



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



---

---

FACULTAD DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**CARACTERIZACIÓN DE UN POSIBLE TRANSPORTADOR DE  
RNA DE DOBLE HEBRA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:  
INÉS VELÁZQUEZ QUESADA

**TUTOR: DR. LUIS A. VACA DOMÍNGUEZ**



México D.F.

2007



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.

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del **Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez** en el **Departamento de Biología Celular** del **Instituto de Fisiología Celular** de la **Universidad Nacional Autónoma de México**.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

<b>Dr. Luis A. Vaca Domínguez</b>	Instituto de Fisiología Celular. UNAM
<b>Dr. Jorge Vázquez Ramos</b>	Instituto de Química. UNAM
<b>Dr. Fernando López Casillas</b>	Instituto de Fisiología Celular. UNAM

El jurado de Examen estuvo constituido por:

<i>Presidente</i>	<b>Dr. Jorge Vázquez Ramos</b>	Instituto de Química. UNAM
<i>Vocal</i>	<b>Dr. Diego González Halphen</b>	Instituto de Fisiología Celular. UNAM
<i>Secretario</i>	<b>Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova</b>	Instituto de Química. UNAM
<i>Suplente</i>	<b>Dra. Diana Escalante Alcalde</b>	Instituto de Fisiología Celular. UNAM
<i>Suplente</i>	<b>Dra. Marina Macías Silva</b>	Instituto de Fisiología Celular. UNAM

Se reconoce la colaboración del **Dr. Jorge Vázquez Ramos**, del Instituto de Química de la UNAM en cuyo laboratorio se realizó la purificación de los anticuerpos anti-FLJ20174.

Agradezco la asesoría técnica de la **Dra. Selma Eréndira Avendaño Vázquez** en los experimentos tipo Western blot; así como la del **Dr. Elpidio García** en la purificación de los anticuerpos anti-FLJ20174.

Agradezco al personal de las **Unidades de apoyo del Instituto de Fisiología Celular**:

Unidad de microscopía Electrónica.

Unidad de Biología Molecular.

Unidad de Cómputo.

Taller de Mantenimiento.

Biblioteca.

Bioterio.

Agradezco al personal del **Departamento de Compras del Instituto de Fisiología Celular**.

Agradezco a los **miembros del Posgrado en Ciencias Bioquímicas**.

Este proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (SEP-2003-CO2-42469/A-1). Durante la realización de este proyecto goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

*Dedico este trabajo a toda mi querida familia*

*A mis papás: Marta y Fernando*

*A mis hermanos: Fer, Meche y Susi*

*A Israel*

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**. Por ser para el pueblo, desde hace décadas, el centro de libertad, igualdad y pluralidad más importante de todos los mexicanos. Fomentadora de cultura y de ciencia. Por permitirme ser parte de ella, gracias.

Al **Posgrado en Ciencias Bioquímicas** por su real interés en la formación académica. A todos los profesores que, además de compartirme sus conocimientos y darme orientación, me alientan con su ejemplo para continuar en este camino. A todos los administrativos que se preocupan en que nosotros nos enfoquemos en los proyectos de investigación.

Al **Instituto de Fisiología Celular** por su constante interés en hacer ciencia y en formar científicos. A los investigadores por su accesibilidad, solidaridad y ejemplo. A todo el personal por su interés, apoyo y cordialidad en los momentos más difíciles.

Al **Dr. Luis A. Vaca Domínguez** por todo lo que logró enseñarme, a veces en contra mía. Por permitirme trabajar con usted (a pesar del espacio), por su disponibilidad y confianza a prueba de todo, su paciencia y su apoyo.

A mi comité tutorial de maestría:

Al **Dr. Jorge Vázquez Ramos** por su compromiso con el posgrado, por su ejemplo y porque siempre fue mi mayor reto y mi mayor miedo.

Al **Dr. Fernando López Casillas** por ser tan crítico y tan académico. Por su interés por formar. Por su apoyo y paciencia.

A mi comité revisor de tesis:

Al **Dr. Jorge Vázquez**, al **Dr. Diego González**, a la **Dra. Tzvetanka Dimitrova**, la **Dra. Diana Escalante** y la **Dra. Marina Macías** les agradezco en especial su ardua labor en la corrección de este texto. Por todos los aportes que hicieron a este escrito, pero sobre todo, por las críticas y las ideas.

A **Leticia García Gutiérrez** por su infinita ayuda tanto moral como administrativa.

A **Elpidio García** por su ayuda en la purificación del anticuerpo anti-FLJ20174.

Al **Dr. Osvaldo Vindrola Asti** y la **Dra. María Rosa Padrós Semorile** por su confianza infinita, su presencia constante, por escucharme y guiarme. Por contagiarme su pasión por la vida y la verdad. Por el ejemplo y el compromiso.

A **Fabián Flores Jasso** y **Eréndira Avendaño Vázquez**, a ella por el método y a él por la pasión. A ambos por su apoyo, indispensable. Por su amor y su compromiso con la investigación que inspira y contagia. Por formar formándose.

A todos los miembros del laboratorio 126 norte:

A **Julián Valdés** por compartir, en todo momento, el flj conmigo.

A **Fabián Flores** por ser mi *sen-sei* y tomártelo tan en serio. Por todo lo que me enseñaste.

A **Israel Pichardo** por tu apoyo y tu confianza, por las críticas con salida, las ideas y los *papers* compartidos.

A los tres por los seminarios (algunos extracurriculares), por las discusiones y las ideas que me hicieron soñar.

A **Aldo Camacho** por ser mi amigo y ser ejemplo.

A **Alfonso Salgado** por las ideas geniales, el comentario clave y la ayuda. Por *la chabela*, y sobre todo por tu neutralidad y empatía.

A **Agustín Luz** por tu apoyo y tu interés cotidiano.

A **Benito Ordaz**, **Cecilia Contreras**, **Damaris Rodríguez**, **Mariana Ramos**, **Guillermina Rosas** y **Laura Lascarez** por las críticas, las ideas y por los momentos compartidos.

A **Alicia Sampieri** y a **Gloria Salgado** por su ayuda y su disposición en todo momento. Por que con su trabajo e interés facilitaron todo mi trabajo.

*Porque es una fortuna conocerlos y aprender de cada uno de ustedes.*

*"... es que tu amor, me queda grande..."*

J.L. Guerra.

A **TODA mi familia**, que es mi mayor orgullo. Por el ejemplo de lucha y de amor sincero. Por las risas, las lágrimas y secretos compartidos. Por la filosofía, el arte, los libros, la danza y la música, la política y la pasión constante e infinita. Por todo el apoyo que me han dado y por todo el cariño, mil gracias.

A **mis papás** por estar ahí SIEMPRE y creer en mi a pesar de TODO. Gracias por darme la vida tantas veces. Por mostrarme el mundo a través de sus ojos y enseñarme a amarlo. Por compartir con nosotros su mundo, su tiempo y su vida.

A mis hermanos **Susi, Meche y For** por ser mis amigos. Gracias a los tres por todo lo que hemos vivido juntos, por quererme a pesar de mi misma, pero sobre todo por que son una fuente constante de aprendizaje y de admiración. A **For**, por ser tan grande, tan noble, tan inteligente... tan For; por compartirte con todos y querer a todos. A **Meche**, por ser la que escucha y entiende, la indecisa que siempre salta al vacío (pero con paracaídas), por ser tan noble y querernos tanto. A mi **Chapi**, por ser la más dura y no tener sentimientos. Por luchar con tanta fuerza contra tus miedos y deseos. Por ser tan crítica contigo y con el mundo y por tratar de ser siempre mejor.

A **Israel**, por tanto compartido, por darme fuerza y confianza cuando la mía escasea y tu apoyo infinito e incondicional. Por dejarme conocerte, por tu honestidad, tu interés y tu pasión (a veces dormida) por la vida. Por adoptarme.

A mis amigos de siempre y por siempre:

A **Guadalupe Huerta** (por ti y por Alejandro). A **Rita Higareda** por tu confianza y tu apoyo siempre. A **Vera Ortiz** e **Israel Cohetero** porque ser su amiga es un orgullo, por su apoyo y su crítica (siempre dura, pero siempre noble).

A **Cristiane Roche** por tu "*soltar essa louca*", que me dio y me quitó tanto. Por tu pasión contagiosa y tu mundo compartido.

A mis compañeros y amigos del posgrado, de quienes aprendí tanto: a **Harumi Scott** y **Gladys Rodríguez** por las porras y los consejos. A **Edith Cabrera**, **Roxana Noriega**, **Mayra Furlan**, **Rosario Pérez (Charis)**., **Katy Kalashnikova** y **Eria Rebollar** por las horas compartidas y el apoyo constante.

*Porque sin ustedes nada habría sido posible y nada valdría la pena*

*Gracias.*

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	
RNA de interferencia	1
Silenciamiento post-transcripcional mediado por microRNAs y siRNAs	2
RNA de interferencia sistémico	5
RNAi sistémico en planarias.	5
RNAi sistémico en insectos.	6
RNAi sistémico en el nemátodo <i>C. elegans</i>	7
1. <i>fed</i> ( <i>feeding defective for RNAi</i> )	7
2. <i>rsd</i> ( <i>RNAi spreading defective</i> )	8
3. <i>sid</i> ( <i>systemic interference defective</i> )	8
3.1 SID-1	9
RNAi sistémico en mamíferos	11
JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES DEL TRABAJO	13
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	15
MÉTODOS	
Líneas celulares.	16
Plásmidos.	16
Transfección.	16
Inmunoprecipitación.	17
Western Blot.	17
Marcaje radiactivo de dsRNA y siRNA.	18
Ensayos de entrada de dsRNA y siRNA.	18
Localización intracelular.	18
Anticuerpos.	19
Purificación del anticuerpo anti-FLJ20174.	20
RESULTADOS	
Análisis de la secuencia de la proteína FLJ20174.	21
Expresión de la proteína de fusión FLJ20174-GFP en células de mamífero.	24
Anticuerpo anti-FLJ20174	25
Ensayos de entrada de dsRNA a células de mamífero.	27
Localización subcelular de la proteína FLJ20174.	31
DISCUSIÓN	35
PERSPECTIVAS	42
REFERENCIAS	44



## RESUMEN

Desde el descubrimiento del RNA de interferencia (RNAi) se describió que en algunos organismos el silenciamiento producido es sistémico, es decir, que la introducción localizada de dsRNA produce el silenciamiento del gen blanco, en todo el organismo y su progenie. En 2002 Winston y cols. describen a SID-1, una proteína de membrana necesaria para el efecto sistémico del RNAi en *C. elegans*. Al expresarse en células de *D. melanogaster*, SID-1 favorece la entrada de dsRNA a éstas. Esta entrada es evidente desde los primeros 5 minutos e independiente de la temperatura y de ATP.

Nosotros estudiamos a la proteína FLJ20174, reportada como homóloga a SID-1 que se expresa en células de mamífero. En este trabajo encontramos que al expresar la proteína de fusión FLJ20174-GFP en células HEK, ésta se localiza mayoritariamente de forma intracelular, localizándose en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi. Además encontramos que al expresar esta proteína, las células HEK tienden a introducir más siRNAs que las células control después de 6 horas de incubación. Estos datos no coinciden con el trabajo reportado por Duxbury y cols, (2005), donde encuentran que la proteína de fusión FLJ20174-GFP expresada en células PANC1, se localiza en lo que parece ser la periferia celular o la membrana celular. Estudios posteriores serán necesarios para esclarecer la localización de FLJ20174 y la participación de esta proteína en la entrada de siRNAs a células de mamífero.

## ABREVIATURAS

<b>DMEM</b>	( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ) medio Eagle modificado por Dulbecco.
<b>BSA</b>	( <i>Bovine Serum Albumin</i> ) albúmina sérica bovina.
<b>DAPI</b>	4'-diamidino-2-fenilindol.
<b>DEPC</b>	dietilpirocarbonato.
<b>DNA</b>	( <i>Deoxiribonucleic Acid</i> ) ácido desoxiribonucleico.
<b>dsRNA</b>	( <i>double strand RNA</i> ) RNA de doble hebra.
<b>fed</b>	( <i>Feeding defective for RNAi</i> ) carente de RNAi sistémico por alimento.
<b>GFP</b>	( <i>Green Fluorescent Protein</i> ) proteína verde fluorescente.
<b>IR</b>	invertidos repetidos.
<b>miRNA</b>	microRNA.
<b>nt</b>	nucleótidos.
<b>pb</b>	pares de bases.
<b>PBS</b>	( <i>Phosphate Buffered Saline</i> ) amortiguador de fosfatos.
<b>PFA</b>	paraformaldehído.
<b>PLL</b>	poli-L-lisina.
<b>pre-microRNA</b>	precursor de microRNA.
<b>pri-microRNA</b>	microRNA primario.
<b>PTO</b>	( <i>Phosphorothioate-derived oligonucleotides</i> ) oligonucleótidos derivados de fosforotionatos.
<b>RdRp</b>	( <i>RNA-dependent RNA polymerase</i> ) RNA polimerasa dependiente de RNA.
<b>RISC</b>	( <i>RNA-induced silencing complex</i> ) complejo de silenciamiento inducido por RNA.
<b>RNA</b>	( <i>Ribonucleic Acid</i> ) ácido ribonucleico.
<b>RNA pol II</b>	RNA polimerasa II.
<b>RNAi</b>	( <i>RNA interference</i> ) RNA de interferencia.
<b>rsd</b>	( <i>RNAi spreading defective</i> ) diseminación defectuosa del RNAi.
<b>SBF</b>	suero bovino fetal.
<b>SID</b>	( <i>Systemic Interference Defective Protein</i> ) proteína causante de la deficiencia de RNAi sistémico.
<b>sid</b>	( <i>Systemic interferente defective</i> ) RNAi sistémico deficiente.
<b>siRNA</b>	( <i>Small interfering RNA</i> ) RNAs de interferencia pequeños.
<b>TBS</b>	( <i>Tris Buffered Saline</i> ) amortiguador de Tris.

# INTRODUCCIÓN

## RNA de interferencia

Fue en 1998 cuando Craig Mello y Andrew Fire reportaron que al introducir a *C. elegans* RNA de doble hebra (dsRNA) se inhibe específicamente la traducción del RNA mensajero (mRNA) al cual este dsRNA es complementario (Fire et al., 1998). A este proceso se le llamó RNA de interferencia (RNAi) (Tuschl et al., 1999).

Pronto se descubrió que el fenómeno de RNAi no es exclusivo de *C. elegans* y se ha descrito en plantas, insectos y hasta en mamíferos (Brown et al., 1999; Ogita et al., 2003; Raponi and Arndt, 2003; Worby et al., 2001; Yang et al., 2001). La especificidad y amplia funcionalidad del RNAi permitieron que éste se convirtiera rápidamente en una útil herramienta para inhibir la expresión de un gen específico y de esta forma estudiar su función.

El uso del RNAi como una herramienta para la inhibición génica, requirió un estudio más profundo de su mecanismo de acción. Diversos trabajos encontraron que la inhibición se lleva a cabo de forma post-transcripcional debido a la degradación específica del mRNA. Estudios posteriores revelaron que las moléculas de dsRNA son procesadas por una RNasa llamada Dicer, generando dsRNA de aproximadamente 21 nt y son estos pequeños RNAs (siRNA) los que causan la inhibición.

Con el descubrimiento de esta maquinaria en la célula, diversos grupos se dedicaron a buscar a las moléculas endógenas que la utilizan. Previamente se habían encontrado pequeños RNAs (microRNAs o *miRNAs*) de cadena sencilla no codificantes, que se expresan en diferentes etapas del desarrollo de *C. elegans* y que regulan la transición de estas etapas bloqueando la síntesis de proteínas específicas (Reinhart et al., 2000) (Olsen and Ambros, 1999). Los primeros en describirse fueron *lin-4* y *let-7*, dos microRNAs que regulan la expresión de LIN-14, LIN-28 y LIN-41. Al analizar el *loci* genómico que da lugar a *lin-4* y *let-7* se observó que el RNA precursor (pre-microRNA) puede formar una estructura de tallo y asa (*hairpin*). Sorprendentemente se encontró que los pre-microRNAs son procesados por Dicer, la misma enzima que procesa a los dsRNA introducidos por el experimentador y que tanto los siRNAs como microRNAs utilizan la misma maquinaria para llevar a cabo el silenciamiento post-transcripcional (Doench et al., 2003; Tijsterman and Plasterk, 2004).

Trabajos posteriores describieron aproximadamente 100 microRNAs de *D. melanogaster*, *C. elegans* y mamíferos que mostraban similitud estructural con los precursores de *lin-4* y *let-7* (Lau et al., 2001; Lim et al., 2003a; Lim et al., 2003b). Algunas estimaciones sugieren que

cerca del 1% del genoma de organismos metazoarios da lugar a microRNAs; en *C. elegans* se han descrito más de 300 y en *H. sapiens* se han predicho más de 200 (Lim et al., 2003a; Lim et al., 2003b; Rodriguez et al., 2004). La gran diversidad de microRNAs descritos hace suponer que el fenómeno de regulación mediado por microRNAs está muy conservado y es ampliamente utilizado por la célula.

### **Silenciamiento post-transcripcional mediado por microRNAs y siRNAs**

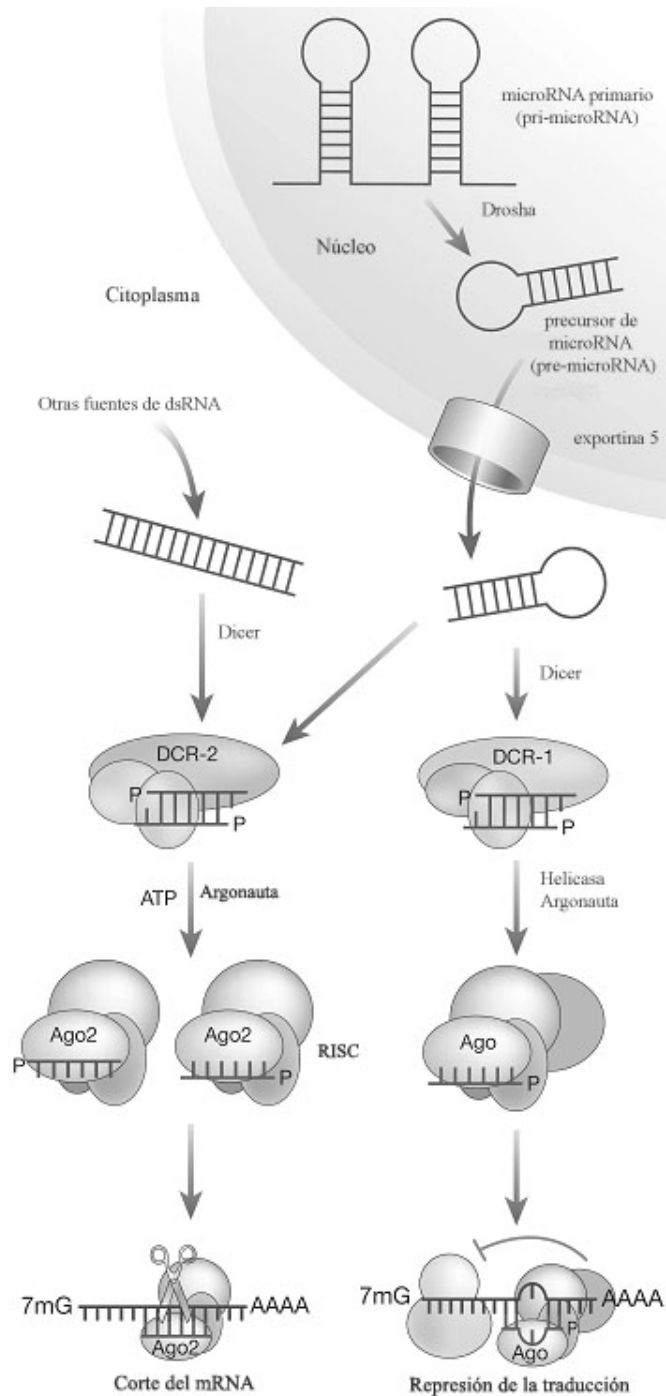
Los microRNAs se transcriben por la RNA polimerasa II (pol II), como precursores de alto tamaño molecular (400–800 pares de bases) llamados microRNAs primarios o pri-microRNAs (Lee et al., 2002; Lee et al., 2004). Estos precursores contienen estructuras cap en su extremo 5' así como una cola de poli(A) en su extremo 3' (Figura 1).

