



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

Desarrollo de un sistema para generar RNA de Interferencia

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

PRESENTA:

Carlos Fabián Flores Jasso

DIRECTOR DE TESIS: Luis Vaca Domínguez





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

Dr. José Narro Robles
Director de la Facultad de Medicina
UNAM
Presente

...ulorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de este trabajo recepcional.
NOMBRE: Carlos Fabián Flores Jasso
FECHA: 11 de Mayo
FIRMA: [Firma]

Por este conducto le informamos que la tesis "Desarrollo de un sistema para producir RNA de interferencia", que presenta el alumno: **Carlos Fabián Flores Jasso**, reúne los requisitos de una tesis de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto los suscritos miembros del Jurado otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.

Atentamente.

[Firma]
Dra. Carmen Gómez Eichelmann

[Firma]
Dr. Luis Vaca Domínguez

[Firma]
Dr. Ángel Zarain Herzberg

[Firma]
Dr. Federico Martínez Montes

[Firma]
Dr. Félix Recillas Targa

A mi Alma M3ter

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Luis Vaca Domínguez, en el departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M.

Carlos Fabián Flores Jasso fue becario del Programa de Becas para la Elaboración de Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (PROBETEL), durante el periodo enero 2003 a julio 2003.

Agradecimientos

Al Dr. Luis Vaca por haberme dado la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo.

A R por soportarme, por acomodarme la mente en todo momento, y por hacerme querer ser mejor cada día. Sin tu hombro hubiera estado muy, muy, muy difícil

Al grupo de trabajo del 126-n de Fisiología Celular : Agustín, Aldo, Alicia, Israel, Julián, Luis y Poncho por todas las discusiones que nos han hecho ir por caminos inesperados y por hacer llevadera la frustración constante de los experimentos fallidos.

A Gabriela Jasso, por toda la fuerza.

ÍNDICE

I INTRODUCCIÓN

II ESTRATEGIAS PARA INHIBIR LA EXPRESIÓN GÉNICA

1 “Knock outs”

2 Dominantes negativos

3 Antisentidos

4 RNAi

a) Métodos para generar RNAi en mamíferos.

III OBJETIVO

IV MATERIALES Y MÉTODOS

V RESULTADOS

VI DISCUSIÓN

VII PERSPECTIVAS

VIII REFERENCIAS

INTRODUCCIÓN

La vida como la conocemos está dirigida y especificada principalmente por los *genomas*. Cada especie posee un genoma que contiene la información necesaria para construir y mantener su propia identidad; la molécula que lleva esta información es el ácido desoxiribonucleico (DNA)¹.

En los organismos eucariontes, el DNA se encuentra concentrado, en su mayor parte, en el núcleo celular y está compuesto de unidades monoméricas llamadas *nucleótidos* (nt). La secuencia de los nucleótidos en el DNA es, lo que a su vez, da origen a los *genes*. Los genes son unidades discretas de información y para que esta información sea procesada, ocurre lo que se conoce como *expresión génica*^{1,2}. En eucariontes, este proceso puede dividirse en tres etapas generales: *transcripción*, *edición* y *traducción*. En la transcripción, las RNA-polimerasas sintetizan varias copias del gen en forma de ácido ribonucleico (RNA). En la edición, el RNA es procesado para dar su forma madura, conocida como RNA mensajero (mRNA), el cual contiene los exones necesarios para dar origen a la proteína. En la traducción, las moléculas de mRNA son decodificadas a proteínas específicas por medio de los ribosomas y RNAs de transferencia (tRNAs), (Fig. I). Los productos finales y funcionales de la expresión génica son las proteínas y cada una de ellas desempeña un papel específico en el entorno celular^{1,2}.

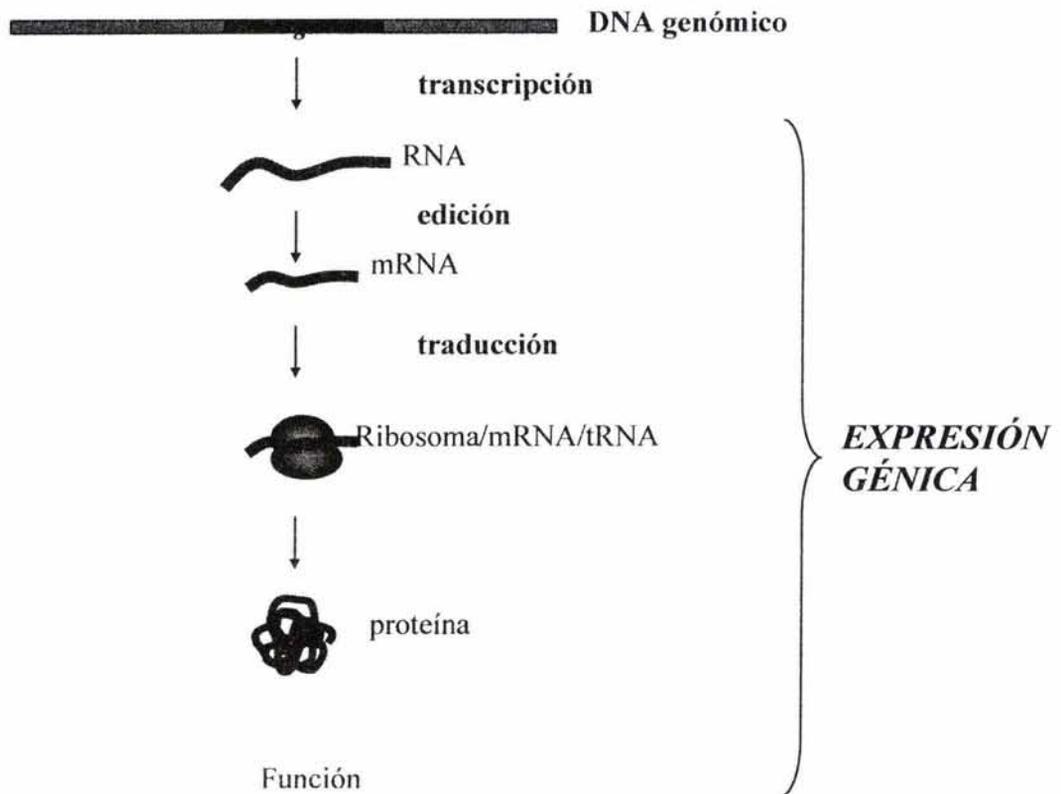


Figura 1 Esquema representativo de los pasos de la expresión génica. Después de transcribirse, el RNA se edita para formar mRNAs maduros que se traducen en los ribosomas. El producto de la traducción son las proteínas. Cada proteína lleva a cabo una función específica en el entorno celular.

Uno de los mayores retos de las ciencias biológicas es conocer y entender la información que contienen los genomas. A pesar de que se han secuenciado los genomas completos de algunas especies, no se conoce con exactitud el número total de genes contenidos en la mayoría de ellos, así como la función de la mayor parte de las proteínas que estos codifican³. Por ejemplo, en el genoma humano se estima que hay 35 mil genes aproximadamente, de los cuales sólo se han identificado experimentalmente alrededor de 15 mil diferentes mRNAs⁴. De estos 15 mil se desconoce la función de las proteínas para las cuales estos codifican. Los 17 mil genes restantes son resultado de algoritmos

computacionales que comparan las secuencias de los mRNAs que han sido identificados experimentalmente entre diferentes especies, y con base en esto, se predicen directamente sobre el DNA de un genoma los posibles genes que este pueda contener ⁴. Empero, la predicción de genes dista de ser perfecta ya que se corre el riesgo de excluir exones o intrones de algún gen, y por otro lado, se puede confundir el principio o el fin de este, dando como resultado predicciones erróneas. Por ejemplo, el genoma humano fue secuenciado al mismo tiempo por dos organizaciones independientes y una de ellas predice que existen alrededor de 32 mil genes; mientras que la otra sostiene que hay alrededor de 40 mil. Así pues, la predicción o incluso la identificación de un posible gen dentro de un genoma ofrece una información casi nula o nula acerca de su función dentro del entorno celular.

Identificar, por lo tanto, si un gen codifica o no para una proteína es esencial para conocer el metabolismo celular. Como se mencionó, para que se exprese un gen, este se tiene que transcribir primeramente a mRNA. Pero aun cuando existe evidencia de que algunas regiones de DNA son transcritas, ello no implica que dichas regiones sean genes. No se sabe con precisión cómo es que las células controlan la transcripción, ya que, se ha reportado que existen secuencias de DNA que se transcriben a RNA con relativa frecuencia pero que no se traducen a proteínas (por ejemplo hnRNAs y sRNAs) ^{3,5}. Por otro lado, tampoco se sabe con exactitud cómo es que las células identifican los transcritos que no deben ser traducidos a proteínas.

Lo anterior es sólo un ejemplo de lo poco que se sabe de la regulación del metabolismo celular, ya que este es controlado por las proteínas y estas no han sido identificadas totalmente ni en número, ni en función, en ninguna especie. Para llegar a identificar con detalle tanto el metabolismo celular, así como la información codificable contenida en los genomas, se deben seguir caracterizando las proteínas y sus funciones.

ESTRATEGIAS PARA INHIBIR LA EXPRESIÓN GÉNICA

Una de las estrategias generalmente usadas par identificar la función de proteínas es la inhibición de la expresión génica. La interrupción de alguno de los pasos mostrados en la

Fig. I puede inhibir el fenotipo provocado por el producto proteínico final. Al inhibir la expresión génica, se pueden buscar fenotipos diferentes al que se tiene cuando los genes se expresan “normalmente”, y estos fenotipos se pueden relacionar directamente con la función de la proteína. La inhibición de la expresión génica se puede lograr de varias formas. A continuación se explican brevemente algunas de las más empleadas:

1. “*Knock outs*.” La mejor forma de inhibir la función de un gen es remover dicho gen de su genoma. Un organismo con un gen “*knock out*” es al que se le ha quitado o modificado deliberadamente un gen de su DNA genómico, y por lo tanto, no produce la proteína o esta pierde su función ⁶. El uso de organismos “*knock out*” ha beneficiado en gran medida a las ciencias biológicas porque gracias a ellos, ha sido posible identificar, en algunas patologías, la o las proteínas involucradas en el origen de estas ^{6,7}. Por ejemplo, en modelos animales para el estudio de la enfermedad de Alzheimer, se pudo identificar que los ratones “*knock out*” que no tienen la proteína BASE no acumulan el péptido β -amiloide que es causante de dicha enfermedad ⁸⁻¹⁰. Otro ejemplo es el de los ratones “*knock out*” para la proteína leptina, los cuales presentan un fenotipo claramente obeso en comparación con los ratones silvestres que han sido alimentados con la misma dieta ¹¹⁻¹⁵. Así, existen muchos ejemplos más de las ventajas que ofrece el uso de animales “*knock out*” para la identificación de proteínas involucradas en vías de señalización celular.

Una de las ventajas que ofrecen los “*knock outs*” es que se pueden obtener tanto células como organismos completos que no tienen el gen de interés. Sin embargo, hay algunas limitaciones que impiden que se puedan emplear como una método rutinaria en los laboratorios. Por ejemplo, se necesita de un tiempo considerable para la construcción y obtención de animales “*knock out*” y en ocasiones la eliminación de un gen resulta en un fenotipo letal, lo que impide evaluar la función de la proteína eliminada. Por lo tanto, es muy difícil generar organismos “*knock out*” de genes que son esenciales durante el desarrollo. Tenemos que considerar además, que los “*knock outs*” ya nunca expresan el gen removido, por lo que es también imposible estudiar expresiones transitorias en estos. Finalmente, la producción de animales “*knock out*” en varios genes es costosa, lleva demasiado tiempo y en ocasiones no es técnicamente posible. De este modo, si se está

interesado en conocer la función específica de una proteína durante el desarrollo, el uso de organismos “knock out” no es ideal. Los “knock outs” son una técnica excelente para evaluar la función de ciertos genes, pero no es una alternativa viable para la exploración sistemática de genomas.

