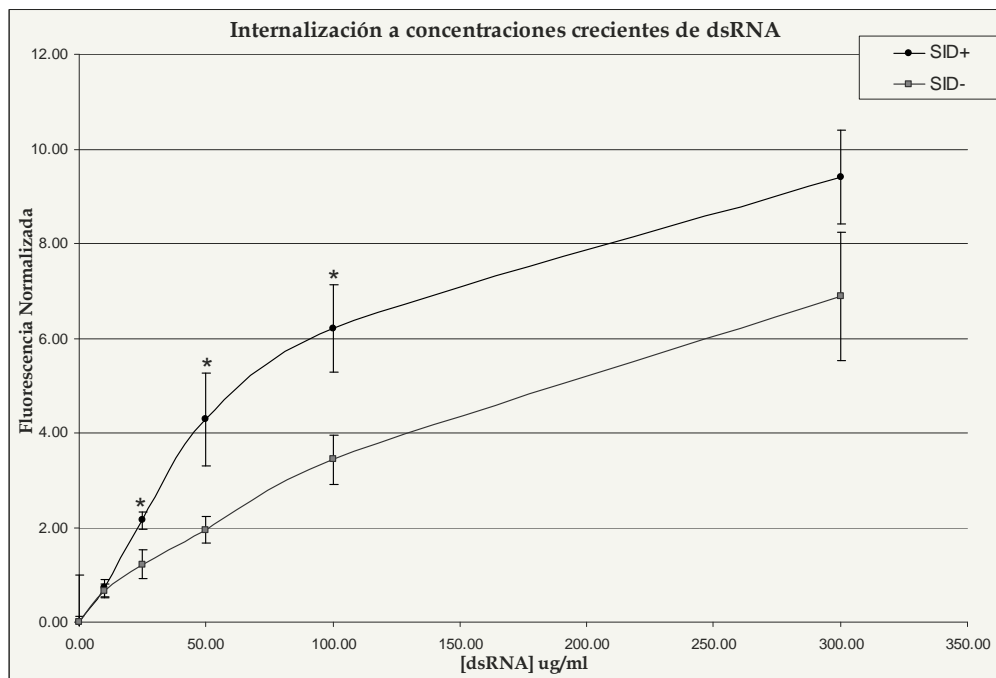
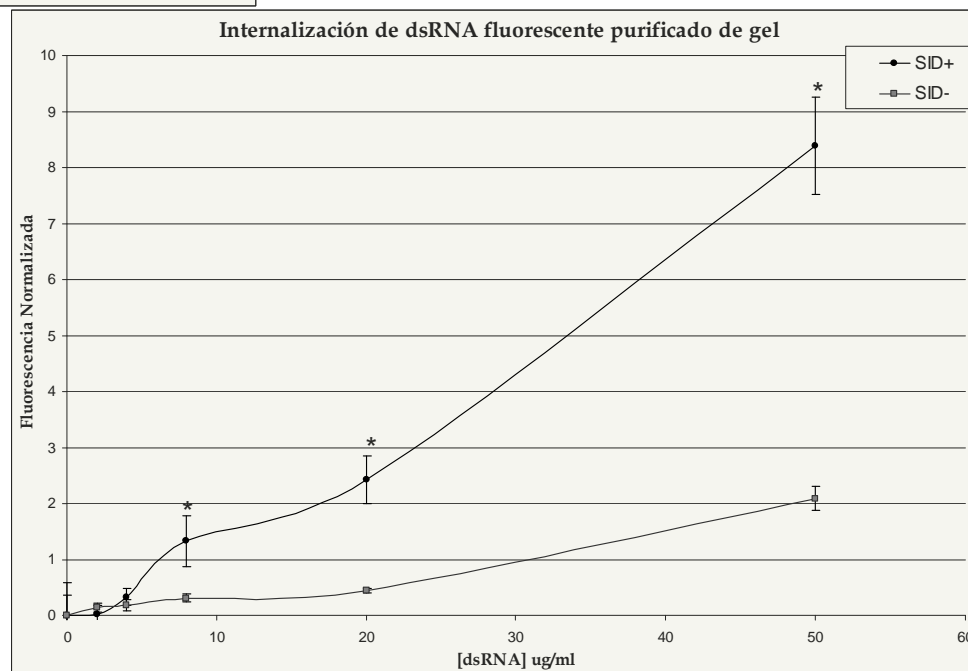


Figura 19. Internalización de dsRNA Fluorescente en diferentes concentraciones. Células HEK 239-FT transducidas con un lentivirus que contenía al gen de la proteína SID-1 (**SID+**) y transducidas con un lentivirus vacío (**SID-**) fueron incubadas en el medio de cultivo Optimen (in suero) con dsRNA fluorescente a 10, 25, 50, 100 o 300 µg/ml durante 3 horas. La fluorescencia fue determinada por citometría de flujo. Los valores de media geométrica de fluorescencia han sido normalizados con sus respectivos controles y se reportan como medias (\pm DE) de tres experimentos realizados en días diferentes; en cada experimento se hicieron triplicados de cada punto en pozos diferentes. Los asteriscos (*) indican aquellos puntos en los que las diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.05$, $n=9$) de acuerdo a la prueba ANOVA de dos colas.

Figura 20. Internalización de dsRNA Fluorescente de alta pureza obtenido de gel a concentraciones bajas en el medio. El ensayo se realizó de manera similar al de la Figura 19. Los valores de media geométrica de fluorescencia han sido normalizados con sus respectivos controles y se reportan como medias (\pm DE) de dos experimentos realizados en días diferentes; en cada experimento se hicieron triplicados de cada punto en pozos diferentes. Los asteriscos (*) indican aquellos puntos en los que las diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.05$, $n=6$) de acuerdo a la prueba ANOVA de dos colas.



5.2.2 INTERNALIZACIÓN DE dsRNA A DISTINTOS TIEMPOS

Una vez estandarizado el método de purificación y la concentración de dsRNA a utilizar en los experimentos (25 ug/mL), se procedió a evaluar la entrada de dsRNA mediada por SID-1 con respecto al tiempo. Como se ve en la grafica de la figura 21 la cantidad de dsRNA internalizado aumenta conforme avanza el tiempo tanto en las células SID- como en las SID+. Sin embargo, el comportamiento de las células SID+ es distinto al de la entrada basal, en especial en las primeras dos horas donde se observa que las células SID+ han internalizado cerca del doble de lo que han internalizado las células SID-. A medida que avanza el tiempo la tasa de transporte disminuye. Cuando las células son incubadas durante toda una noche (cerca de 16 horas), ya no hay diferencias significativas entre la cantidad de dsRNA internalizado por las células SID+ y las células SID-. Esto se puede deber a que en ese tiempo las células han internalizado todo el dsRNA del medio ya sea por la entrada basal o por la mediada por SID-1, o a que el ácido nucleico se ha degradado y a que la marca fluorescente se ha eliminado de la célula.

Es importante señalar que las células SID+ y SID- presentan un comportamiento muy similar al observado en los experimentos de concentración (Figuras 19 y 20): en las células SID+, la pendiente de los primeros 4 puntos es mucho mayor que en la de los últimos tres, en tanto que las células SID- internalizan dsRNA de manera lineal. Esto de nuevo sugiere que SID-1 funciona mediante un mecanismo saturable tanto por la concentración como en el tiempo y que este mecanismo es distinto que el endógeno.

En la literatura se ha reportado que el transporte mediado por SID-1 en células S2 es relativamente rápido, desde los primeros 5 minutos ya se observa una entrada significativa [1, 51]. Sin embargo, lo que nosotros observamos en células de mamífero es una entrada más lenta: a los 10 minutos no hay diferencias significativas en la entrada de dsRNA entre las células SID+ y SID-. En nuestros

RESULTADOS

ensayos, las diferencias estadísticamente significativas se observaron hasta los 30 minutos de incubación.

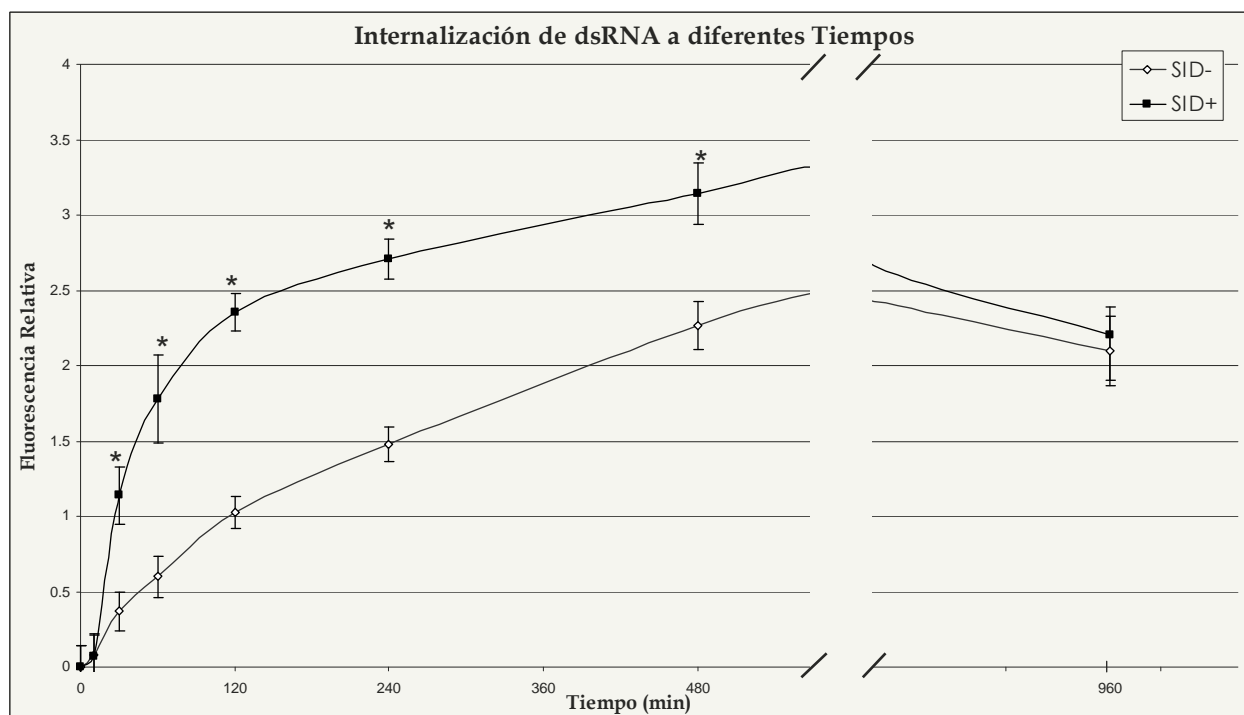


Figura 21. Internalización de dsRNA a diferentes tiempos de incubación. Células HEK 239-FT transducidas con un lentivirus que contenía al gen de la proteína SID-1 (**SID+**) y transducidas con un lentivirus vacío (**SID-**) fueron incubadas con dsRNA fluorescente a 25 μ g/ml en optimem durante 10, 30, 60, 120, 240, 480 minutos y toda la noche (16 horas, 960 min). Los valores de fluorescencia han sido normalizados con sus respectivos controles y se reportan como medias (\pm DE) de tres experimentos realizados en días diferentes; en cada experimento se hicieron triplicados de cada punto en pozos diferentes. Los asteriscos (*) indican aquellos puntos en los que las diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.05$, $n = 9$) de acuerdo a la prueba ANOVA de dos colas.

5.3 RNA DE INTERFERENCIA MEDIADO POR SID-1

De los experimentos anteriores se determinó que SID-1 acelera la internalización de dsRNA a la célula, la siguiente pregunta era si dicho dsRNA era capaz de generar RNA de interferencia. Tanto Hunter [1] como Tsang [50] reportaron en sus modelos (células S2 de *D. melanogaster* y células madre embrionarias de ratón, respectivamente) que el dsRNA internalizado vía SID-1 promovía el silenciamiento

génico de un reportero transfectado. Sus controles validaron el hecho de que el silenciamiento fuera por RNAi y no por un artefacto de la transfección. Sin embargo, dicha aproximación no corresponde por completo a lo que ocurre de manera natural (que el gen a silenciar se exprese de manera endógena). Por esto, se decidió utilizar células HEK 293-FT que expresaban de manera estable a la proteína GFP (GFP+); dicha línea celular se generó en el laboratorio con un lentivirus similar al usado en los experimentos (Protocolo 1). Estas células GFP+ fueron transfectadas con un plásmido que contenía al gen de SID-1 bajo el promotor de citomegalovirus (células GFP+SID+) y con un plásmido vacío como control negativo (células GFP+SID-). Ambos tipos celulares fueron incubados o transfectados con dsRNA cuya secuencia correspondía a la del gen de GFP (~700pb) o con dsRNA con una secuencia no interferente de tamaño similar, como control negativo. Adicionalmente se utilizó un siRNA contra GFP y un siRNA no interferente. Luego de 48 horas, mediante citometría de flujo, se determinó la media geométrica de fluorescencia de las distintas poblaciones. Comparando este valor entre las células tratadas y las células control, se determinó el porcentaje de silenciamiento de la expresión de GFP.