Antes de salir del núcleo los pri-microRNAs son reconocidos y cortados por un complejo microprocesador de aproximadamente 500 kDa. En este complejo se encuentra una proteína con dominio de unión a dsRNA llamada DGCR8 o Pasha y una RNasa tipo III llamada Drosha la cual corta al pri-microRNA (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Lee et al., 2003). Este corte genera a los precursores de microRNAs (pre-microRNAs), RNAs de aproximadamente 70 nt los cuales se caracterizan por tener una estructura de *hairpin*.

Después de este primer procesamiento los pre-microRNAs deben salir del núcleo. Esta salida se lleva a cabo por medio de la exportina 5, un receptor de transporte soluble que reconoce estructuras de tallo y asa de pequeña longitud (Yi et al., 2003) (Lund et al., 2004).

Ya en el citoplasma el pre-microRNA es procesado por Dicer, dando lugar a microRNAs de cadena doble de aproximadamente 21 nt con 2 nt sobresalientes (*overhangs*) en el extremo 3' de cada hebra (Hammond et al., 2000; Hutvagner et al., 2001). Aunque inicialmente Dicer se describió en células de *D. melanogaster*, pronto se encontraron proteínas homologas en plantas, *S. pombe*, *C. elegans* y *H. sapiens*. En la mayoría de las especies animales se encontró un gen único para esta enzima, mientras que en *Drosophila* se han identificado 2 Dicers (Dcr-1 y Dcr-2); al parecer Dcr-2 participa en la vía de RNAi y Dcr-1 en la vía de los miRNAs.

Después del corte por Dicer el microRNA se incorpora dentro de un complejo proteico al que se le llamó RISC (*RNA- Induced Silencing Complex*), donde se hibrida con el mRNA blanco (Bernstein et al.; Hammond et al., 2000). Cuando el apareamiento con el mRNA es perfecto, el mRNA blanco es cortado por una de las proteínas del complejo de RISC (Argonata 2) y posteriormente es degradado por exonucleasas (Liu et al., 2004; Meister et al., 2004). Por el contrario, cuando este apareamiento es imperfecto (como sucede



**FIGURA 1.** Modelo del mecanismo de procesamiento y función de microRNAs y siRNAs. Los genes que dan lugar a los microRNAs se transcriben por la RNA pol II, generándose pri-microRNAs. Estos son procesados en el núcleo por una RNasa llamada Drosha, dando lugar a los pre-microRNAs, los cuales tienen una estructura de tallo y asa (*hairpin*). Los pre-miRNAs salen del núcleo mediante la exportina 5. Ya en el citoplasma éstos son procesados por Dicer, una RNasa que corta el *hairpin* dejando un RNA de doble hebra de aproximadamente 21nt. Dicer también procesa las moléculas de dsRNAs introducidas a la célula por el experimentador, generando pequeñas moléculas de dsRNAs llamadas siRNAs. Posteriormente los siRNAs y los microRNAs de doble hebra entran a un complejo proteico denominado RISC, el cual selecciona una de las hebras y la aparea con un mRNA complementario. Si el apareamiento de bases es total, el mRNA es cortado por una proteína de RISC (AGO2); por el contrario si el apareamiento de bases no es totalmente complementario la traducción se detiene pero el mRNA no se degrada. Imagen modificada de la original de Meister & Tuschl, 2004.

generalmente con los microRNAs de mamíferos), la traducción únicamente se inhibe sin degradarse el mRNA.

Las proteínas que componen a RISC no están totalmente caracterizadas. Usando extractos de células de mamífero se han identificado proteínas de la familia de Argonauta (eIF2C1 y/o eIF2C2)(Martinez et al., 2002), Gemina3, Gemina4 (Mourelatos et al., 2002) y últimamente la proteína de retraso mental del cromosoma X frágil (FMRP) (Caudy et al., 2002; Jin et al., 2004a; Jin et al., 2004b). Sin embargo, poco se sabe acerca de la función de estas proteínas en el silenciamiento por RNAi.

El proceso de RNAi se ha observado en diversos organismos, desde plantas, nemátodos, insectos hasta mamíferos. La maquinaria para llevar a cabo este silenciamiento parece conservarse en distintos organismos, aunque en cada uno esta maquinaria tiene ciertas particularidades (Tabla 1). La conservación de esta maquinaria y la gran cantidad de microRNAs encontrados nos indica que el RNAi es un proceso ampliamente utilizado por los organismos cuyas particularidades deberán analizarse posteriormente.

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Plantas
RNasa III	Dicer Drosha	Dicer Drosha	Dicer 1 Dicer 2 Drosha	DCR-1 Drosha	DCL1 DCL2 DCL3
Argonautas	eIF2C1 (Ago1) eIF2C2 (Ago2) Ago3 Ago4	Ago1 Ago2 (endonucleasa) Ago3 Ago4	Aubergine Ago1 piwi Ago2	RDE-1 ALG-1 y ALG-2 PPW-2 PPW-1	AGO1 AGO4
Helicasas	Gemin3	Gemin3	Spindle-E Armitage	DRH-1/DRH-2 SMG-2 MUT-14	SDE3
RdRp				RRF-1 EGO-1 RRF-3	SGS2/SDE1/RDR6 RDR1 RDR2
Proteínas con dominios de unión a dsRNA.	DGCR8 TRBP	DGCR8 TRBP (PRBP)	R2D2 Pasha Loquacious	RDE-4	Hyl1 DRB4

**TABLA 1.** En la tabla se muestran distintas proteínas que participan en el proceso de RNA de interferencia en diversos organismos.

## **RNA de interferencia sistémico**

Uno de los aspectos más intrigantes en el fenómeno de RNAi es su carácter sistémico; es decir, que la introducción localizada de dsRNA produce el silenciamiento del gen blanco, en todo el organismo y su progenie (Fire et al., 1998).

El carácter sistémico del RNAi implica la existencia de una maquinaria no descrita anteriormente. En primer lugar debe existir un mecanismo que permita que la señal de inhibición atraviese la membrana lipídica; algunos grupos plantean que debe existir un mecanismo para amplificar esta señal (Sijen et al., 2001; Voinnet, 2005); y por último un mecanismo que permita que esta señal salga de la célula, ya sea hacia el medio extracelular o para que viaje de célula a célula.

Poco conocemos acerca de los mecanismos de entrada y salida de esta señal de interferencia, y no sabemos si la maquinaria descrita hasta la fecha se conserve entre distintos organismos. Por otra parte, sabemos que la amplificación de dsRNAs se lleva a cabo por una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). Esta proteína utiliza la hebra de siRNA unida al mRNA blanco como *primer*, y al mRNA blanco como molde generando así nuevas moléculas de dsRNA. Miembros de la familia de RdRp han sido descritas claramente en plantas y en el nemátodo *C. elegans* (Dalmay et al., 2000; Sijen et al., 2001; Voinnet, 2005), pero se cree que esta proteína no está presente en todos los organismos.

### **RNAi sistémico en planarias.**

Aunque existen pocos trabajos al respecto, hay reportes que indican la existencia de RNAi sistémico en planarias. En un trabajo inicial se reportó que la inyección de dsRNA en la cavidad craneal de *G. tigrina* inhibe la expresión del mRNA blanco en el ojo. Esta inhibición se observó desde las primeras 24 horas post-inyección y se mantuvo durante 3 semanas (Pineda et al., 2000). Posteriormente se reportó, que al alimentar a la planaria *S. mediterranea* con bacterias que producen dsRNA contra diferentes mRNAs blancos, disminuye la concentración de éstos mensajeros. Esta disminución es de larga duración ya que se observó aún 24 días después del tratamiento. Más interesante fue el hecho de que esta inhibición persiste durante el proceso de regeneración (Newmark et al., 2003). Estos datos nos indican que las planarias cuentan con la maquinaria necesaria para llevar a cabo RNAi sistémico, aunque trabajos posteriores serán necesarios para caracterizar esta maquinaria.

### **RNAi sistémico en insectos.**

Hasta la fecha existe una gran polémica acerca de la existencia o no de RNAi sistémico en la mosca *D. melanogaster*. En dos trabajos se ha reportado que al expresar de forma tejida específica transgenes invertidos repetidos (IR) que dan lugar a dsRNA, la inhibición de los mRNAs blanco se produce únicamente en las regiones donde el dsRNA se expresa (Fortier and Belote, 2000; Roignant et al., 2003). A pesar de estos trabajos, el grupo de Manev ha reportado que la inyección de dsRNA permite la inhibición sistémica de diversos mRNAs en la mosca adulta (Dzitoyeva et al., 2001; Dzitoyeva et al., 2003).

En insectos se han utilizado dos estrategias para introducir dsRNA: (1) generando insectos mutantes que contienen secuencias invertidas repetidas (IR), las cuales al transcribirse dan lugar a una secuencia en forma de *hairpin* que generará dsRNA y (2) la inyección localizada de dsRNA. Según los trabajos reportados parece que el efecto sistémico depende de la manera en la cual el dsRNA es introducido en el organismo. El carácter sistémico del RNAi es claro cuando el dsRNA se inyecta en el abdomen del insecto; sin embargo cuando las células expresan invertidos repetidos no se observa RNAi sistémico.

Algo similar se observó en *C. elegans*, donde se ha encontrado que la expresión por la célula de dsRNA genera un RNAi sistémico débil, dependiente de la temperatura y de la distancia desde el punto de origen; mientras que la inyección al organismo o la entrada por el intestino de dsRNA, produce un RNAi sistémico evidente. En 2003 el grupo de Andrew Fire reportó que se puede inducir RNAi sistémico cuando las células expresan dsRNA, al alimentar al *C. elegans* con dsRNA no relacionados (Timmons et al., 2003). Estos datos nos indican que el fenómeno de RNAi sistémico involucra diversos factores, por lo que la existencia o no de RNAi sistémico en *D. melanogaster*, aun debe de ser determinada.

En estos últimos años diversos trabajos han demostrado la existencia de RNAi sistémico en otros insectos. En 2002 el grupo de Levashina demuestra que al inyectar dsRNA contra defensina en el tórax del mosquito *A. gambiae*, disminuye la concentración de este mRNA blanco por un periodo de 12 días (Blandin et al., 2002). En ese mismo año describen la existencia de RNAi parental (de padres a crías) en el escarabajo de la harina *T. castaneum*. Para producirlo inyectan dsRNA contra diversos mRNAs en pupas hembras, posteriormente estas hembras ya adultas se cruzaron con machos sin tratamiento observándose en casi el 100% de las crías el efecto inhibitorio de los genes blanco (Bucher et al., 2002).

Posteriormente se reportó la existencia de RNAi sistémico en el saltamontes *S. americana* y en la cucaracha *B. germanica*. En *S. Americana*, observaron la inhibición del gen *vermillion* en



el ojo, al inyectar dsRNA contra este mRNA en el corazón del saltamontes. Sin embargo, cabe mencionar que este efecto se observó únicamente en el 15% de los animales inyectados (Dong and Friedrich, 2005). Para estudiar el efecto de RNAi sistémico en la cucaracha *B. germanica*, inyectaron dsRNA en la cavidad abdominal de la cucaracha hembra y observaron, aun 15 días después de la inyección, la inhibición del mRNA blanco en el ovario (Ciudad et al., 2006).

Estos trabajos parecen indicar que el efecto sistémico del RNAi se presenta por lo menos en algunos insectos. Trabajos posteriores serán necesarios para esclarecer el fenómeno sistémico en insectos y para determinar cual es la maquinaria necesaria para que esto ocurra.

### **RNAi sistémico en el nemátodo *C. elegans*.**

Aunque existen reportes de RNAi sistémico en diferentes especies animales, los trabajos realizados para caracterizar la maquinaria del fenómeno sistémico se han llevado a cabo únicamente en *C. elegans*.

En este nemátodo existen diversas formas de introducir dsRNA para generar un efecto sistémico; (1) microinyectar directamente dsRNA a cualquier órgano o en el fluido de la cavidad del cuerpo, (2) expresar en un tejido dsRNA e (3) ingerir dsRNA, ya sea comiendo bacterias que expresan dsRNA o al incubar al *C. elegans* en un medio que contenga dsRNA. De estos procedimientos, son la microinyección y la ingestión los que generan un efecto sistémico más potente. La expresión en un tejido de dsRNA genera un efecto sistémico débil, que depende de factores como la temperatura y la distancia desde el punto de expresión del dsRNA.

Para conocer cual es la maquinaria necesaria para generar RNAi sistémico, tres distintos grupos han realizado trabajos genéticos estudiando mutantes incapaces de producir un fenómeno sistémico pero que aun son capaces de producir RNAi de forma autónoma. Los genes reportados se nombraron *fed* (*feeding defective for RNAi*) (Timmons et al., 2003), *rsd* (*RNAi spreading defective*)(Tijsterman et al., 2004) y *sid* (*systemic interference defective*)(Feinberg and Hunter, 2003; Winston et al., 2002).

#### **1. *fed* (*feeding defective for RNAi*).**

En un intento por detectar genes involucrados en el RNAi sistémico, Andrew Fire reportó 2 mutantes de *C. elegans* incapaces -exclusivamente- de producir el efecto sistémico del RNAi al ingerir bacterias que producen dsRNA. A estos mutantes los denominan *fed-1* y *fed-2* por *feeding defective for RNAi*. Aunque en éstos no se observa un silenciamiento sistémico al ingerir el dsRNA, sí son capaces de generar un efecto sistémico si el dsRNA es inyectado o

se produce dentro de las células. Esto parece indicar que el proceso afectado es la entrada de dsRNA a las células del intestino.

Sin embargo, para poder determinar la función de estos genes en el fenómeno del RNAi sistémico son necesarios más estudios.

## 2. *rsd (RNAi spreading defective)*.

En 2004 el grupo de Ronald H. A. Plasterk, buscan *C. elegans* mutantes que sean incapaces de generar RNAi sistémico cuando ingieren bacterias que producen dsRNA. A estas mutantes les llamaron *rsd* por *RNAi spreading defective* (Tijsterman et al., 2004).

De este tipo de mutantes encontraron 2 grupos: *rsd-4* y *rsd-8* los cuales no generan RNAi cuando los mRNAs blanco se expresan en células somáticas o en células germinales. Por otro lado *rsd-2*, *rsd-3* y *rsd-6* fueron incapaces de generar RNAi cuando los mRNAs blanco se expresan en células germinales; pero cuando los gusanos ingieren dsRNA contra genes que se expresan en células somáticas, si producen RNAi sistémico. Este fenotipo sugiere que existe una maquinaria particular que permite propagar el silenciamiento por RNAi a células germinales.

Al tratar de identificar los genes *rsd* se encontró que *rsd-3* codifica para una proteína con un dominio N-terminal homólogo a epsina (ENTH); este dominio se une a fosfoinositol y se encuentra frecuentemente en proteínas presentes en las vesículas. Al buscar homólogos a esta proteína en humanos, se encontró que RSD-3 es homóloga a entoprotina, una proteína que ha sido implicada en el tráfico de vesículas en mamíferos (Wasiak et al., 2002).

Otro de los genes identificados fue *rsd-6*, el cual genera una proteína con dominios tudor. Estos dominios se encuentran frecuentemente en las proteínas de unión a RNA aunque se sabe que por sí solos no son capaces de unir RNA. Además se encontró que RSD-2 interactúa frecuentemente con RSD-6. Finalmente, *rsd-8* genera una proteína transmembranal reportada por Hunter como SID-1 (Winston et al., 2002).

## 3. *sid (systemic interference defective)*.

En el año 2002 el grupo de Craig Hunter desarrolló una estrategia para identificar genes involucrados en el carácter sistémico del RNAi en *C. elegans*. Para esto, generaron un mutante que contiene dos transgenes: *myo-2::GFP* que produce GFP en los músculos de la tráquea y *myo-3::GFP* que produce GFP en los músculos de la pared del cuerpo. A esta mutante se le introdujo otro transgene (*myo-2::GFP dsRNA*) que produce dsRNA contra GFP en células de la tráquea. Con este inteligente diseño, lograron diferenciar el fenómeno de RNAi autónomo del RNAi sistémico. En este sistema la inhibición autónoma de la GFP

es muy clara; aunque el RNAi sistémico observado es dependiente de la posición y sensible a la temperatura.

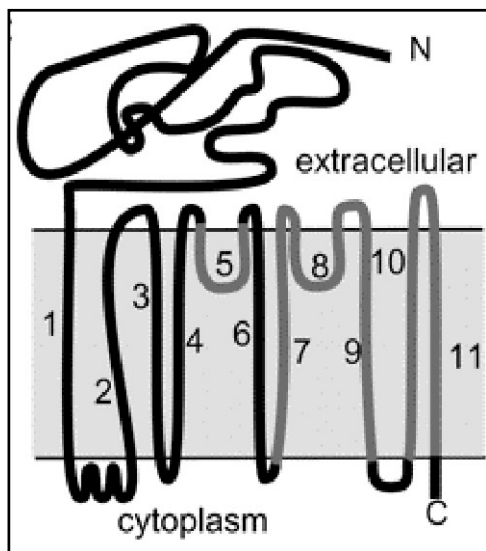
Se definen como mutantes *sid* (*systemic interference defective*) a aquellos nemátodos donde no se observa la GFP en la traquea (RNAi autónomo) pero que si expresan la GFP en los músculos del cuerpo. De esta forma, este grupo encontró tres genes cuya mutación inhibe el fenotipo sistémico pero no afecta el silenciamiento local; a estos genes les llamó *sid-1*, *sid-2* y *sid-3* (Winston et al., 2002) pero en este trabajo únicamente caracterizaron el gen *sid-1*.

### 3.1 SID-1

Al estudiar más detalladamente los nemátodos mutantes en el gen *sid-1*, se observó que éstos tampoco inician un efecto sistémico al ingerir bacterias que generan dsRNA ó al inyectar dsRNA en diferentes órganos. Además se observó que este mutante no transmite el silenciamiento a su progenie.

El gen *sid-1* codifica para una proteína de 776 aminoácidos con 11 dominios transmembranales. Al fusionar distintos dominios con  $\beta$ -galactosidasa, se determinó que más de 400 aminoácidos del extremo amino-terminal de SID-1 son extracelulares y que el extremo carboxilo se localiza en el citosol (Figura 2).

Estos datos sugerían que SID-1 actúa como un transportador de dsRNAs, lo que permite que se produzca el fenómeno de RNAi sistémico.