2. *Dominantes negativos.* A diferencia de los “knock outs”, esta forma de inhibir la expresión génica se basa en el principio de *competencia* y se usa regularmente en cultivos celulares. Por lo general, se introduce exógenamente la secuencia modificada del gen que se desea inhibir, lo que provoca que el producto proteico final no tenga función. Para lograr esto, la secuencia puede estar truncada en una región de la proteína o estar mutada en amino ácidos importantes para llevar a cabo su función. Para expresar predominantemente el gen modificado, es necesario que este se transcriba mediante promotores de expresión constitutiva ¹⁶. De este modo, la proteína modificada competirá con la proteína endógena, pero gracias al promotor de expresión constitutiva, se producirán muchas más copias de la proteína mutada o truncada que de la silvestre (Fig. II). Por lo tanto, los dominantes negativos actúan sobre el último paso de la expresión génica mostrado en la Fig. I.

Los dominantes negativos son muy útiles en la identificación de cascadas de señalización celular. Como se muestra en la Figura II, al competir con la o las proteínas endógenas, el dominante negativo acapara las vías de señalización en las que está involucrada la proteína silvestre y provoca la disminución de su función. Por ejemplo, en el caso de dimerizaciones homólogas, el dominante negativo puede “secuestrar” una de las dos proteínas del dímero silvestre, provocando así fenotipos que reflejan la disminución de la proteína de interés. Otra de las ventajas que ofrecen, es que se pueden identificar complejos multiprotéicos dado que muchas de las proteínas en una célula actúan en forma de multímeros: si la proteína a estudiar tiene la función metabólica de ser parte de un complejo, como es el caso de las proteínas de andamiaje, es posible que al utilizar dominantes negativos el complejo no se forme o se desestabilice produciendo resultados similares al ejemplo de dimerización. Sin embargo, existen algunas limitaciones que convierten a esta estrategia poco eficaz. Por ejemplo, la inhibición de la función de las proteínas por este método alcanza regularmente un 30%, y si el promotor

del gen endógeno tiene una expresión transitoria fuerte o constitutiva, el uso de dominantes negativos tendrá un efecto reducido sobre el fenotipo esperado.

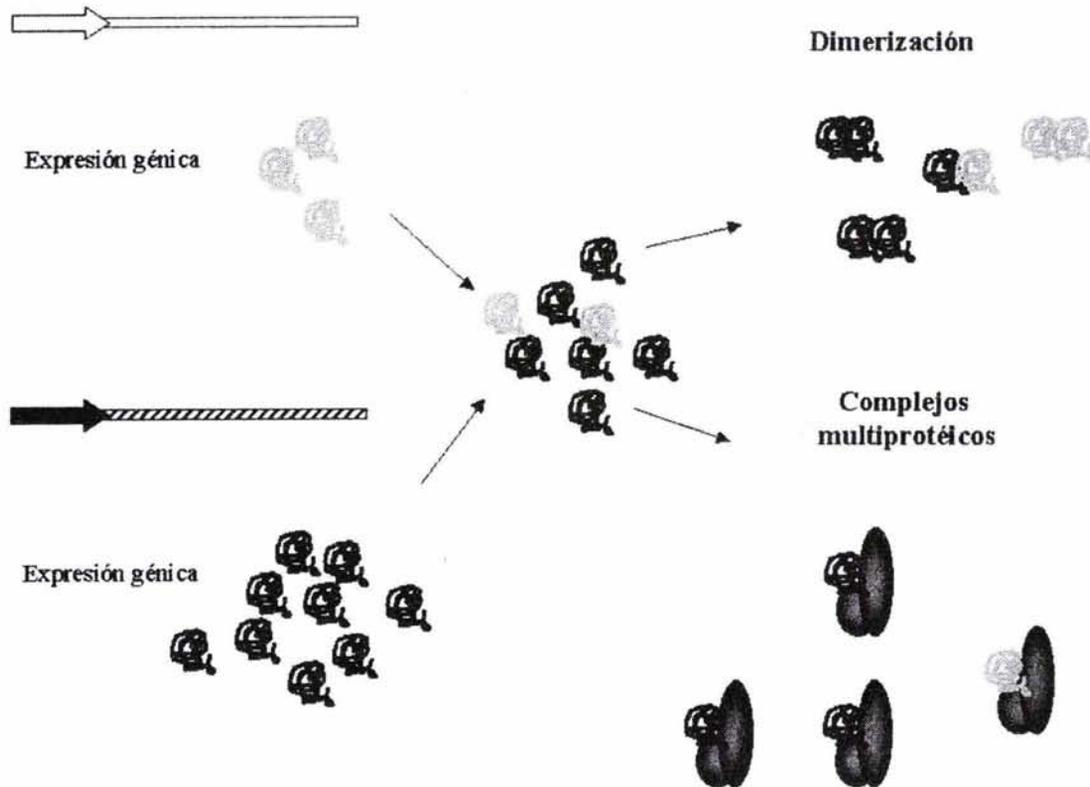


Figura II Modelo del mecanismo de acción de los *Dominantes negativos*. El gen dominante negativo (barra con rayas) se expresa bajo un promotor de expresión constitutiva (flecha negra), lo cual permite que haya más copias de la proteína modificada (en negro) que de la silvestre (en gris). Al haber más copias de la proteína modificada, esta acapara las vías en las que está involucrada la proteína silvestre. Arriba a la derecha se muestra un ejemplo del dominante negativo sobre una dimerización. Abajo a la derecha se muestra un ejemplo del dominante negativo actuando sobre un complejo multi-proteínico. La flecha y barra blanca representan al gen silvestre; los óvalos representan a diferentes proteínas de un complejo proteínico.

Otra limitación que tienen es que su uso generalmente es en cultivos celulares puesto que la forma más fácil de introducirlos a las células es mediante transfecciones de plásmidos o mediante virus recombinantes. De otro modo, la generación de organismos completos que sean dominantes negativos tomaría un tiempo considerable y equivalente a

la generación de un organismo “knock out”, pero con las limitaciones de un dominante negativo.

3. *Antisentidos.* Como su nombre lo indica, es posible inhibir la expresión génica introduciendo a las células la secuencia antisentido y complementaria del gen que se quiere inhibir¹⁷. A pesar de que los antisentidos se han usado durante varios años, muy poco se sabe de su mecanismo celular¹⁸. Lo que se sabe es que esta forma de inhibición de la expresión génica no induce modificaciones al DNA genómico ni utiliza el principio de competencia como los casos anteriores, sino, en su lugar, actúa sobre el RNA que ha sido transcrito hibridándose a este para evitar su traducción^{19,20}. Existen varias maneras para producir antisentidos: se pueden construir vectores que transcriben, bajo promotores de expresión constitutiva, la secuencia antisentido del gen a inhibir; se pueden sintetizar *in vitro* la secuencia antisentido o un fragmento de ella e introducirlo a la célula por los métodos comúnmente utilizados (transfección, electroporación o inyección); o también se pueden utilizar directamente fragmentos de DNA antisentido^{19,21}. En cualquiera de estas formas, lo que se espera finalmente es que no se traduzca el mRNA complementario al antisentido. Como ya se mencionó, a pesar de que esta estrategia ha sido utilizada intensamente en la última década, es poco eficaz y no siempre se obtienen los resultados esperados¹⁸. Lo anterior es por una razón principal: por cualquier protocolo que se siga, el antisentido se debe hibridar con su secuencia complementaria ya sea el transcrito primario o el mRNA maduro, y esto no siempre sucede. Hay mecanismos intracelulares que disparan un estado de alarma cuando moléculas exógenas de ácidos nucleicos entran a las células. Por ejemplo, en mamíferos, el sistema de interferón se activa al reconocer RNAs o DNAs “extraños” y los degrada²². Cuando se introducen antisentidos a la célula, estos son degradados antes de que se hibriden con su RNA complementario. Y es por lo anterior que es necesario introducir grandes cantidades de antisentidos para que algunas moléculas logren hibridarse con el mRNA. Sin embargo, al aumentar las concentraciones se producen efectos tóxicos que alteran la traducción a nivel general y la célula termina en apoptosis²². En la mayoría de los genes en los que se logran inhibir con antisentidos sólo se logran porcentajes de inhibición de 30-40 %; sin embargo, este porcentaje es insuficiente para observar un fenotipo definido en la mayoría de los casos.

4. *RNAi*. El RNA de interferencia (RNAi) es un fenómeno que ha revolucionado las ciencias biológicas desde su descubrimiento gracias a su gran potencia y especificidad¹⁸. La simple introducción de RNA de doble hebra (dsRNA) a células eucariontes reduce la expresión del gen cuya secuencia sea homóloga al dsRNA introducido. Esta reducción es altamente específica, es decir, sólo los mRNAs que son complementarios al dsRNA introducido son inhibidos²³. El RNAi se ha utilizado como una herramienta que permite silenciar prácticamente cualquier gen de forma post-transcripcional en una gran variedad de especies²⁴, lo que sugiere que la maquinaria que produce el RNAi está evolutivamente conservada²⁵⁻²⁸.

En sus comienzos, el RNAi era un fenómeno intrigante para muchos investigadores, sin embargo, la intensa investigación dirigida a identificar el mecanismo celular por el cual el RNAi actúa, ha permitido conocer algunas de las proteínas que son responsables del fenómeno de silenciamiento. El panorama general que se tiene hasta el momento es el siguiente: Cuando el dsRNA es introducido a las células, este se corta en fragmentos de 21 nucleótidos por una endonucleasa citoplasmática específica para dsRNA llamada Dicer^{29,30}. A estos fragmentos se les conoce como siRNAs (“small interfering RNAs”) y tienen la particularidad estructural que en cada uno de sus extremos 3’ sobresalen dos nucleótidos de la doble hebra (Fig. IIIA). Luego, los siRNAs producto de Dicer, entran a un complejo multi-proteínico llamado RISC (“RNA Induced Silencing Complex”), el cual degrada al mRNA mediante la hibridación secuencia específica con los siRNAs, provocando así el silenciamiento post-transcripcional del gen²⁶ (Fig. IIIA).

A pesar de que sus componentes no han sido identificados totalmente, ya se sabe que el complejo RISC está en el citoplasma²⁹ y en cercanía con los ribosomas dado que hay factores que son componentes del inicio de la traducción, como eIF2C/Argonata, GEM3 y GEM4, que son parte del RISC y que también son parte del complejo multi-proteínico de los ribosomas³¹. Además, el RISC se ha co-purificado con los ribosomas, a más de que las proteínas que forman parte de los ribosomas han sido co-localizadas con el RISC. Por lo tanto, puede ser que el RISC como los ribosomas sean parte de un mismo complejo multi-proteínico de gran masa molecular que actúa coordinadamente.