Como era de esperarse, la transfección con dsRNA con la secuencia de GFP silencia la expresión de esta proteína cerca del 40% tanto en células SID- como en SID+ [Figura 22]. Dicho porcentaje es notable puesto que se está silenciando un gen que se expresa de manera constitutiva y sobre todo tomando en cuenta que la GFP es una proteína con una prolongada vida media al interior de la célula [100]. Por otro lado observamos que, al ser transfectados, los siRNAs dirigidos contra GFP son más potentes que los dsRNAs de 700pb, ya que disminuyen hasta el 50% la expresión de la proteína. Este resultado es congruente con lo ya reportado en la literatura respecto a que los siRNAs son más efectivos para silenciar genes en células de mamíferos [16-17].

Cuando el dsRNA de 700 pb (ya sea control no interferente u homólogo a la GFP) es simplemente adicionado al medio de cultivo de células SID- no observamos una

disminución significativa en la fluorescencia de la célula. Este resultado es interesante puesto que previamente habíamos observado una entrada basal inespecífica de dsRNA en células SID- (figuras 19, 20 y 21), e indica que el dsRNA que entra a la célula de manera inespecífica no participa en el RNAi. Por su parte, cuando incubamos con dsRNA homólogo a GFP (dsGFP) a las células transfectadas con SID-1 (GFP+SID+) observamos una disminución cercana al 30% respecto a las incubadas con un dsRNA no interferente (ds-NI). Este resultado indica que el dsRNA que entra a la célula vía SID-1 es capaz de silenciar genes de manera específica, contrario a lo que ocurre con el dsRNA que entra a la célula de manera endógena.

Un resultado interesante es que los siRNAs diseñados para interferir la expresión de la GFP no tuvieron un efecto significativo en la fluorescencia de las células GFP+SID+ (a pesar de que habían mostrado su efectividad para silenciar a la GFP al ser transfectados). Dicho resultado nos habla de la especificidad de SID-1 respecto a discriminar moléculas de dsRNA de distintos tamaños.

Es importante destacar que el silenciamiento mediado por SID-1 es menos potente que el obtenido por transfección (30% y 40%, respectivamente), tanto con siRNA como con dsRNA de 700 pb [Figura 22]. Esto indica que la transfección de dsRNA es un método más eficiente para realizar estudios de RNA. Para caracterizar mejor esta diferencia, se realizaron experimentos de internalización de dsRNA radioactivo a la misma concentración que en los experimentos de silenciamiento y se comparó la cantidad de dsRNA que entra a la célula mediante transfección contra la internalizada vía SID-1 [Figura 23].

RESULTADOS

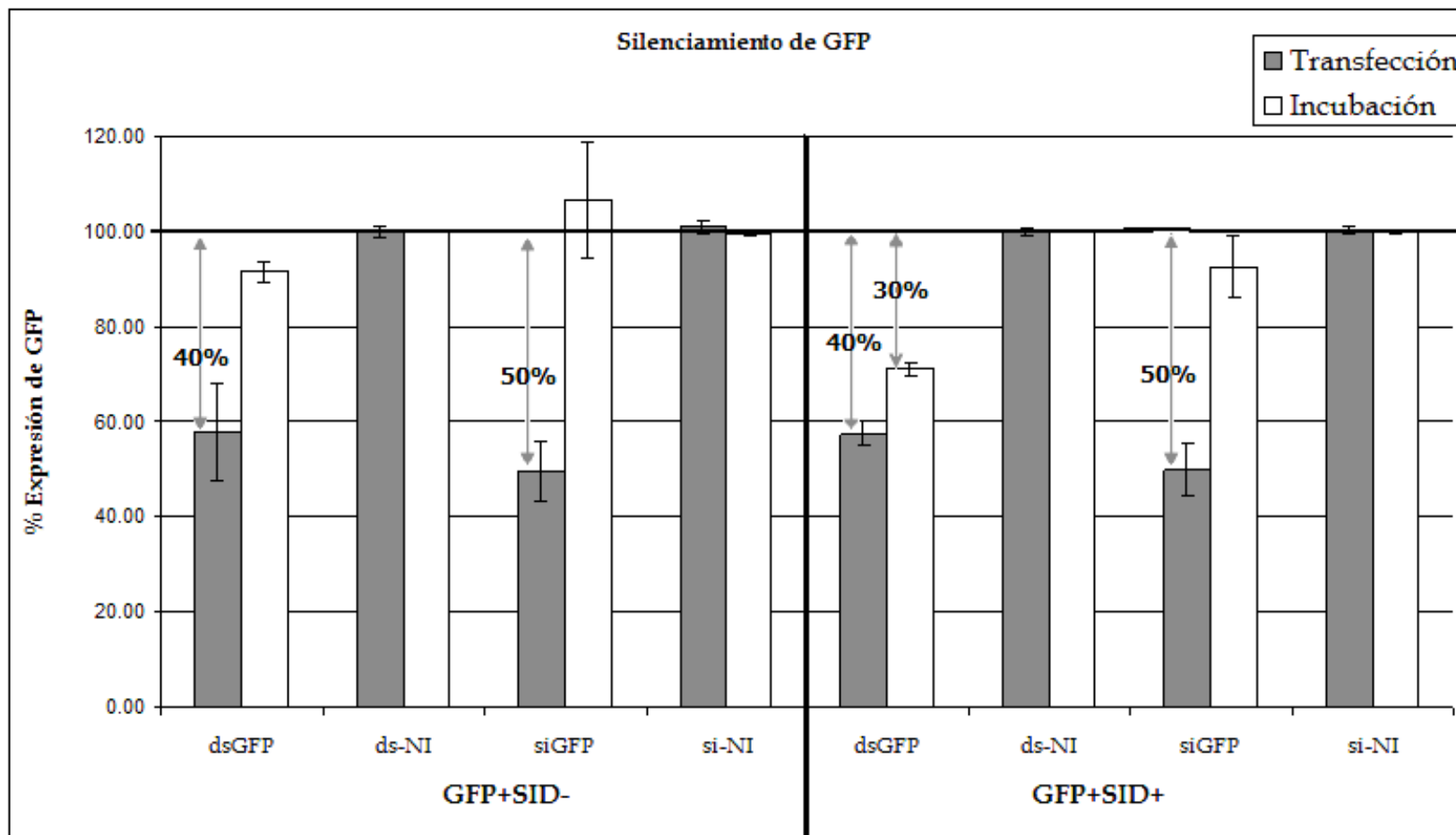


Figura 22. Silenciamiento específico de la proteína GFP mediado por dsRNA. Células HEK 293-FT que expresan a la proteína GFP de manera estable fueron transfectadas con un plásmido para expresar a SID-1 (GFP+SID+) o un plásmido vacío (GFP+SID-). Posteriormente fueron incubadas o transfectadas con 4 μ g de dsRNA (conc. final:16 μ g/ml) cuya secuencia corresponde a la del gen de la proteína GFP (dsGFP), o de un siRNA diseñado para silenciar a la proteína GFP (siGFP). Como controles negativos se utilizaron un dsRNA o siRNA con secuencias no interferentes (ds-NI y si-NI, respectivamente). Después de 48 horas de incubación, se determinó el porcentaje de expresión de la proteína GFP en las distintas poblaciones con respecto al control (células no tratadas) mediante citometría de flujo. Para cada caso, la fluorescencia máxima fue normalizada al 100% respecto al valor de las células transfectadas o incubadas con el dsRNA control (ds-NI). Los valores a un lado de las flechas de dos puntas indican el porcentaje de silenciamiento (por ejemplo, en las células GFP+SID- transfectadas con siGFP la expresión de la proteína GFP disminuyó cerca del 50%). Las barras corresponden a la media del porcentaje de expresión de GFP (\pm DE) de cuatro experimentos realizados en días diferentes (n=4). Los detalles de este experimento se describen en el Protocolo 6.

RESULTADOS

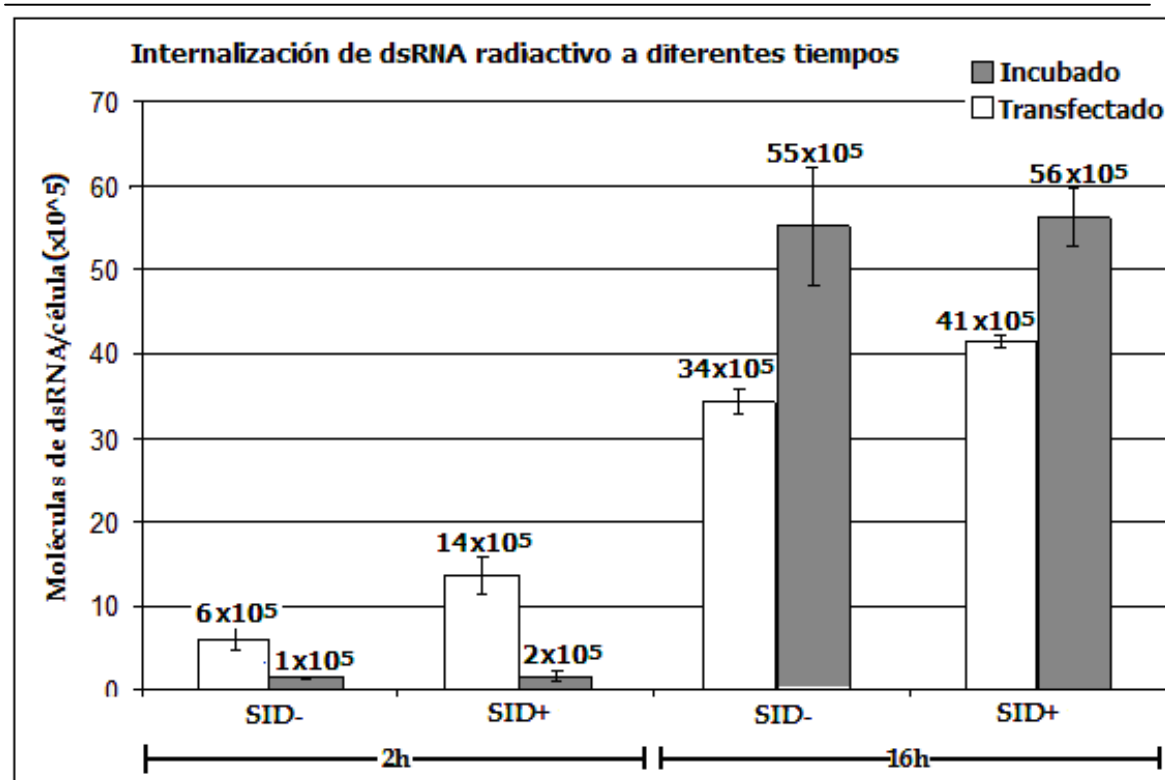


Figura 23. Cuantificación de dsRNA radiactivo. En la gráfica se reporta el número de moléculas de dsRNA radioactivo que fue internalizado por cada célula que expresaba (SID+) y no expresaba (SID-) a la proteína SID-1 luego de 2 horas y toda una noche (16h) de incubación o transfección con dsRNA radioactivo a una concentración de $16\mu\text{g/ml}$. Los valores se reportan como medias (\pm DE) de dos experimentos realizados en días diferentes con cuatro pozos del mismo punto por experimento ($n=8$). Los detalles de este experimento se describen en el Protocolo 5.

Luego de dos horas de incubación en presencia de dsRNA radiactivo, las células SID+ han internalizado el doble de moléculas que las células SID- (14×10^5 y 6×10^5 , respectivamente). Esto ratifica lo observado en los experimentos de tiempo, donde a 2 horas de incubación la fluorescencia en las células SID+ es de el doble que la fluorescencia de las células SID- [Figura 21]. En el mismo tiempo, las células transfectadas han internalizado muy poco dsRNA (de $1-2 \times 10^5$ moléculas por célula). Esto se puede deber a que los complejos de lípidos y dsRNA requieran más tiempo para formarse o que se transporten más lentamente que las moléculas de dsRNA desnudas.

Considerando en conjunto los resultados de silenciamiento y los de entrada de dsRNA radioactivo, observamos que por transfección 55×10^5 moléculas de dsRNA por célula

silencian a GFP en un 40%, en tanto cuando la entrada es vía SID-1, 41×10^5 moléculas de dsRNA por célula silencian a GFP en un 30%. Entonces, parece ser que mediante transfección se genera un efecto RNAi más potente porque se internalizan más moléculas. Esto se puede deber a que los complejos lipídicos contienen más dsRNA del que se puede transportar vía SID-1.