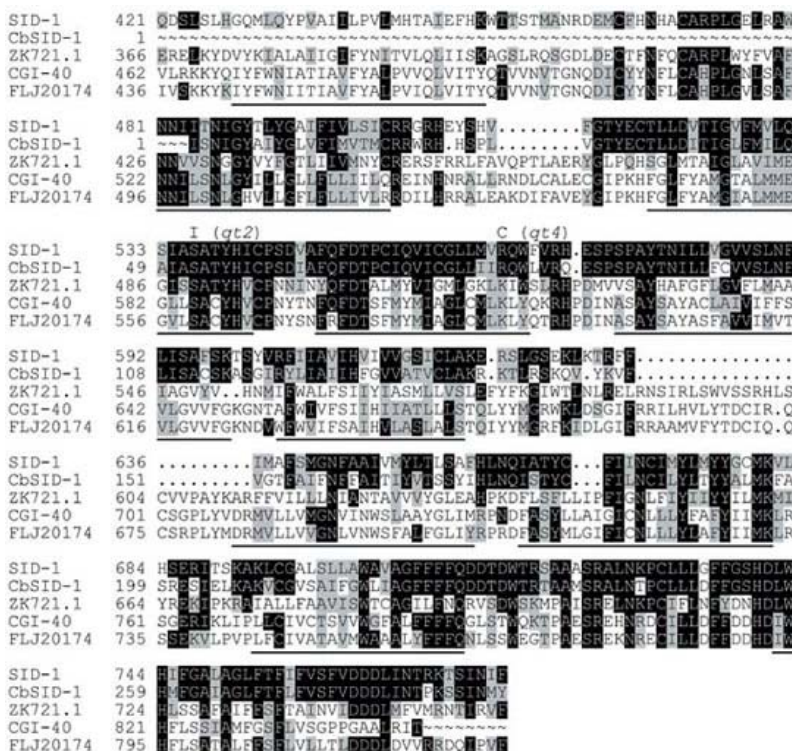


**FIGURA 2.** Modelo de la estructura de SID-1. La proteína SID-1 es una proteína de casi 800 aminoácidos altamente hidrofóbica que contiene 11 dominios transmembranales. Su gran extremo amino-terminal se encuentra localizado de forma extracelular, mientras que su extremo carboxilo se localiza dentro de la célula. Este modelo está fundamentado con datos experimentales (Feinberg and Hunter, 2003), las zonas negras corresponden a aquellos dominios cuya topología está plenamente identificada, mientras que las zonas grises corresponden a dominios cuya topología no es contundente. (Imagen tomada de la original de Feinberg y Hunter, 2003).

Pero ¿será SID-1 necesario para la entrada de la señal de interferencia o para la salida de esta señal? para contestar esto, Hunter y su grupo generan un *C. elegans* mosaico. Este nemátodo expresa GFP en todas sus células; en algunas SID-1 y la proteína DsRED2 (variante soluble de la proteína fluorescente roja) y en otras células el *sid-1* está mutado y no se observa la proteína DsRED2. Al ingerir este *C. elegans* mosaico bacterias que expresan dsRNA contra GFP, se demuestra que las células capaces de silenciar la GFP son aquellas que expresan SID-1, por otro lado las células que contienen el *sid-1* mutado son incapaces de silenciar la GFP. Con esto se concluye que SID-1 es necesario para la entrada de la señal de interferencia.

Posteriormente Feingerg y Hunter (2003) mostraron que SID-1 no solo es necesario para generar un efecto sistémico del RNAi, sino que su expresión ectópica promueve la entrada de dsRNA a las células de *Drosophila*. Al parecer el efecto de entrada de dsRNA depende del tamaño del dsRNA, siendo mayor el efecto de inhibición a mayor longitud del dsRNA. En este mismo trabajo los autores proponen que la entrada de dsRNA mediada por SID-1 es por difusión pasiva, ya que no se afecta al eliminar ATP ni al reducir la temperatura. Estudios de inmunocitoquímica, realizados en células de *Drosophila* transfectadas con el gen *sid-1*, mencionan que SID-1 se localiza en la membrana celular (Feinberg and Hunter, 2003) aunque se observa mayoritariamente de forma intracelular.

Finalmente en este trabajo Hunter reporta la presencia de genes homólogos a *sid-1* en mamíferos (*flj20174* y *cgi-40*), abriendo la posibilidad de la existencia de RNAi sistémico en humanos (Figura 3) (Winston et al., 2002).



**FIGURA 3.** Alineamiento de los extremos carboxilo-terminal de SID-1 y sus supuestos homólogos en nemátodos y en mamíferos: CbSID-1 (*C. briggsae*), ZD721.1 (*C. elegans*), CGI-40 (*Homo sapiens*) y FLJ20174 (*Homo sapiens*). Residuos idénticos a SID-1 se muestran en negro, aminoácidos similares se muestran en gris. Regiones subrayadas indican zonas en las cuales todas las secuencias se predicen que son transmembranales. Se observa gran similitud en los extremos carboxilo de SID-1 (posiciones 421-776) con ZK721.1 (29% de identidad y 50% de similitud), CGI-40 (27% de identidad y 48% de similitud) y FLJ20174 (28% de identidad y 47% de similitud). Imagen tomada de Feinberg and Hunter, 2003.

### **RNAi sistémico en mamíferos.**

El tema de RNAi sistémico en mamíferos es aún muy controversial. Hasta la fecha no se ha observado la diseminación de la señal de interferencia hacia todo el organismo y su progenie, pero se ha observado que esta señal puede moverse desde su punto de aplicación hasta un órgano blanco.

El uso del RNAi para combatir diversas patologías en el ser humano, ha propiciado que diversos grupos intenten introducir siRNAs a mamíferos. Muchos de estos grupos han utilizado virus que expresan un *hairpin* y utiliza la vía de los microRNAs para procesarse e inhibir el mRNA blanco. Otros grupos han usado liposomas o lípidos catiónicos (Sioud and Sorensen, 2003; Sorensen et al., 2003; Zimmermann et al., 2006) y otras estrategias como la introducción de complejos poliméricos (Bitko et al., 2005; Ge et al., 2004; Urban-Klein et al., 2005) y electroporación (Schiffelers et al., 2005; Takabatake et al., 2005).

Por otro lado, se han publicado diversos trabajos donde ha disminuido la expresión de un mRNA blanco al introducir siRNAs desnudos y sin modificar en ratones.

Para introducir estos siRNAs a mamíferos, se han utilizado distintas vías de administración, lo cual generalmente depende del órgano o tejido donde se localiza el mRNA blanco.

Una de las vías más utilizadas ha sido la vía intravenosa, ya sea por el método hidrodinámico (el cual consiste de una rápida inyección de un gran volumen de solución introducida en el ratón por la vena de la cola) o por una inyección a baja presión. Así, al hacer un estudio de la inhibición de la luciferasa por siRNAs en ratones, se reportó una disminución en la expresión de este gen en el hígado, riñón, bazo, pulmón y páncreas. Esta inhibición fue de hasta el 88% y se observó un día después de inyectar, por el método hidrodinámico, 5 µg de siRNA en una sola dosis (Lewis et al., 2002). Otros reportes han utilizado esta misma estrategia para inhibir mRNAs de estos mismos órganos (Klein et al., 2003; Zender et al., 2003) o de algunos otros como en células de cáncer de mama (Liang et al., 2005) e incluso, diversos trabajos han utilizado este método para inhibir genes virales y así combatir una infección en mamíferos (Giladi et al., 2003; Klein et al., 2003; Tompkins et al., 2004).

Aunque la vía más utilizada ha sido la vía intravenosa, esta no ha sido la única. Otros trabajos han introducido siRNAs por vía intraperitoneal o subcutánea. De esta forma se logró la inhibición del mRNA del factor de crecimiento vascular endotelial -el cual es sobreexpresado en células tumorales- y se observó una disminución del crecimiento tumoral después de 4 días de inyectar 125 µg de siRNAs por kg de peso del animal (Filleur et al., 2003).

En 2004 el grupo de John Cryan introduce por infusión 0.4 mg de siRNAs por día, contra el mRNA del transportador de dopamina y logra una inhibición de este mRNA en neuronas del cerebro medio, la hipófisis, el *núcleo acumbens* y el tubo olfatorio (Thakker et al., 2005).

Utilizando otras vías de administración se ha observado que los siRNAs logran entrar a las células pero no pueden viajar hacia otros tejidos. Así, se observó que al introducir siRNAs en una sola dosis contra GFP por vía intra-traqueal (75 µg/ratón), hay una disminución considerable de la fluorescencia en el pulmón; sin embargo no se observó la inhibición de este gen en el hígado (Lomas-Neira et al., 2005).

Hay varios grupos que han inhibido genes al introducir siRNAs desnudos por vía intranasal; sin embargo -al igual que por vía intratraqueal- esta inhibición es específicamente contra mRNAs que se expresan en el pulmón (Zhang et al., 2004) o contra mRNAs de virus que infectan las células de pulmón (Bitko et al., 2005; Li et al., 2005).

El uso de condiciones poco fisiológicas (alta presión y gran volumen) para introducir siRNA por vía intravenosa nos impide afirmar la existencia de RNAi sistémico en mamíferos. Sin embargo, el éxito obtenido al aplicar localmente siRNAs hace pensar que, por lo menos, estos son capaces de entrar a la célula e inhibir a su mRNA blanco en el citoplasma. El reporte de Hunter de 2002 plantea la existencia de homólogos a SID-1 en mamíferos; nosotros nos preguntamos si serán estos supuestos homólogos los responsables de la entrada de siRNAs a células de mamífero.

## JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES DEL TRABAJO

A partir del descubrimiento del RNAi en *C. elegans* diversos grupos se dedicaron a estudiar si este fenómeno se presentaba en otros organismos. Así se encontró que el RNAi es un mecanismo muy conservado presentándose en diversos organismos como plantas, levaduras, nemátodos, insectos y mamíferos. Además, como era de imaginarse, se observó que la maquinaria necesaria para producir RNAi se presenta en todos estos organismos, aunque cada uno presenta ciertas particularidades.

Por otro lado, el carácter sistémico del RNAi estaba muy debatido: en plantas y *C. elegans* este fenómeno es muy claro, pero había indicios de que en *Drosophila* y en mamíferos no se presenta.

En el 2002 Craig Hunter y su grupo encuentran en *C. elegans* 3 genes que participan en el carácter sistémico del RNAi sin intervenir en su efecto local (Winston et al., 2002). Este grupo no sólo caracteriza a uno de los genes (*sid-1*) sino que plantea la existencia de genes homólogos en células de mamífero (*cgi-40* y *flj20174*).

La existencia de RNAi sistémico en mamíferos abre la posibilidad del uso del RNAi como herramienta terapéutica, por lo que diversos grupos, incluyendo al nuestro, nos volcamos al estudio de estos supuestos homólogos.

En diversos mamíferos como toro, rata, ratón, chimpancé y humano existen dos marcos de lectura abierta reportados como homólogos de SID-1. Estos homólogos se conocen como *flj20174* (también llamado SIDT1) y *cgi-40* (también llamado SIDT2). Al comparar las secuencias de aminoácidos de CGI-40 y FLJ20174 se observa que la identidad entre ellas no es muy alta (55% en humanos). Sin embargo, tanto la secuencia de FLJ20174 como de CGI-40 están muy conservadas en distintos mamíferos (aproximadamente 90% de identidad).

Estudios previos realizados en el laboratorio, indicaron que el mRNA de CGI40 se expresa en embriones de ratón, desde etapas tempranas del desarrollo embrionario (6.5 días) hasta el nacimiento. Este mRNA también se encontró en todos los órganos de ratón adulto analizados (bazo, cerebro, corazón, hígado, intestino, músculo, pulmón, riñón, timo, testículo y útero); así como en distintas líneas celulares de mamíferos (células CAPAN, HEK, HeLa, CHO, fibroblastos de ratón 3T3).

Por el contrario, el mRNA de FLJ20174 no se encontró en las etapas tempranas del desarrollo embrionario del ratón (del día 6.5 al día 12), detectándose únicamente a partir del día 13 de gestación hasta el nacimiento. En ratones adultos este mRNA se encontró en

el cerebro, el intestino, el riñón, el timo, el testículo y el útero, pero no se detectó en bazo, cerebelo y ninguna de las líneas celulares analizadas (células CAPAN, HEK, HeLa, CHO y fibroblastos de ratón 3T3).

Para estudiar las características de estos homólogos, se intentó expresar estas proteínas en distintas células de mamífero. Los primeros intentos realizados en el laboratorio, para obtener células que expresen en forma estable a la proteína FLJ20174, habían resultado infructuosos. Por otro lado, en algunos ensayos se había observado que la proteína FLJ20174-GFP se encuentra mayoritariamente de forma intracelular.

Durante el curso de este trabajo, el grupo de Edward E. Whang reportó que, al introducir el gen *flj20174* de esta proteína en células PANC1 (células del ducto pancreático de adenocarcinoma), estas células introducen más siRNA fluorescentes que las células control (Duxbury et al., 2005). Además, al incubar a estas células con siRNA contra proteínas endógenas, este grupo logra inhibir la expresión de estas proteínas (Duxbury et al., 2005). No solo eso, también muestra que la proteína de fusión FLJ20174-GFP se localiza preferencialmente en la membrana celular, aunque no utilizan marcadores de membrana. Los resultados reportados por Duxbury y cols. no coinciden con los resultados previos que nosotros habíamos obtenido. Esto nos llevó a repetir algunos experimentos y a buscar nuevas estrategias para expresar la proteína FLJ20174 y determinar si realmente esta proteína es capaz de aumentar la entrada de dsRNA a células de mamífero.



## **HIPÓTESIS**

La proteína FLJ20174 favorece la entrada de RNA de doble hebra a células de mamífero.

## **OBJETIVOS**

1. Expresar la proteína FLJ20174 en distintas células de mamífero.
2. Determinar si la expresión de FLJ20174 favorece la entrada, desde el medio extracelular, de dsRNA y siRNA a células de mamífero.
3. Caracterizar la localización subcelular de la proteína FLJ20174.

## MÉTODOS

### *Líneas celulares*

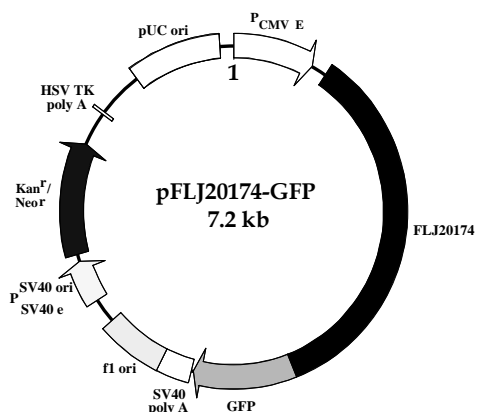
En este trabajo se utilizaron células HEK (células de riñón humano embrionario), células HeLa (células de adenocarcinoma de cérvix humano) y células CHO (células de ovario de hámster chino). Para su crecimiento estas células se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) adicionado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y se mantuvieron a 37°C y en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### *Plásmidos*

El gen *hflj20174* se obtuvo de la clona COL09863 del consorcio RIKEN. Para clonar el gen *hflj20174* en el vector pEGFP-N1 se utilizaron los oligos: *forward* 5'TCA GAT CTG CAC CGG GCT TTG GAA3' y *reverse* 5'GTG GAT CCC AGA AGA CAG GGA TCT GGT CTC3' los cuales contienen la secuencia para hibridarse con *hflj20174* y una secuencia para cortar con las enzimas Bgl II y BamHI respectivamente. Al oligo *reverse* se le mutó el codón de paro, para generar la proteína de fusión FLJ20174-GFP.

El gen *hflj20174* se amplificó por PCR de la clona COL09863 y el producto de PCR se clonó en el plásmido pDrive (Invitrogen); este plásmido se amplificó y se le realizó una doble digestión con las enzimas Bgl II y BamHI. El fragmento liberado se clonó en el plásmido pEGFP-N1 (Bioscience Clontech) (Figura 4).

La secuencia del plásmido se verificó por restricción y se secuenció parcialmente utilizando los oligos 5'GTG TAC GGT GGG AGG TCT3', 5'GGT GCT GTC CTG GCA GGT TCC TC3' y 5'CCA GAC CTG GAA TCT ACA GCG AAA3'.



**FIGURA 4.** Plásmido pFLJ20174-GFP. En la figura se muestra que, en el plásmido, el gen de la proteína GFP queda fusionado al extremo 3' del gen de la proteína FLJ20174. La expresión de ésta proteína está regulada por el promotor de citomegalovirus (CMV). La resistencia a neomicina nos permite realizar transfecciones estables. Esta construcción fue realizada por el estudiante de doctorado Víctor Julián Váldez.

Como control utilizamos al plásmido comercial pEGFP-N1 (Bioscience Clontech) sin modificar. En algunos experimentos se utilizó como control negativo el plásmido pIP<sub>3</sub>R-YFP el cual codifica para el receptor del inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) fusionado, en su extremo amino terminal, a la proteína amarilla fluorescente (EYFP). Este plásmido fue construido en su totalidad por la maestra Alicia Sampieri.

### *Transfección*

Para estos experimentos, las células se sembraron en cajas de 60 mm al 40% de confluencia. Veinticuatro horas después estas células se incubaron con 1.6 µg de DNA en el reactivo de lipofectamine plus (Invitrogen) en medio Opti-MEM®I (GIBCO) siguiendo las instrucciones del proveedor. Aproximadamente 6 horas después, se retiró el medio de transfección, se colocó medio DMEM adicionado con 10% de Suero Bovino Fetal y se incubaron en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Los experimentos se realizaron 48 horas post-transfección.

### ***Inmunoprecipitación***

Cuarenta y ocho horas post-transfección, las células se lavaron con PBS frío y se incubaron durante 1 hora a 4°C en agitación con amortiguador RIPA (100 mM de NaCl, 20 mM de NaF, 10 mM de pirofosfato de sodio, 50 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA, 1% de Tritón X-100, 0.1% de SDS, 24 mM de deoxicolato de sodio e inhibidores de proteasas). Pasado este tiempo, el lisado celular obtenido se centrifugó a 4°C por 15 minutos para separar las células no lisadas (*pastilla* celular) y los extractos celulares (sobrenadante). Estos extractos se incubaron durante 1 hora a 4°C con proteína A-agarosa (Invitrogen), se centrifugaron y se recuperó el sobrenadante para inmunoprecipitar.

La inmunoprecipitación se realizó incubando el sobrenadante (12 a 16 horas a 4°C en agitación) con proteína A-agarosa y el anticuerpo anti-EGFP (1:2500). Posteriormente la fracción inmunoprecipitada se lavó para disminuir el pegado inespecífico: 3 veces con amortiguador WB1 (50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 1% de Tritón X-100, 12 mM de deoxicolato de sodio, pH 7.5), 2 veces con amortiguador WB2 (50 mM de Tris, 500 mM de NaCl, 0.1% de Tritón X-100 y 1.2 mM de deoxicolato de sodio, pH 7.5) y un último lavado con amortiguador WB3 (50 mM de Tris, 0.1% de Tritón X-100 y 1.2 mM de deoxicolato de sodio, pH 7.5). La *pastilla* celular resultante se analizó por un ensayo tipo Western blot.