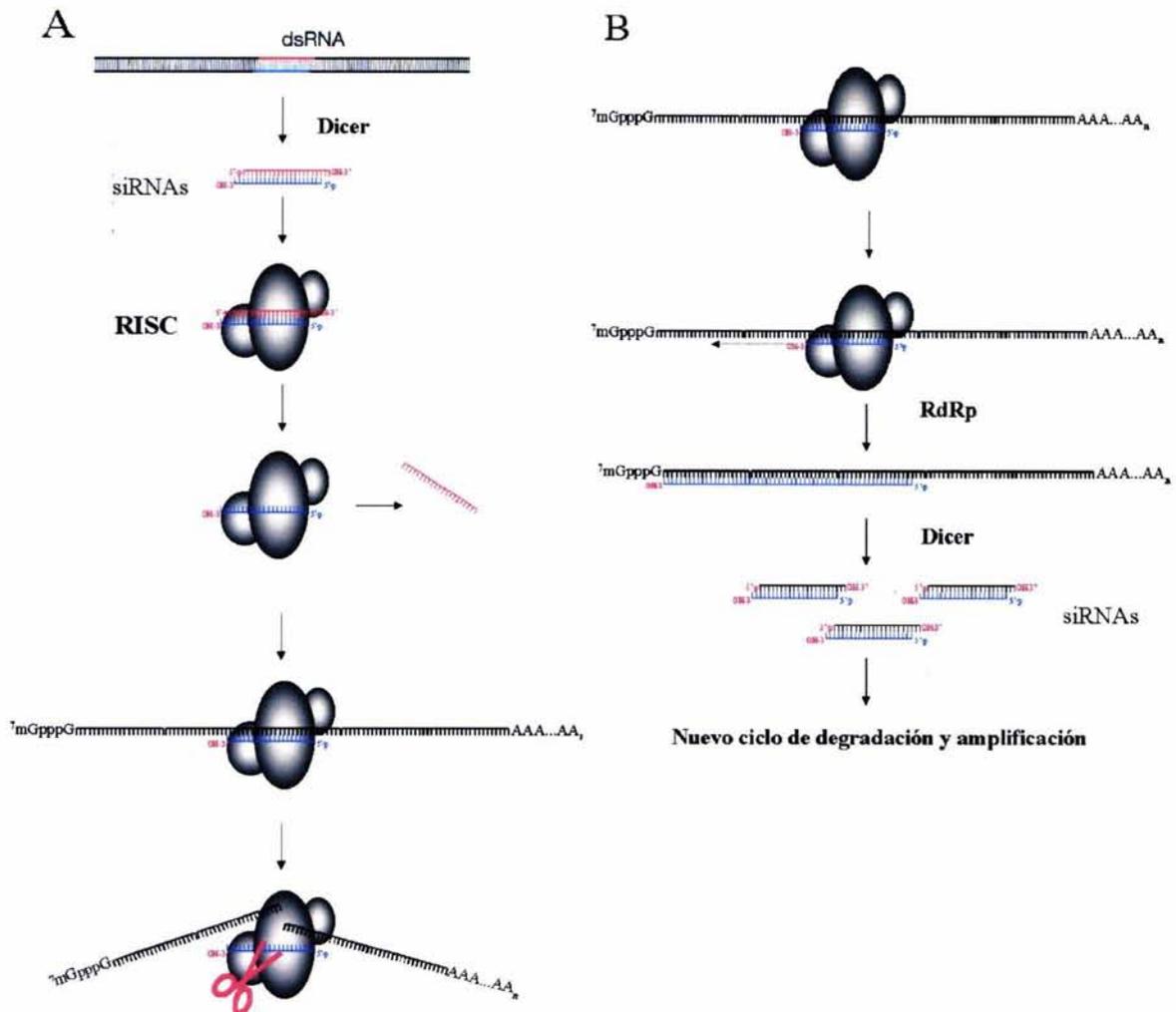


Figura III Mecanismo molecular del RNAi. A, Cuando se introduce dsRNA a la célula, este es cortado por Dicer en fragmentos de 21 nt llamados siRNAs. Los siRNAs entran en RISC y la hebra antisentido (azul) se conserva en el complejo. Después, el mensajero se hibrida con la hebra antisentido y el mRNA se degrada. B, Después de la hibridación del mRNA con el antisentido del siRNA ocurre una amplificación del antisentido provocada por las RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRps). La hebra amplificada forma dsRNA y este es cortado nuevamente por Dicer, generando así más siRNAs que entran a otro ciclo de degradación.

El RNAi es la herramienta más potente que se conoce hasta el momento para inhibir la expresión génica transitoriamente; se pueden lograr inhibiciones de hasta un 99%, efecto que solo es equiparable al obtenido en organismos “knock out”. El efecto del RNAi puede ser de larga duración en algunos organismos. Por ejemplo en plantas, el efecto del RNAi puede durar semanas e incluso meses ²⁶ y en nemátodos el efecto dura hasta la filial 1 ¹⁸. Este efecto es muy prolongado gracias a la amplificación que sufre el RNAi por medio de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRps). Cuando el dsRNA es cortado por Dicer y se generan los siRNAs, las RdRps sintetizan RNA tomando como molde al mRNA y como cebador o “*primer*” al siRNA antisentido hibridado al mRNA (Fig.IIIB). Así, se generan nuevas moléculas de dsRNA que entran cíclicamente a la degradación por Dicer, resultando en un efecto de larga duración ²⁶ (Fig. IIIB). La inhibición por RNAi es tan potente, que puede ocurrir en forma de una inhibición *sistémica* en algunas organismos como plantas, nemátodos y algunos insectos³², en otras palabras, el efecto de inhibición observado localmente en un tejido o grupo de células se propaga a lo largo del organismo y se generan fenotipos parecidos a un organismo “knock out”, pero en este caso, la inhibición de la expresión génica es transitoria.

Una enorme ventaja del uso de RNAi para inhibir la expresión génica es que, a diferencia de los “knock out”, con RNAi es factible inhibir muchos genes de forma simultánea. Recientemente se ha demostrado el poder de esta técnica de silenciamiento génico, al utilizarse para silenciar todos los genes de un cromosoma completo en el nematodo *Caenorhabditis elegans* ^{33,34}. Gracias a que la producción de dsRNA es relativamente simple y rápida, es posible utilizar al RNAi como una herramienta de inhibición de la expresión génica a gran escala, lo cual permite que la tarea de exploración genómica sea menos ardua.

a) *Métodos para generar RNAi en mamíferos.*

Cuando se describió por primera vez el uso del RNAi, rápidamente los grupos de investigación alrededor del mundo trataron de adoptarlo como una herramienta para inhibir genes en células de mamífero. Sin embargo, los primeros experimentos fueron

desalentadores, ya que a diferencia de lo que ocurre en plantas, levaduras, nemátodos e insectos, las células de mamífero no presentan una inhibición específica del gen complementario al dsRNA que se introduce, sino una inhibición general de la expresión génica iniciada por dsRNA³⁵. Este efecto inespecífico es debido a la acción de las proteínas involucradas en la cascada de señalización del interferón³⁶⁻³⁸. Entre las primeras proteínas que se activan de esta cascada se encuentra la proteína cinasa activada por dsRNA (PKR), la cual se autofosforila cuando se une a dsRNA con longitud mayor a 30 bases³⁶. El evento anterior produce la activación de la enzima (2'-5')oligo(adenylato) sintetasa (2'-5'OAS). Ambas proteínas pertenecen a la cascada de señalización del interferon α/β , que se activa cuando las células de mamífero son infectadas con virus de dsRNA. Esta cascada desemboca finalmente en el arresto funcional de los ribosomas, se impide así la traducción de las proteínas a nivel general y por último se activan caspasas que llevan la célula a apoptosis²². Por lo tanto, en sus comienzos, el uso de dsRNA para inhibir específicamente la expresión una proteína en mamíferos no parecía factible.

Sin embargo, algunos grupos de investigación comenzaron a introducir a las células directamente los siRNAs productos de Dicer, en lugar de dsRNA de gran longitud, ya que los siRNAs son de aproximadamente 21 nt. y no activan a PKR ni a la cascada del interferón³⁵. De este modo, se comprobó efectivamente que los siRNAs sintetizados *in vitro*, son capaces de entrar a la vía de RNAi y que además inhiben específica y potentemente tanto genes endógenos como genes exógenos en células de mamíferos sin los efectos de inhibición general provocados por el interferón^{28,39}. Estos hallazgos revolucionaron tanto el uso de RNAi en mamíferos como la inhibición de la expresión génica en estos, de tal forma, que se ha empezado a usar para silenciar genes *in vivo* en murinos²⁸ y se ha propuesto como una posible terapia génica en humanos^{25,40}.

Cuando se demostró que el RNAi podía ser utilizado eficazmente en mamíferos introduciendo directamente siRNAs a las células, las compañías biotecnológicas comenzaron a sintetizar siRNAs para su uso comercial. El diseño de estos esta basado, dependiendo de la compañía, en el contenido de guaninas y citocinas (GCs), en la longitud del siRNA y en su posición en el mRNA a la cual se hibridan. Sin embargo, no todos los siRNAs son igualmente potentes y efectivos, hay algunas secuencias que sólo hacen inhibiciones parciales y otras no inhiben la expresión de la proteína^{41,42}. A pesar de

la intensa investigación de los últimos años, no se sabe con exactitud que es lo que causa que algunas secuencias de siRNAs no sean efectivas o tengan muy poca eficiencia mientras que otras eliminan más del 90% de la expresión del mismo gen. Se ha propuesto por ejemplo, que la región del mensajero a la cual se hibridan los siRNAs es esencial para su posterior degradación por el RISC ⁴², o que la complementariedad entre el siRNA y el mRNA no es total, ya que se ha demostrado que algunos siRNAs necesitan una hibridación perfecta con el mRNA para inducir un efecto de interferencia⁴². Sin embargo, siRNAs que no son totalmente complementarios al mRNA inhiben la expresión génica perfectamente ⁴². Así pues, la identificación de secuencias para uso en experimentos de RNAi ha sido hasta hoy día un ejercicio de ensayo y error, en donde usualmente se sintetizan 4 ó 5 secuencias de 21 nucleótidos seleccionadas a lo largo del mRNA de interés y se ensayan en experimentos de inhibición para escoger la más eficiente. Este ejercicio, aunque finalmente resulta en la elección de una secuencia útil y poderosa, es costoso y consume mucho tiempo.

Otra de las estrategias alternativas mas eficaces para generar RNAi en células de mamíferos, es el uso de plásmidos que confieran interferencia mediante la expresión de estructuras de tallo y asa o *hairpins* de RNA de 21-25 nucleótidos de longitud (shRNAs) ⁴³⁻⁴⁶. Estos plásmidos, transcriben RNAs pequeños que contienen las secuencias sentido y antisentido del siRNA, las cuales están separadas entre si por un *loop* o asa que contiene algunos nucleótidos (6-9 nt) (Fig. IVA). Al ser transcritos, los RNAs se auto-hibridan para formar los hairpins y estos pueden entrar eficientemente a la vía de Dicer, la cual los edita removiendo el loop y deja los 2-nt canónicos que sobresalen de la doble hebra de siRNA (Fig. IVA). Cabe recalcar que los shRNAs no rebasan el tamaño de 30 nt en su forma de doble hebra, lo cual permite que se procesen sin activar a la PKR y sin mandar a la célula a apoptosis.

Para transcribir los hairpins es necesario utilizar promotores en los que se conozca el sitio exacto del inicio y fin de la transcripción con la finalidad de producir transcritos del tamaño deseado. Esto no es factible utilizando promotores de RNA polimerasa tipo I o II; sin embargo, recientemente se ha demostrado que los promotores de RNA polimerasa tipo III (RNA pol III) producen shRNAs adecuados para entrar en la vía de RNAi^{40,44,46}. Cuando las RNA pol III encuentran cinco timidinas (Ts) seguidas en una secuencia

sentido de DNA, detienen la transcripción y además cortan las tres Ts mas cercanas al extremo 3' del RNA⁴⁷ (Fig IVA). Por lo tanto, para construir vectores que transcriban shRNAs hay que seguir la simple regla de incluir cinco Ts al final del shDNA. Esto permite que los transcritos de hairpins sean finamente diseñados para su uso en RNAi, evitando así la activación del interferón.