En estos experimentos, también se observó que luego de una noche de incubación, las células SID- internalizan menos dsRNA en una proporción similar que las células SID+ (34×10^5 y 41×10^5 , respectivamente). Considerando que el dsRNA que entra por la vía endógena no genera RNAi y el internalizado vía SID-1 si lo hace, estos resultados confirman que la maquinaria de internalización que actúa en cada sistema es distinta.

5.4 SELECTIVIDAD DE SID-1

Se ha reportado que SID-1 promueve preferentemente la internalización de ácidos nucleicos grandes [1]. Sin embargo, no se había determinado hasta que grado SID-1 es capaz de discriminar entre el dsRNA y otros ácidos nucleicos. Para profundizar en lo anterior, comparamos la entrada de distintos tipos de ácidos nucleicos marcados radiactivamente entre células SID+ y células SID-. A saber, probamos: RNA de una y doble hebra (ssRNA y dsRNA, respectivamente), RNAs pequeños interferentes (siRNA), y DNA de una y doble hebra (ssDNA y dsDNA, respectivamente).

Los resultados demuestran que las células SID+ internalizan prácticamente la misma cantidad de ssDNA, dsDNA, ssRNA y siRNA que las células SID-. Sólo se observan diferencias significativas en el transporte de dsRNA, donde se observa de nuevo que se transporta cerca del doble de éste ácido nucleico con respecto al control. Esto sugiere que SID-1 es altamente selectivo a un solo tipo de ácido nucleico, y parece reconocer y transportar preferencialmente RNA de doble hebra largo [Figura 24].

Este resultado explica hasta cierto punto el por que los siRNAs interferentes contra GFP no fueron capaces de silenciar la expresión del gen reportero al ser incubados con células que expresaba a SID-1 [Figura 22].

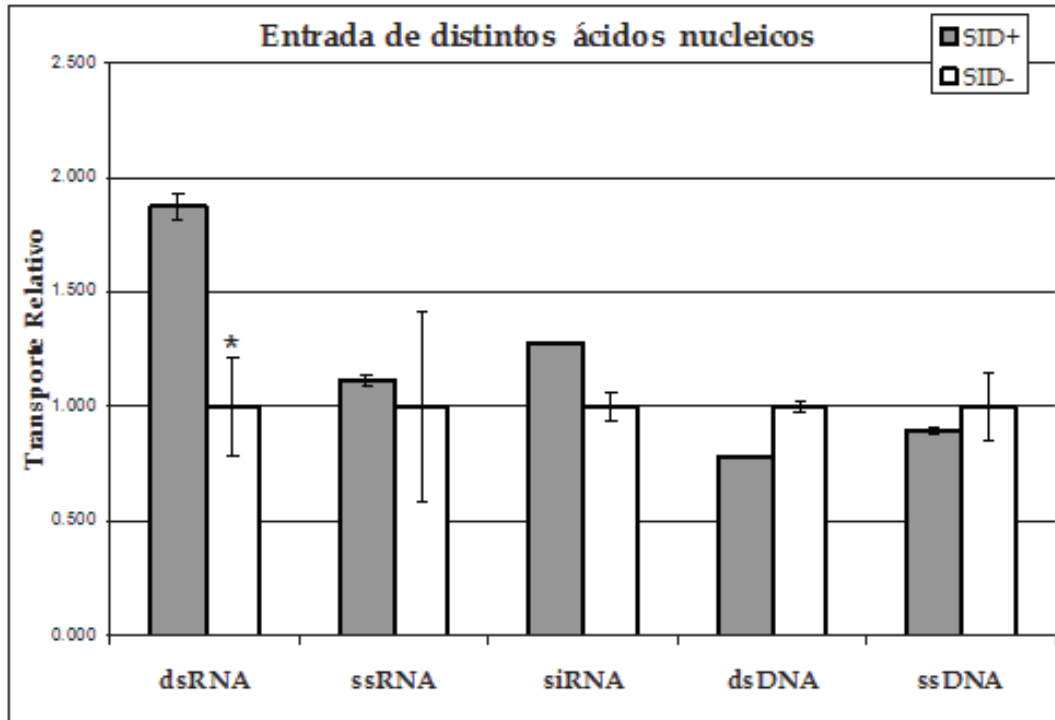


Figura 24. Internalización de RNA de doble hebra (dsRNA), una hebra (ssRNA) o pequeño interferente (siRNA), y de DNA de doble (dsDNA) o una hebra (ssDNA). Los ácidos nucleicos fueron marcados en el extremo 5' con P³²-UTP y agregados al medio de cultivo de células SID+ o SID- en concentraciones equimolares durante 3 horas. Los resultados están reportados como medias (±DE) de transporte relativo, normalizado al número de moléculas internalizadas por el control, de dos experimentos realizados en días diferentes con seis puntos por experimento. Los asteriscos (*) indican aquellos valores en los que las diferencias son estadísticamente significativas (p<0.05, n=12) de acuerdo a la prueba ANOVA de dos colas.

5.5 MECANISMO DE INTERNALIZACIÓN DE dsRNA MEDIADO POR SID-1.

En la literatura se había reportado que SID-1, al ser expresado en células de *D. melanogaster*, transporta dsRNA de manera independiente de la temperatura y es insensible a la depleción de ATP, por lo que se proponía que SID-1 puede funcionar como un canal de transporte pasivo [1]. Parece ser que *C. elegans* es el único organismo que transporta dsRNA por un canal, ya que otros organismos lo hacen por

endocitosis [65]. Sin embargo no podemos dejar de lado el hecho de que el RNAi sistémico en *C. elegans* depende de una larga lista de genes implicados en vías endocíticas [6, 39, 47, 61, 66-67, 101]. Tomando esto en cuenta, se decidió determinar si la entrada de dsRNA mediada por SID+ en células de mamífero se veía afectada por una serie de condiciones experimentales diseñadas para inhibir las distintas vías de transporte en la célula [Figuras 25 y 26].

En primer lugar, decidimos determinar si la internalización de dsRNA vía SID-1 en células HEK 203-FT dependía de la temperatura. Para ello, células SID+ y SID- se preincubaron durante 1 hora a una de tres temperaturas: 37°C, 26°C o 4°C. Luego de este tiempo se adicionó al medio dsRNA fluorescente a una concentración de 25µg/mL y se incubaron durante 3 horas más a la temperatura correspondiente. Al terminar el periodo de incubación, las células se lavaron exhaustivamente para luego ser analizadas en el citómetro de flujo. Con la media geométrica de fluorescencia se determinó la entrada relativa de dsRNA a las células en las diferentes condiciones.

Los resultados sugieren que SID-1 es sensible a la temperatura al ser expresado en células HEK 293-FT: mientras que a 37°C y 26°C las células SID+ internalizan más que las SID-, a 4°C la entrada vía SID-1 se abate considerablemente (aproximadamente 60%). Es interesante mencionar que la disminución de temperatura a 4°C también abate la entrada basal de dsRNA lo que indica que el mecanismo endógeno y el mecanismo de SID-1 tienen en común el requerir energía para transportar dsRNA.

Para dilucidar la relación entre las vías endocíticas y la entrada de dsRNA vía SID-1 se ensayaron distintas drogas que afectan distintos componentes de las vías de endocitosis. Los compuestos utilizados fueron: oligomicina, que inhibe la producción de ATP; citocalacina D, quien evita la polimerización de la actina; LY294002 y Wortmanina, las cuales inhiben a la macropinocitosis; y clorpromazina y nistatina, quienes evitan la endocitosis mediada por clatrina y caveolina, respectivamente.

RESULTADOS

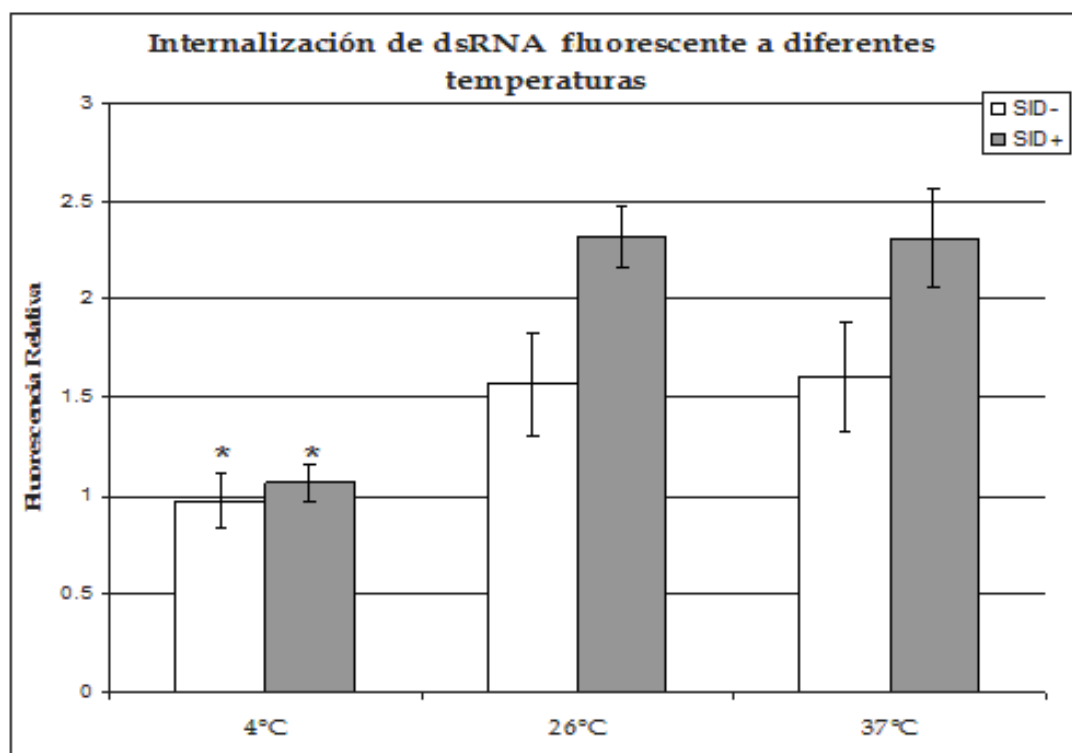


Figura 25. Internalización de dsRNA Fluorescente a diferentes temperaturas. Células SID- y SID+ fueron preincubadas durante una hora a 4°C, 26°C o 37°C; luego de este tiempo se adicionó dsRNA a una concentración final de 25µg/ml. La cantidad de dsRNA internalizado (presentado como fluorescencia normalizada con respecto a células SID+ o SID- incubadas en ausencia de dsRNA) fue determinada por citometría de flujo 3 horas después de la adición de dsRNA. Durante todo el experimento las células permanecieron en las temperaturas indicadas. Los valores se reportan como medias (\pm DE) de cuatro experimentos realizados en diferentes días. Los asteriscos (*) indican aquellos valores en los que las diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.05$, $n=4$) de acuerdo a la prueba ANOVA de dos colas. Los detalles de este experimento se describen en el Protocolo 3.

En la figura 26 se observa que la entrada de dsRNA tanto en células SID+ como en SID- es sensible a la depleción de ATP pues en presencia de oligomicina disminuyen un 50% y 16%, respectivamente. Este resultado demuestra que la entrada de dsRNA vía SID-1 es altamente dependiente de la cantidad de ATP intracelular e incluso sus requerimientos de ATP parecieran ser mayores a los de la entrada basal. Por su parte el que la entrada dependiente de SID-1 sea sensible a oligomicina contrasta con lo previamente reportado en células S2 [1].

Por otro lado, tanto la entrada basal como la mediada por SID-1 disminuyen al ser incubadas con Citocalasina D, lo que sugiere que la polimerización de la actina es necesaria para ambos procesos. En conjunto, la dependencia de ATP y la participación

de la actina, apuntan a que la internalización endógena y la mediada por SID-1 son por vías endocíticas. Por su parte, el que sólo la entrada basal de dsRNA sea inhibida por los fármacos LY294002 y Wortmanina (50% menos que el control) apunta a que la macropinositosis es la responsable de esta entrada endógena de dsRNA. En cambio, sólo la entrada en las células SID+ es afectada por el fármaco nistatina (disminución del 80% respecto al control). Esto nos habla de que la entrada de dsRNA vía SID-1 depende de endocitosis mediada por caveolina.