### ***Western blot***

Para realizar los ensayos tipo Western blot las muestras se resuspendieron en amortiguador Laemmli (Tris 12.5 mM a pH 6.8, 0.2% de SDS, 0.3% de  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.3% de glicerol y 0.01% de bromofenol), se hirvieron por 10 minutos y se separaron en geles de poliacrilamida. La electroforesis se corrió a 80-100 V en amortiguador de corrida (Tris 25 mM, 250 mM de glicina y 0.1% de SDS). Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD) en un amortiguador de transferencia (Tris 24 mM, 192 mM de glicina y metanol al 20%) aplicando 120 mA durante 2 horas y 30 minutos. El bloqueo se realizó en una solución de leche al 3% y albúmina sérica bovina al 1%. La dilución del primer anticuerpo se realizó en amortiguador TBS y las membranas se incubaron 12-16 horas a 4°C en agitación. Las membranas se lavaron 3 veces con amortiguador TBS/Tween-20 0.01% y una vez con TBS. Las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo (anti-conejo-HRP) durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente se lavaron 3 veces con amortiguador TBS/Tween-20 0.01% y una vez con TBS. Las membranas se revelaron utilizando SuperSignal West Dura (PIERCE).

Para probar la sensibilidad de los anticuerpos anti-FLJ20174 se realizaron ensayos tipo Dot blot. Para esto, distintas concentraciones del péptido sintético contra el cual se produjeron los anticuerpos (MFLYLSDSLRSKDRR) se gotearon sobre una membrana de nitrocelulosa. Cuando las gotas se secaron, esta membrana se trató como se describió anteriormente, igual que las membranas de Western blot. Como anticuerpos primarios se utilizaron anticuerpos anti-FLJ20174 a distintas concentraciones.

### ***Marcaje radiactivo de dsRNA y siRNA***

Los ensayos de entrada de dsRNA se realizaron con RNA marcado radiactivamente. Para la síntesis de dsRNA largos (807 pb) se utilizó como molde un producto de PCR del vector pCMV2-GFP, el cual contiene la secuencia del gen *gfp* flanqueado por ambos lados por la secuencia T7. La reacción de transcripción *in vitro* se llevó a cabo usando la enzima T7 RNA polimerasa (BioLabs) siguiendo las

instrucciones del proveedor. Al término de la reacción se le añadieron 2 unidades de DNasa I RNasa-free (Roche) y se incubó durante 1 hora a 37°C. Para purificar el RNA del peso esperado, la reacción se corrió en un gel de poliacrilamida al 6% en condiciones desnaturalizantes; se cortó la banda prioritaria y se extrajo el RNA agregando 3 volúmenes de amortiguador de extracción (0.3 M de acetato de sodio, 0.5 mM de EDTA pH 8 y 0.1% de SDS) e incubando toda la noche a 48°C en agitación. El RNA se recuperó precipitándolo con 3 volúmenes de etanol absoluto e incubando toda la noche a 20°C. Posteriormente este RNA se resuspendió en H<sub>2</sub>O DEPC y se marcó radiactivamente.

Para los ensayos de entrada de siRNA se utilizaron siRNAs comerciales contra tirosinasa (5' aag aat gct gcc cac cat gga3' y su secuencia complementaria).

El marcaje radiactivo de dsRNA largos y siRNA se realizó utilizando la enzima T4 polinucleótido-cinasa (Invitrogen) y [<sup>32</sup>P]ATP (Amersham Biosciences) como lo indica el proveedor. Posteriormente los nucleótidos libres se eliminaron por columnas (MicroSpin™ Columns; Bioscience): G-25 para limpiar los siRNAs marcados y G-50 para los dsRNA de 807 pb. Para hibridar el RNA marcado, este se incubó en amortiguador de hibridación (100 mM de acetato de potasio, 30 mM de HEPES-KOH a pH 7.4, 2 mM de acetato de magnesio) como previamente se ha descrito (Elbashir et al., 2001), se calentó a 92°C por 10 minutos y se incubó a 37°C toda la noche.

#### ***Ensayos de entrada de dsRNA y siRNA.***

Veinticuatro horas post-transfección, las células se tripsinizaron y se sembraron en cajas de 24 pozos a la confluencia indicada a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente las células se lavaron con PBS y se incubaron con medio DMEM sin suero en presencia de siRNA (21 pb) o dsRNA (807 pb) a una concentración de 250 ng/ml y 200 ng/ml respectivamente por 1 hora ó 6 horas a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado el tiempo de incubación, el medio se recuperó como referencia y las células se lavaron 1 vez con PBS frío. Enseguida las células se incubaron con tripsina al 0.25% en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. Las células ya despegadas se pasaron a tubos *ependorf* y se lavaron 3 veces con PBS frío. La *pastilla* celular se resuspendió en SDS 0.1% y se cuantificó la marca radiactiva en con un contador de centelleo.

El número de cuentas por minuto (CPM) se normalizó con la concentración de proteínas de cada pozo.

#### ***Localización intracelular.***

La localización subcelular se determinó con células fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4%.

Para esto, después de 24 horas de transfección las células se tripsinizaron para sembrar 0.5 X 10<sup>6</sup> células en cubreobjetos previamente preparados con poli-L-lisina (PLL), los cuales se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente las células se lavaron con amortiguador de fosfatos (PBS) y se fijaron con PFA al 4% a temperatura ambiente; después de 10 minutos las células se lavaron 3 veces con PBS.

Para marcar el núcleo celular utilizamos el marcador de DNA 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) por 2 minutos a temperatura ambiente.

En los ensayos de colocalización subcelular se utilizaron marcadores de membrana, de retículo endoplásmico y de complejo de Golgi.

Para marcar la membrana celular se utilizó el colorante lipofílico FM 4-64. Para esto, cuarenta y ocho horas post-transfección, las células se incubaron con 5 µg/ml del marcador FM 4-64 y se observaron al microscopio.

El marcaje del retículo endoplásmico se llevó a cabo utilizando el marcador de retículo ER-tracker Blue - White DPX (Molecular Probes). Para esto 24 horas post-transfección 0.5 X 10<sup>6</sup> células se sembraron en cubreobjetos preparados con PLL y se incubaron a 37°C. Al día siguiente las células se lavaron con medio de Hank (Gibco) adicionado con 2 mM de calcio sin suero y se incubaron por 30 minutos a 37°C con una solución 2 µM de ER-tracker Blue -White DPX. Posteriormente este medio se cambió por PBS y las células se incubaron por 30 minutos a 37°C. Finalmente las células se fijaron con PFA 4%.

Para determinar la localización del complejo de Golgi se realizaron ensayos de inmunocitoquímica. Veinticuatro horas post-transfección las células se sembraron en cubreobjetos previamente tratados con PLL y se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente las células se lavaron con PBS y se fijaron con PFA al 4% por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las células se lavaron con PBS (3 lavados de 5 minutos cada uno) y se incubaron en una solución de 3% de suero bovino fetal (SBF) y 0.3% de Tritón X-100 en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo las células se lavaron con PBS (3 lavados de 5 minutos cada uno) y se incubaron con 2 µg/ml del anticuerpo anti-golgina 97 por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Enseguida las células se lavaron con PBS (3 lavados de 5 minutos cada uno) y se incubaron con el anticuerpo anti-ratón-Cy5 en una solución de 1% de albúmina sérica bovina (BSA)/PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación las células se lavaron con PBS (3 lavados de 10 minutos cada uno). El núcleo celular se marcó con DAPI, como se mencionó anteriormente.

Todas las preparaciones se analizaron utilizando el microscopio confocal Olympus FV1000.

### *Anticuerpos*

Anti-EGFP. Para detectar la proteína fluorescente verde (GFP), se utilizó el anticuerpo policlonal de Biosciences Living Colors Full-Length producido en conejo (número de catálogo 632460). Este anticuerpo reconoce la forma nativa y desnaturalizada de la proteína recombinante EGFP, así como sus formas recombinantes EYFP, ECFP, AcGFP, y proteínas de fusión.

Anti-FLJ20174. Para detectar la proteína FLJ20174 se utilizó un anticuerpo policlonal específico. Para esto, la compañía ZYMED seleccionó una región del FLJ20174 inmunogénica y específica la cual corresponde a la secuencia **MFLYLSDLRSKDRR** (Figura 5). Se sintetizó este péptido y se inyectó a un conejo. El suero obtenido de este conejo fue usado para identificar la proteína FLJ20174.



**FIGURA 5.** Modelo donde se representa la localización del epítipo contra el cual se generaron los anticuerpos anti-FLJ20174. Este epítipo no se presenta en la secuencia de la proteína CGI-40 de *Homo sapiens*; mientras que sí se encuentra en la secuencia de la proteína FLJ20174 de *Homo sapiens* y de *Mus musculus*. Las regiones en negro muestran los dominios predichos como transmembranales.

Anti-conejo-HRP. Para detectar el anticuerpo de conejo se utilizó el anticuerpo comercial de ZYMED (ZyMax Goat anti-Rabbit IgG H+L HRP conjugate).

Anti-golgina-97. El anticuerpo, utilizado para los ensayos de inmunocitoquímica se obtuvo de Molecular Probes (número de catálogo A-21270). Este anticuerpo es de tipo monoclonal, producido en ratón y reconoce a la proteína humana de 97 kDa llamada golgina 97. Esta proteína se localiza en la periferia de la cara citoplasmática de la membrana del aparato de Golgi.

***Purificación del anticuerpo anti-FLJ20174.***

Para limpiar el anticuerpo anti-FLJ20174 y el suero preinmune, utilizamos el kit MONTÁGE®Antibody Purification PROSEP-A. Para esto se equilibraron las columnas con amortiguador de unión (1.5 M glicina/NaOH, 3 M NaCl, pH 9.0) y posteriormente se colocó en la columna el suero prefiltrado y diluido 1:1 con amortiguador de unión. La columna se centrifugó y se lavó con amortiguador de unión para remover los contaminantes no unidos. Para eluir los anticuerpos, se colocó en la columna 10 ml de amortiguador de elución (0.2 M de glicina/HCl pH 2.5) y al volumen eluido se le agregó 0.1 volúmenes de amortiguador de neutralización (1 M de tris/HCl, pH 9) para neutralizar el pH.

## RESULTADOS

### Análisis de la secuencia de la proteína FLJ20174.

En el estudio publicado por Winston y cols., (2002), se reporta la existencia de homólogos de SID-1 en humanos (CGI-40 y FLJ20174). En este trabajo se reportó que el extremo carboxilo terminal de la proteína FLJ20174 tiene un 28% de identidad y un 47% de similitud con el extremo carboxilo terminal de SID-1; mientras que CGI-40 tiene un 27% de identidad y un 48% de similitud con este mismo fragmento (Figura 3). Con este antecedente se decidió estudiar si una de estas proteínas homólogas, la proteína FLJ20174, es capaz de favorecer la entrada de dsRNA a células de mamífero.

La secuencia del cDNA *flj20174* fue reportada en 2004 al secuenciar los cDNAs presentes en el colon humano (Strausberg et al., 2002). Posteriormente también se reportó la existencia de este cDNA en células de cáncer de mama y de ovario, presentándose incluso como una posible proteína marcadora de estos tipos de cáncer (Ferguson et al., 2005).

El gen que da lugar al FLJ20174 se encuentra en el cromosoma 3 (3q13.2). Se predice que en su secuencia contiene 25 exones que al transcribirse y procesarse da lugar a un mRNA de 4614 nt. La proteína FLJ20174 que se traduce de este mRNA, es de 827 aa y tiene un peso molecular predicho de 91.7 kDa.

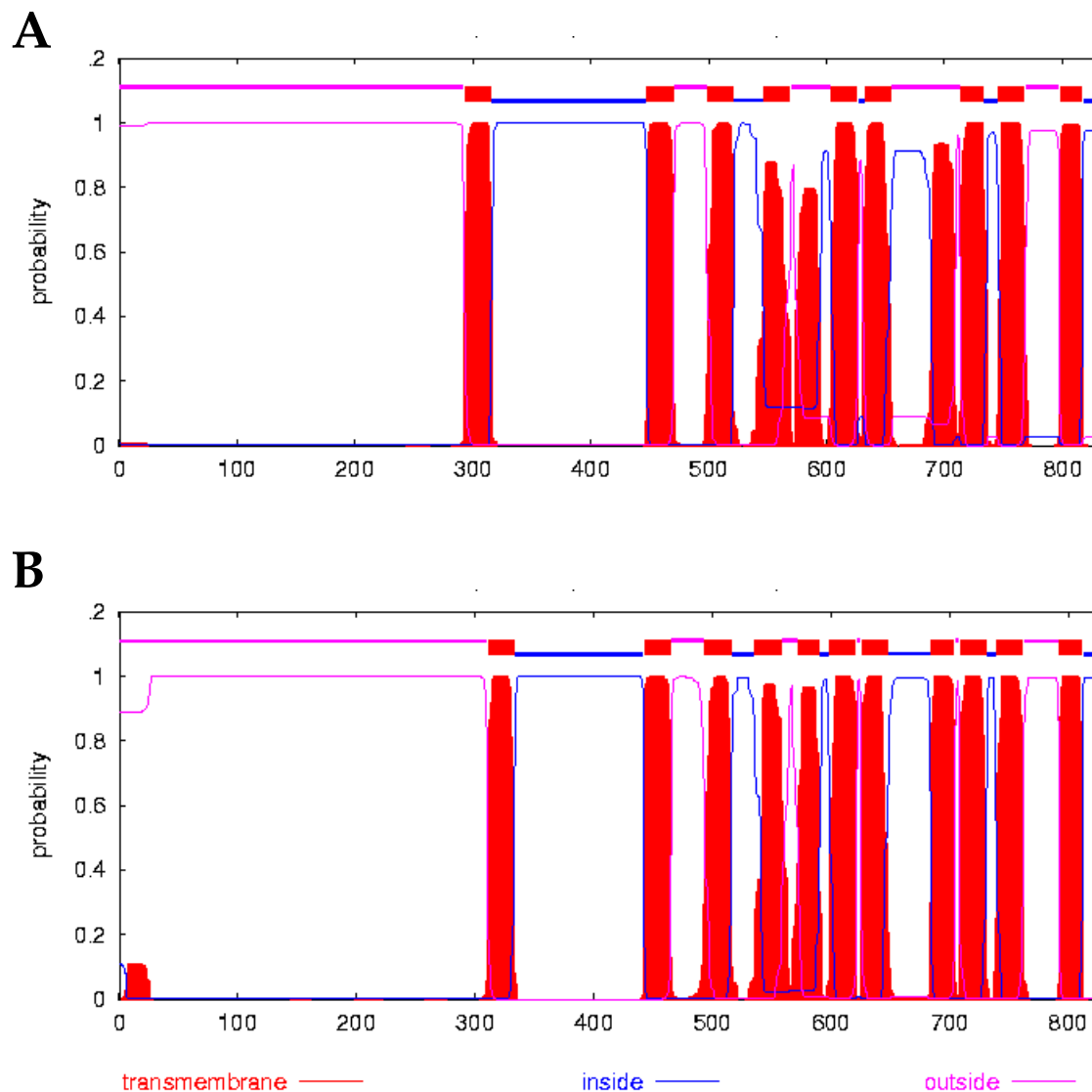
En el análisis realizado por Winston y cols. (2002), este grupo alinea únicamente un fragmento de estos supuestos homólogos -aproximadamente el 45% del total de la secuencia proteica de SID-1, contra aproximadamente el 40% de la secuencia proteica de FLJ20174- comparando así poco menos que la mitad de la secuencia de estas proteínas. Por esto, en primer lugar realizamos un alineamiento global de la secuencia de SID-1 con la de FLJ20174 utilizando el servidor EMBL-EBI (Figura 6). Con este alineamiento se encontró que el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias es del 16%. Como pensábamos, se observó que los extremos carboxilo terminal son los que presentan mayor identidad y similitud en su secuencia de aminoácidos.

Actualmente sabemos que existen proteínas que pueden realizar la misma función, pero cuya secuencia de aminoácidos difiere considerablemente. Dado que la proteína SID-1 es una proteína de membrana, se decidió realizar un análisis computacional de los dominios transmembranales de ambas proteínas y compararlas (Figura 7). De esta forma, se encontró que la proteína FLJ20174, al igual que SID-1, se predice como una proteína de membrana celular con 11 dominios transmembranales; ambas presentan un péptido señal que las envía a la vía secretora y una secuencia amino-terminal extracelular de aproximadamente el mismo tamaño (302 aa en el caso de SID-1 y 290aa en FLJ20174).



SID-1 FLJ20174	MIRVYLIIIMHLVIGLTQNNSTTPSPITSSNSSVLVFEISSKMKMIEKKLEANTVHVLR 60 -MRGCLRLLALLCALPWLLLAASPGHPAKSFRQPAPRRDPFDAARGADFDHVYSGVVNLS 59 :* * : : . : : : * : . : . : . : . : . : . : * *
SID-1 FLJ20174	LELDQSFILDLTQVAEIVDSSKYSKEDGVILEVTVSNGRDSFLLKLPVYVNLKLYTDG 120 TENIYSFNYSQPDQVAVRVVYVNSSSENLYNPVLVVVRQQKEVLSWQVPLLFQGLYQR- 118 * ** . * * . : : * * : : . : . : **
SID-1 FLJ20174	KLLNPLVEQDFGAHRKRHRIGDPHFHQLIVTVQSRNLADIDYRLHVTHLDRAQYDFLKF 180 SYNYQEVSRITLCPSEATNETGP--LQQLIFVDVAMAPLGAQYKLLVTKLK----HFQL 171 . * : : . : . : * : : * * * * . : * * * * . : : :
SID-1 FLJ20174	KTGQTTKTLNQLTFVKPIGFFLNCSEQNISQFHVTLYSEDDICANLITVPANESIYDR 240 RTNVAFHFTASPSQPQYFLYKFKDVSVLIKVVSEMAPCSVSVQVQINMCPVYDLDHN- 230 : * : : : . : . : * : . . * . . * . . : : : * * . : : :
SID-1 FLJ20174	SVISDKTHNRRVLSFTKRADIFFTETEISMFKSFRIFVFIAPDDSGCS----TNTSRKS 295 ----VEFNGVYQSMTKKAAITLQKDKDFPGEQ-FVVFVVIKPEDYACGGSFFIQQEKENQT 284 . * * * * * * : : : : : * : : * * * * . * . : : : :
SID-1 FLJ20174	FNEKKISFEFKLE--NQSYAVPTALMMIFLTPCLL-----FLPIVINIKNR 344 WNLQRKNLEVTIVPSIKESVYVKSFLSVFIFLSFYLGCLLVGFVHYLRFQRKIDGSF 344 : * : * : * . : . : : * * * : : * : : * : : . : * : : * : * *
SID-1 FLJ20174	KLAPSQSNLISFSPVPS--EQRDMDLSHDEQNTSSELENNGEIPAAENQIVEEITAEN 401 GSNDGSGNMVASHPIAASTPEGSNYGTIDESSSPGRQMSSSDGGPPGQSDTDSVVEESD 404 . . . * : : * : : * : . . : . : . : : . : . : * . : : . : . : :
SID-1 FLJ20174	QETS--VEEGNREIQVKIPLKQDSLHLG-----QMLQYPVAIILPVLMTAIEF 449 FDTMPDIESDKNIIRTKMFLYLSDLRKRDRRIVSKKYIYFWNIIITIAVFYALPVIQLVI 464 : * : * . : . : * : * : * . * * : . : : : . : : * : : :
SID-1 FLJ20174	HKWTTSTMANRDEMCFHNHACARPLGELRAWNNIITNIGYTLGAI FIVLSICR----- 503 TYQTVVNVGTGNQDICYNFLCAHPLGVLSAFNNILSNLGHVLLGFLFLLIIVLRDILHRR 524 * . : : : : : : *
SID-1 FLJ20174	--RGRHEYSHVFGTYECTLLDVTIGVFMVLQSIASATYHICPSDVAQFDTPCIQVICGL 561 ALEAKDIFAVEYGIKHFGLFYAMGIALMMEGLSACYHVC PNYSNFQFDTSFMYMIAGL 584 . . : . : : * : : * : : * : : : : * * * * * * * * * * * * . : : * * *
SID-1 FLJ20174	LMVRQWVVRHESP-SPAYTNILLVGVVSLNFLISAFSKTSYVRFIIAVIHVIVVGSICLA 620 CMLKLYQTRHPDINASAYSAYASFAVVIMVTVLGVVFGKNDVWFVWVIFSAIHVLASLALS 644 : * : : * * . : : * * : : * * : : : . . . * * : . : * : * * * * :
SID-1 FLJ20174	KERS-LGSEKLRTRFF-----IMAFSMGNFAAIVMYLTLASF 656 TQIYYMGRFKIDLGI FRRAAMVFYTDICIQQCSRPLYMDRMVLLVVGNLVNWFSALFLIY 704 : . : * * * . : * : : : : : : : : : : * * * * * * : : * * * * :
SID-1 FLJ20174	HLNQIATYCF--IINCIMYLMYCGMKVLHSE RITSKAKLGCALSLLAWAVAGFFFFQD 713 RPRDFASYMLGIFICNLLLYLAFYIIMKLRSEKVLVPLFCIVATAVMWAAALYFFFQN 764 : . : * * * : * * : * * * * * * * * * * * * : . : * * * * * * * * * * :
SID-1 FLJ20174	DTDWTRSAASRALNKPCLLLGFFGSHDLWHIFGALAGLFTFIFVSVFVDDDLINRKTSTI 773 LSSWEGTPAESREKNRECILLDFDHDHWHFLSATALFFSFLVLLTLDLDDLVVRRDQI 824 : * : * * * * : *
SID-1 FLJ20174	NIF 776 PVF 827 : *

**FIGURA 6.** Alineamiento global de la proteína SID-1 (*C. elegans*) y de la proteína FLJ20174 (*Homo sapiens*). Con asterisco (\*) se señalan los aminoácidos idénticos; (:) muestra sustituciones conservadas y con (•) se muestran sustituciones semiconservadas. En subrayado se muestran las regiones predichas como transmembranales. La mayor identidad en la secuencia de aminoácidos se observa en el extremo carboxilo terminal de estas proteínas. Este análisis se obtuvo con el servidor EMBL- EBI basándose en la secuencia de aminoácidos de las proteínas SID-1 (número de acceso del GenBank AAL78657) y FLJ20174 (número de acceso del GenBank NP\_060169).