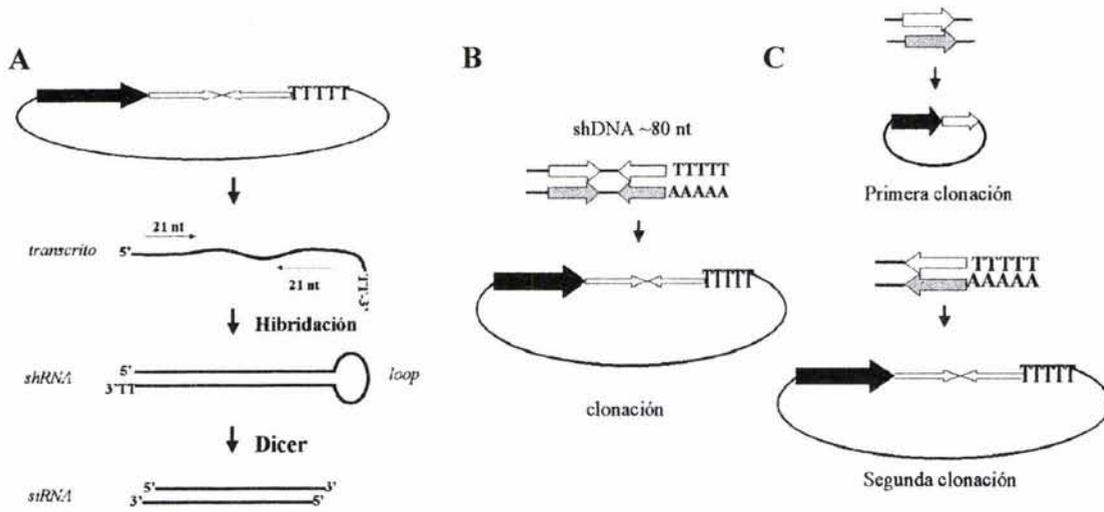


Figura IV Diseño de vectores que expresan shRNAs. A, Cuando se transcribe la secuencia de RNA que lleva las secuencias invertidas se forma un shRNA que después es cortado por Dicer. B, Para producir un *shDNA* se tiene que sintetizar dos oligonucleótidos complementarios de ~80 nt, después se tienen que hibridar y por último se deben clonar. C, Alternativamente se pueden hacer clonaciones secuenciales para evitar que los oligonucleótidos se autohibriden. En la primer clonación se inserta la secuencia sentido y en la segunda clonación se inserta la secuencia antisentido, en ambos casos se debe ligar DNA de doble hebra. Las flechas blancas representan una hebra, las flechas grises representan su hebra complementaria y las flechas negras

Aunque el uso de shRNAs ha promovido aún más el uso de RNA de interferencia en mamíferos -como es el caso de los adenovirus recombinantes que producen shRNAs⁴⁸- la elección de la secuencia contenida en el hairpin (al igual que los siRNAs), sigue requiriendo prolongados ensayos de prueba y error con múltiples secuencias, por lo que la producción de estos no persiste de ser muy costosa y de consumir mucho tiempo. Por ejemplo, si se desea construir un vector para producir shRNAs, primero es necesario diseñar un oligonucleótido de DNA de ~75 nt que contenga la secuencia sentido y antisentido del siRNA, un terminador de la transcripción (al menos cinco Ts) en el extremo 3', una pequeña secuencia que sirva como asa separadora del hairpin (alrededor de 6-9 nt), dos secuencias distintas de reconocimiento para enzimas de restricción (~6 nt cada una), las cuales permitirán la clonación direccional del shRNA (Fig. IVB), y por

último, como no es posible ligar hebras sencillas de DNA en cadenas dobles del vector, se debe diseñar un segundo oligo con el mismo número de nucleótidos y que contenga exactamente la misma secuencia pero complementaria al primero. Posteriormente, los dos oligonucleótidos se hibridan para producir lo que se conoce como shDNAs, se cortan los sitios de restricción con sus respectivas enzimas y se liga en el plásmido que contenga el promotor de RNA Pol III.

Sin embargo, cuando se hibridan los dos oligonucleótidos ocurren auto-hibridaciones las cuales provocan que la estructura secundaria de lugar a un hairpin de DNA, lo cual reduce la eficiencia de ligación enormemente debido a que el loop que se forma en un extremo del hairpin elimina uno de los dos extremos cohesivos necesarios para su ligación .

Para evitar los efectos de autohibridación al producir shDNAs, alternativamente se pueden diseñar cuatro oligonucleótidos de aproximadamente 35 nt cada uno para formar el shDNA de los cuales, dos son para producir la secuencia sentido y dos para la secuencia antisentido (Fig. IVC). En el primer par, un oligo contiene la secuencia sentido y el otro su complementaria; en el segundo par, un oligo contiene la secuencia antisentido y el otro su complementaria, además de dos sitios de restricción en cada par de ellos que permiten su clonación direccional y secuencial. Con esta alternativa se elimina la autohibridación que puede ocurrir con oligonucleótidos muy grandes de secuencias palindrómicas, ya que las secuencias sentido y antisentido se producen mediante ligaciones secuenciales.

Sin embargo, a pesar de que esta estrategia elimina el problema de las autohibridaciones, las ligaciones secuenciales toman un tiempo considerable de realización, además de incrementar aún más en costo del RNAi, ya que en este caso se requieren más oligonucleótidos y más ligaciones para la producción y clonación del shDNA. Por otro lado, si se requiere sintetizar muchas secuencias de 21 nt para encontrar la más efectiva, lo ideal sería tener un método que pudiera automatizarse. La automatización de este proceso es vital si se desea explorar la función de muchos genes simultáneamente; ya que de otra forma habría que producir cada shDNA individualmente, lo cual requiere mucho tiempo y es poco práctico para encontrar la secuencia de 21 nt más efectiva para inhibir la expresión de uno o más genes.

La generación de shDNAs ha probado ser una de las formas más efectivas para llevar a cabo experimentos de RNAi en mamíferos. A diferencia de los siRNAs sintetizados químicamente, los shDNAs permiten producir hairpins de manera continua en las células, ya que es relativamente fácil y rápido purificar grandes cantidades de plásmidos que transcriban shRNAs. Sería por ello de gran utilidad, contar con un método sencilla para generar rápidamente diversos shDNAs a un bajo costo y que además este método pueda ser automatizable.

El presente trabajo describe la implementación de un método rápido, fácil y económico de producir shDNAs útiles para experimentos de RNAi. Con este método, se elimina la necesidad de sintetizar oligonucleótidos de gran tamaño (75-80 nt) además de que permite automatizar la construcción de shDNAs con diversas secuencias de 21 nt. Por otro lado, podría eliminar la necesidad de probar distintas secuencias de 21 nt para encontrar la más eficiente, ya que permite diseñar, a priori, el shRNA que teóricamente provocará el mejor efecto de silenciamiento. Con este método es posible producir una gran variedad de secuencias de shDNAs simultáneamente y se elimina además la necesidad de ligaciones secuenciales.

III OBJETIVO

Implementar un método rápido, sencillo y económico de producir shDNAs útiles para experimentos de RNAi. Este método debe permitir producir una gran variedad de shDNAs simultáneamente, lo que a su vez facilitará su automatización.

IV MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS Y SOLUCIONES

La tripsina, PBS, bacterias competentes, LB, TAE, así como geles de agarosa o acrilamida se prepararon siguiendo los protocolos enlistados en la sección A de *Molecular cloning : a laboratory manual*¹⁶. Los protocolos de biología molecular empleados en este trabajo se hicieron siguiendo los métodos estándar contenidos en la referencia anterior.

CULTIVO CELULAR

Para la realización de los experimentos se usó una línea celular proveniente de cáncer cérvico uterino de humano (HeLa), la cual fue obtenida de la colección del ATCC. Las células se crecieron en monocapa en cajas de 60 mm de diámetro con medio líquido DMEM (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen) y 1mM de piruvato de sodio (Sigma) con un pH final de 7.3. Para resembrar y mantener los cultivos, las células se lavaron una vez con PBS, se despegaron de la caja incubándolas con 1 ml de tripsina durante 3 min y se les agregó DMEM para después diluirlas al 30 % en cada resiembra. Las células se mantuvieron en un incubador a 37° C, en una atmósfera con 5% de CO₂ y la toda manipulación de las células se realizó en condiciones de esterilidad.

CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS Y shDNAs

Para construir el vector pBB4H1, se amplificó por PCR el promotor de histona1 (H1) de DNA genómico de humano obtenido de una muestra de sangre donada por el Q.F.B. Agustín Luz. Los oligonucleótidos utilizados para la PCR son:

5'- CCATGGAATTCGAACGCTGACGT -3' y

5'- GCAAGCTTTGGTCTCATAAGAACTTATAAGATTCCC -3' que contienen los sitios *EcoR* I y *Hind* III respectivamente (secuencia subrayada). El producto de PCR se subclonó en el plásmido pDrive (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante, para obtener el plásmido pDrive-H1. Después, el pDrive-H1 se digirió con las enzimas *EcoR* I y *Hind* III para liberar un fragmento de 230 pb que contiene al promotor H1. El

fragmento después fue clonado en los sitios *EcoR* I y *Hind* III del plásmido pBlueBac 4 (pBB4) (Invitrogen) para obtener el plásmido pBB4H1.

Para generar los shDNAs se usaron los siguientes oligonucleótidos:

hpGFP1, 5'-GCAAGCTTCCCCAAAAACCACTACCTGAGCACCCAGGGGCCCC-3',

hpGFP2, 5'-GCAAGCTTCCCCAAAAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGGCCCC-3',

hpGFP3, 5'-GCAAGCTTCCCCAAAAACGGCCACCAGTTCAGCGTGGGGGCCCC-3',

hpGFP4, 5'-GCAAGCTTCCCCAAAAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGGCCCC-3',

hpTRPC4, 5'-GCAAGCTTCCCCAAAAUUACUCGUCAACAGGCGGACGGGGGCCCC-3'

Nota: Las secuencia que se encuentra antes de AAAAA, contiene el sitio *Hind* III (subrayado) seguido de cuatro Cs. Las Cs fueron añadidas en el diseño de los oligonucleótidos ya que permiten que la RNA pol III comience a sintetizar RNA de 31 bases después de la caja TATA del promotor. La RNA pol III sintetiza el RNA al encontrar la primera A después de la base -1 del promotor. La región en cursivas representa la secuencia que se tomó del gen.

La reacción enzimática del fragmento Klenow se llevó a cabo en un termociclador para controlar eficazmente las temperaturas. Todos los oligonucleótidos se procesaron de la misma forma. Se tomaron 10 µl de los oligonucleótidos (~35 mM) y se calentaron a 95°C durante 5 min (Fig. V), cuando la temperatura llegó a 40°C se añadieron 10µl de la mezcla que contiene dNTPs, 2mM; fragmento Klenow (Invitrogen), 5 unidades; Buffer 2 10X (Invitrogen), 2 µl; DMSO, 2% y H₂O a un volumen final de 10 µl. La reacción prosiguió de acuerdo con las temperaturas mostradas en la Fig V.

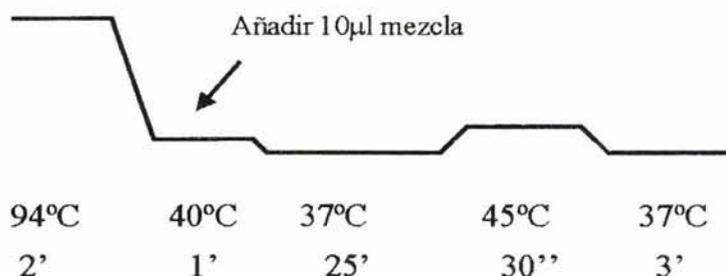


Figura V Temperaturas de la reacción de Klenow. La mezcla que contiene el fragmento Klenow se agrega hasta que la temperatura baja a 40°C aproximadamente. Las temperaturas se programaron en un termociclador.

[Alternativamente, se puede mejorar la eficiencia de la síntesis del shDNA añadiendo (después de la reacción de Klenow): 3 unidades de TAQ polimerasa, 5 µl de buffer de PCR 10X, 2 µl de MgCl₂ 50 mM y H₂O a un volumen final de 50 µl; y siguiendo las temperaturas: 94°C, 30''; 60°C, 30''; 72°C, 1'; durante 30 ciclos.]

Después, los productos de la reacción de Klenow se limpiaron con columnas de intercambio iónico para extracción de gel *Concert* (Invitrogen) y se resuspendieron en un volumen final de 50 µl siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los 50 µl de los productos limpios se digirieron con la enzima *Hind* III, esta se inactivo a 65°C durante 15 min y los productos se ligaron en el sitio *Hind* III del pBB4H1 previamente desfosforilado con fosfatasa alcalina. No es necesario purificar la banda de ~75 pb del shDNA ya que los fragmentos que no sean correctamente sintetizados contienen los dos extremos cohesivos después de cortar con *Hind* III, lo que impide que sean ligados. Los productos de la ligación fueron transformados en bacterias *E.coli* DH5α competentes por CaCl₂.