5.6 LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN SID-1::GFP

Se ha informado que en células S2, la proteína de fusión SID-1::GFP se distribuye en parte en membrana citoplasmática y sobre todo en retículo endoplásmico y aparato de Golgi [1]. Para corroborar que lo mismo ocurría en células de mamífero, se generó una proteína quimérica SID-1::GFP, donde la proteína GFP se fusionó al extremo carboxilo intracelular de SID-1. Esta proteína se expresó transitoriamente en células HEK 293-FT. Antes de realizar los estudios de localización se corroboró experimentalmente que esta proteína quimérica fuera capaz de internalizar dsRNA igual que la proteína silvestre (ver figura 17).

La proteína de fusión SID-1::GFP se observa mayoritariamente distribuida en el citoplasma en una estructura reticulada y no en membrana plasmática como previamente se había reportado (Figura 27). Para confirmar esto, resta utilizar marcadores de distintas estructuras celulares y determinar si dichas estructuras colocalizan con la proteína de fusión SID-1::GFP.

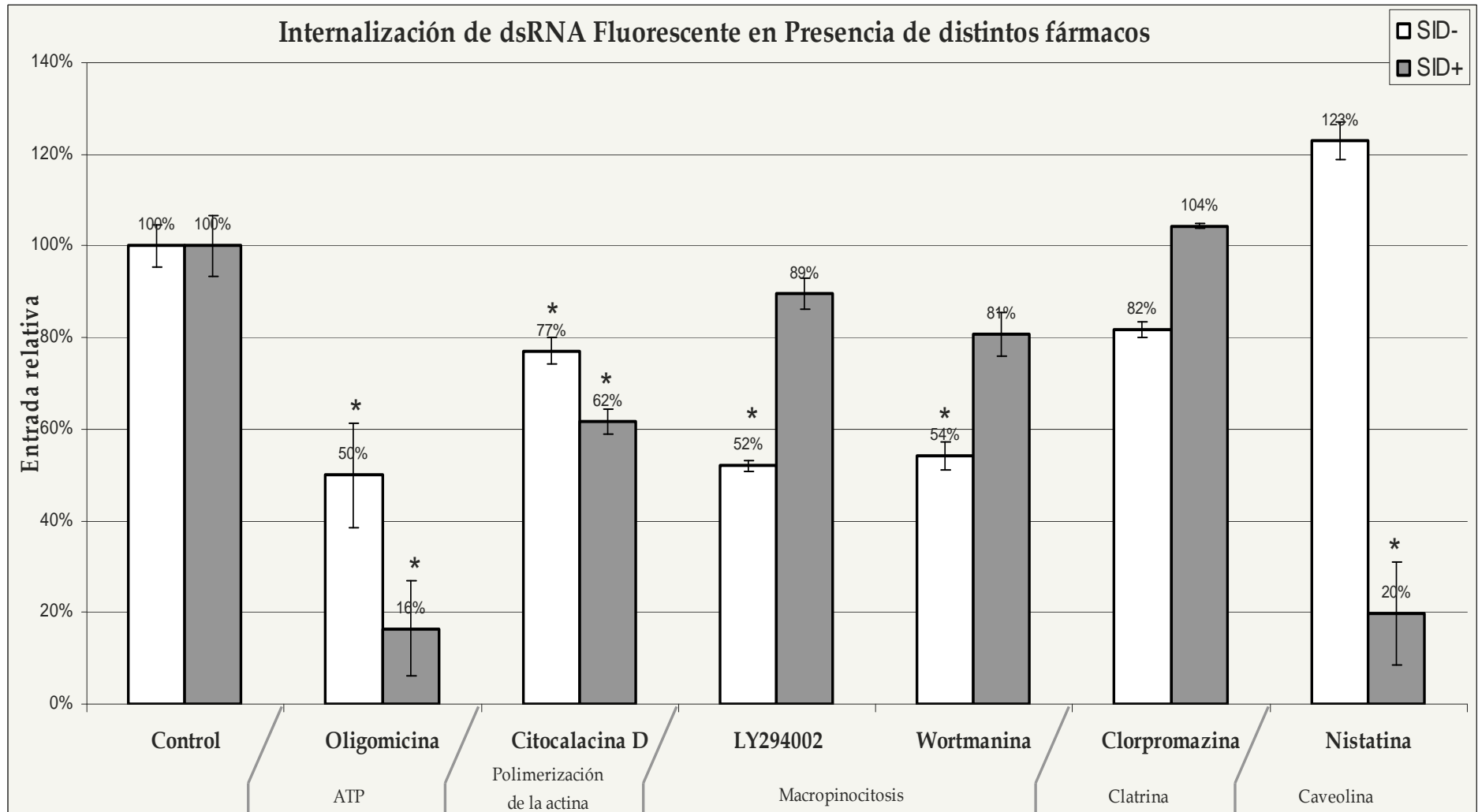


Figura 26. Internalización de dsRNA fluorescente en presencia de distintos fármacos. En la sección inferior de la figura se señala la vía que es inhibida por cada compuesto. Los datos se reportan como la media (\pm DE) del transporte con respecto al control (vehículo) de tres experimentos con dos pozos de cada condición por experimento. Los asteriscos (*) indican aquellos puntos en los que las diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.05$, $n=6$) de acuerdo a la prueba ANOVA de dos colas. Los detalles de este experimento se describen en el Protocolo 4.

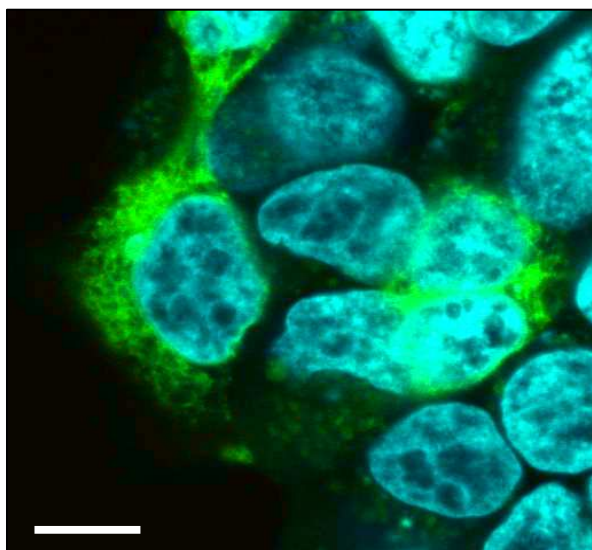


Figura 27. Distribución de la proteína de fusión SID-1::GFP. En verde se muestra el canal de la proteína GFP. La proteína de fusión SID-1::GFP se encuentra principalmente en el citoplasma en estructuras reticuladas. En azul se muestra el canal del marcador de núcleo DAPI. Las barras de escala equivalen a 10 μ m. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal FV10i™ de Olympus© y analizadas con el software FV10 ASW 2.0. Los detalles de este experimento se describen en el Protocolo 7.

Se ha descrito que ciertas proteínas pueden cambiar su localización celular en presencia de su ligando por lo que se realizaron experimentos en los que se incubaron células SID-1::GFP en presencia de dsRNA con una secuencia no interferente. Mediante microscopía confocal, se determinó la localización de la proteína a diferentes tiempos de incubación y se observó que cambia su patrón de distribución espacial en presencia del dsRNA. En la Figura 28 se observa que la proteína SID-1::GFP pasa de una estructura reticulada distribuida homogéneamente en el citoplasma a cúmulos similares a vesículas de entre 0.5-2 μ m en presencia de dsRNA.

Por otro lado, se determinó que la proteína de fusión colocaliza con dsRNA marcado con el fluoróforo Alexa 526 [Figura 29]. Esto es un indicio de que la proteína de fusión interacciona espacialmente con el dsRNA. Aunque no queda claro el momento o lugar en el que SID-1 y el dsRNA interaccionan por primera vez (considerando la poca proteína que hay en membrana).

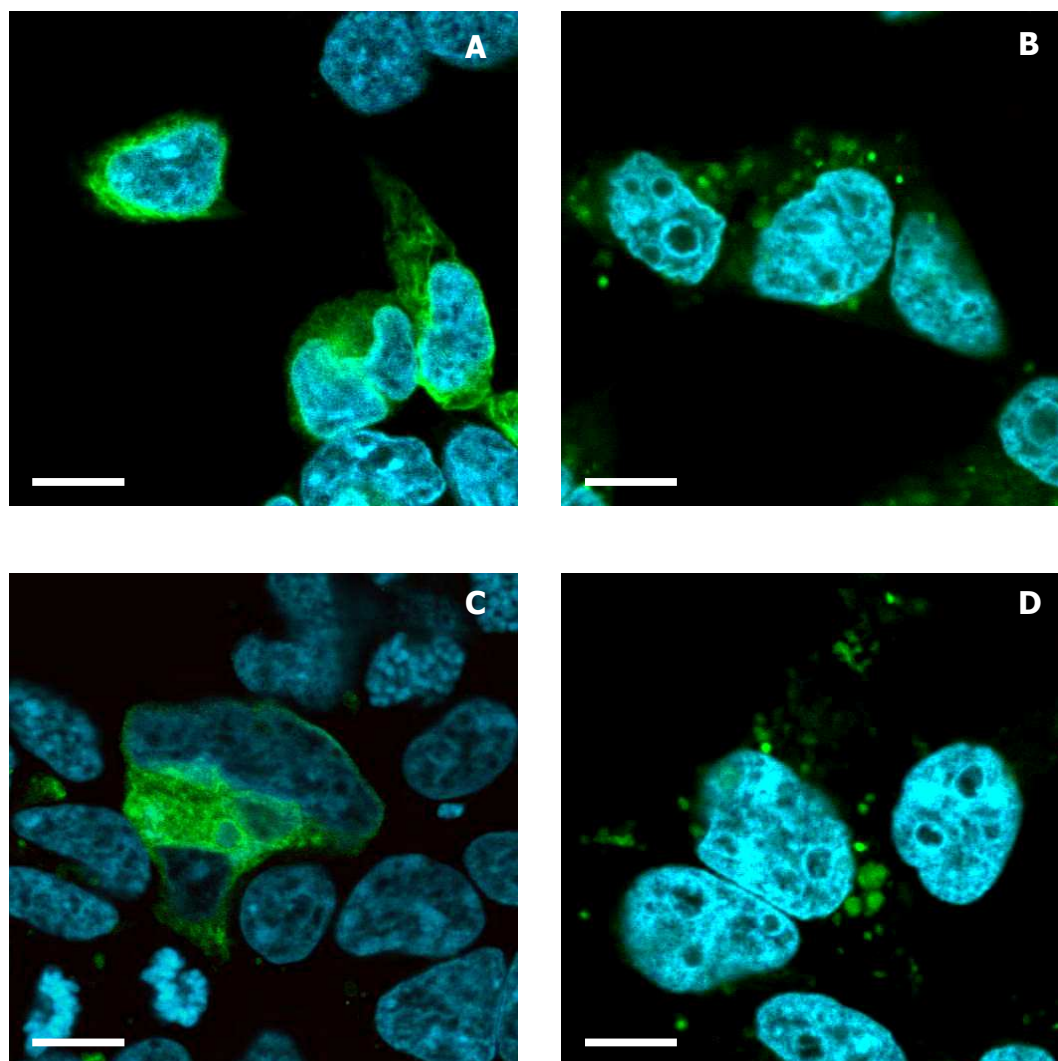


Figura 28. SID-1 modifica su patrón de distribución en la célula en presencia de dsRNA. Las células HEK 293-FT que expresaban a la proteína SID-1::GFP se incubaron durante 30 y 180 minutos en presencia de dsRNA con una secuencia no interferente. A los 30 min, el patrón de distribución de la proteína ha cambiado (**A**) con respecto al control (**B**); en este punto SID-1::GFP se encuentra en estructuras vesiculares menores de 1 μm . En el último tiempo, 180 min, la proteína se localiza en vesículas más grandes, de cerca de 2 μm (**D**), en tanto que en su control no se observan cambios (**C**). Las barras de escala equivalen a 10 μm . Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal FV10i™ de Olympus® y analizadas con el software FV10. Los detalles de este experimento se describen en el Protocolo 7.

