

**MICRO ARN PARA EL SILENCIAMIENTO DE GENES
DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1**

YARLEY VLADIMIR PABÓN MARTÍNEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2012**

**MICRO ARN PARA EL SILENCIAMIENTO DE GENES
DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1**

YARLEY VLADIMIR PABÓN MARTÍNEZ

**Tesis presentada para optar por el título de:
Magister en Ciencias Básicas Biomédicas**

Supervisor

H José Arteaga, MD, MSc, Ph.D

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2012

DEDICATORIA

*A Dios,
mi Mamá y mi Papá,
mis hermanos (Yorguin, Diego, Miguel, Lourdes Rocío¹), y mi cuñada (Milena)
mis sobrinas (Viviana, Carmen, y Laura) y mi sobrino (Ángel),
mis tías Dioselda y Rosalba,
mi familia terrenal y celestial.*

*A los pacientes infectados con VIH quienes buscan en Dios y la ciencia una cura
a su enfermedad.*

AGRADECIMIENTOS

Primero, quisiera dar Gracias a Dios por haber permitido culminar mi Maestría. ¡Dios proveyó, Dios provee, Dios proveerá!

A mis padres por su amor e incondicionalidad, así como también a mis hermanos, cuñada, sobrinas y sobrino, tías por su constante apoyo y cariño. Gracias por haberme ayudado hacer posible este trabajo.

También, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que han contribuido y me han apoyado durante estos años. Me gustaría especialmente agradecer a las siguientes personas e instituciones:

Dr. **H. José Arteaga**, mi supervisor, por su amistad y toda su orientación científica, y a la Dra. **María E. Cardona**, mi co-directora, mi madrina.

Los miembros del grupo de investigación de Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM) y del Laboratorio Central de Investigaciones (LCI), especialmente, a la Dra **Clara González**, por su apoyo constante e incondicionalidad, **Lenis** por su ejemplo, **Yesid** por su amistad e incondicionalidad, **Rocío** y **María Fernanda** por su cercanía, **Eddy** y **Juan** por toda su colaboración.

Muy especialmente, a **Esperanza Vesga Torres**, mi querida Presidenta, mi mentora, la gestora de todo esto. Muchas gracias.

Our collaborators at **Karolinska Institutet**: **Professor Edvard Smith**, for giving me the opportunity of training in Molecular Cell Biology and Gene therapy group at Karolinska Institutet. I learned a lot and I have shared it with my partners at my home University, Tack!. To all **MCG Group members**, by your collaboration and assistance; especially **Adbi** and “**mi estudiante**”, and off course to **Ladan** my best friend during my training. Everyone did of my training in the Karolinska Institute an experience unforgettable.

A mis compañeros y amigos de la maestría (II y VII), por su compañerismo y amistad, en especial a **Martha**, por su generosa amistad y sus sabios consejos. Espero poder tener la alegría y privilegio de desarrollar proyectos juntos.

A mis buenos amigos de Suecia y Colombia, por su amistad sincera y fiel. **Staffan, Juliana, Ximena** (la muchacha), **Laura, Andrea, Beto, Camilo** y **B. Mayerly**. Tack så mycket, Muchas gracias.

A las instituciones:

Fundación "**HIV Research Trust**", quien financió mi pasantía con una beca durante siete meses en el Karolinska Institutet.

The International AIDS Society por la beca e invitación para participar en la "XVIII International AIDS Conference" en Austria.

Departamento Administrativo de Ciencia, tecnología e innovación (Colciencias), por la financiación del proyecto "RNA interference (siRNA) for the treatment of HIV-1 infection", código: 11020416427, en cual estaba enmarcada mi tesis de maestría.