TRANSFECCIÓN E INFECCIÓN DE CÉLULAS HeLa

Los plásmidos fueron transfectados en las células utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Se sembraron células HeLa a una confluencia de 60% en cajas de 12 pozos y se incubaron 24 h. a 37°C y 5% de CO₂, se lavaron una vez con 1 ml de Optimem (Invitrogen) a pH de 7.3. Las transfecciones se hicieron incubando las células con una mezcla que contiene 100 µl de Optimem, 3 µl de Lipofectina 2000 y DNA a diferentes concentraciones (ver resultados) y se incubaron durante 4 h. a 37°C. Se agregaron 500 µl de DMEM con 20% suero fetal bovino y se dejaron recuperar 24 h. a 37°C. Se lavaron con 1 ml de PBS, se infectaron con 500 µl de Optimem y con adenovirus a una MOI final de 2 y se incubaron a 37°C. Cuatro h. después de la infección se agregaron 500 µl de DMEM con 20% de suero fetal bovino a las células y se incubaron nuevamente durante 24 h. a 37°C, 5% CO₂. Al día siguiente se cuantificaron los resultados.

PRODUCCIÓN DE ADENOVIRUS RECOMBINANTES QUE CONTIENEN EL GEN DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE

Los adenovirus recombinantes contienen el gen de la proteína verde fluorescente dirigida por el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). El virus se produjo de acuerdo al protocolo previamente reportado⁴⁹. Brevemente: El plásmido “shuttle” que contiene la proteína verde fluorescente bajo el control transcripcional del promotor CMV se usó para la construcción del vector adenoviral. La recombinación homóloga de este plásmido con el plásmido Adeasy 1 se llevó a cabo en bacterias electro-competentes BJ5183. Una vez confirmada la recombinación por restricción, el plásmido recombinante se purificó por columna y se transfectó en células HEK 293. Las células infectadas fueron monitoreadas para evaluar el efecto citotóxico de la infección. Después se colectaron y se rompieron con ciclos de calor y congelamiento y se purificaron los virus por gradientes de Cloruro de Cesio. La cuantificación del virus se llevó a cabo por ensayo de placa. El título del stock fue 5×10^8 p.f.u. / ml.

CITOMETRÍA DE FLUJO

Para estimar los niveles de expresión de la GFP, las células que fueron tratadas con el plásmido y/o virus, se despegaron de los pozos con 1 ml de tripsina, se resuspendieron en 1 ml de PBS y se analizó la intensidad de la fluorescencia con un citómetro de flujo FACScan (Beckton and Dickinson) contando 10000 eventos en cada experimento. Para evaluar la inhibición de la fluorescencia y corregir las diferencias entre experimentos debidas a las ligeras variaciones de la transducción del adenovirus, las poblaciones se normalizaron a 100% de la fluorescencia sobre el basal en cada experimento individual. Los porcentajes de las regiones cuantificadas se estimaron utilizando el programa WINMDI y tomando el inverso de las regiones no fluorescentes como índice de inhibición. El porcentaje de inhibición se obtuvo del promedio de tres experimentos individuales.

IMÁGENES DE MICROSCOPIA CONFOCAL

Las células HeLa que fueron tratadas con plásmido y/o virus, se lavaron con PBS y se despegaron con tripsina 24 horas después de la infección con adenovirus y se

resembraron en cubreobjetos estériles. Veinticuatro horas después se analizaron en un microscopio confocal tomando los mismos parámetros en cada una de las condiciones.

V RESULTADOS

Construcción de shDNAs

Entre las desventajas que hay para generar shDNAs se encuentran el diseño y la síntesis de oligonucleótidos de gran longitud. Estas desventajas convierten al RNAi en una herramienta económicamente costosa y difícil de implementar. Para diseñar un shDNAs que sea económico y que además conserve la eficiencia de los protocolos comúnmente usados, hemos aprovechado el principio por el cual se amplifica DNA o RNA *in vitro* con métodos como PCR, RT-PCR, Primer Extensión, etc. En estos métodos, la amplificación se lleva a cabo gracias a un cebador o *primer* que permite que la correspondiente polimerasa comience a sintetizar DNA o RNA en dirección 5'-3', tomando como iniciador al extremo 3' del primer y como molde a la hebra complementaria al mismo (Fig VIA).

Utilizando este principio, exploramos la posibilidad de reducir, en primera instancia, el costo del shDNA ocupando un solo oligonucleótido que permita sintetizar la hebra sentido y antisentido, además de su correspondiente hebra complementaria. En la Figura VIB se muestra la lógica del procedimiento: Si se utiliza un oligonucleótido que en su extremo 3' tenga una secuencia tal que le permita hibridarse a una molécula idéntica a si mismo, se generaran dos extremos 3' similares a los necesarios en una reacción de amplificación. Los extremos 3' pueden ser polimerizados posteriormente al tomar la hebra complementaria como molde, dando como resultado una cadena de DNA de doble hebra que se sintetizó a partir de un sólo oligonucleótido. Esta cadena contiene la secuencia sentido y la antisentido en ambas hebras (Fig. VIB).

Para que los extremos 3' se hibriden correctamente, es necesario utilizar una secuencia palindrómica parecida a las secuencias de los sitios de restricción. Esto permite que las hebras conserven la dirección antiparalela de los ácidos nucleicos. Además, la secuencia palindrómica debe hibridarse a su complementaria con suficiente estabilidad como para que la polimerasa pueda iniciar la reacción, pero al mismo tiempo, la hibridación solo debe ocurrir por los extremos 3'. Por otro lado, el número de bases contenidas en el palíndrome debe ser entre 6 y 10 nt, ya que al transcribirse el RNA, este servirá además como loop para el hairpin cuando se hibride la secuencia sentido con la antisentido.

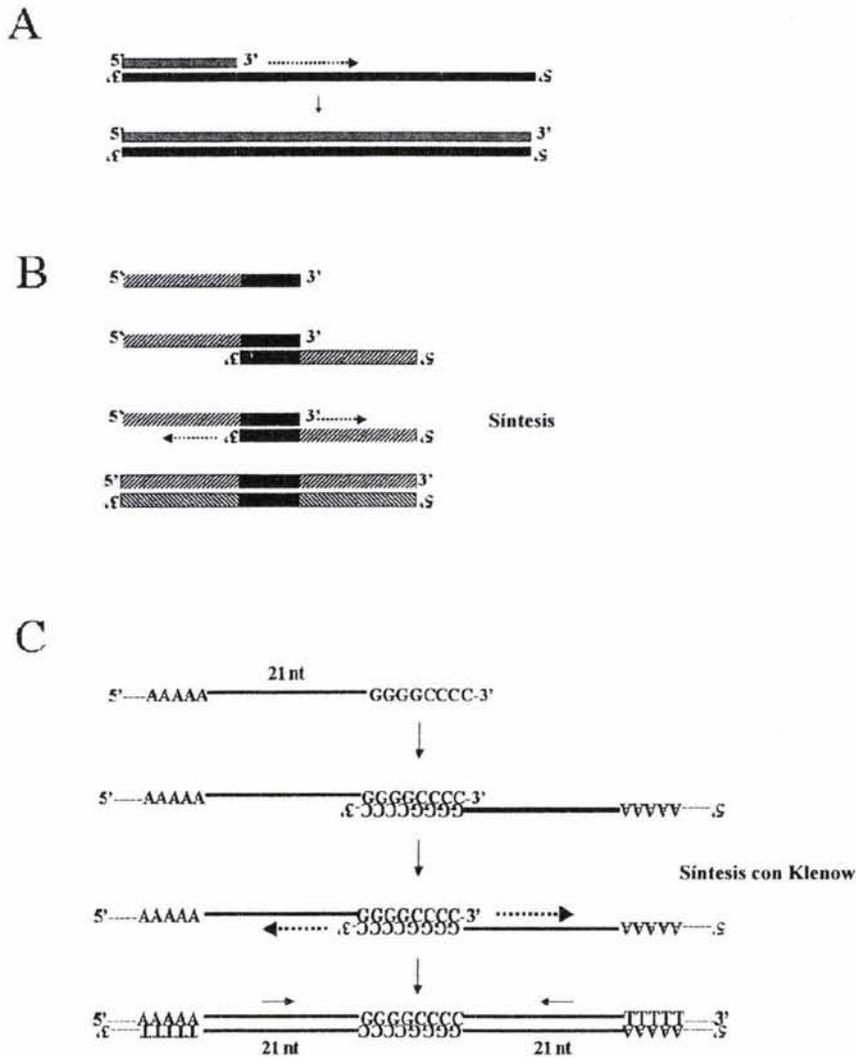


Figura VI Modelo de amplificación para generar un shDNA. A, La amplificación de DNA se lleva a cabo por medio de un primer (gris) que se hibrida a su secuencia complementaria (negro). Cuando se sintetiza a partir de los extremos 3' se forma una cadena de DNA que contiene la hebra molde y su complementaria. B, Si se sintetiza un oligo que en su extremo 3' (región en negro) contenga una secuencia que le permita hibridarse a una molécula idéntica, se producen dos extremos que pueden ser polimerizados para formar DNA de doble hebra. C, Si se incluye la secuencia de 21 nt entre AAAAA y GGGGCCCC y se rellena con Klenow, es posible formar un shDNA que contenga la secuencia sentido y antisentido de 21 nt en la misma hebra. Al transcribirse el shDNA se generará un shRNA que lleve como secuencia separadora o posible asa la secuencia ggggcccc. Las líneas punteadas antes y después de las As y Ts representan la secuencia de un sitio de restricción.

Entre las secuencias que podrían cumplir con estas características, se encuentran las que cuentan con un alto contenido de GCs. Las uniones de G-C se estabilizan formando tres puentes de hidrógeno ^{1,16}(a diferencia de las A-T que forman solo dos), y por lo tanto se requiere de mayor energía para su desnaturalización. Al buscar entre diferentes secuencias con GCs, encontramos que 5'-GGGGCCCC-3' cumple con las características necesarias de longitud y estabilidad, ya que su T_m es 37°C; ideal para una DNA polimerasa como el fragmento Klenow de *E. coli*, cuya máxima actividad enzimática se lleva a cabo a esta misma temperatura. Además, esta secuencia conserva la característica de palíndrome propia de los sitios de restricción, lo cual permite que se pueda hibridar a una molécula idéntica y formar dos hebras antiparalelas de DNA.

Además de incluir en el oligonucleótido la secuencia 5'-GGGGCCCC-3' al final de los 21 nt. correspondientes al gen que se desea silenciar, se debe incluir un terminador de la transcripción para RNA pol III. Cuando la RNA pol III encuentra cinco Ts en la hebra sentido, se termina la transcripción y la polimerasa corta las tres Ts más cercanas al extremo 3', por lo que sólo dos Ts del terminador permanecen en el RNA transcrito ⁴⁷.

Como el terminador de la transcripción debe estar al final del shDNA, no es posible que este se incluya en el extremo 3' del oligonucleótido, ya que al polimerizar con Klenow el terminador no resultaría en el lugar indicado. Sin embargo, si se incluye en el extremo 5' del oligonucleótido la secuencia 5'-AAAAA-3', se generara un terminador 5'-TTTTT-3' al finalizar la reacción de Klenow, tal como se muestra en la Figura VIC. De tal forma que, un oligonucleótido que contenga cinco As, seguidas de los 21 nt del hairpin y que al final contengan la secuencia GGGGCCCC, teóricamente puede generar una secuencia de DNA de doble hebra que de como resultado un shDNA. Por otro lado, para facilitar la clonación del shDNA, hemos incluido en el oligonucleótido la secuencia de un sitio de restricción (*Hind* III) río arriba de las As, seguido de algunas bases que permiten que la Pol III transcriba el RNA a partir de la primera de las cinco As ⁴⁷(ver materiales y métodos).

Como se muestra en la Figura VIC, después de la síntesis del shDNA se forma una estructura perfectamente palindrómica que contiene dos sitios de restricción idénticos en cada extremo del shDNA. Como se mencionó, estos sitios facilitan la clonación del shDNA, pero además, se elimina la necesidad de clonaciones direccionales dado que el shDNA es perfectamente palindrómico.