RESULTADOS

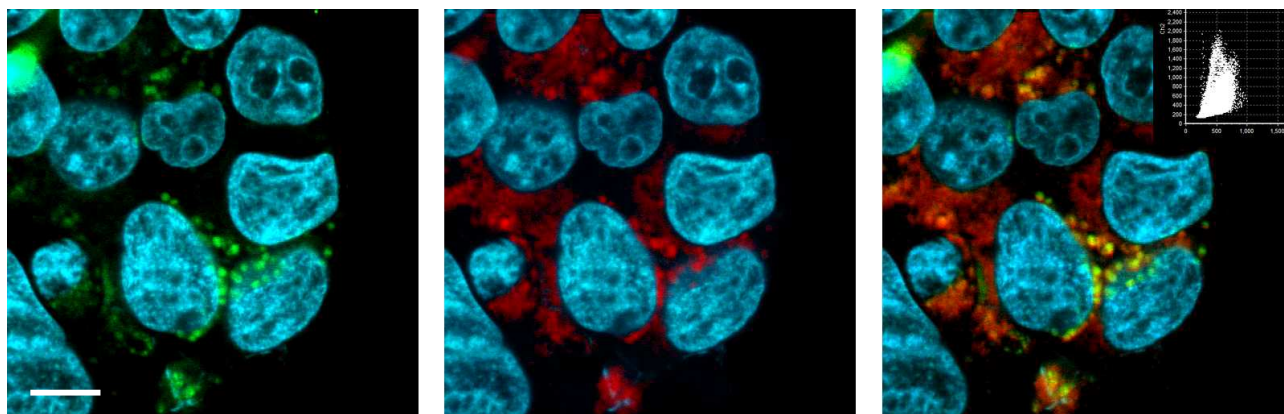


Figura 29. El dsRNA marcado con Alexa colocaliza con la proteína de fusión SID-1::GFP. Células que expresaban a la proteína SID-1::GFP se incubaron en presencia de dsRNA marcado con Alexa durante 3 horas. **A** corresponde al canal de la proteína GFP, **B** al canal de Alexa y **C** al sobreposición de los dos canales. En la parte superior derecha de **C** se muestra la gráfica de colocalización. Las barras de escala equivalen a 10 μ m. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal FV10iTM de Olympus© y analizadas con el software FV10 ASW 2.0. Los detalles de este experimento se describen en el Protocolo 7.

Aunque las células HEK 293-FT son deficientes en proteínas que reconocen ácidos nucleicos y en general tienen disminuido el sistema de respuesta a interferón [75], existía la posibilidad de que la relocalización de la proteína SID-1::GFP se debiera a un efecto inespecífico por la presencia de un ácido nucleico de doble hebra. Por ello, para corroborar que el efecto de relocalización de SID-1::GFP se presentara sólo en presencia de dsRNA, se repitieron los experimentos de incubación con ssRNA, ssDNA, dsDNA y siRNA. En la Figura 30 se muestra que el efecto de relocalización de SID-1 es específico de la presencia de dsRNA.

RESULTADOS

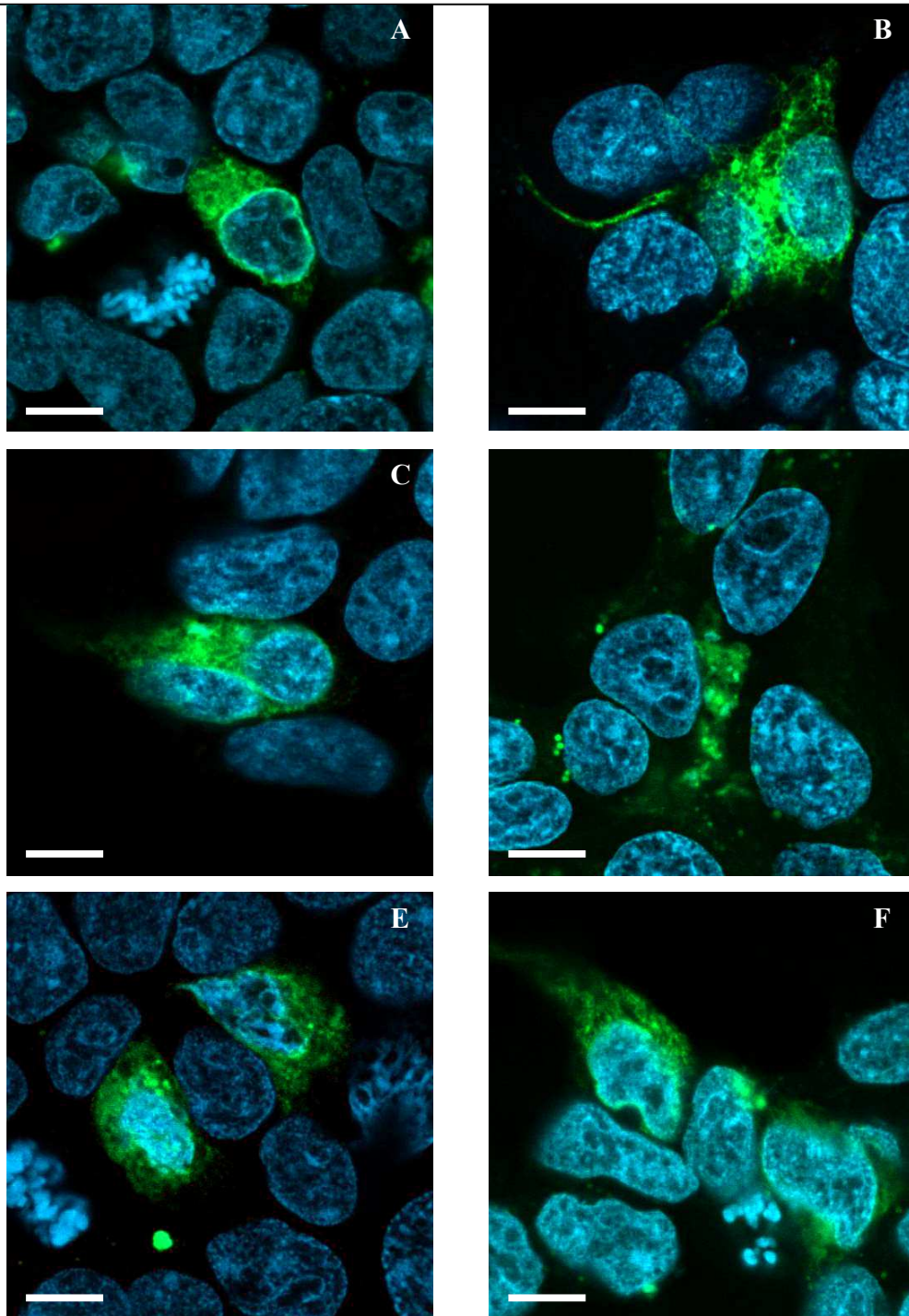


Figura 30. Distribución espacial de la proteína de fusión SID-1::GFP en presencia de distintos ácidos nucleicos. Las células transfectadas con la proteína SID-1::GFP se incubaron durante 3 horas en presencia de concentraciones equimolares de dsRNA de 21pb (**B**), RNA de una hebra de 700pb (**C**), RNA de doble hebra de 700pb (**D**), DNA de una hebra de 700pb (**E**) y DNA de doble hebra de 700pb (**F**). Solo las células incubadas en presencia de dsRNA de 700pb modifican su distribución espacial con respecto al control (**A**). Las barras de escala equivalen a 10 μ m. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio FV10i™ de Olympus© y analizadas con el software FV10 ASW 2.0. Los detalles de este experimento se describen en el Protocolo 7.

6. DISCUSIÓN

No cabe duda que el RNA de interferencia es actualmente una de la herramienta más útil para silenciar genes con las que se dispone en los laboratorios. Su especificidad y potencia son sus mejores cualidades. El hecho de que además en el nemátodo *Caenorabditis elegans* el RNAi sea sistémico gracias a la proteína SID-1, ha permitido estudios que hasta hace unos años parecían imposibles. Distintos autores habían sugerido el posible uso de SID-1 como herramienta biotecnológica para inducir RNAi en células de mamífero, sin embargo, al momento de iniciar este trabajo no era claro que tan factible sería su uso para tal fin [102].

Al revisar a detalle la literatura sobre el transporte de dsRNA y el RNAi sistémico en *C. elegans*, encontramos que no se han caracterizado a profundidad los procesos mediante los cuales SID-1 transporta o promueve la internalización de dsRNA al interior de la célula [1, 51]. Tampoco se conoce a detalle la especificidad de SID-1 respecto a promover la entrada de otros ácidos nucleicos. Dada la importancia que tiene el conocer el mecanismo de acción de SID-1, tanto para ampliar nuestro conocimiento sobre el fenómeno de RNAi sistémico, como para poder emplearlo en estudios de RNAi, nos dimos a la tarea de caracterizar a esta proteína en un contexto de células de mamífero.

Es importante recalcar que el mecanismo de acción de SID-1 no se ha caracterizado a detalle en el organismo del cual proviene: *C. elegans*. Todos los intentos por caracterizar a SID-1 se han llevado a cabo en cultivos celulares de *Drosophila melanogaster*. Debemos tomar en cuenta que el contexto celular en el que se realizó este estudio, en especial porque, en nuestro modelo de células de mamífero, SID-1 parece comportarse de manera distinta a como lo hace en células de *Drosophila*.

En este trabajo empleamos células HEK 293-FT. Esta línea resultó ideal para nuestros estudios, primero, porque es susceptible de ser transducida con vectores virales, ya que tiene dismuídos los mecanismos de repuesta a agentes infecciosos mediada por interferón [75]; segundo, no contiene en su superficie o en su citosol proteínas de reconocimiento de dsRNA, específicamente el RIG-1 y TLR3, que pudieran provocar reacciones inespecíficas por la presencia de dsRNA [30, 103].

En células S2 de *Drosophila melanogaster* que expresaban a SID-1, Hunter y colaboradores [1] observaron que la potencia del RNAi dependía proporcionalmente del tamaño del dsRNA, se requería de hasta 1000 veces más dsRNA de 100 pb que de 500pb para lograr los mismos niveles de inhibición, y de 100,000 veces más siRNA (21 pb) que de dsRNA de 100 nt para silenciar a niveles similares un gen reportero. Posteriormente se demostró que estas diferencias no se debían a que SID-1 transportara preferencialmente dsRNA grande, ya que entraba a la célula aproximadamente la misma cantidad de dsRNA de 1000 o 100 pb que de siRNAs, lo cual era más congruente con la hipótesis de que SID-1 pudiera ser un canal [51]. En células de mamífero no parece ocurrir lo mismo, nuestros resultados sugieren que SID-1 sí es selectivo, no sólo entre un dsRNA de 700 pb y un siRNAs sino también entre distintos tipos de ácidos nucleicos (Figura 23). Las células SID+ internalizan preferencialmente dsRNA de 700 pb en comparación con ssRNA, siRNA, dsDNA o ssDNA. Además, el dsRNA que entra vía SID-1 es capaz de silenciar genes de manera específica, contrario a lo observado con el siRNA. De acuerdo a Hunter y colaboradores [51], los siRNAs no silencian porque no se incorporan eficientemente a la maquinaria de RNAi, sin embargo, de acuerdo a la Figura 22, los siRNAs parecen ser más eficientes que los dsRNAs largos cuando ambos son transfectados, lo cual indica que los RNAs pequeños sí son reconocidos por la maquinaria de RNAi. Por tanto el hecho de que los siRNAs no desaten RNAi cuando se encuentran en el medio de cultivo de células SID+ se debe principalmente a que SID-1 no transporta este tipo de ácido nucleico.

La selectividad de SID-1 insinúa un mecanismo o sistema de transporte más complejo que un canal. El sistema en el que SID-1 está implicado es capaz de diferenciar entre distintas estructuras y longitudes de ácidos nucleicos. Dado que el sistema discrimina por completo entre dsRNA y dsDNA, parece ser capaz de detectar diferencias tan sutiles como la presencia o ausencia de un hidroxilo. Por su parte, el hecho de que SID-1 transporte exclusivamente dsRNA grande y no dsRNA de 21pb puede deberse a que la proteína reconozca estructuras tridimensionales que sólo pueden adoptar los dsRNAs grandes o a que requiera interaccionar con una cierta cantidad de pares de bases en el dsRNA para activarse y promover su internalización.

La proteína SID-1 puede ser quien reconozca directamente al dsRNA, a pesar de no tener dominios conocidos de unión a ácidos nucleicos; aunque no se descarta la posibilidad de que esté modificando la función de una proteína que una de manera específica dsRNA grandes y que esté conservada tanto en mamíferos como en *Drosophila*.

Nuestros resultados no nos permiten diferenciar si SID-1 actúa en solitario o modifica la actividad de otra proteína. Sin embargo, es contundente el hecho de que la sola expresión de SID-1 en células de mamífero es suficiente para promover la entrada de dsRNA a la célula: en todos nuestros experimentos se observó que las células SID+ internalizan más dsRNA que las SID-. Cabe recordar que Hunter y colaboradores [51] describieron que células S2 que expresan a SID-1 transportan hasta 1000 veces más dsRNA que aquellas que no lo expresan y el transporte ocurre durante los primeros 5 segundos de incubación. En nuestros estudios hechos con células HEK las diferencias de transporte son más discretas: las células SID+ introducen tan sólo el doble o triple de dsRNA que las células SID-, además de que el transporte mediado por SID-1 es relativamente lento, pues se observa una entrada significativa hasta después de 30 min. Sobre todo, es interesante notar que SID-1 en células de mamífero se satura a concentraciones altas [Figura 19]. El transporte a distintas concentraciones no se había abordado

hasta ahora, Hunter y colaboradores sólo probaron dos concentraciones (1 y 10 $\mu\text{g/ml}$), con lo cual no pudieron determinar si en S2 la internalización también es saturable.