**FIGURA 7.** Predicción de dominios transmembranales de **(A)** SID-1 y **(B)** FLJ20174 de humano (hFLJ20174). Estos datos se obtuvieron del servidor ExPASy Proteomics tool con el programa TMHMM basándose en la secuencia de aminoácidos de estas proteínas.

Dado el porcentaje de identidad entre el extremo C-terminal de SID-1 y FLJ20174 y la similitud en el patrón de hidrofobicidad de ambas proteínas, se decidió estudiar si la proteína FLJ20174 se comporta de forma similar a SID-1 y es capaz de favorecer la entrada de dsRNA a las células.

### **Expresión de la proteína de fusión FLJ20174-GFP en células de mamífero.**

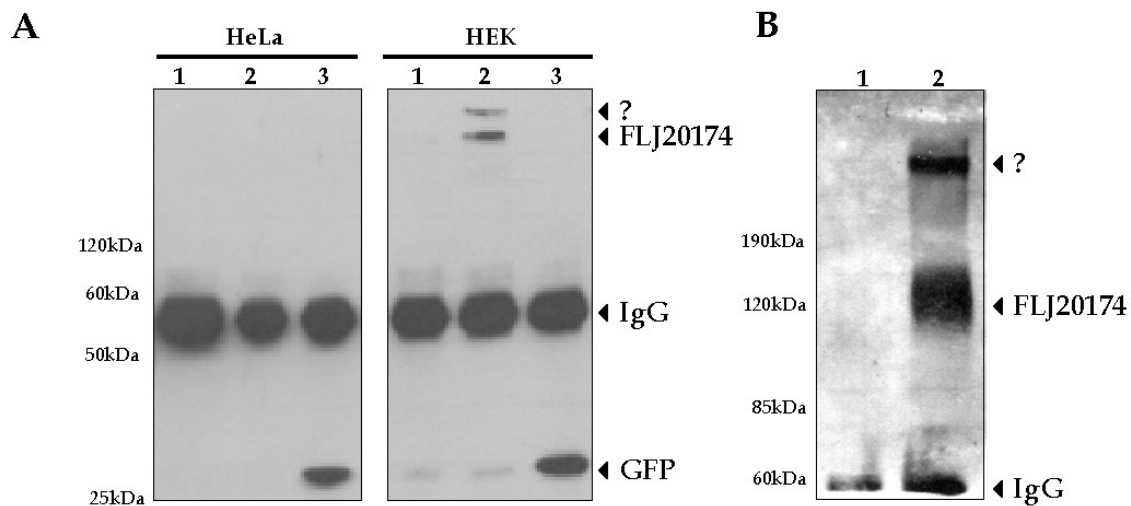
Para estudiar a la proteína FLJ20174, se decidió expresarla en células de mamífero. Para esto, se obtuvo la clona COL09863 que contiene el gen *hflj20174* del la colección *full-length Japan* (FLJ). Posteriormente este gen se introdujo en el plásmido comercial pEGFP-N1 de tal forma que el gen *flj20174* quedó fusionado en su extremo 3' con el gen de la proteína fluorescente verde (*gfp*). Así, se predice que en la proteína de fusión FLJ20174-GFP, la GFP quedaría en el citoplasma celular y el largo extremo amino terminal queda de forma extracelular. Este plásmido permitiría estudiar la expresión de la proteína FLJ20174-GFP en células de mamífero y la localización subcelular de la misma.

Inicialmente, se realizaron transfecciones transitorias en líneas celulares de mamífero comúnmente utilizadas en el laboratorio: HEK (células de riñón de embrión humano) y HeLa (células de adenocarcinoma de cérvix humano) y se intentó detectar por Western blot a la proteína de fusión.

Al analizar los extractos totales de estas células nunca se observó a la proteína FLJ20174-GFP (118.1 kDa), sin embargo al observar las células transfectadas bajo el microscopio, se observaron células fluorescentes, aunque pocas.

Ya se había observado en el laboratorio que las proteínas de fusión se expresan mucho menos que la proteína EGFP sola, aunado al hecho de que la fluorescencia que observamos fue tenue, pensamos que el problema podría ser que la proteína de fusión se estaba expresando poco. Para aumentar la concentración de la proteína de fusión en el ensayo, se decidió realizar inmunoprecipitaciones de los extractos utilizando el anticuerpo contra EGFP seguido por ensayos tipo Western blot con este mismo anticuerpo. Aun en estas condiciones, no se logró observar a la proteína de fusión en extractos de células HeLa transfectadas con el plásmido pFLJ20174-GFP (Figura 8A). Por el contrario, en células HEK transfectadas con este mismo plásmido se observaron 2 bandas; una de estas parece corresponder a la proteína de fusión FLJ20174-GFP (118.1 kDa) mientras que la otra es una proteína de alto peso molecular (más de 190 kDa) que también es reconocida por el anticuerpo contra GFP (Figura 8A y 8B). Se piensa que esta banda puede ser un conglomerado de la proteína de fusión o complejos multiproteicos cuyo peso molecular exacto no logramos determinar.

La proteína FLJ20174-GFP se observa en estos ensayos, como una banda poco definida y con un peso molecular ligeramente mayor al esperado (>120 kDa). Lo anterior hace suponer que esta proteína presenta modificaciones post-traduccionales como podría ser la glicosilación de algunos residuos.



**FIGURA 8.** Expresión de la proteína de fusión FLJ20174-GFP en células de mamífero. La figura muestra ensayos de inmunoprecipitación seguidos de ensayos tipo Western blot de extractos de células transfectadas transitoriamente. La inmunoprecipitación se realizó con anticuerpos contra EGFP y el Western blot se realizó con estos mismos anticuerpos. **(A)** Extractos de células HeLa y HEK. 1. *Wild type* 2. Transfectadas con el plásmido pFLJ20174-GFP. 3. Transfectadas con el plásmido pEGFP-N1. Gel de poliacrilamida al 10%. **(B)** Extractos de células HEK transfectadas transitoriamente. 1. Transfectadas con el plásmido pEGFP-N1. 2. Transfectadas con el plásmido pFLJ20174-GFP. Gel de poliacrilamida al 7%.

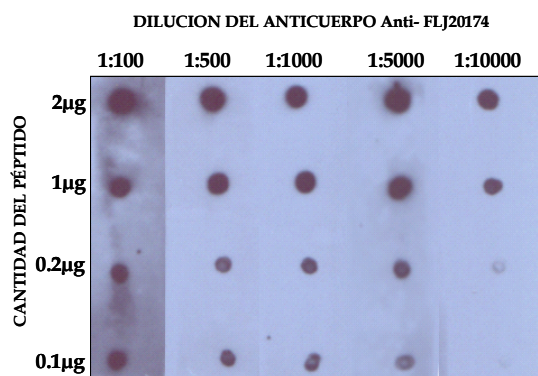
En conjunto los datos anteriores indican que la proteína de fusión FLJ20174-GFP se está expresando en células HEK y que al menos una fracción de ésta se encuentra formando complejos de alto peso molecular (aunque es posible que estas aglomeraciones se produzcan durante el proceso de homogenización celular). En la línea celular HeLa no se logró identificar la proteína de fusión, probablemente debido a la baja eficiencia de transfección obtenida.

#### Anticuerpo anti-FLJ20174

En un intento por trabajar con la proteína FLJ20174 sola, se quiso obtener anticuerpos contra esta proteína y así seguir su expresión en células de mamífero y localización subcelular. En el laboratorio no se cuenta con anticuerpos contra esta proteína y evidentemente, tampoco los ofrece ninguna compañía.

Para poder estudiar la proteína FLJ20174 endógena, se mandaron a hacer anticuerpos contra ésta. La compañía ZYMED seleccionó una región inmunogénica y específica e inmunizó conejos con este péptido. La región seleccionada abarca a los aminoácidos 422 al 435, los cuales corresponden al dominio citoplasmático entre el primero y el segundo dominio transmembranal. Este péptido se conserva en la secuencia de FLJ20174 de humano y de ratón lo que permitiría trabajar con células de ambos organismos.

En un análisis inicial de Dot blot utilizando el péptido contra el que se hicieron los anticuerpos, se observó que en una dilución 1:10 000 los anticuerpos reconocen hasta 1  $\mu$ g del péptido contra el cual está generados (Figura 9).



**FIGURA 9.** Ensayo tipo Dot blot realizado para determinar la sensibilidad del anticuerpo anti-FLJ20174 al péptido contra el cual fue producido. El péptido MFLYLSDLRKRDRR se goteó a distintas concentraciones en una membrana de nitrocelulosa y se detectó con distintas diluciones del anticuerpo anti-FLJ20174.

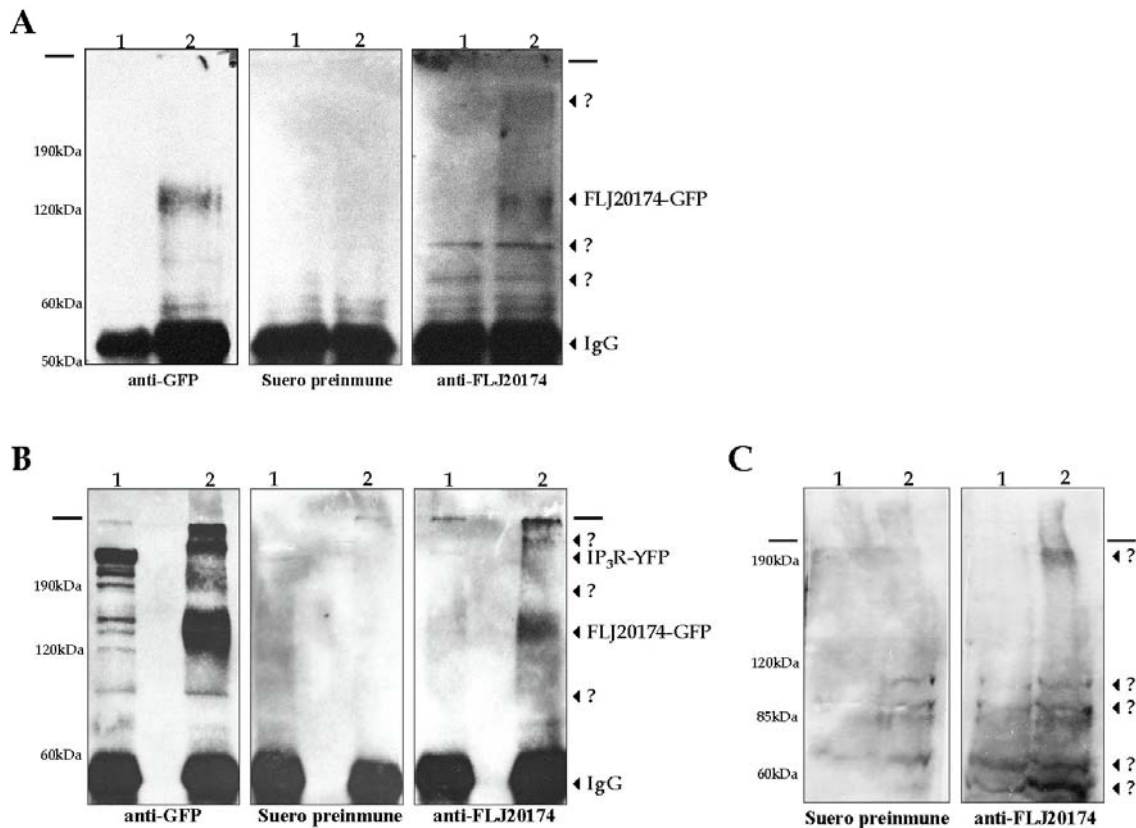
Para determinar si este anticuerpo reconoce a la proteína de fusión, se hicieron diversos ensayos con extractos de células HEK transfectadas de manera transitoria. Se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-EGFP y se realizó un Western blot con anticuerpos anti-EGFP, anti-FLJ20174 o con el suero preinmune. En estos ensayos fue muy difícil observar una proteína específica. Utilizando una dilución del anticuerpo anti-FLJ20174 de 1:250, se logró ver una banda muy tenue que pudiera corresponder a la proteína de fusión (Figura 10A).

Para disminuir el fondo observado, se decidió limpiar el suero utilizando proteína Agarosa, recuperando únicamente los anticuerpos. Con este suero purificado se repitieron los ensayos de inmunoprecipitación seguida de Western blot, aunque en esta ocasión se utilizaron, como control negativo, células que expresan de forma transitoria a la proteína IP<sub>3</sub>R-YFP (288 kDa). Esta proteína de fusión también es reconocida por los anticuerpos anti-EGFP, pero no debería ser detectada por los anticuerpos anti-FLJ20174.

De esta forma, se observó una banda correspondiente a la proteína de fusión FLJ20174-GFP reconocida por los anticuerpos anti-FLJ20174 (Figura 10B); como se esperaba, estos mismos anticuerpos no reconocen a la proteína IP<sub>3</sub>R-YFP.

Aunque los anticuerpos anti-FLJ20174 reconocen a la proteína de fusión en fracciones celulares inmunoprecipitadas, estos fueron incapaces de reconocer esta proteína en homogenados celulares totales (Figura 10C). En estos homogenados, los anticuerpos anti-FLJ20174 reconocen diversas proteínas de forma inespecífica (también reconocidas por el suero preinmune); en los homogenados de células transfectadas con el plásmido pFLJ20174-GFP, los anticuerpos anti-FLJ20174 reconocen una banda de un peso molecular tal que no puede entrar al gen de corrida; pero no se logró identificar a la proteína

FLJ20174-GFP. Debido a la baja afinidad de los anticuerpos anti-FLJ20174 para reconocer a esta proteína en extractos totales, se decidió seguir trabajando con la proteína de fusión FLJ20174-GFP.



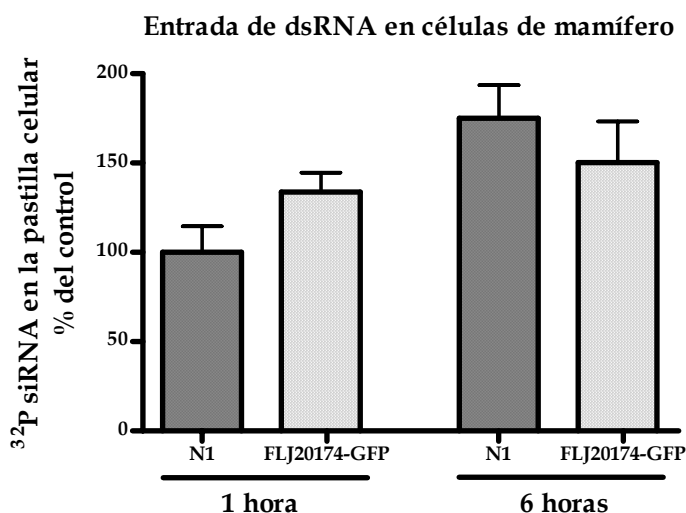
**FIGURA 10.** Diferentes ensayos realizados para probar el anticuerpo anti-FLJ20174. **(A)** Homogenados de células HEK transfectadas de forma transitoria, 1. pEGFP-N1. 2. pFLJ20174-GFP; se sometieron a una inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-EGFP seguida por ensayos tipo Western blot utilizando distintos anticuerpos. **(B)** Homogenados similares tratados de igual manera que en A; 1. pIP<sub>3</sub>R-YFP. 2. pFLJ20174-GFP. En esta ocasión el Western blot se realizó con anticuerpos purificados disueltos en leche al 3%/TBS. **(C)** Extractos totales de células HEK transfectadas de forma transitoria 1. pEGFP-N1. 2. pFLJ20174-GFP. Las proteínas mayores de 30 kDa se concentraron por centricon y se sometieron a un Western blot aplicando 50µg de proteína por carril. En todos los casos los anticuerpos se usaron a las mismas diluciones: anti-EGFP se diluyó 1:5000 en TBS; anti-FLJ20174 y el suero preimmune se diluyeron 1:250 en TBS.

### Ensayos de entrada de dsRNA a células de mamífero

Como ya se ha mencionado, Hunter encuentra que la expresión de SID-1 en células de *D. melanogaster* (insecto que supuestamente no presenta RNAi sistémico) es suficiente para aumentar de forma significativa la entrada de dsRNA a estas células. Esta entrada es rápida (evidente desde los primeros 5 minutos), independiente de ATP y no sensible a la temperatura (Feinberg and Hunter, 2003). Estos datos hacen suponer que SID-1 funciona formando un canal, que permite directamente la entrada de dsRNA a las células o que participa junto con elementos no identificados -presentes en las células S2 y cl-8 de *D. melanogaster*- para favorecer la entrada de dsRNA a estas células.