Universidad Industrial de Santander (UIS), por el apoyo financiero de mis salidas a los diferentes eventos científicos en los cuales participé durante el desarrollo de mi tesis de maestría.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	21
2. OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GENERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. MARCO TEÓRICO	24
3.1 TERAPIA GÉNICA	24
3.1.1 Terapia génica y marcadores de selección	24
3.2 SPLICING DE ARN	26
3.2.1 Splicing como forma de liberación de miARN y siARN	26
3.2.2 Intrones	27
3.2.3 Secuencias de reconocimiento del empalmosoma	27
3.3 MIARN y ARN DE INTERFERENCIA	31
3.3.1 MiARN	31
3.3.1.1 Localización y estructura de miARN en el genoma	32

3.3.1.2 Biogénesis y procesamiento de miARN	33
3.3.1.2.1 Vía canónica de generación de miARN	33
3.3.1.2.1.1 Principales proteínas involucradas en la generación de miARN	36
3.3.1.2.1.2 Proteínas accesorias involucradas en la generación de miARN	37
3.3.1.2.2 Vías no canónicas de generación de miARN	38
3.3.1.2.3 Diferencias y similitudes entre la vía canónica y las vías no canónicas de generación de miARN	39
3.3.2 ARN de interferencia	41
3.3.3 Características comunes de las vías de generación de miARN y los siARN	42
3.4 VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)	43
3.4.1 Introducción	43
3.4.2 Estructura	43
3.4.3 Genoma del VIH	44
3.4.4 Ciclo de replicación	45
3.4.5 Epidemiología	46
4. MATERIALES Y MÉTODOS	47
4.1 DISEÑO DE UNA SECUENCIA INTRÓNICA ARTIFICIAL	47

4.2 DISEÑO DE SECUENCIAS DE MIARN Y SHRNAMIR	49
4.3 CONSTRUCCIÓN DE VECTORES	53
4.3.1 Construcción de vectores con secuencias de miARN	53
4.3.2 Construcción de vectores con secuencias de shRNAmir	55
4.4 PREPACIÓN DE PLÁSMIDOS Y PURIFICACIÓN	56
4.5 CULTIVO CELULAR Y TRANSFECCIONES	58
4.6 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	59
4.7 CITOMETRÍA DE FLUJO	59
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
5.1 ESTRATEGIA PARA LA INSERCIÓN DEL INTRÓN ARTIFICIAL DENTRO DEL MARCO DE LECTURA DEL GEN DE RESISTENCIA A LA OUABAÍNA	60
5.2 DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA INTRÓNICA ARTIFICIAL	60
5.2.1 Sitios de multi-clonación insertados en la secuencia intrónica artificial	60
5.3 EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DEL MECANISMO DEL SPLICING Y EXPRESIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA A LA OUABAÍNA	64
5.4 EVALUACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE MIARN	66
5.5 EVALUACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE shRNAmir	74

6. CONCLUSIONES	81
7. RECOMENDACIONES	82
7. BIBLIOGRAFÍA	83

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 2. Resumen de las vías no canónicas de generación de miARN	40
Tabla 3. Características de las secuencias de miARN	50
Tabla 4. Características de las secuencias de shRNAmir	52
Tabla 5. Detalle de las construcciones realizadas durante este trabajo	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Secuencia consenso en el sitio de splicing 5' y 3' y el sitio de ramificación de los intrones de pre-ARNm tipo U2 y U12	28
Figura 2. Reacción de trans-esterificación durante el splicing para la liberación de un intron	30
Figura 3. Vía canónica de generación de miARN	35
Figura 4. siARN en humanos	41
Figura 5. Organización del genoma del VIH-1	45
Figura 6. Visión global de la infección por VIH-1	46
Figura 7. Plásmido vector pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre	53
Figura 8. Diseño de una secuencia intrónica artificial con un segmento codificante para un miARN	62
Figura 9. Representación esquemática del funcionamiento de un modelo de miARN	63
Figura 10. Diseño de una secuencia intrónica artificial con un segmento codificante para un shRNAmir	63
Figura 11. Representación esquemática del funcionamiento de un modelo de shRNAmir	64
Figura 12. Imágenes de microscopia de fluorescencia de células HeLa transfectadas y sin transfectar, 24 horas y 48 horas después del tratamiento con Ouabaína	65