Una posible explicación de lo que se ha reportado sobre SID-1 en células S2 es que en estos trabajos [1, 51] la cuantificación de la entrada de dsRNA estuviera mezclada con pegado inespecífico del ácido nucleico a la membrana plasmática. Este hecho explicaría la velocidad de entrada y la no dependencia de ATP y temperatura. Además, el que se reporte entrada a tiempos tan cortos como 5 segundos [51] debe verse con reserva, puesto que la posibilidad de error es muy alta en este tipo de experimentos. Por último, es importante notar el bajo número de repeticiones en los trabajos ya publicados ($n=2$).

En lo que respecta a nuestros experimentos, el uso de la tripsina, junto con al RNasa H para eliminar el dsRNA de la superficie celular, además de la adición de azul de tripano para enmascarar la fluorescencia de fondo, brindan la seguridad de que la señal de fluorescencia observada era exclusiva del dsRNA internalizado.

El que en células SID+ la internalización de dsRNA sea lenta, saturable y de tan sólo el doble o triple que las SID- se puede explicar de dos maneras:

(i) En el contexto de las células de mamífero SID-1 no es eficiente para transportar dsRNA porque requiere de factores que las células HEK 293-FT no comparten con S2.

(ii) La proteína SID-1 no es un canal sino un transportador o receptor acoplado a vías endocíticas, según lo cual el transporte sería relativamente lento y se observaría hasta después de varios minutos de incubación y no a los pocos segundos como en los canales y, sobre todo, sería saturable.

Para determinar la dependencia de SID-1 con el contexto celular sería necesario aislar a la proteína y probar su capacidad de transporte en bicapas lipídicas

DISCUSIÓN

artificiales. Dada la complejidad de llevar a cabo este tipo de experimentos, decidimos avocarnos al segundo punto y determinar si SID-1 poseía características de un transportador o receptor acoplado a vías endocíticas mediante el uso de fármacos que las inhiben específicamente.

Los riesgos y beneficios del uso de inhibidores para demostrar alguna vía endocítica siguen causando controversia [104]. Sobre todo porque algunos de ellos tienen una selectividad dudosa, o sus mecanismos de acción dañan proteínas clave para diversos procesos celulares. Con esto en mente, a continuación se enlistan las características más importantes de los fármacos utilizados en este estudio.

Figura 31. Propiedades generales de fármacos inhibidores de endocitosis y otros procesos.

Fármaco	Inhibe:	Mecanismo de acción	Comentarios
Oligomicina	Síntesis de ATP	Se une de manera específica a la fracción F_0 de la ATP sintasa	Se ha observado que a concentraciones altas y tiempos prolongados de exposición ciertos procesos que no requieren ATP también se inhiben (fuente)
Citocalacina D	Polimerización de la actina	Se une a la actina y evita su polimerización	Diversos procesos en la célula requieren de la formación de microfilamentos, en especial el la formación vesículas endocíticas y su transporte en el citoplasma
LY294002, Wortmanina	Macropinocitosis	Inhibición de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), lo que bloquea la fusión de los pseudópodos con la membrana	Muy específicas
Clorpromazina	Endocitosis mediada por clatrina	Provoca la remoción de la cubierta de clatrina	Bloquea a la macropinocitosis y la fagocitosis en ciertas líneas celulares (fuente)
Nistatina	Endocitosis mediada por caveolina	Secuestra al colesterol de la membrana	Los complejos que forma con el colesterol generan perforaciones en la membrana

Los pros y los contras del uso de cada fármaco se han mencionado para recalcar el hecho de que los resultados obtenidos con ellos no son absolutos y requieren ser corroborados mediante otras técnicas.

En las gráficas de transporte de dsRNA con respecto al tiempo y la concentración [Figuras 19 y 20] se observa que las células HEK 293-FT transportan de manera

endógena a este ácido nucleico. Este transporte es relativamente lento aunque constante [Figura 21]. Así mismo, el dsRNA que entra por esta vía no participa en el RNAi [Figura 22]. Dicha vía es sensible a la temperatura [Figura 25] y es inhibida por oligomicina, además de que disminuye su actividad en presencia de Citocalacina D y de Wortmanina y LY294002 [Figura 26]. Por tanto, el proceso de transporte endógeno de dsRNA en estas células es dependiente de energía, requiere la polimerización de la actina y de la actividad de la PI3K. Se concluye entonces, que dicho mecanismo es la macropinocitosis. Así pues, el mecanismo que proponemos para la entrada basal sería que el dsRNA es transportado de manera inespecífica junto con otros solutos para posteriormente ser degradado en el endolisosoma. Este modelo explica el hecho de que en células SID- el dsRNA no induzca RNAi a pesar de ser internalizado. En células HEK, se ha reportado que la internalización de dsRNA que activa al interferón depende de clatrina [75], aunque también se sabe que existe otro transporte que no conduce al dsRNA hacia los organelos donde se encuentran el interferón [105]. Así pues, nuestros resultados sugieren que este segundo mecanismo de transporte puede ser la macropinocitosis.

En lo que respecta a las células HEK que expresan a SID-1, el mecanismo de internalización de dsRNA mediado por esta proteína se satura a concentraciones altas [Figura 19] y es relativamente lento [Figura 21]. El dsRNA transportado de esta manera es capaz de silenciar un gen de manera específica [Figura 22], lo cual implica que es incorporado a la maquinaria de RNAi. En nuestras manos el transporte se inhibe a bajas temperaturas [Figura 25] y es fuertemente dependiente de ATP, además de ser sensible a la presencia de inhibidores de la polimerización de actina (citocalacina D) y de la endocitosis mediada por caveolina (nistatina) [Figura 26]. En conjunto, los resultados anteriores parecen ser incompatibles con la hipótesis de que SID-1 sea un canal, y en cambio sugieren que el mecanismo de transporte de dsRNA en el que participa SID-1 es la endocitosis mediada por caveolina.

Lo anterior explica por qué la curva de entrada de dsRNA contra concentración en células SID+ tiene dos pendientes: una correspondería a las contribuciones de ambos mecanismos (primeros cuatro puntos de la Figura 19), y la otra, muy similar a la del mecanismo endógeno, indicaría la saturación en el transporte mediado por SID-1. El hecho de que la entrada de un ácido nucleico sea saturable a concentraciones altas corresponde a lo previamente reportado con dsDNA, oligonucleótidos y mRNA desnudos, cuya entrada a la célula depende de mecanismos endocíticos [74].

Cabe recordar que diversos autores ya han especulado acerca la importancia que tiene la endocitosis en el transporte de dsRNA implicado en RNAi sistémico [47]. En el caso específico de *C. elegans*, un mecanismo endocítico explicaría por qué el dsRNA expresado de manera endógena a partir de un transgen es menos eficiente para inducir RNAi sistémico que el dsRNA proveniente del medio o el expresado por bacterias [47]. En este sentido, los endosomas jugarían un papel importante en la entrada del dsRNA a la maquinaria de RNAi y en la diseminación de la señal de interferencia. Se ha reportado que muchos componentes de la maquinaria de RNAi (incluyendo a Dicer y Ago-2) están asociados o tienen dominios de anclaje a la membrana de organelos como el Retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, por tanto, si el endosoma es transportado a estos organelos, el dsRNA sería procesado directamente y la eficiencia del proceso sería mayor a que si el dsRNA entrara desnudo al citoplasma, ya que las probabilidades de ser localizado o llegar a la maquinaria de RNAi serían menores.

Aunado a lo anterior, que el transporte de dsRNA sea por vías endocíticas en células de mamífero también es congruente con la observación de que el silenciamiento de genes relacionados con la maquinaria de endocitosis inactiva al RNAi sistémico en *C. elegans* [41, 47, 65]. Resulta interesante recordar a dos de estos genes: a la α -tubulina y a la subunidad A de la ATPasa vacuolar. La observación de que la primera proteína se requiere para el RNAi sistémico confirma la implicación de la endocitosis mediada por caveolina, ya que la

formación de los microtúbulos es indispensable para el transporte de las caveolas [106]. Por su parte, la ATPasa vacuolar nos habla de la importancia que tiene la acidificación del endosoma en el viaje del dsRNA hacia la maquinaria de RNAi. Dado que el dsRNA que entra por vía SID-1 genera RNAi, para que sea reconocido por esa maquinaria tiene que escapar del endosoma tardío. De no ocurrir el escape, el dsRNA sería degradado en el endolisosoma. Como se ha reportado para otras moléculas [80, 107], la acidificación del endosoma podría promover el escape del dsRNA del endosoma tardío. Según nuestros datos, SID-1 podría participar en este punto, ya sea traslocando al dsRNA hacia el citoplasma o promoviendo su transporte hacia otros organelos.

Si el transporte de dsRNA mediado por SID-1 es a través de endocitosis, la formación y movimiento de vesículas que contienen a la proteína puede corresponder a lo observado en este trabajo mediante microscopía confocal. Con esta técnica, se observó que la proteína SID-1::GFP está distribuida principalmente en el citoplasma en estructuras reticuladas. Cuando células que expresan a esta proteína se incubaron en presencia de dsRNA, SID-1::GFP modifica su distribución [Figura 28]. La internalización del dsRNA vía endocitosis puede entonces promover la redistribución de vesículas que contienen a SID-1. El hecho de que la proteína SID-1::GFP colocalice con dsRNA marcado con Alexa [Figura 29] indica que estas dos moléculas tienen una asociación espacial. Ello puede corresponder a las vesículas que contienen al dsRNA y a SID-1 transportadas desde la membrana hacia diferentes zonas de la célula. Para corroborar esto, será necesario monitorear el viaje de las dos moléculas en la célula a lo largo del tiempo, además de marcar estructuras intracelulares (retículo endoplásmico, aparato de golgi y endosomas) y determinar si SID-1::GFP y el dsRNA colocalizan con ellas.

Es importante recalcar que si bien los resultados de este trabajo sugieren que SID-1 no es un canal, éstos no son suficientes para determinar si es un transportador o un receptor. La mayoría de los transportadores conocidos por lo general tienen

más de cinco segmentos transmembranales, en tanto que los receptores suelen tener de 1 a tres segmentos [108]. En este sentido, la topología predicha para SID-1 soporta la idea de que sea un transportador. Esto debe ser corroborado de manera experimental aislando a SID-1 de su ambiente celular, para luego determinar si transporta el dsRNA de manera independiente de la formación de vesículas. Esto se podría lograr insertando a SID-1 en una membrana artificial. Si SID-1 no transporta el dsRNA de un lado a otro de la membrana en un sistema de membranas artificiales, entonces requiere del sistema de formación de vesículas para translocar al dsRNA hacia el citoplasma y por tanto sería un receptor.

Queda la posibilidad de que SID-1 funcione como un canal en el contexto de *Drosophila* y en cambio sea un receptor acoplado a vías endocíticas en el contexto de células de mamífero. Sin embargo, esto es muy poco probable, ya que hasta el momento no se ha reportado la existencia de una proteína cuyas propiedades cambien tan drásticamente en contextos celulares distintos. La caracterización de SID-1 en células en cultivo de *C. elegans* ayudaría a resolver esta disyuntiva, sin embargo, no existen actualmente líneas celulares de este nematodo.

En conclusión, nuestros datos sugieren que el mecanismo por el cual SID-1 promueve la entrada de dsRNA a células de mamífero es por endocitosis dependiente de caveolina. Nuestra propuesta es la siguiente: SID-1 se encuentra en caveolas, donde reconoce al dsRNA presente en el medio, lo cual funge como señal de internalización. La caveola se invagina gracias a la acción de la actina y otras proteínas, para luego moverse a través del citosol, formando primero el endosoma temprano, que después será acidificado por acción de la ATPasa Vacuolar, en esta estructura pueden ocurrir dos cosas:

(i) SID-1 puede ser transportado hacia el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi, donde el dsRNA se puede incorporar a la maquinaria de RNAi, en tanto que SID-1 sería reciclado a las caveolas para continuar con su actividad de transporte.

(ii) la acidificación del endosoma promueve cambios en la conformación de SID-1 tales que éste transloca al dsRNA hacia el citoplasma, para después ser reciclado de nuevo a la caveola.