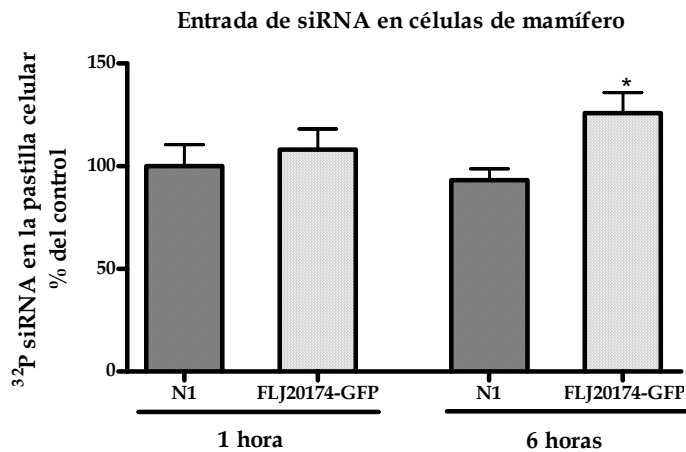
En este mismo trabajo se reportó que la proteína de fusión SID-1-GFP, expresada en *C. elegans*, es capaz de restablecer el efecto sistémico cuando SID-1 está mutado (Winston et al., 2002), lo que hace suponer que esta construcción es funcional. Por esto, se decidió utilizar la construcción FLJ20174-GFP para realizar los ensayos de transporte y al mismo tiempo determinar la localización subcelular de la proteína FLJ20174.

Como sabemos, SID-1 parece tener una mayor afinidad por dsRNA grandes (50 pb -500 pb); sin embargo la introducción de dsRNAs mayores de 25 pb causa en células de mamífero una inhibición global de la traducción (Sledz and Williams, 2004). A pesar de esto, se decidió analizar la entrada de dsRNA grandes (807 pb) -sin estudiar el efecto inhibitorio de mRNAs debido a esta entrada-, en células transfectadas con el plásmido pEGFP-N1 (control) o con el plásmido pFLJ20174-GFP. Para esto se sintetizó dsRNA de 807 pb y lo se marcó en los extremos 5' con ATP radiactivo como se mencionó anteriormente. Este dsRNA se incubó con células que expresan la GFP sola (N1) o la proteína de fusión FLJ20174-GFP por 1 hora ó por 6 horas. En estos estudios no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las células control y las que expresan la proteína de fusión FLJ20174-GFP en ninguno de los dos tiempos analizados (Figura 11).



**FIGURA 11.** Entrada de dsRNA (807 pb) a células HEK N1 y HEK FLJ20174-GFP. Cuarenta y ocho horas post-transfección las células se incubaron en medio DMEM sin suero con 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de dsRNA por 1 hora ó por 6 horas. Después de este tiempo, las células se lavaron con PBS y se incubaron con tripsina 0.25%/PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. La *pastilla* celular se lavó 3 veces con PBS frío y para finalizar se resuspendió en SDS 0.1%. La radiactividad se contó en un contador de centelleo y se normalizó con el contenido total de proteínas. En la figura se muestran las CPM/ $\mu\text{g}$  de proteína expresadas como porcentaje del control pEGFP-N1 durante la primera hora de incubación. Este ensayo se realizó por triplicado y se presentan como promedios  $\pm$  desviación estándar. La presencia de la proteína de fusión FLJ20174-GFP no modificó de forma significativa ( $p > 0.05$ ) la entrada de dsRNA después de una ó 6 horas de incubación con respecto a su control.

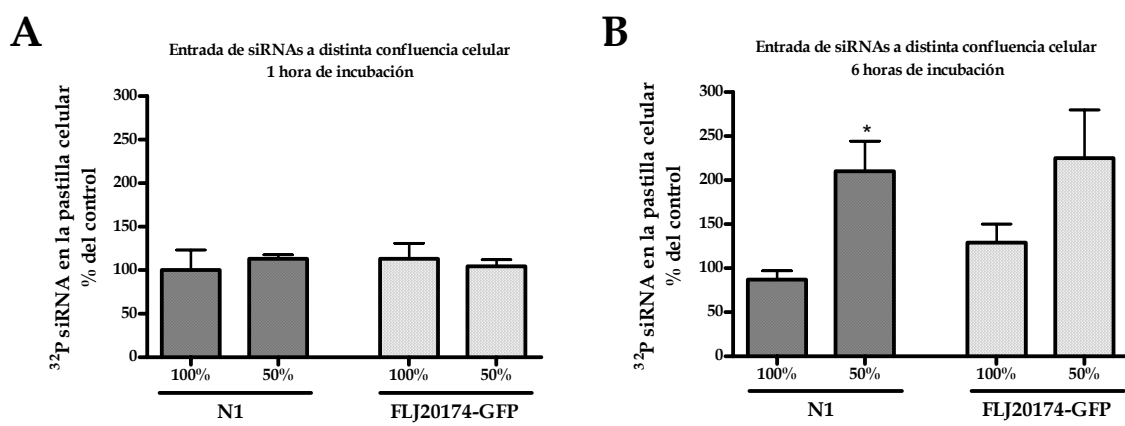
Ya que las moléculas fisiológicamente activas en células de mamífero no son dsRNA grandes, sino siRNAs, es lógico pensar que las proteínas de transporte de dsRNA en células de mamífero sean más eficientes para transportar dsRNAs pequeños. Por esto se realizaron ensayos de entrada utilizando siRNAs en las mismas condiciones que las utilizadas para los ensayos de dsRNA grandes. Al analizar la entrada de siRNAs después de 1 hora de incubación no se encontraron diferencias significativas entre las células que expresan GFP y las que expresan la proteína FLJ20174-GFP (Figura 12). Por otro lado después de 6 horas de incubación se encontró que las células que expresan la proteína de fusión FLJ20174-GFP introducen un poco más siRNAs que las células que expresan GFP sola. Sin embargo cabe mencionar que esta diferencia no es comparable con las diferencias encontradas en células S2 debidas a SID-1, donde se observan aumentos de 10 órdenes de magnitud. El hecho de que la entrada debida a FLJ20174 se observe hasta después de 6 horas de incubación nos indica también que, en todo caso, FLJ20174 no funciona de la misma forma que SID-1.



**FIGURA 12.** Entrada de siRNAs a células HEK N1 y HEK FLJ20174-GFP. Cuarenta y ocho horas post-transfección las células se incubaron en medio DMEM sin suero con 0.25 µg/ml de siRNAs por 1 hora ó por 6 hora. Después de este tiempo, las células se lavaron con PBS y se incubaron con tripsina 0.25%/PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. La *pastilla* celular se lavó 3 veces con PBS frío y para finalizar se resuspendió en SDS 0.1%. La radiactividad se contó en un contador de centelleo y se normalizó con el contenido de proteínas total. En la figura se muestran las CPM/µg de proteína expresadas como porcentaje del control pEGFP-N1 durante la primera hora de incubación. Este gráfico es el resultado de dos ensayos realizados de forma independiente donde cada ensayo se realizó por triplicado. Aquí los presentamos como promedios ± desviación estándar (n=6). En el ensayo se observa que las células que expresan la proteína de fusión FLJ20174-GFP después de 6 horas de incubación, permiten la entrada de 30 % más siRNAs (\* p<0.05) con respecto a su control.



En 1999 el grupo de Bernard Lebleu, estudiando la entrada de oligonucleótidos antisentido (DNA de una sola hebra) en queratinocitos, encontró que esta entrada es rápida, irreversible, saturable e independiente de la temperatura (Laktionov et al., 1999; Noonberg et al., 1993). Sin embargo, esta entrada es detectable únicamente cuando el ensayo se realiza en células que crecen a baja confluencia (30-50% de confluencia celular). La similitud de esta entrada con la entrada debida a SID-1, nos hizo pensar que probablemente la baja eficiencia observada en el ensayo se debe a la confluencia celular con la que realizamos nuestros experimentos (100% de confluencia celular); por esto se repitió el análisis en cultivos de distinta confluencia celular (Figura 13).



**FIGURA 13.** Entrada de siRNAs a células HEK N1 y HEK FLJ20174-GFP en cultivos de distinta confluencia celular. Cuarenta y ocho horas post-transfección las células se incubaron en medio DMEM sin suero con 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de siRNAs por 1 hora ó por 6 horas. Después de este tiempo, las células se lavaron con PBS y se incubaron con tripsina 0.25%/PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. La *pastilla* celular se lavó 3 veces con PBS frío y para finalizar se resuspendió en SDS 0.1%. La radiactividad se contó en un contador de centelleo y se normalizó con el contenido de proteínas total. Los experimentos se realizaron en cultivos que se encontraban a una confluencia del 50% ó del 100%. En **(A)** se observan los resultados normalizados después de 1 hora de incubación, y en **(B)** se observan los datos después de 6 horas de incubación.

En el gráfico se observa que las células que se incuban a un 50% de confluencia tienden a introducir mayor cantidad de siRNAs (\*  $p < 0.05$ ) después de 6 horas de incubación que estas mismas células cuando crecen a una confluencia del 100%.

Contrario a lo que se esperaba, en los ensayos realizados al 50% de confluencia no se observaron diferencias en la entrada de siRNAs, entre las células que expresan la proteína FLJ20174 y las células control ni a 1 hora ni después de 6 horas de incubación (Figura 13). El aumento que previamente se observó por la presencia de FLJ20174-GFP desaparece, debido a que las células incubadas al 50% de confluencia continúan introduciendo siRNAs después de 1 hora de incubación. Esto indica que el efecto producido por la confluencia celular sobrepasa al efecto producido por la expresión de la proteína FLJ20174-GFP. No se sabe a que se deba este efecto; pero el hecho de que se observe mayor entrada de siRNA

después de 6 horas de incubación indica que este mecanismo de entrada no ha llegado a su equilibrio después de 1 hora.

A pesar de que se observó una pequeña diferencia en la entrada de siRNA cuando las células expresan la proteína de fusión FLJ20174-GFP, sabemos que esta entrada no es comparable - ni en tiempo ni en magnitud- con la entrada debida a SID-1 en células de *Drosophila*. Este resultado puede ser debido a muchas causas: en primer lugar la fusión con la que estamos trabajando tiene a la GFP fusionada al extremo C-terminal de la proteína FLJ20174 -extremo con mayor similitud en secuencia de aminoácidos con SID-1-. Además, tememos que el tamaño de la GFP, por efecto estérico impida la entrada de dsRNA. A pesar del reporte de Hunter de que la proteína de fusión SID-1-GFP es capaz de restituir el efecto sistémico en *C. elegans* mutantes, es posible que esto no ocurra con nuestra proteína de fusión. La baja expresión de la proteína de fusión aunado a una baja eficiencia podría explicar nuestros resultados. Por otro lado, los ensayos de transporte *in vitro* realizados tanto por el grupo de Hunter con SID-1 como por el grupo de Whang con FLJ20174, se realizaron con estas proteínas fusionadas a un epítipo de menor tamaño conocido como FLAG. Hasta la fecha no hemos logrado construir un plásmido que codifique para la proteína FLJ20174-FLAG. Estudios posteriores deberán realizarse con este epítipo para concluir si la proteína FLJ20174 es capaz de aumentar la entrada de dsRNA en cualquier célula de mamífero.

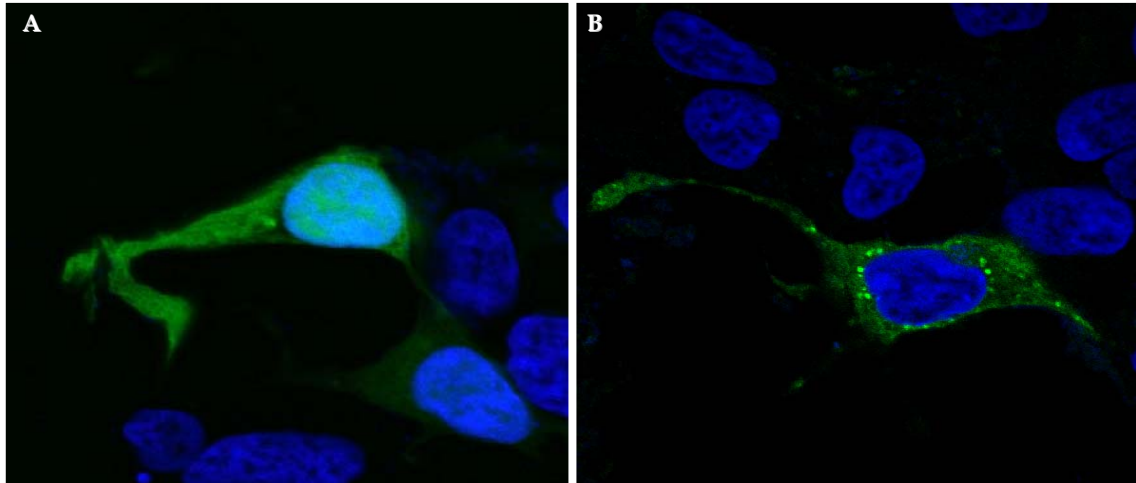
#### **Localización subcelular de la proteína FLJ20174.**

Como sabemos, la función de una proteína está fuertemente relacionada con su localización subcelular. La proteína FLJ20174, al igual que SID-1, contiene una secuencia señal que la dirige a la vía secretora; ninguna de estas proteínas parece tener alguna señal de retención en el retículo endoplásmico o en el complejo de Golgi, ni una señal que las dirija hacia algún otro organelo, por lo que estas proteínas se predicen como proteínas de membrana plasmática.

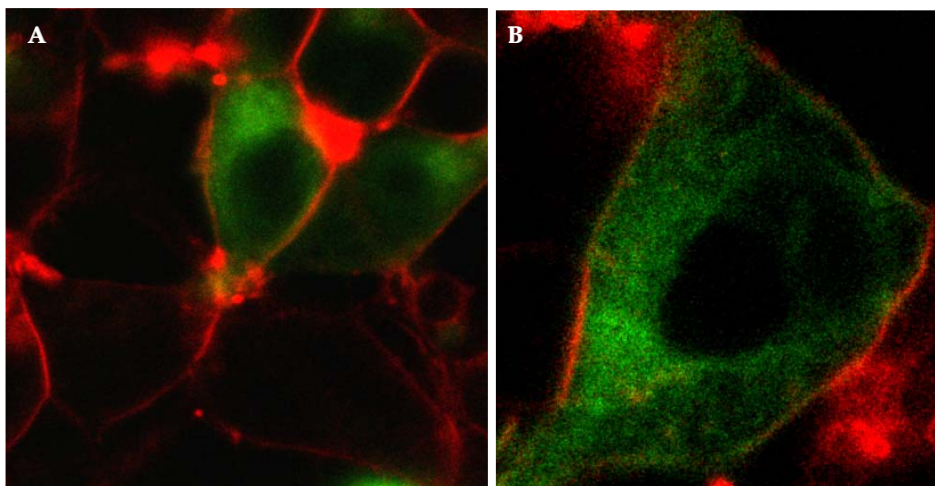
Para determinar la localización subcelular de la proteína FLJ20174, se utilizó la construcción FLJ20174 fusionada a GFP y se transfectó transitoriamente en células HEK para después observarlas al microscopio confocal.

Inicialmente se observó que FLJ20174-GFP se localiza mayoritariamente de forma intracelular en algún compartimiento citoplasmático. Nunca se observó que esta proteína se localice en la membrana celular o en la periferia de la misma (Figura 14). Para confirmar esta observación se incubaron a las células transfectadas con un marcador de membrana plasmática (FM 4-64) y se analizaron al microscopio confocal.

En estos experimentos, en ningún caso se encontró colocalización del FLJ20174-GFP con el marcador de membrana (Figura 15), observándose la señal de fluorescencia de forma intracelular, en estructuras que podría ser el retículo endoplásmico.



**FIGURA 14.** Localización subcelular de la proteína de fusión FLJ20174-GFP en células HEK. **(A)** Células transfectadas con el plásmido control (pEGFP-N1); en verde se muestra la localización de EGFP y en azul el núcleo celular. **(B)** Células HEK 48 horas después de que se transfectaron con el plásmido pFLJ20174-GFP y en azul el núcleo celular. En esta imagen se observa que la proteína EGFP se localiza indistintamente en toda la célula incluyendo el núcleo celular; por otro lado la proteína FLJ20174-GFP se localiza en lo que corresponde a un organelo de citoplasma celular. Nunca observamos que esta proteína se localice en el núcleo ni en la periferia celular.



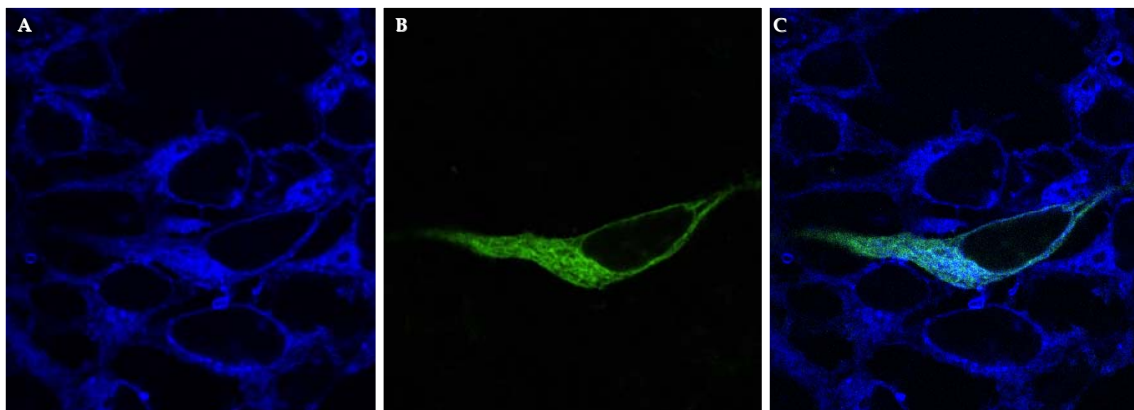
**FIGURA 15.** Localización subcelular de la proteína de fusión FLJ20174-GFP en presencia de un marcador de membrana. Células HEK transfectadas con el plásmido pFLJ20174-GFP se incubaron con el marcador de membrana FM 4-64. **(A)** y **(B)** muestran estas células a diferente aumento. En esta imagen se observa que la proteína FLJ20174-GFP (verde) no colocaliza con el marcador de membrana FM 4-64 (rojo).

Este experimento fue realizado en su totalidad por el alumno de doctorado Víctor Julián Valdés.