Un oligonucleótido con tales características de secuencia y longitud podría formar estructuras secundarias diferentes a la mostrada en la Figura VIC. Por lo tanto, para prever las posibles estructuras en el diseño de este método, añadimos en el oligonucleótido varias secuencias al azar de 21 nt entre las As y las GGGGCCCC para simular la creación de diferentes shDNAs y las analizamos por computadora. Utilizando algoritmos como el que manejan los programas DNAMAN y OLIGOS para predecir estructura secundaria, no encontramos ningún impedimento estructural por el cual no se pueda formar DNA de doble hebra. Además, en todas las secuencias analizadas se predice la formación de una estructura secundaria formada a partir de la hibridación de los extremos 3', idéntica a la mostrada en la Figura VIC. Por lo tanto, teóricamente es posible generar shDNAs con un sólo oligonucleótido.

Para verificar experimentalmente si se pueden producir shDNAs de esta forma, diseñamos un oligonucleótido para silenciar a la proteína verde fluorescente (GFP). La secuencia de 21 nt de GFP se incluyó en el oligonucleótido para dar como resultado la estructura de la figura VIC. Después de la polimerización con Klenow (ver materiales y métodos), se separó el producto de la reacción por electroforesis en un gel de poliacrilamida. Como se esperaba, la reacción se llevó a cabo de acuerdo a lo esperado, dando un producto de ~75 pb que corresponde al oligonucleótido polimerizado (Fig. VIIA). Para confirmar que la secuencia del shDNA fuera correcta, el producto de 75 pb se clonó y se secuenció. La secuencia obtenida es la esperada, por lo que concluimos que el método con un oligonucleótido permite generar shDNAs eficazmente.

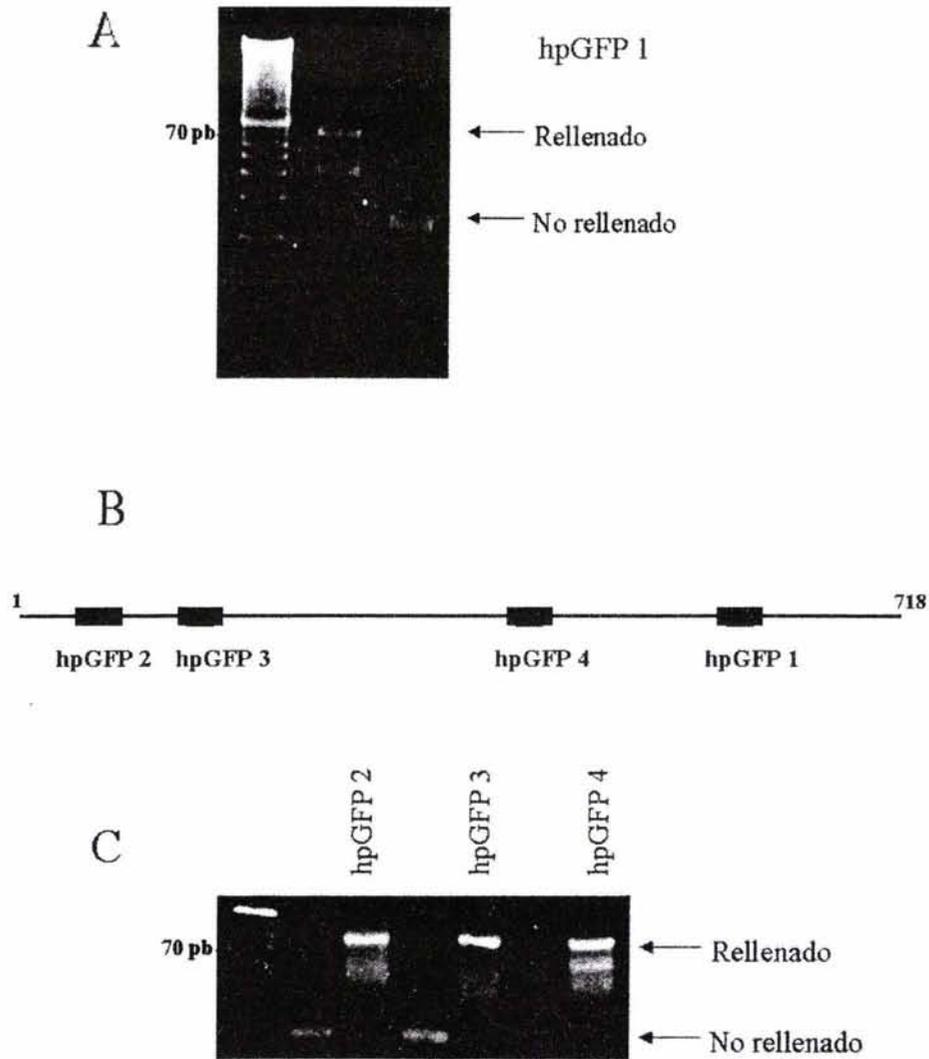


Figura VII Rellenado del shDNA con Klenow. **A.** El oligo hpGFP1 “rellenado” produce un shDNA de ~75 pb, el control no rellenado corre como hebra sencilla en el tamaño aproximado de 30 pb. **B.** Posiciones de los diferentes shDNAs dentro del mRNA de GFP. **C.** Gel de agarosa al 4% que muestra el resultado de la automatización del rellenado de los shDNAs. En todos los casos se obtuvo una banda de ~75 pb al hacer la reacción simultáneamente.

Automatización del método

Habiendo confirmado la eficiencia del método para construir shDNAs, se decidió probar además si este puede ser automatizable, es decir, si se pueden llevar a cabo reacciones simultáneas con oligonucleótidos idénticos pero que difieran únicamente en la secuencia de 21 nt que formará el shRNA. Ya que la hibridación de los oligonucleótidos por el extremo 3' depende únicamente de la secuencia GGGGCCCC, es posible utilizar el mismo programa de temperaturas para producir más shDNAs. Lo anterior es posible porque la temperatura de autohibridación del oligonucleótido depende de la secuencia GGGGCCCC, la cual es constante en el método que diseñamos.

Para ello se sintetizaron tres oligonucleótidos más que contienen diferentes secuencias de 21 nt a lo largo del mismo mensajero de GFP (Fig. VIIB) y se rellenaron idénticamente al primero en tres reacciones simultáneas. Como se muestra en la Figura VIIC, las tres reacciones con Klenow se rellenaron satisfactoriamente lo cual demuestra que este método es automatizable para sintetizar simultáneamente shDNAs que difieran únicamente en la secuencia de 21 nt.

Eficiencia del método para inhibir la expresión génica en células de mamífero

Para probar la efectividad de los diferentes shDNAs diseñados con el método en el silenciamiento de GFP, se transfectaron células HeLa con los plásmidos que expresan los diferentes hairpins. Al día siguiente se incubaron con un adenovirus recombinante que expresa GFP y 24 horas después se evaluó el silenciamiento de la fluorescencia. La inhibición de GFP obtenida con los diferentes plásmidos es similar en cada uno de ellos cuando se transfectan con 3.5 µg/ml de DNA (Fig. VIII). Para comprobar que esta inhibición es específica y únicamente silencia al mRNA complementario a la secuencia de 21 nt, construimos un shDNA control que contiene una secuencia no relacionada a GFP. Como se esperaba, la transfección del plásmido que lleva un shDNA no relacionado no inhibe la expresión de GFP, lo cual demuestra que el método conserva la especificidad reportada del RNAi. La estructura secundaria que da lugar a cada shRNA se obtuvo de un modelado *in silico* llevado a cabo con el servidor Mfold.

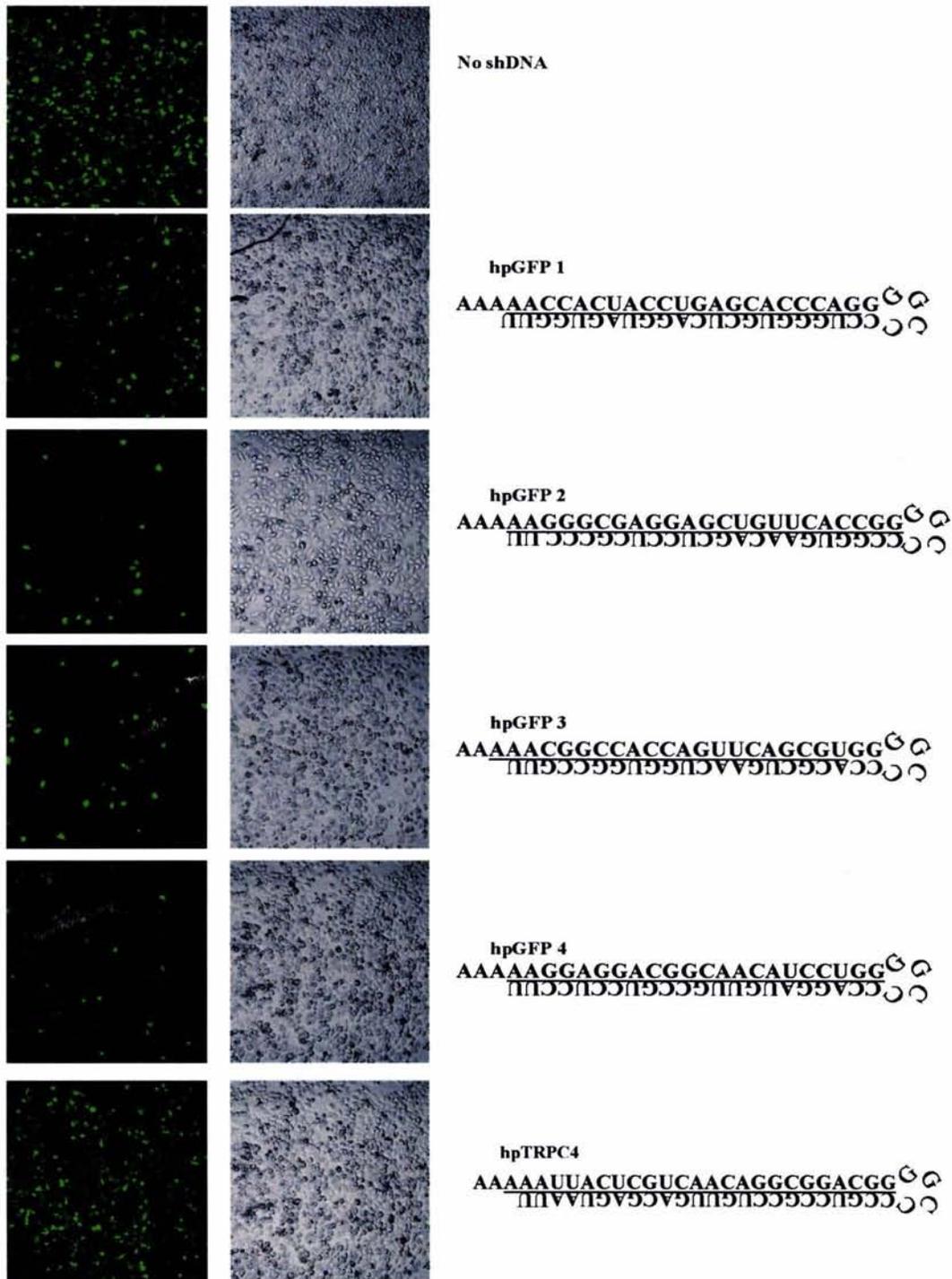


Figura VIII Microscopía confocal de células HeLa mostrando los diferentes niveles de inhibición de GFP producida por los shDNAs. Las células fueron transfectadas con 3.5 µg/ml de plásmido y 24 h. después incubadas con un adenovirus que expresa EGFP. Como control de especificidad se transfectó el plásmido con el shDNA no relacionado hpTRPC4. A la derecha se muestran las estructuras secundarias de los shRNAs que se transcriben de los plásmidos transfectados. Las secuencias subrayadas corresponden a la secuencia del mRNA de GFP o TRPC4. Estas estructuras se obtuvieron por el modelado *in silico* del servidor Mfold: <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold.html>.