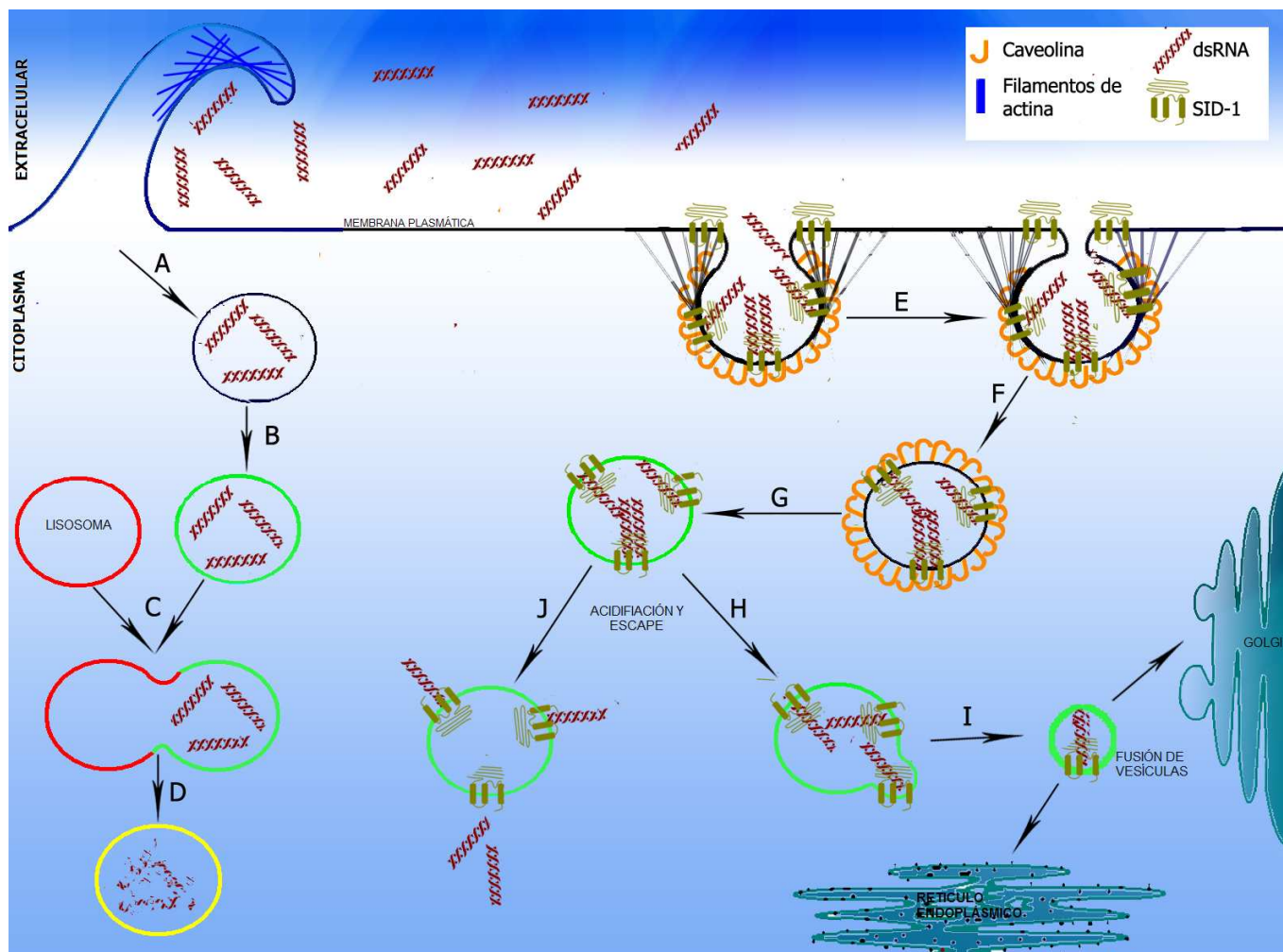


Figura 32. Transporte de dsRNA mediado por endocitosis. Las células HEK transportan dsRNA de manera inespecífica mediante macropinocitosis (A), la acidificación del endosoma (B) promueve su fusión con el lisosoma (C); dentro del endolisosoma el dsRNA es degradado (D). Por otro lado, SID-1 puede encontrarse en caveolas integradas a la membrana plasmática, donde puede interactuar con el dsRNA del medio y promover su internalización por acción de la caveolina (E), la actina participa en el proceso de formación y transporte del endosoma (F), él cual, al acidificarse (G) pierde la cubierta de caveola. La acidificación del endosoma puede inducir dos eventos: (J) cambios conformacionales en SID-1 que permitan el transporte de dsRNA hacia el citoplasma ó, (H) la formación de vesículas que contengan a SID-1 y al dsRNA (I) para ser transportadas hacia el aparato de Golgi o el retículo endoplásmico.

Luego de la observación de que SID-1, al ser expresado de manera ectópica [1, 50], es suficiente para promover tanto la internalización de dsRNA como su participación en el RNAi, surgieron grandes expectativas con respecto a su uso como herramienta para estudios de silenciamiento génico en distintos organismos y, principalmente, en células de mamífero [102]. Esto tomó especial relevancia debido a que, en mamíferos, las aplicaciones experimentales y terapéuticas con base en dsRNA hasta se han visto limitadas por la entrada del ácido nucleico al citoplasma y, en su caso, el escape del endosoma (RNAi in Pharmacopeia).

La proteína SID-1 apareció entonces como una alternativa muy atractiva. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta ciertos detalles abordados tanto en este como en otros estudios [109]. La primera limitante en el uso de SID-1 como herramienta para introducir dsRNA y generar RNAi en células de mamífero, es que esta metodología sólo se puede emplear en células que no posean defensas o mecanismos de reconocimiento y degradación de RNA de doble hebra, tales como el sistema del interferón y las proteínas de reconocimiento de dsRNA, ya que la sola presencia de dsRNA extraño induciría apoptosis. Por ello, hasta el momento sólo se ha tenido éxito al usarse en células HEK. Aunque esto reduzca su espectro de uso en mamíferos, SID-1 seguiría siendo una herramienta invaluable de no ser porque en células en cultivo nuestros resultados demuestran que la transfección sigue siendo un mejor método para inducir RNAi. En una transfección se internaliza más dsRNA, lo que resulta en un efecto RNAi más potente [Figuras 23 y 24]. Además, en los protocolos de silenciamiento mediado por SID-1 se requiere más dsRNA que en los de transfección. Por otro lado, falta realizar estudios sobre la duración del efecto de silenciamiento mediado por SID-1.

Si se quisiera usar a SID-1 como herramienta para estudios de RNAi, será necesario caracterizar a fondo el mecanismo de acción de esta proteína, lo que incluye no sólo identificar la vía por la que internaliza dsRNA (ya sea que funcione como un canal o un receptor que induzca su internalización) sino además conocer su estructura tridimensional para determinar que regiones son necesarias para el reconocimiento del dsRNA. Una vez que se tenga caracterizado el mecanismo

DISCUSIÓN

mediante el cual SID-1 promueve la internalización del dsRNA se podrán generar mutantes de la proteína que mejoren su eficiencia.

Como se ha visto, todavía hay muchos aspectos por definir y analizar para proponer con entereza el mecanismo mediante el cual SID-1 promueve la internalización de dsRNA o utilizarlo como herramienta biotecnológica. Desde la perspectiva del autor, el valor de este trabajo reside precisamente en que abre pautas a la resolución de estas interrogantes a la vez que genera muchas otras.

7. CONCLUSIONES

- La expresión de la proteína SID-1 de *C. elegans* en células HEK 293-FT es suficiente para promover el transporte de RNA de doble hebra.
- El dsRNA que entra a la célula vía SID-1 es capaz de participar en el silenciamiento génico postranscripcional (RNA de interferencia).
- La proteína SID-1 parece promover la internalización de dsRNA por medio de endocitosis mediada por caveolina mientras que la entrada basal parece ser vía macropinositosis.
- La presencia de dsRNA relocaliza a SID-1::GFP de una estructura reticulada a vesículas que colocalizan con dsRNA.

8. PERSPECTIVAS

Como se ha mencionado, la aportación principal de este trabajo consiste en abrir pautas y generar interrogantes al respecto del funcionamiento de SID-1. Los resultados obtenidos con el uso de fármacos no son absolutos, por lo cual, la principal interrogante que queda por resolver es: ¿SID-1 realmente promueve el transporte de dsRNA por caveolina?

Para resolver esto, primero será necesario determinar si SID-1 está o no en membrana plasmática mediante biotinylation de proteínas de membrana. Además, será necesario clarificar por qué y cómo la proteína de fusión SID-1::GFP modifica su distribución espacial en presencia de dsRNA. Esto se puede lograr mediante el seguimiento de un conjunto de células que expresen a SID-1::GFP a través del tiempo y en presencia de dsRNA. También será necesario determinar si esta proteína se encuentra o no en algún organelo conocido mediante el uso de marcadores específicos de retículo endoplásmico (p. ej. ER Tracker), aparato de Golgi (mediante inmunocitoquímica), lisosomas (p. ej. lisotracker) y membrana plasmática (p. ej. FM 4-64).

Por último, será necesario verificar la participación de la endocitosis mediada por caveolina con dos tipos de abordaje:

- 1.- Determinación de la interacción física entre SID-1 y estructuras endocíticas.
- 2.- Inhibición específica de procesos endocíticos

La caracterización de la proteína SID-1 nos ayudará a ampliar nuestro conocimiento sobre el fenómeno de RNAi sistémico y brindará las bases para sus posibles aplicaciones a nivel biotecnológico.

PERSPECTIVAS

En la siguiente tabla se resumen propuestas para cada aproximación:

Inhibición de procesos endocíticos			
	Descripción	Consideraciones	Ref.
Fármacos			
Filipina	Secuestra colesterol de la membrana. Desestabiliza caveolas.	No genera poros como la nistatina. Altamente selectiva.	[93]
Indometacina	Produce acumulación de ácido araquidónico. Evita la formación de caveolas.	Selectivo	[92]
Metil-beta-ciclodextrina	Genera complejos de inclusión con colesterol	Inhibe tanto a la endocitosis mediada por clatrina como la mediada por caveolina	
Nocodazol, PMA	Evitan el ensamblaje de microtúbulos. Inhiben la endocitosis mediada por caveolina	Los microtúbulos pueden participar en otros tipos de endocitosis independiente de clatrina.	[104]
Latrunculina, Toxina C2	Desestabilizan los filamentos de actina.	Inhiben todos los tipos de endocitosis.	[77]
Bafilomicina A	Inhibe a la ATPasa vacuolar. Evita la acidificación del endosoma.		[104]
Cloroquina	Aumenta el pH del endosoma. Evita su acidificación.		
Mutantes en:			
Caveolina	RNAi en contra de caveolina Inhibe la formación de las caveolas.	Muy selectiva.	[77]
Dinamina y/o Eps15	RNAi o contra estas proteínas evita invaginación de vesículas envueltas por clatrina	Dinamina también se ha visto envuelta en endocitosis mediada por caveolina	
Determinación de interacciones físicas			
Microscopía			
Caveolina	Diversos grupos la han usado fusionada a YFP y GFP	Se piensa que la proteína de fusión interfiere con la formación de caveolas	[98]
Transferrina	Su receptor está acoplado a endocitosis mediada por clatrina. Comercialmente acoplada a Alexa 488 o 549	Marcador específico de endocitosis mediada por clatrina.	
Subunidad B de la Toxina del Cólera	Se une al gangliosido GM-1, presente en caveolas. Comercialmente— acoplada a Alexa 488 o 549	La presencia del gangliosido GM-1 no se restringe a caveolas	
Dextran	Marcador de macropinocitosis. Marcado comercialmente con Texas Red o Fluoresceína.		
Inmunoprecipitación			
Contra Caveolina fijada a SID-1	Fijar a las células e inmunoprecipitar a Caveolina, determinar si está unida a SID-1	Muy específica	[77]

9. REFERENCIAS

1. Feinberg, E.H. and C.P. Hunter, *Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1*. Science, 2003. **301**(5639): p. 1545-7.
2. Sharp, P.A., *RNAi and double-strand RNA*. Genes Dev, 1999. **13**(2): p. 139-41.
3. Sharp, P.A. and P.D. Zamore, *Molecular biology. RNA interference*. Science, 2000. **287**(5462): p. 2431-3.
4. Hannon, G.J., *RNA interference*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 244-51.
5. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans**. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
6. Tomoyasu, Y., et al., *Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium**. Genome Biol, 2008. **9**(1): p. R10.
7. Kennerdell, J.R. and R.W. Carthew, *Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway*. Cell, 1998. **95**(7): p. 1017-26.
8. Kennerdell, J.R. and R.W. Carthew, *Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(8): p. 896-8.
9. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
10. Hammond, S.M., et al., *Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1146-50.
11. Liu, J., et al., *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1437-41.
12. Song, J.J., et al., *Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1434-7.
13. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.
14. Tomari, Y., et al., *A protein sensor for siRNA asymmetry*. Science, 2004. **306**(5700): p. 1377-80.
15. Tuschl, T., et al., *Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro*. Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3191-7.
16. Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. Genes Dev, 2001. **15**(2): p. 188-200.
17. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
18. Caplen, N.J., et al., *Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9742-7.
19. Hutvagner, G. and P.D. Zamore, *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2056-60.
20. Matranga, C. and P.D. Zamore, *Small silencing RNAs*. Curr Biol, 2007. **17**(18): p. R789-93.
21. Han, J., et al., *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the *Drosophila*-*DGCR8* complex*. Cell, 2006. **125**(5): p. 887-901.
22. Snove, O., Jr. and P. Saetrom, *[Nobel Prize for RNA interference]*. Tidsskr Nor Laegeforen, 2006. **126**(24): p. 3252.