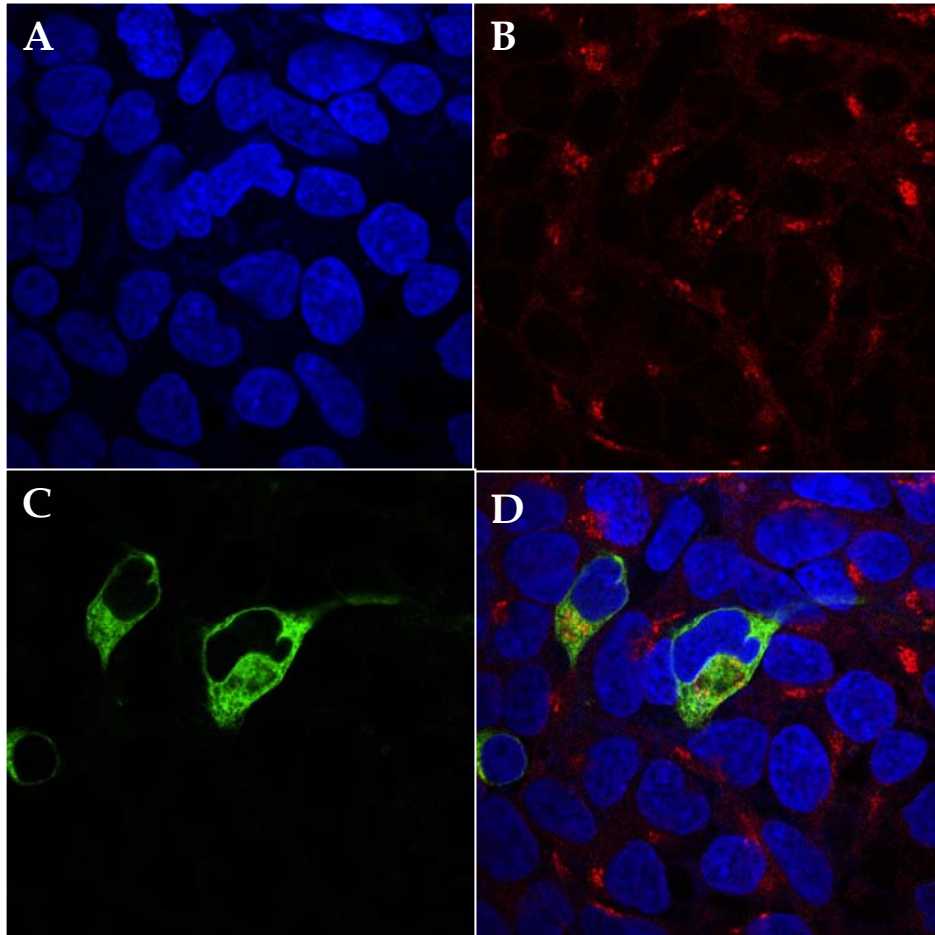
Para determinar en qué organelo se encuentra la proteína de fusión FLJ20174-GFP, se realizaron ensayos de colocalización de esta proteína con marcadores de retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, dos organelos que pertenecen a la vía secretora.

Al hacer estos ensayos se encontró que la proteína de fusión FLJ20174-GFP colocaliza con marcadores del retículo endoplásmico (Figura 16) y del aparato de Golgi (Figura 17), aunque no se descarta que también se localice en otros organelos.

El retículo endoplásmico y el aparato de Golgi son organelos que forman parte de lo que se conoce como la vía secretora. De tal forma que todas las proteínas que deben de localizarse en algún momento o de manera definitiva en la membrana plasmática, deberán pasar previamente por estos compartimentos. Por esta razón no era raro encontrar que una proteína de membrana celular se encuentre en estos organelos; sin embargo el hecho de que nunca se observó que esta proteína colocalice con el marcador de membrana celular nos hizo pensar que probablemente esta sea su localización final. El hecho de que la proteína de fusión también colocalice con marcadores del aparato de Golgi, hace suponer que la proteína no se está degradando en el retículo endoplásmico debido a un plegamiento incorrecto.



**FIGURA 16.** Localización subcelular de la proteína de fusión FLJ20174-GFP y su colocalización con retículo endoplásmico. **(A)** Localización subcelular del retículo endoplásmico utilizando el marcador de retículo ER-Tracker™ Blue-White DPX (azul); en **(B)** se observa en verde la localización de la proteína de fusión FLJ20174-GFP y en **(C)** se observa que ambas proteínas colocalizan. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal.



**FIGURA 17.** Inmunocitoquímica donde se observa la localización subcelular de la proteína FLJ20174-GFP y su colocalización con el aparato de Golgi. En **(A)** se muestra el núcleo celular marcado con DAPI; **(B)** muestra por inmunocitoquímica la localización del aparato de Golgi. **(C)** Se observa la localización de la proteína FLJ20174-GFP y en **(D)** se observa que la proteína de fusión FLJ20174-GFP colocaliza con el marcador del aparato de Golgi y no se localiza en el núcleo celular.

Es poco probable que FLJ20174 favorezca la entrada de dsRNA a las células localizándose en estos organelos; no se descarta la posibilidad de que la cantidad de FLJ20174-GFP en la membrana celular sea mínima y no logremos detectarla. También es probable que esta proteína se localice en la membrana bajo la acción de algún estímulo.

Por otro lado cabe mencionar que, aunque la función de SID-1 requiere que esta proteína se localice en la membrana celular, diversos ensayos realizados por Hunter demostraron que esta proteína se localiza mayoritariamente de forma intracelular (Feinberg and Hunter, 2003).

Si FLJ20174 necesita algún estímulo para localizarse en la membrana o si ésta funciona de forma intracelular deberá estudiarse a mayor profundidad.

## DISCUSIÓN

La existencia de proteínas homólogas a SID-1 que puedan introducir dsRNA a células de mamífero implica un mecanismo, hasta ahora desconocido, que podría facilitar ampliamente el uso del RNAi en organismos superiores. Por esto, un amplio estudio acerca de la función de estas proteínas es necesario. En el presente trabajo estudiamos a la proteína FLJ20174, una proteína de *Homo sapiens* reportada como homólogo de SID-1.

Para el estudio de esta proteína decidimos expresarla en células de mamífero y ahí estudiar su función. Pensamos que si FLJ20174 se encuentra de forma natural en estas células, es ahí donde tendrá las condiciones adecuadas para su funcionalidad.

Aunque se plantea que SID-1 funciona sin ayuda de otras proteínas, algunos reportes nos hacen pensar que esto no es del todo cierto; por ejemplo, se ha propuesto que SID-1 no es suficiente para la entrada de dsRNA desde el intestino de *C. elegans*, y su función requiere a SID-2 (Voinnet, 2005). Por otro lado, la ausencia de RNAi sistémico en *Drosophila* -la principal razón para el uso de células S2 de *Drosophila* para el estudio de SID-1- no está totalmente comprobada. Incluso en 2006 se reportó que las células S2 tienen un mecanismo que permite la entrada de dsRNA (Saleh et al., 2006). Aunque parece ser que esta entrada es independiente de la entrada debida a SID-1, no se descarta que SID-1 actúe junto con algunos elementos de esta otra vía para llevar a cabo su función.

El patrón de hidrofobicidad indica que FLJ20174 es una proteína de membrana con dominios transmembranales similares a los presentes en SID-1. Sin embargo, la baja similitud entre la secuencia de aminoácidos del FLJ20174 con SID-1 nos indica que esta proteína puede tener diferencias significativas en su funcionalidad.

El extremo amino terminal de ambas proteínas difiere considerablemente. Se predice que este extremo se encuentra en el medio extracelular y, por lo tanto, está más en contacto con las moléculas presentes en el mismo. Aunque esto es cierto, existen proteínas cuyo dominio de reconocimiento se encuentran en los dominios transmembranales. Es en estos dominios donde se observa la mayor similitud entre la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas. Nosotros apostamos a que este extremo sea importante para definir la función de SID-1 y su afinidad por dsRNA.

Uno de los primeros problemas que tuvimos que enfrentar en la realización de este trabajo fue la baja expresión de la proteína de fusión FLJ20174-GFP. A pesar de que este gen se encuentra regulado por un promotor fuerte (promotor de citomegalovirus), y de que los experimentos se realizaron 48 horas después de transfectar a las células, únicamente

logramos observar la proteína de fusión al realizar ensayos de inmunoprecipitación seguido por ensayos tipo Western blot. Nosotros pensamos que la baja concentración de la proteína de fusión es efecto de una transfección poco eficiente. Aunque en estas mismas condiciones el plásmido pEGFP-N1 se expresa fuertemente, el tamaño del plásmido pFLJ20174-GFP puede disminuir la eficiencia de transfección. También es posible, que ésta proteína de fusión afecte la viabilidad de las células que la expresan, o que el tiempo de vida media de la proteína de fusión sea muy corto, y la proteína se esté degradando rápidamente.

Para solucionar el problema de la transfección, intentamos obtener células que expresen de forma estable a la proteína; sin embargo las clonas seleccionadas procesaron la proteína de fusión obteniendo a la GFP libre, por lo que decidimos trabajar con células que expresan de forma transitoria la proteína FLJ20174-GFP.

La proteína de fusión FLJ20174-GFP la identificamos en ensayos tipo Western blot como una banda difusa de un peso molecular de más de 120 kDa; un poco mayor al peso molecular esperado (118.1 kDa). El carácter difuso y el aumento en el peso molecular pueden deberse a modificaciones postraduccionales, como la glicosilación ya que se predice que la proteína FLJ20174 tiene en su secuencia ocho sitios de N-glicosilación.

En los ensayos de inmunoprecipitación seguidos por ensayos tipo Western blot encontramos, además de la proteína FLJ20174-GFP, una banda de más de 190 kDa. Pensamos que esta banda puede ser un complejo proteico que no logramos separar bajo las condiciones utilizadas, aunque también es probable que este complejo se genere durante el procesamiento de las muestras. Otra posibilidad es que la proteína de fusión presente distintas modificaciones postraduccionales que modifiquen de forma significativa el peso molecular de ésta.

En el trabajo de Duxbury et al., (2005) se llevó a cabo un ensayo tipo Western blot de las células que expresaban a la proteína FLJ20174-FLAG, mencionando únicamente la proteína del tamaño esperado. Sin embargo, no podemos afirmar que este complejo se forme por la presencia de la GFP en nuestra proteína de fusión o sea específico de la línea celular con la que trabajamos, ya que este grupo presenta únicamente el fragmento de la imagen del Western blot que corresponde al peso esperado.

Debido a su peso molecular y a su intrínseca carga negativa, se piensa que el RNA es incapaz de entrar a las células y pocos son los trabajos que afirman lo contrario.

En el trabajo realizado por Hunter, se demuestra que SID-1 favorece la entrada de dsRNA a células S2 de *Drosophila*, y que además estos dsRNA son funcionales (capaces de inhibir a un mRNA blanco).

En este trabajo nosotros analizamos el efecto de la proteína FLJ20174 únicamente en la eficiencia de entrada de dsRNA, y no determinamos si las moléculas de dsRNA introducidas se localizan en el citoplasma celular y logran inhibir a su mRNA blanco.

En los ensayos de entrada de dsRNA grandes (>800 pb) a las células, no observamos diferencias significativas entre las células que expresan FLJ20174 y las células control.

Por otro lado, encontramos que, tras la expresión de la proteína de fusión (FLJ20174-GFP) y después de 6 horas de incubación, las células tienden a introducir más siRNA que las células control. A pesar de que en dos experimentos independientes observamos esta tendencia, el porcentaje de entrada debida a la proteína de fusión varía de un experimento a otro ( $42.00\% \pm 23.46$  y  $23.33\% \pm 7.652$ ); lo que nos indica que entre estos ensayos existe alguna variable que no estamos controlando.

Previamente se ha planteado que la entrada de oligonucleótidos antisentido a células de mamífero depende del tiempo de las células en cultivo (número de pases) (Laktionov et al., 1999); como nosotros no controlamos la edad del cultivo de un experimento a otro, es probable que esto pueda modificar la eficiencia en la entrada de siRNAs.

La entrada de siRNA debida a la proteína FLJ20174-GFP no se compara en tiempo ni en magnitud con la entrada de dsRNA producida por SID-1. Esta última proteína es capaz de aumentar la entrada de dsRNA a las células, desde los primeros 5 minutos de incubación; por el contrario nosotros no observamos ninguna diferencia entre las células control y las que expresan la proteína FLJ20174-GFP después de 1 hora de incubación, y este aumento únicamente se observa después de 6 horas.

Aunque esta entrada es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), las variaciones entre 2 distintos experimentos y la poca diferencia con respecto al control nos obligan a realizar, en el futuro, estudios con un cultivo más homogéneo y probablemente con el FLJ20174 fusionado a un epítipo más pequeño.

Durante la realización de este trabajo el grupo de Edward Whang encuentra que la expresión de la proteína de fusión FLJ20174-FLAG aumenta la entrada de siRNA a las células de mamífero PANC1 después de 6 horas de incubación, pero que el efecto de esta entrada (la inhibición del mRNA blanco) es 3 veces superior al control a partir de los primeros 10 minutos (Duxbury et al., 2005). Este grupo sólo estudia la entrada de siRNAs a



las células después de 6 horas de incubación, no sabemos si por conveniencia o porque no lograron observar diferencias antes.

En todo caso, pensamos que las diferencias entre nuestros experimentos y los reportados por Whang, pueden deberse al tipo celular utilizado o al sistema con el que nosotros trabajamos. Ya se ha reportado que la eficiencia de la entrada de ssDNA y las proteínas que participan en esta entrada, difieren de una línea celular a otra (Yakubov et al., 1989; Chelobanov et al., 2004; de Diesbach et al., 2000; Laktionov et al., 1999). Si FLJ20174 no trabaja de forma independiente, es probable que las proteínas presentes en las células HEK pueden modificar su eficiencia.

Por otra parte, sabemos que los experimentos realizados por Whang se llevaron a cabo con un cultivo mucho más homogéneo que el nuestro. Este grupo obtiene líneas celulares que - en presencia del antibiótico aminoglicósido G418- expresan de forma estable la proteína de fusión FLJ20174-FLAG. Nosotros no logramos obtener una línea celular que exprese de forma estable nuestra proteína de fusión y en ensayos realizados en el laboratorio, se observó que la presencia de G418 en el medio de cultivo afecta considerablemente la entrada de dsRNA a las células.

La localización subcelular de FLJ20174-GFP reportada por Whang también nos indica que las diferencias observadas pueden deberse a la línea celular utilizada. En los múltiples ensayos de localización subcelular que realizamos nunca observamos que la proteína FLJ20174-GFP se encuentre en la membrana celular. Por el contrario, Whang encontró que en células PANC1, la proteína de fusión FLJ20174-GFP -donde la GFP se encuentra fusionada al extremo C-terminal del FLJ20174- se localiza en lo que parece ser la membrana celular o por lo menos la periferia celular. Dado que en células HEK nunca observamos este patrón, pensamos que FLJ20174 debe requerir algunas proteínas, ausentes en las células HEK, para localizarse en la membrana celular.

Hasta la fecha no hemos logrado una eficiente transfección de células PANC1, para determinar si la localización subcelular de la proteína de fusión depende de la línea celular. También es probable que esta proteína sufra una relocalización subcelular tras algún tipo de activación como puede ser la presencia de dsRNA en el medio de cultivo.

Nuestros resultados demuestran que la proteína FLJ20174-GFP se localiza de forma intracelular, mayoritariamente en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi; pero ¿si FLJ20174-GFP no se localiza en la membrana celular, como es posible que favorezca la entrada de siRNA a estas células?. En estudios con oligonucleótidos antisentido (ssDNA) se ha encontrado que algunas de las proteínas de membrana que interaccionan con estos

oligos y favorecen su entrada a las células se internalizan (Laktionov et al., 1999). Raúl Andino propone que proteínas similares a SID-1 (*SID-1-like*) pueden ser necesarias para liberar la señal de interferencia desde endosomas al citoplasma celular cuando esta señal entra por vía endocítica (Saleh et al., 2006).

Por otro lado, aunque para funcionar como un canal SID-1 debe localizarse en la membrana celular, en ensayos de inmunocitoquímica y al analizar al microscopio la expresión de la proteína SID-1-GFP, el grupo de Hunter encuentra que SID-1 se localiza mayoritariamente de forma intracelular (Feinberg and Hunter, 2003; Winston et al., 2002).

Para determinar cual es el mecanismo por el cual la proteína FLJ20174 podría introducir siRNA a las células necesitamos más estudios. Estudiar si en células HEK esta entrada depende de la temperatura y de ATP, es fundamental para determinar si la vía endocítica está involucrada. Sin embargo, para este estudio es importante trabajar con un cultivo celular mucho más homogéneo.

Además de la entrada de siRNA debido a la presencia de FLJ20174-GFP, las células retienen un porcentaje de la señal de fluorescencia total (aproximadamente el 30%) mayor al observado en otras líneas celulares (Lingor et al., 2004). Aunque no conocemos cual es este mecanismo de entrada, es evidente que se llega a un equilibrio antes de la primera hora de incubación ya que no observamos cambios significativos después de 6 horas. Es poco probable que en nuestros ensayos estemos observando siRNA unido a la membrana celular o a proteínas de membrana y no dentro de las células, ya que antes de la cuantificación, éstas se incubaron con tripsina y se les realizaron múltiples lavados con PBS frío. Sin estas condiciones de severidad observamos que las células control retienen aproximadamente 37% más siRNAs.

Existen pocos trabajos que reporten la entrada de siRNAs a células de mamífero *in vitro*; sin embargo se ha encontrado que tras largos tiempos de incubación moléculas de siRNA son capaces de entrar a estas células en cultivo (Lingor et al., 2004; Overhoff and Sczakiel, 2005). Lingor encontró que tras la internalización, estos siRNAs se localizan en endosomas tardíos y lisosomas (Lingor et al., 2004). Por su parte, Georg Sczakiel encuentra que esta entrada es débil y que aumenta considerablemente tras la co-incubación con oligonucleótidos derivados de fosforotionatos (PTO) por un mecanismo de endocitosis mediada por caveolina (Overhoff and Sczakiel, 2005).

La entrada de siRNA a células de mamífero por endocitosis no es de extrañar, si se considera que existe un gran número de trabajos donde se reporta la entrada de oligonucleótidos antisentido (DNA de hebra sencilla de entre 8-25 nt) a estas células (de Diesbach et al., 2002; Loke et al., 1989; Tari and Lopez-Berestein, 2001; Vlassov et al., 1994; Yakubov et al., 1989). En estos trabajos se reporta que estos oligonucleótidos se introducen a las células por endocitosis mediada por receptor o por endocitosis de fase fluida, e incluso se han encontrado algunas proteínas que participan en la entrada de oligonucleótidos a las células (de Diesbach et al., 2000; de Diesbach et al., 2002; Hanss et al., 1998; Loke et al., 1989; Vlassov et al., 1994; Yakubov et al., 1989).

Algunos de estos trabajos reportan que aunque los oligonucleótidos antisentido logran ingresar a las células, estos no sirven para inhibir a mRNAs blanco, ya que se localizan en lisosomas y probablemente se degradan. El grupo de Lingor también encontró que siRNA incubados en cultivo de neuronas se introducen a estas células pero se dirigen también a lisosomas. Sin embargo, a la fecha nosotros no podemos asegurar que los siRNAs introducidos no se dirigen a lisosomas y si son degradados o no.

Es importante conocer la capacidad de las células de introducir oligonucleótidos antisentido ya que, aunque en la realización de este proyecto utilizamos condiciones previamente establecidas para que las moléculas de RNA se encuentren en forma de dsRNA y no como hebra sencilla (Elbashir et al., 2001), es posible que cierto porcentaje de RNA se encuentre como hebra sencilla y por lo tanto entre a las células por alguno de los mecanismos previamente descritos para la entrada de ssDNA.

El hecho de que moléculas de RNA y DNA desnudo entren a células de mamífero no nos indica cual pueda ser la función de este mecanismo de entrada o la función de la entrada misma.