Por otro lado, para comparar la efectividad de cada shDNAs, se transfectaron diferentes concentraciones de los plásmidos que expresan los hairpins contra GFP. Los resultados revelaron que la inhibición de la expresión de GFP se redujo de manera dosis dependiente (Fig. 4); mientras que la fluorescencia no se redujo en las células que fueron transfectadas con el plásmido que expresa el hairpin no relacionado, aun en concentraciones altas, lo cual confirma la especificidad de los shRNAs ya que solo se degrada el mRNA complementario a la hebra antisentido del shRNA. Al ajustar los datos de los shRNAs a una curva dosis respuesta, se encontró que la concentración que inhibió la mayor cantidad de fluorescencia está entre 2-3 $\mu\text{g/ml}$ de DNA/ 1.25×10^5 células (Fig. 5). Los shRNAs mas efectivos en silenciar la fluorescencia fueron hpGFP 2, hpGFP 3 y hpGFP 4 inhibiendo la expresión de GFP (~65-70%), mientras que hpGFP 1 inhibió la expresión de GFP con una eficiencia menor (~40%). Concentraciones de DNA mayores a 3.5 $\mu\text{g/ml}$ no provocan una inhibición mayor en ningún caso, lo cual indica que la inhibición es saturable. Un dato interesante es que la secuencia de 21 nt del hpGFP1 es una secuencia que ya había sido empleada en un trabajo anterior en células de mamífero mostrando una buena inhibición (la inhibición fue evaluada por western blot) ²³, sin embargo, en los experimentos que realizamos encontramos que hay secuencias que tienen mayor efectividad al inhibir la expresión de GFP.

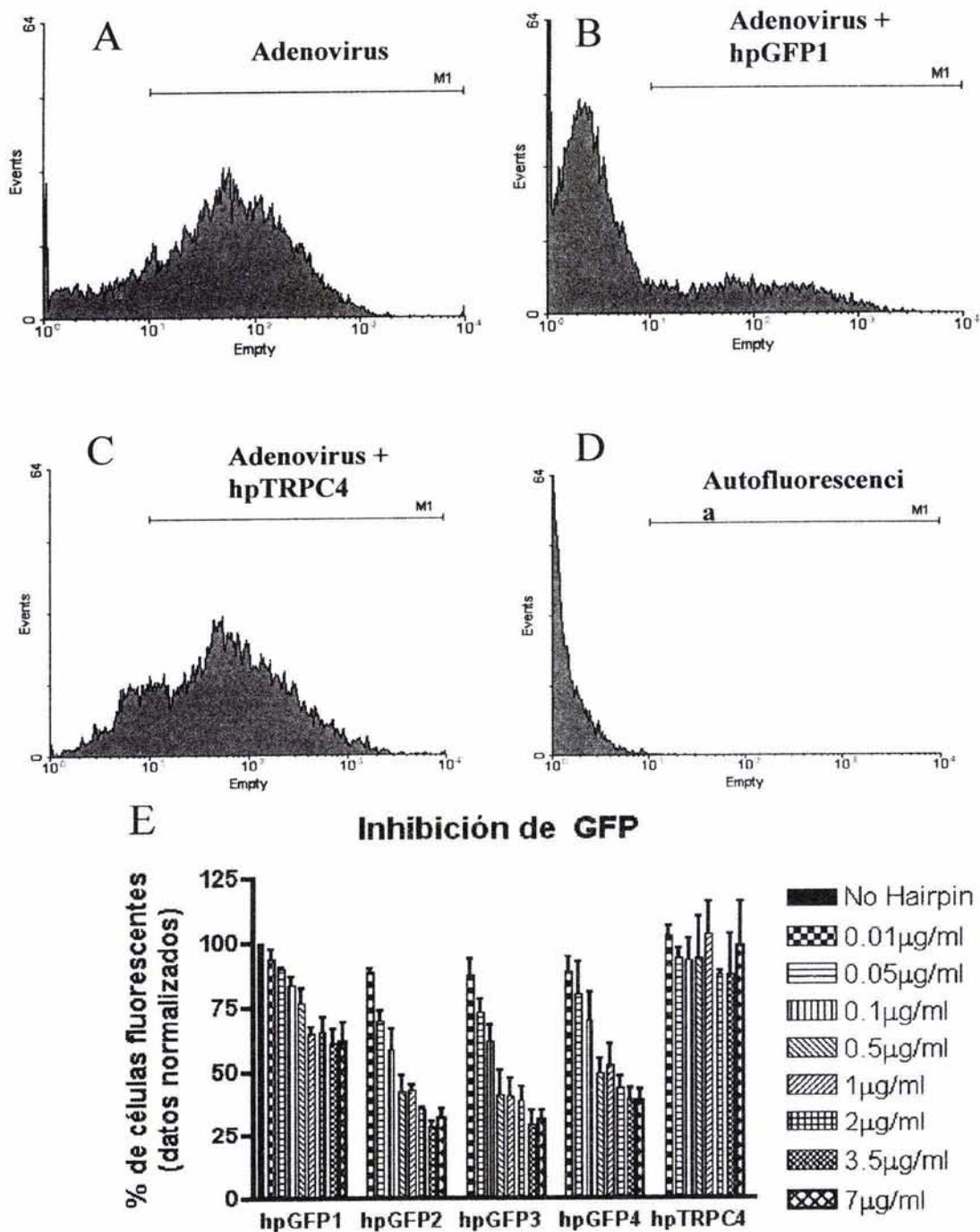


Figura IX Inhibición de GFP. Experimentos representativos de la inhibición de GFP con diferentes plásmidos. La región en verde representa las células que expresan GFP. **A-C**, Células incubadas con 2 MOI de adenovirus-GFP. **B**, Células transfectadas con 3.5 $\mu\text{g/ml}$ de plásmido hpGFP1. **C**, Células transfectadas con 3.5 $\mu\text{g/ml}$ de shDNA no relacionado (hpTRPC4). **D**, Células control sin adenovirus ni plásmido. **E**, Transfección con diversas concentraciones de plásmido. Los datos fueron normalizados tomando como 100% de fluorescencia la región M1 en A-D. Promedio \pm desviación estándar, $n=3$.

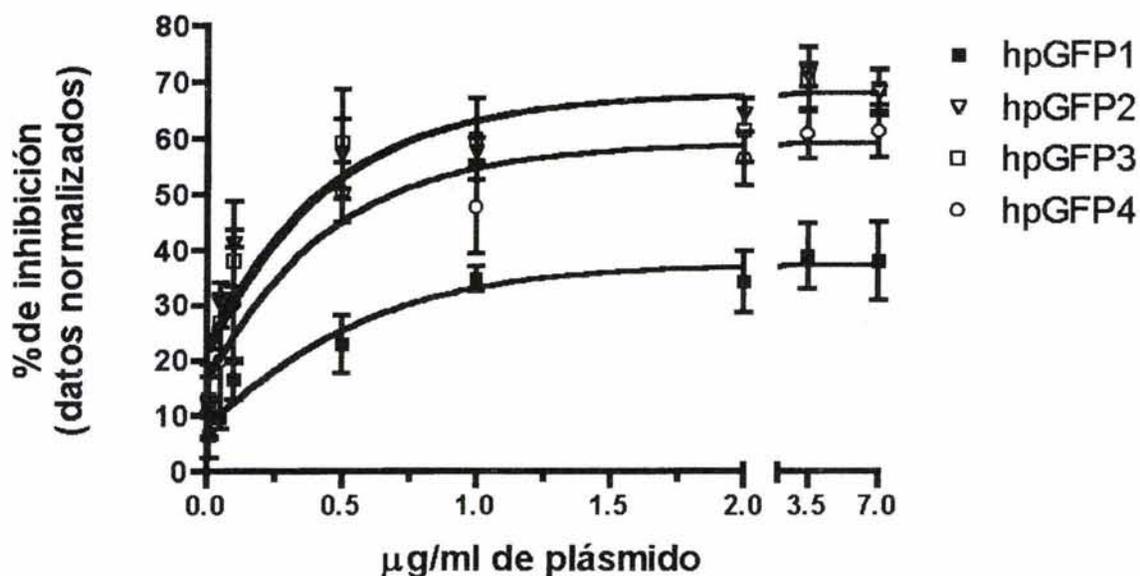


Figura X Curva dosis respuesta de la inhibición de GFP. Los hairpins más efectivos fueron hpGFP2, hpGFP3 y hpGFP4. Estos inhibieron la fluorescencia aproximadamente al 70%, n=3.

Cuando la realización de este trabajo estaba en proceso, se publicaron simultáneamente dos trabajos hechos por grupos independientes en los que se propone el mecanismo por el cual el complejo RISC identifica la hebra antisentido en los siRNAs resultantes de la restricción por Dicer^{50,51}. Ambos grupos proponen, con base en experimentos muy elegantes, que cuando los siRNAs entran al complejo RISC, este separa las dos hebras del siRNA y se queda con la hebra de RNA cuyo extremo 5' sea más fácilmente deshibridado, en otras palabras, el RISC conserva la hebra que contenga el extremo 5' con el valor de ΔG más positivo. Mientras más negativo sea el ΔG , se hibridarán con mayor facilidad dos hebras complementarias; mientras más positivo sea el ΔG , se hibridarán con menor facilidad dos hebras complementarias. Por lo tanto, el RISC

Como se muestra en la Figura 6B, hpGFP2, hpGFP3 y hpGFP4 tienen un ΔG más positivo del lado 5' de la hebra antisentido con respecto al extremo opuesto, lo cual sugiere que RISC conserva en mayor proporción la hebra antisentido al mRNA y concuerda con los resultados obtenidos de la inhibición de GFP (Fig. 5). Sin embargo, hpGFP1 tiene un ΔG menos positivo en el extremo 5' de la hebra antisentido con respecto al extremo opuesto, lo cual sugiere que el RISC conserva en mayor proporción la hebra sentido del siRNA ya que se necesita menos energía para separar ese extremo del siRNA. Que RISC conserve en mayor proporción la hebra sentido del hpGFP1, podría explicar el hecho de que este hairpin fue el menos efectivo al inhibir la expresión de GFP (Fig. 5). Por lo tanto, el efecto del silenciamiento observado con hpGFP1 es parcial debido a la preferencia de RISC por conservar la hebra sentido del siRNA.

VI DISCUSIÓN

En el presente trabajo se desarrolló una nueva y eficiente forma de generar hairpins para su uso en experimentos de RNAi en células de mamífero. Este método utiliza un sólo oligonucleótido que permite la síntesis de shDNAs, lo cual reduce en gran medida el costo y el tiempo requerido para realizar experimentos de RNAi. La producción de shDNAs había sido hasta la fecha un proceso costoso ya que se necesitaba de al menos dos oligonucleótidos de gran longitud (~80 nt) para generar un shDNA, o en su lugar, se requería de cuatro oligonucleótidos de menor longitud (~40 nt) que deben ser hibridados y clonados secuencialmente. En ambos casos, el número total de bases requeridas para formar un shDNA es aproximadamente 160 nt. Con el método de un oligonucleótido, se puede producir un shDNA con un oligonucleótido de 40 bases aproximadamente, lo cual reduce a un cuarto el costo del shDNA. Esta es una gran ventaja que ofrece el método de un oligonucleótido, ya que como se mencionó, es necesario probar cuatro o cinco diferentes secuencias de 21 nt hasta encontrar la más efectiva. Usando el método de un oligonucleótido se pueden producir cuatro diferentes shDNAs al mismo costo de uno solo con los métodos hasta ahora empleados.

Otra de las ventajas que ofrece el método de un oligonucleótido es que se puede automatizar y se pueden producir simultáneamente un número ilimitado de shDNAs. La automatización del método permite encontrar fácil y rápidamente la secuencia de 21 nt más efectiva; ventaja inexistente en los métodos hasta la fecha empleados. Además, con este método se elimina la necesidad de hacer clonaciones direccionales ya que el shDNA es un palíndromo perfecto; las clonaciones direccionales obligan a sintetizar oligonucleótidos con al menos dos sitios de restricción diferentes en cada extremo. En los oligonucleótidos sintetizados para el método de un oligonucleótido se incluye sólo un sitio, lo cual ayuda a reducir el costo del mismo.