23. Li, L.C., et al., *Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(46): p. 17337-42.
24. Griffiths-Jones, S., *miRBase: microRNA sequences and annotation*. Curr Protoc Bioinformatics, 2010. **Chapter 12**: p. Unit 12 9 1-10.
25. Moberg, K.H. and I.K. Hariharan, *Big things from a little RNA*. Trends Cell Biol, 2003. **13**(9): p. 455-7.
26. Buchon, N. and C. Vaury, *RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements*. Heredity, 2006. **96**(2): p. 195-202.
27. Cullen, B.R., *Five questions about viruses and microRNAs*. PLoS Pathog, 2010. **6**(2): p. e1000787.
28. Okamura, K., et al., *The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila*. Cell, 2007. **130**(1): p. 89-100.
29. Reynolds, A., et al., *Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent*. RNA, 2006. **12**(6): p. 988-93.
30. Gil, J. and M. Esteban, *Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action*. Apoptosis, 2000. **5**(2): p. 107-14.
31. Gil, J., J. Alcami, and M. Esteban, *Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(7): p. 4653-63.
32. Marques, J.T., et al., *A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(5): p. 559-65.
33. Sakurai, K., P. Chomchan, and J.J. Rossi, *Silencing of gene expression in cultured cells using small interfering RNAs*. Curr Protoc Cell Biol, 2010. **Chapter 27**: p. Unit 27 1 1-28.
34. Mittal, V., *Improving the efficiency of RNA interference in mammals*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(5): p. 355-65.
35. Kamath, R.S., et al., *Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Genome Biol, 2001. **2**(1): p. RESEARCH0002.
36. Li, S.D. and L. Huang, *Targeted delivery of antisense oligodeoxynucleotide and small interference RNA into lung cancer cells*. Mol Pharm, 2006. **3**(5): p. 579-88.
37. Skalsky, R.L. and B.R. Cullen, *Viruses, microRNAs, and Host Interactions*. Annu Rev Microbiol, 2010.
38. Timmons, L., *Delivery methods for RNA interference in C. elegans*. Methods Mol Biol, 2006. **351**: p. 119-25.
39. Grishok, A., *RNAi mechanisms in Caenorhabditis elegans*. FEBS Lett, 2005. **579**(26): p. 5932-9.
40. Timmons, L., D.L. Court, and A. Fire, *Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in Caenorhabditis elegans*. Gene, 2001. **263**(1-2): p. 103-12.
41. Hunter, C.P., et al., *Systemic RNAi in Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006. **71**: p. 95-100.
42. Timmons, L., et al., *Inducible systemic RNA silencing in Caenorhabditis elegans*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(7): p. 2972-83.
43. Winston, W.M., C. Molodowitch, and C.P. Hunter, *Systemic RNAi in C. elegans requires the putative transmembrane protein SID-1*. Science, 2002. **295**(5564): p. 2456-9.

44. Calixto, A., et al., *Enhanced neuronal RNAi in C. elegans using SID-1*. Nat Methods, 2010.
45. Sijen, T., et al., *On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing*. Cell, 2001. **107**(4): p. 465-76.
46. Kalantidis, K., et al., *RNA silencing movement in plants*. Biol Cell, 2008. **100**(1): p. 13-26.
47. Tijsterman, M., et al., *Genes required for systemic RNA interference in Caenorhabditis elegans*. Curr Biol, 2004. **14**(2): p. 111-6.
48. De Camilli, P., et al., *The ENTH domain*. FEBS Lett, 2002. **513**(1): p. 11-8.
49. Selenko, P., et al., *SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(1): p. 27-31.
50. Tsang, S.Y., et al., *Ectopic expression of systemic RNA interference defective protein in embryonic stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **357**(2): p. 480-6.
51. Shih, J.D., et al., *The SID-1 double-stranded RNA transporter is not selective for dsRNA length*. RNA, 2009. **15**(3): p. 384-90.
52. Whangbo, J.S. and C.P. Hunter, *Environmental RNA interference*. Trends Genet, 2008. **24**(6): p. 297-305.
53. Jose, A.M., J.J. Smith, and C.P. Hunter, *Export of RNA silencing from C. elegans tissues does not require the RNA channel SID-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(7): p. 2283-8.
54. Winston, W.M., et al., *Caenorhabditis elegans SID-2 is required for environmental RNA interference*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(25): p. 10565-70.
55. Marsh, M. and A. Helenius, *Virus entry: open sesame*. Cell, 2006. **124**(4): p. 729-40.
56. Chen, I., P.J. Christie, and D. Dubnau, *The ins and outs of DNA transfer in bacteria*. Science, 2005. **310**(5753): p. 1456-60.
57. Schneider, A. and L. Marechal-Drouard, *Mitochondrial tRNA import: are there distinct mechanisms?* Trends Cell Biol, 2000. **10**(12): p. 509-13.
58. Dong, Y. and M. Friedrich, *Nymphal RNAi: systemic RNAi mediated gene knockdown in juvenile grasshopper*. BMC Biotechnol, 2005. **5**: p. 25.
59. Shannon, A.J., et al., *Systemic RNAi mediated gene silencing in the anhydrobiotic nematode Panagrolaimus superbus*. BMC Mol Biol, 2008. **9**: p. 58.
60. Xu, W. and Z. Han, *Cloning and phylogenetic analysis of sid-1-like genes from aphids*. J Insect Sci, 2008. **8**: p. 1-6.
61. Huvenne, H. and G. Smagghe, *Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review*. J Insect Physiol, 2010. **56**(3): p. 227-35.
62. Ratcliff, F., B.D. Harrison, and D.C. Baulcombe, *A similarity between viral defense and gene silencing in plants*. Science, 1997. **276**(5318): p. 1558-60.
63. Henricson, A., et al., *Functional characterization in Caenorhabditis elegans of transmembrane worm-human orthologs*. BMC Genomics, 2004. **5**(1): p. 85.
64. Saleh, M.C., et al., *Antiviral immunity in Drosophila requires systemic RNA interference spread*. Nature, 2009. **458**(7236): p. 346-50.
65. Saleh, M.C., et al., *The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(8): p. 793-802.

66. Kim, J.K., et al., *Functional genomic analysis of RNA interference in C. elegans*. Science, 2005. **308**(5725): p. 1164-7.
67. Fares, H. and B. Grant, *Deciphering endocytosis in Caenorhabditis elegans*. Traffic, 2002. **3**(1): p. 11-9.
68. Vlassov, V.V., P.P. Laktionov, and E.Y. Rykova, *Extracellular nucleic acids*. Bioessays, 2007. **29**(7): p. 654-67.
69. Laktionov, P.P., et al., *Characterisation of membrane oligonucleotide-binding proteins and oligonucleotide uptake in keratinocytes*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(11): p. 2315-24.
70. Laktionov, P., et al., *Uptake of oligonucleotides by keratinocytes*. Nucleosides Nucleotides, 1999. **18**(6-7): p. 1697-9.
71. Chelobanov, B.P., P.P. Laktionov, and V.V. Vlasov, *Proteins involved in binding and cellular uptake of nucleic acids*. Biochemistry (Mosc), 2006. **71**(6): p. 583-96.
72. Wolff, J.A., *Naked DNA transport and expression in mammalian cells*. Neuromuscul Disord, 1997. **7**(5): p. 314-8.
73. Wittrup, A., et al., *Identification of proteins released by mammalian cells that mediate DNA internalization through proteoglycan-dependent macropinocytosis*. J Biol Chem, 2007. **282**(38): p. 27897-904.
74. Probst, J., et al., *Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA in vivo is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent*. Gene Ther, 2007. **14**(15): p. 1175-80.
75. Itoh, K., et al., *The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN-beta production*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5522-9.
76. Conner, S.D. and S.L. Schmid, *Regulated portals of entry into the cell*. Nature, 2003. **422**(6927): p. 37-44.
77. Vassilieva, E.V. and A. Nusrat, *Vesicular trafficking: molecular tools and targets*. Methods Mol Biol, 2008. **440**: p. 3-14.
78. Kumari, S., S. Mg, and S. Mayor, *Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell*. Cell Res, 2010. **20**(3): p. 256-75.
79. Spang, A., *On vesicle formation and tethering in the ER-Golgi shuttle*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(4): p. 531-6.
80. Spang, A., *On the fate of early endosomes*. Biol Chem, 2009. **390**(8): p. 753-9.
81. Shen, L. and J.R. Turner, *Actin depolymerization disrupts tight junctions via caveolae-mediated endocytosis*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(9): p. 3919-36.
82. Schafer, D.A., *Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(1): p. 76-81.
83. Nichols, B.J. and J. Lippincott-Schwartz, *Endocytosis without clathrin coats*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(10): p. 406-12.
84. Swanson, J.A. and C. Watts, *Macropinocytosis*. Trends Cell Biol, 1995. **5**(11): p. 424-8.
85. Marsh, M. and H.T. McMahon, *The structural era of endocytosis*. Science, 1999. **285**(5425): p. 215-20.
86. Sorkin, A., *Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: a team effort*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(4): p. 392-9.
87. Nabi, I.R. and P.U. Le, *Caveolae/raft-dependent endocytosis*. J Cell Biol, 2003. **161**(4): p. 673-7.

88. Parton, R.G. and K. Simons, *The multiple faces of caveolae*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(3): p. 185-94.
89. Pelkmans, L. and A. Helenius, *Endocytosis via caveolae*. Traffic, 2002. **3**(5): p. 311-20.
90. Mayor, S. and R.E. Pagano, *Pathways of clathrin-independent endocytosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(8): p. 603-12.
91. Anderson, H.A., Y. Chen, and L.C. Norkin, *Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(11): p. 1825-34.
92. Gimpl, G. and K. Gehrig-Burger, *Cholesterol reporter molecules*. Biosci Rep, 2007. **27**(6): p. 335-58.
93. Orlandi, P.A. and P.H. Fishman, *Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains*. J Cell Biol, 1998. **141**(4): p. 905-15.
94. Richard, J.P., et al., *Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors*. J Biol Chem, 2005. **280**(15): p. 15300-6.
95. Daya, S. and K.I. Berns, *Gene therapy using adeno-associated virus vectors*. Clin Microbiol Rev, 2008. **21**(4): p. 583-93.
96. Dull, T., et al., *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8463-71.
97. Cooper, J.A., *Effects of cytochalasin and phalloidin on actin*. J Cell Biol, 1987. **105**(4): p. 1473-8.
98. Di Marzio, L., et al., *pH-sensitive non-phospholipid vesicle and macrophage-like cells: binding, uptake and endocytotic pathway*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(12): p. 2749-56.
99. Hansen, S.H., K. Sandvig, and B. van Deurs, *Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification*. J Cell Biol, 1993. **121**(1): p. 61-72.
100. Tsien, R.Y., *The green fluorescent protein*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 509-44.
101. Fraser, A.G., et al., *Functional genomic analysis of C. elegans chromosome I by systematic RNA interference*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 325-30.
102. van Roessel, P. and A.H. Brand, *Spreading silence with Sid*. Genome Biol, 2004. **5**(2): p. 208.
103. Williams, B.R., *Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation*. Biochem Soc Trans, 1997. **25**(2): p. 509-13.
104. Ivanov, A.I., *Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful?* Methods Mol Biol, 2008. **440**: p. 15-33.
105. Gantier, M.P. and B.R. Williams, *The response of mammalian cells to double-stranded RNA*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(5-6): p. 363-71.
106. Wong, A.W., S.J. Scales, and D.E. Reilly, *DNA internalized via caveolae requires microtubule-dependent, Rab7-independent transport to the late endocytic pathway for delivery to the nucleus*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22953-63.
107. Mallard, F., et al., *Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport*. J Cell Biol, 1998. **143**(4): p. 973-90.

108. Peris, P., D. Lopez, and M. Campos, *IgTM: an algorithm to predict transmembrane domains and topology in proteins*. BMC Bioinformatics, 2008. **9**: p. 367.
109. Gewirtz, A.M., *On future's doorstep: RNA interference and the pharmacopeia of tomorrow*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3612-4.