En los estudios realizados con oligonucleótidos se encontró que un exceso de dsDNA y ssRNA inhibe la entrada de ssDNA a la células, por lo que parece que las proteínas que reconocen ssDNA en la membrana pueden interaccionar con cualquier tipo de oligonucleótido (de Diesbach et al., 2000; de Diesbach et al., 2002). Por otro lado, a diferencia de lo que sucede en plantas, en mamíferos los oligonucleótidos de hebra sencilla se degradan en pocos minutos en presencia de suero (Bertrand et al., 2002). Por el contrario, estudios *in vitro* indican que aproximadamente el 50% de siRNAs permanecen intactos después de 2 horas de incubación con SBF (Heidel et al., 2004), aunque parece ser que la

estabilidad de estos siRNAs en suero depende fuertemente de la secuencia (Haupenthal et al., 2006).

Ya que existe una maquinaria para el uso de siRNA en las células y que, en presencia de suero las moléculas de dsRNA tienen una vida media mayor que las moléculas de hebra sencilla, es probable que las moléculas fisiológicamente activas sean dsRNA y, por lo tanto estas sean introducidas por las células de mamífero por los mecanismos previamente descritos para la entrada de ssDNA.

La descripción de la maquinaria que permite la entrada de siRNAs a las células puede tener gran impacto en el uso del RNAi en mamíferos. Esta descripción puede indicarnos no sólo cómo es que el RNA se introduce a las células, sino cómo información gen-específica se transmite de célula a célula y para qué.

## **PERSPECTIVAS**

### **1. Construcción del plásmido pFLJ20174-FLAG**

Si la proteína GFP, fusionada al extremo carboxilo terminal de FLJ20174, altera la eficiencia en la función de FLJ20174, es necesario entonces, trabajar con ésta proteína fusionada a un epítoto más pequeño. Para esto, se está trabajando en la construcción de un plásmido que exprese la proteína FLJ20174 fusionada a un octapéptido conocido como FLAG. Ensayos de entrada y de inmunocitoquímica con esta construcción permitirá confirmar los datos obtenidos a la fecha.

### **2. Modificaciones post-traduccionales de la proteína FLJ20174**

En ensayos tipo Western blot la proteína de fusión FLJ20174–GFP se presenta como una banda difusa, lo que podría ser indicio de diversas modificaciones post-traduccionales. Ésta proteína presenta en su secuencia de aminoácidos ocho sitios potenciales de N-glicosilación, lo cual explicaría el patrón difuso observado. Estudios con inhibidores de la glicosilación, tales como tunicamicina, permitirán determinar si la glicosilación es la responsable de este patrón.

Por otro lado, en estos mismos ensayos observamos una proteína de más de 190 kDa también reconocida por el anticuerpo anti-GFP. Cabe suponer, que ésta proteína corresponde a la proteína FLJ20174-GFP con múltiples modificaciones post-traduccionales; aunque debido a su peso molecular nos inclinamos a pensar que ésta banda corresponde a un complejo multiprotéico. En todo caso, en primer lugar debemos determinar el peso molecular exacto de ésta banda, con un gel de poliacrilamida menos concentrado. Un gel de electroforesis bidimensional nos permitirá determinar sí ésta banda corresponde a un complejo multiprotéico o a un dímero o trímero de la proteína FLJ20174-GFP.

### **3. Interacción de la proteína FLJ20174 con otras proteínas**

En la naturaleza, pocas son las proteínas que funcionan solas; en general interactúan entre ellas para activarse, regularse, localizarse en un sitio específico, etc. Dado lo poco que conocemos acerca de la proteína FLJ20174, consideramos interesante determinar con que proteínas interactúa de manera medianamente fuerte.

Estudios iniciales realizados en el laboratorio, indican que la proteína de fusión FLJ20174-GFP co-inmunoprecipita con una proteína de aproximadamente 80 kDa aún no identificada y que esta co-inmunoprecipitación se mantiene con 500 mM de NaCl. Posteriormente se intentará caracterizar esta proteína.

#### **4. Caracterización de la entrada de siRNA dependiente de FLJ20174-GFP**

En este trabajo se encontró que la expresión de la proteína de fusión FLJ20174-GFP favorece la entrada de siRNAs a células HEK. Aunque creemos necesario verificar estos resultados en un cultivo celular más homogéneo, es importante determinar las características de ésta entrada. Para esto, debemos realizar curvas de tiempo y concentración de siRNAs y repetir los ensayos de entrada a distintas temperaturas (4°C y 37°C) y en presencia y ausencia de ATP.

Ensayos de inhibición de un mRNA blanco, nos permitirán determinar si los siRNAs que entran a las células mediados por FLJ20174, son capaces de impedir la traducción de estos mRNAs. En este momento contamos en el laboratorio con todo lo necesario para realizar los ensayos de inhibición, utilizando como blanco al mensajero de luciferasa.

#### **5. Caracterización de la proteína CGI-40**

La existencia de dos genes homólogos a SID-1 en células de mamífero, puede ser indicativo de distintas afinidades por dsRNAs o particularidades en su función. En este trabajo estudiamos uno de éstos dos genes (*flj20174*), sin embargo caracterizar la función de CGI-40 es necesario. En este momento, se cuenta en el laboratorio con un plásmido que expresa la proteína CGI-40 en células de mamífero y un plásmido que expresa la proteína CGI-40-GFP en estas mismas células lo cual permitirá hacer estudios de entrada de dsRNA y localización subcelular. Datos preliminares indican que, al igual que FLJ20174-GFP, la proteína CGI-40-GFP se localiza de forma intracelular.

#### **6. Utilización de la proteína SID-1 como control positivo.**

Para valorar el sistema que utilizamos, creemos necesario utilizar como control positivo a la proteína SID-1. En este momento se cuenta en el laboratorio, con un plásmido que expresa la proteína SID-1 en células de mamífero así como un plásmido que expresa la proteína SID-1-GFP en estas mismas células.

Si SID-1 es capaz de favorecer la entrada de dsRNA en células de *Drosophila* S2, pensamos que entonces, la función de sus proteínas homólogas (FLJ20174 y CGI-40) puede estudiarse en este tipo de células. En el laboratorio se han construido plásmidos que permiten expresar a la proteína FLJ20174, CGI-40, SID-1, FLJ20174-GFP, CGI40-GFP y SID-1-GFP en células de *Drosophila* S2. Con éstos plásmidos se realizarán los ensayos de transporte en células S2 para determinar si, al igual que SID-1, FLJ20174 y CGI-40 favorecen la entrada de dsRNA a estas células.

## REFERENCIAS

- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., Hannon, G. J., and 2001 Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Bertrand, J. R., Pottier, M., Vekris, A., Opolon, P., Maksimenko, A., and Malvy, C. (2002). Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 1000-1004.
- Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O., and Barik, S. (2005). Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 11, 50-55.
- Blandin, S., Moita, L. F., Kocher, T., Wilm, M., Kafatos, F. C., and Levashina, E. A. (2002). Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO Rep* 3, 852-856.
- Brown, S. J., Mahaffey, J. P., Lorenzen, M. D., Denell, R. E., and Mahaffey, J. W. (1999). Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. *Evol Dev* 1, 11-15.
- Bucher, G., Scholten, J., and Klingler, M. (2002). Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr Biol* 12, R85-86.
- Caudy, A. A., Myers, M., Hannon, G. J., and Hammond, S. M. (2002). Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev* 16, 2491-2496.
- Chelobanov, B. P., Laktionov, P. P., Kharkova, M. V., Rykova, E. Y., and Vlassov, V. V. (2004). Isolation of nucleic acid binding proteins: an approach for isolation of cell surface, nucleic acid binding proteins. *Ann N Y Acad Sci* 1022, 239-243.
- Ciudad, L., Piulachs, M. D., and Belles, X. (2006). Systemic RNAi of the cockroach vitellogenin receptor results in a phenotype similar to that of the *Drosophila* *yolkless* mutant. *Febs J* 273, 325-335.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., and Baulcombe, D. C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101, 543-553.
- de Diesbach, P., Berens, C., N'Kuli, F., Monsigny, M., Sonveaux, E., Wattiez, R., and Courtoy, P. J. (2000). Identification, purification and partial characterisation of an oligonucleotide receptor in membranes of HepG2 cells. *Nucleic Acids Res* 28, 868-874.
- de Diesbach, P., N'Kuli, F., Berens, C., Sonveaux, E., Monsigny, M., Roche, A. C., and Courtoy, P. J. (2002). Receptor-mediated endocytosis of phosphodiester oligonucleotides in the HepG2 cell line: evidence for non-conventional intracellular trafficking. *Nucleic Acids Res* 30, 1512-1521.
- Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F., and Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.
- Doench, J. G., Petersen, C. P., and Sharp, P. A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 17, 438-442.
- Dong, Y., and Friedrich, M. (2005). Nymphal RNAi: systemic RNAi mediated gene knockdown in juvenile grasshopper. *BMC Biotechnol* 5, 25.

Duxbury, M. S., Ashley, S. W., and Whang, E. E. (2005). RNA interference: a mammalian SID-1 homologue enhances siRNA uptake and gene silencing efficacy in human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 459-463.

Dzitoyeva, S., Dimitrijevic, N., and Manev, H. (2001). Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult *Drosophila* triggers RNA interference in the central nervous system. *Mol Psychiatry* 6, 665-670.

Dzitoyeva, S., Dimitrijevic, N., and Manev, H. (2003). Gamma-aminobutyric acid B receptor 1 mediates behavior-impairing actions of alcohol in *Drosophila*: adult RNA interference and pharmacological evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5485-5490.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.

Feinberg, E. H., and Hunter, C. P. (2003). Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* 301, 1545-1547.

Ferguson, D. A., Muenster, M. R., Zang, Q., Spencer, J. A., Schageman, J. J., Lian, Y., Garner, H. R., Gaynor, R. B., Huff, J. W., Pertsemlidis, A., *et al.* (2005). Selective identification of secreted and transmembrane breast cancer markers using *Escherichia coli* ampicillin secretion trap. *Cancer Res* 65, 8209-8217.

Filleur, S., Courtin, A., Ait-Si-Ali, S., Guglielmi, J., Merle, C., Harel-Bellan, A., Clezardin, P., and Cabon, F. (2003). SiRNA-mediated inhibition of vascular endothelial growth factor severely limits tumor resistance to antiangiogenic thrombospondin-1 and slows tumor vascularization and growth. *Cancer Res* 63, 3919-3922.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Fortier, E., and Belote, J. M. (2000). Temperature-dependent gene silencing by an expressed inverted repeat in *Drosophila*. *Genesis* 26, 240-244.

Ge, Q., Filip, L., Bai, A., Nguyen, T., Eisen, H. N., and Chen, J. (2004). Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8676-8681.

Giladi, H., Ketzinel-Gilad, M., Rivkin, L., Felig, Y., Nussbaum, O., and Galun, E. (2003). Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther* 8, 769-776.

Gregory, R. I., Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235-240.

Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.

Hanss, B., Leal-Pinto, E., Bruggeman, L. A., Copeland, T. D., and Klotman, P. E. (1998). Identification and characterization of a cell membrane nucleic acid channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1921-1926.

Hauptenthal, J., Baehr, C., Kiermayer, S., Zeuzem, S., and Piiper, A. (2006). Inhibition of RNase A family enzymes prevents degradation and loss of silencing activity of siRNAs in serum. *Biochem Pharmacol* 71, 702-710.



Heidel, J. D., Hu, S., Liu, X. F., Triche, T. J., and Davis, M. E. (2004). Lack of interferon response in animals to naked siRNAs. *Nat Biotechnol* 22, 1579-1582.

Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834-838.

Jin, P., Alisch, R. S., and Warren, S. T. (2004a). RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol* 6, 1048-1053.

Jin, P., Zarnescu, D. C., Ceman, S., Nakamoto, M., Mowrey, J., Jongens, T. A., Nelson, D. L., Moses, K., and Warren, S. T. (2004b). Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat Neurosci* 7, 113-117.

Klein, C., Bock, C. T., Wedemeyer, H., Wustefeld, T., Locarnini, S., Dienes, H. P., Kubicka, S., Manns, M. P., and Trautwein, C. (2003). Inhibition of hepatitis B virus replication in vivo by nucleoside analogues and siRNA. *Gastroenterology* 125, 9-18.

Laktionov, P. P., Dazard, J. E., Vives, E., Rykova, E. Y., Piette, J., Vlassov, V. V., and Lebleu, B. (1999). Characterisation of membrane oligonucleotide-binding proteins and oligonucleotide uptake in keratinocytes. *Nucleic Acids Res* 27, 2315-2324.

Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., and Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.

Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S., and Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J* 21, 4663-4670.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., and Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23, 4051-4060.

Lewis, D. L., Hagstrom, J. E., Loomis, A. G., Wolff, J. A., and Herweijer, H. (2002). Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 32, 107-108.

Li, B. J., Tang, Q., Cheng, D., Qin, C., Xie, F. Y., Wei, Q., Xu, J., Liu, Y., Zheng, B. J., Woodle, M. C., *et al.* (2005). Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat Med* 11, 944-951.

Liang, Z., Yoon, Y., Votaw, J., Goodman, M. M., Williams, L., and Shim, H. (2005). Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res* 65, 967-971.

Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2003a). Vertebrate microRNA genes. *Science* 299, 1540.

Lim, L. P., Lau, N. C., Weinstein, E. G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M. W., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2003b). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 17, 991-1008.

Lingor, P., Michel, U., Scholl, U., Bahr, M., and Kugler, S. (2004). Transfection of "naked" siRNA results in endosomal uptake and metabolic impairment in cultured neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 1126-1133.

- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.
- Loke, S. L., Stein, C. A., Zhang, X. H., Mori, K., Nakanishi, M., Subasinghe, C., Cohen, J. S., and Neckers, L. M. (1989). Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3474-3478.
- Lomas-Neira, J. L., Chung, C. S., Wesche, D. E., Perl, M., and Ayala, A. (2005). In vivo gene silencing (with siRNA) of pulmonary expression of MIP-2 versus KC results in divergent effects on hemorrhage-induced, neutrophil-mediated septic acute lung injury. *J Leukoc Biol* 77, 846-853.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95-98.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., Tuschl, T., and 2002 Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110, 563-574.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15, 185-197.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 16, 720-728.
- Newmark, P. A., Reddien, P. W., Cebria, F., and Sanchez Alvarado, A. (2003). Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 *Suppl 1*, 11861-11865.
- Noonberg, S. B., Garovoy, M. R., and Hunt, C. A. (1993). Characteristics of oligonucleotide uptake in human keratinocyte cultures. *J Invest Dermatol* 101, 727-731.
- Ogita, S., Uefuji, H., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., and Sano, H. (2003). Producing decaffeinated coffee plants. *Nature* 423, 823.
- Olsen, P. H., and Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 216, 671-680.
- Overhoff, M., and Sczakiel, G. (2005). Phosphorothioate-stimulated uptake of short interfering RNA by human cells. *EMBO Rep* 6, 1176-1181.
- Pineda, D., Gonzalez, J., Callaerts, P., Ikeo, K., Gehring, W. J., and Salo, E. (2000). Searching for the prototypic eye genetic network: *Sine oculis* is essential for eye regeneration in planarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4525-4529.
- Raponi, M., and Arndt, G. M. (2003). Double-stranded RNA-mediated gene silencing in fission yeast. *Nucleic Acids Res* 31, 4481-4489.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.

- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14, 1902-1910.
- Roignant, J. Y., Carre, C., Mugat, B., Szymczak, D., Lepesant, J. A., and Antoniewski, C. (2003). Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *Rna* 9, 299-308.
- Saleh, M. C., van Rij, R. P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O'Farrell, P. H., and Andino, R. (2006). The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nat Cell Biol* 8, 793-802.
- Schiffelers, R. M., Xu, J., Storm, G., Woodle, M. C., and Scaria, P. V. (2005). Effects of treatment with small interfering RNA on joint inflammation in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 52, 1314-1318.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H., and Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107, 465-476.
- Sioud, M., and Sorensen, D. R. (2003). Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 1220-1225.
- Sledz, C. A., and Williams, B. R. (2004). RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways. *Biochem Soc Trans* 32, 952-956.
- Sorensen, D. R., Leirdal, M., and Sioud, M. (2003). Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol* 327, 761-766.
- Strausberg, R. L., Feingold, E. A., Grouse, L. H., Derge, J. G., Klausner, R. D., Collins, F. S., Wagner, L., Shenmen, C. M., Schuler, G. D., Altschul, S. F., *et al.* (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16899-16903.
- Takabatake, Y., Isaka, Y., Mizui, M., Kawachi, H., Shimizu, F., Ito, T., Hori, M., and Imai, E. (2005). Exploring RNA interference as a therapeutic strategy for renal disease. *Gene Ther* 12, 965-973.
- Tari, A. M., and Lopez-Berestein, G. (2001). Cellular uptake of antisense oligonucleotides. *Curr Opin Investig Drugs* 2, 1450-1453.
- Thakker, D. R., Natt, F., Husken, D., van der Putten, H., Maier, R., Hoyer, D., and Cryan, J. F. (2005). siRNA-mediated knockdown of the serotonin transporter in the adult mouse brain. *Mol Psychiatry* 10, 782-789, 714.
- Tijsterman, M., May, R. C., Simmer, F., Okihara, K. L., and Plasterk, R. H. (2004). Genes required for systemic RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 14, 111-116.
- Tijsterman, M., and Plasterk, R. H. (2004). Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell* 117, 1-3.
- Timmons, L., Tabara, H., Mello, C. C., and Fire, A. Z. (2003). Inducible systemic RNA silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 14, 2972-2983.
- Tompkins, S. M., Lo, C. Y., Tumpey, T. M., and Epstein, S. L. (2004). Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8682-8686.

Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P., and Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* 13, 3191-3197.

Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbeid, S., Czubayko, F., and Aigner, A. (2005). RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Ther* 12, 461-466.

Vlassov, V. V., Balakireva, L. A., and Yakubov, L. A. (1994). Transport of oligonucleotides across natural and model membranes. *Biochim Biophys Acta* 1197, 95-108.

Voinnet, O. (2005). Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Lett* 579, 5858-5871.

Wasiak, S., Legendre-Guillemain, V., Puertollano, R., Blondeau, F., Girard, M., de Heuvel, E., Boismenu, D., Bell, A. W., Bonifacino, J. S., and McPherson, P. S. (2002). Enthoprotin: a novel clathrin-associated protein identified through subcellular proteomics. *J Cell Biol* 158, 855-862.

Winston, W. M., Molodowitch, C., and Hunter, C. P. (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* 295, 2456-2459.

Worby, C. A., Simonson-Leff, N., and Dixon, J. E. (2001). RNA interference of gene expression (RNAi) in cultured *Drosophila* cells. *Sci STKE* 2001, PL1.

Yakubov, L. A., Deeva, E. A., Zarytova, V. F., Ivanova, E. M., Ryte, A. S., Yurchenko, L. V., and Vlassov, V. V. (1989). Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6454-6458.

Yang, S., Tutton, S., Pierce, E., and Yoon, K. (2001). Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 21, 7807-7816.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-3016.

Zender, L., Hutker, S., Liedtke, C., Tillmann, H. L., Zender, S., Mundt, B., Waltemathe, M., Gosling, T., Flemming, P., Malek, N. P., *et al.* (2003). Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7797-7802.

Zhang, X., Shan, P., Jiang, D., Noble, P. W., Abraham, N. G., Kappas, A., and Lee, P. J. (2004). Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 enhances ischemia-reperfusion-induced lung apoptosis. *J Biol Chem* 279, 10677-10684.

Zimmermann, T. S., Lee, A. C., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M. N., Harborth, J., Heyes, J. A., Jeffs, L. B., John, M., *et al.* (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441, 111-114.