Para generar shDNAs con el método de un oligonucleótido, simplemente hay que escoger la secuencia de 21 nt del gen que se desea inhibir y colocarla en medio de cinco As y GGGGCCCC (el sitio palindrómico de auto hibridación). Usando esta sencilla regla hemos construido cuatro shDNAs que contienen diversas secuencias de 21 nt a lo largo

del mRNA de GFP. Los shDNAs más efectivos (hpGFP2, hpGFP3 y hpGFP4) alcanzaron una inhibición máxima de 65-70%, mientras que el menos efectivo (hpGFP1) alcanzó una inhibición máxima de 40%. Los resultados muestran, tal como se esperaba, que no todas las secuencias son igualmente efectivas. Como se mencionó antes, la secuencia de 21 nt del hpGFP1 es una secuencia que ya había sido empleada en un trabajo anterior en células de mamífero mostrando una buena inhibición²³. Sin embargo, en los experimentos que realizamos encontramos que hay secuencias que tienen mayor efectividad al inhibir la expresión de GFP.

Cuando se hizo el análisis de los extremos 5' y 3' de los productos de 21 nt resultado del corte conceptual, se encontró que hpGFP 1 contiene un extremo 3' que no es fácilmente deshibridado por el RISC, lo cual puede explicar el hecho de que es el shRNA menos efectivo.

El análisis del valor de ΔG de los extremos del siRNA indica que es posible prever si una secuencia es buen candidato para su uso en experimentos de RNAi. Si se calcula el ΔG de las posibles secuencias de 21 nt que servirán como siRNAs, se pueden escoger de antemano las secuencias que inhibirán la expresión génica con mayor potencia. Por otro lado, hemos demostrado que es posible hacer el cálculo de energía libre partiendo de estructuras de hairpin, lo cual elimina la necesidad de utilizar siRNAs sintetizados *in vitro* o químicamente, en los que se sabe previamente como es la estructura secundaria del siRNA. Poder calcular la energía libre de la hibridación de la hebras en un hairpin ofrece una gran ventaja al hacer experimentos de RNAi en mamíferos, ya que se postulaba que solamente se podían hacer este tipo de predicciones en siRNAs, no en hairpins.

El cálculo de energía libre podría eliminar la necesidad de ensayo y error que se produce al buscar la secuencia de 21 mas efectiva para inducir RNAi en mamíferos. Esta ventaja favorece que se puedan silenciar diferentes genes eficazmente en un menor tiempo y a un menor costo.

El método de un oligonucleótido para generar shDNAs es una excelente opción si se desea inhibir la expresión génica en células de mamífero. Las ventajas técnicas y económicas provistas por este método permiten que el RNAi se pueda implementar a gran escala en mamíferos para inhibir simultáneamente familias enteras de genes. La

inhibición a gran escala es ya una realidad en algunos organismos como *C. elegans*, donde se inhibió la expresión génica de un cromosoma completo usando RNAi³³. Más recientemente, se ha hecho una búsqueda de las proteínas involucradas en la señalización de p53 en células de mamífero lo cual indica que la inhibición de genes a gran escala por RNAi es ya una realidad^{52,53}. La optimización de los experimentos con RNAi, como el que se presenta en este trabajo, es crucial en la producción de bibliotecas de secuencias de siRNAs o shDNAs que permitan hacer experimentos *in vitro* e *in vivo* en organismos superiores. Por ejemplo, se puede usar la inhibición por RNAi para uso terapéutico en humanos^{17,20,54}, o para uso contra infecciones virales^{55,56} o incluso se pueden usar vectores virales que confieran silenciamiento de algún gen por RNAi^{48,57,58}.

La generación de herramientas que faciliten el uso de RNAi a gran escala en organismos superiores producirá un nuevo salto de la biología moderna, ya que se podrá identificar con mayor rapidez y precisión el papel que desempeñan muchas proteínas con función desconocida.

VII PERSPECTIVAS

Otra manera de comprobar que la efectividad de los shDNAs puede ser predecible, es diseñar un shDNA que contenga un valor de ΔG más negativo en el extremo 3' de la hebra sentido del siRNA. Con esto se comprobaría que la efectividad de los shRNAs puede ser identificada *a priori*, sin tener que hacer un gran número de ensayos.

Por otro lado, sería interesante probar si se hacen mutaciones en el hpGFP1 que no alteren la complementariedad del siRNA pero a su vez inviertan el valor de ΔG de los extremos del siRNA GFP1, provocan un efecto de silenciamiento mayor que el observado en los experimentos de este trabajo. Este tipo de ensayos permitirían comprobar, sin lugar a dudas, que los valores de la ΔG de los extremos 5 y 3' son esenciales para determinar si un shRNA va a inhibir adecuadamente el gen de interés.

VIII REFERENCIAS

1. Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M. *Lehninger principles of biochemistry*, ca. 1260 (Worth Publishers, New York, 2000).
2. Lewin, B. *Genes VIII*, xxi, 1027 (Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2004).
3. Brown, T.A. *Genomes*, xxviii, 472 (Wiley-Liss, New York ; Chichester England, 1999).
4. Bork, P. & Copley, R. The draft sequences. Filling in the gaps. *Nature* **409**, 818-20 (2001).
5. Normile, D. & Pennisi, E. Team wrapping up sequence of first human chromosome. *Science* **285**, 2038-9 (1999).
6. Babinet, C. & Cohen-Tannoudji, M. Genome engineering via homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells: an amazingly versatile tool for the study of mammalian biology. *An Acad Bras Cienc* **73**, 365-83 (2001).
7. Misra, R.P. & Duncan, S.A. Gene targeting in the mouse: advances in introduction of transgenes into the genome by homologous recombination. *Endocrine* **19**, 229-38 (2002).
8. Carrell, R.W. Alzheimer's disease. Enter a protease inhibitor. *Nature* **331**, 478-9 (1988).
9. Selkoe, D.J. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* **399**, A23-31 (1999).
10. Cohen, F.E. & Kelly, J.W. Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature* **426**, 905-9 (2003).
11. Roberts, S.B. & Greenberg, A.S. The new obesity genes. *Nutr Rev* **54**, 41-9 (1996).
12. Weigle, D.S. & Kuijper, J.L. Obesity genes and the regulation of body fat content. *Bioessays* **18**, 867-74 (1996).
13. Hamann, A. & Matthaei, S. Regulation of energy balance by leptin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **104**, 293-300 (1996).
14. Houseknecht, K.L., Baile, C.A., Matteri, R.L. & Spurlock, M.E. The biology of leptin: a review. *J Anim Sci* **76**, 1405-20 (1998).
15. Schalling, M., Johansen, J., Nordfors, L. & Lonnqvist, F. Genes involved in animal models of obesity and anorexia. *J Intern Med* **245**, 613-9 (1999).
16. Sambrook, J. & Russell, D.W. *Molecular cloning : a laboratory manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001).
17. Nielsen, P. Targeting structured nucleic acids with antisense agents. *Drug Discov Today* **8**, 440 (2003).
18. Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11 (1998).

19. Stahel, R.A. & Zangemeister-Wittke, U. Antisense oligonucleotides for cancer therapy-an overview. *Lung Cancer* **41 Suppl 1**, S81-8 (2003).
20. Pirollo, K.F., Rait, A., Sleer, L.S. & Chang, E.H. Antisense therapeutics: from theory to clinical practice. *Pharmacol Ther* **99**, 55-77 (2003).
21. Cho-Chung, Y.S. Antisense DNAs as targeted genetic medicine to treat cancer. *Arch Pharm Res* **26**, 183-91 (2003).
22. Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. & Schreiber, R.D. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**, 227-64 (1998).
23. Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Muller, U. & Filipowicz, W. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 14428-33 (2001).
24. McManus, M.T. et al. Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. *J Immunol* **169**, 5754-60 (2002).
25. Kunath, T. et al. Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat Biotechnol* **21**, 559-61 (2003).
26. Hannon, G.J. RNA interference. *Nature* **418**, 244-51 (2002).
27. Bohula, E.A. et al. The efficacy of small interfering RNAs targeted to the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) is influenced by secondary structure in the IGF1R transcript. *J Biol Chem* **278**, 15991-7 (2003).
28. Tuschl, T. Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol* **20**, 446-8 (2002).
29. Zeng, Y. & Cullen, B.R. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *Rna* **8**, 855-60 (2002).
30. Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. & Hannon, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-6 (2001).
31. McManus, M.T. & Sharp, P.A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* **3**, 737-47 (2002).
32. Cerutti, H. RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *Trends Genet* **19**, 39-46 (2003).
33. Kamath, R.S. & Ahringer, J. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* **30**, 313-21 (2003).
34. Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M. & Sugimoto, A. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol* **11**, 171-6 (2001).
35. Elbashir, S.M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-8 (2001).
36. Proud, C.G. PKR: a new name and new roles. *Trends Biochem Sci* **20**, 241-6 (1995).
37. Katze, M.G. Regulation of the interferon-induced PKR: can viruses cope? *Trends Microbiol* **3**, 75-8 (1995).
38. Sharp, T.V., Xiao, Q., Justesen, J., Gewert, D.R. & Clemens, M.J. Regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR and (2'-5')oligo(adenylate) synthetase by a catalytically inactive PKR mutant through competition for double-stranded RNA binding. *Eur J Biochem* **230**, 97-103 (1995).

39. Boutla, A., Delidakis, C., Livadaras, I., Tsagris, M. & Tabler, M. Short 5'-phosphorylated double-stranded RNAs induce RNA interference in *Drosophila*. *Curr Biol* **11**, 1776-80 (2001).
40. Paddison, P.J., Caudy, A.A. & Hannon, G.J. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1443-8 (2002).
41. Gallo, M., Montserrat, J.M. & Iribarren, A.M. Design and applications of modified oligonucleotides. *Braz J Med Biol Res* **36**, 143-51 (2003).
42. Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M.T., Babaie, E. & Prydz, H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* **30**, 1757-66 (2002).
43. Brummelkamp, T.R., Bernards, R. & Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-3 (2002).
44. Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J. & Conklin, D.S. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* **16**, 948-58 (2002).
45. Yu, J.Y., DeRuiter, S.L. & Turner, D.L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6047-52 (2002).
46. Xia, X.G. et al. An enhanced U6 promoter for synthesis of short hairpin RNA. *Nucleic Acids Res* **31**, e100 (2003).
47. Baer, M., Nilsen, T.W., Costigan, C. & Altman, S. Structure and transcription of a human gene for H1 RNA, the RNA component of human RNase P. *Nucleic Acids Res* **18**, 97-103 (1990).
48. Shen, C., Buck, A.K., Liu, X., Winkler, M. & Reske, S.N. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett* **539**, 111-4 (2003).
49. He, T.C. et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2509-14 (1998).
50. Khvorovova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209-16 (2003).
51. Schwarz, D.S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199-208 (2003).
52. Paddison, P.J. et al. A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature* **428**, 427-31 (2004).
53. Berns, K. et al. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* **428**, 431-7 (2004).
54. Robinson, R. RNAi Therapeutics: How Likely, How Soon? *PLoS Biol* **2**, E28 (2004).
55. Chiu, Y.L., Cao, H., Jacque, J.M., Stevenson, M. & Rana, T.M. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference directed against human transcription elongation factor P-TEFb (CDK9/CyclinT1). *J Virol* **78**, 2517-29 (2004).
56. Michienzi, A. et al. RNA-mediated inhibition of HIV in a gene therapy setting. *Ann N Y Acad Sci* **1002**, 63-71 (2003).
57. Boden, D. et al. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res* **32**, 1154-8 (2004).

58. Boden, D., Pusch, O., Lee, F., Tucker, L. & Ramratnam, B. Efficient Gene Transfer of HIV-1-Specific Short Hairpin RNA into Human Lymphocytic Cells Using Recombinant Adeno-associated Virus Vectors. *Mol Ther* **9**, 396-402 (2004).