Figura 13. Imágenes de microscopia de fluorescencia de células HeLa transfectadas con miARN dirigidos contra la proteína GFP, 24 horas y 48 horas después de la transfección	68
Figura 14. Imágenes de microscopia de fluorescencia de células HeLa transfectadas con miARN dirigidos contra la proteína Rev, 24 horas y 48 horas después de la transfección	69
Figura 15. Imágenes de microscopia de fluorescencia de células HeLa transfectadas con miARN dirigidos contra la proteína DsRed, 24 horas y 48 horas después de la transfección	70
Figura 16. Evaluación por citometría de flujo de la expresión de un miARN dirigido contra la proteína GFP en células HeLa	71
Figura 17. Evaluación por citometría de flujo de la expresión de un miARN dirigido contra la proteína Rev en células HeLa	72
Figura 18. Evaluación por citometría de flujo de la expresión de un miARN dirigido contra la proteína DsRed en células HeLa	73
Figura 19. Evaluación por citometría de flujo de la expresión de un shRNAmir dirigido contra la proteína GFP en células 293T	74
Figura 20. Evaluación por citometría de flujo de la expresión de un shRNAmir dirigido contra la proteína Nef en células 293T	75

GLOSARIO

ARGONAUTA 2: Proteína catalítica del Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN.

ARN DE INTERFERENCIA (del inglés, *RNA interference*): Mecanismo de silenciamiento genético.

COMPLEJO DE SILENCIAMIENTO INDUCIDO POR ARN (del inglés, *RNA-induced silencing Complex*): Complejo regulatorio de genes, activado por un pequeño ARN de cadena sencilla asociado con una proteína Argonauta, que regula la expresión génica mediada por la complementariedad de secuencia entre el ARN pequeño y el ARN mensajero blanco.

DICER (del inglés, *Dicer*): Ribonucleasa de la familia de las RNasa tipo III.

DOMINIO PAZ: Estructura conservada de unión a ácidos nucleicos que es encontrada en miembros de la familia de proteínas de Dicer y Argonauta.

DOMINIO PIWI: Estructura conservada que es encontrada en miembros de la familia de proteína Argonauta. Estructuralmente similar al dominio ribonucleasa H y en algunos casos tiene actividad endoribonucleasa.

DROSHA: Enzima RNasa tipo III encargada del clivaje de los extremos 5' y 3' del sustrato de Dicer en los pre-miARN.

EMPALMOSOMAS: Complejo conformado de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas y factores proteicos encargado de realizar el splicing.

EXÓN: Segmento de un pre-ARN mensajero que contiene secuencias codificantes para proteínas.

CADENA ACTIVA: Cadena del dúplex de siARN o miARN seleccionada e incorporada en RISC.

CADENA PASAJERA: Cadena del dúplex de siARN o miARN que no es incorporada en RISC y que eventualmente es degradada.

INTRÓN: Secuencia no codificante que interrumpe dos exones y que deberá ser escindida desde el pre-ARN mensajero antes de la traducción.

MiARN (del inglés, *micro RNA*): ARN no codificante de 21-24 nucleótidos, generado a partir de un precursor largo de ARN endógeno en forma de horquilla de aproximadamente 70 nucleótidos.

MIARN PRIMARIO (del inglés, *primary transcripts*): Transcripto primario largo producido inicialmente en la vía de generación de los miARN.

MIRTRON: miARN que es generado a partir de un intrón corto escindido sin la mediación de Drosha.

RIBONUCLEOPROTEÍNA NUCLEAR PEQUEÑA (del inglés, *small nuclear ribonucleoproteins*): Partículas nucleares de las células conformadas por una molécula corta de ARN (<~300 nucleótidos) y una o más proteínas. Involucradas en el procesamiento del pre-ARN mensajero, la transferencia y biogénesis del ARN.

PRECURSOR DE MIARN (del inglés, *precursor miRNA*): segunda estructura formada en la vía de generación de los miARN, que es exportada del núcleo para ser procesada en el citoplasma.

MICRO ARN PARA EL SILENCIAMIENTO DE GENES DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1*

AUTOR: PABÓN-MARTÍNEZ, Y. Vladimir**

PALABRAS CLAVES: ARN de interferencia, micro ARN, procesamiento postranscripcional del ARN, Ouabaína, VIH-1.

RESUMEN:

ARN de interferencia (ARNi) es un potente mecanismo de silenciamiento genético inducido por fragmentos de 21 pares de base denominados ARN interferentes pequeños (siARN). La utilización del mecanismo de liberación endógena de siARN mediado por micro ARN (miARN) puede lograr una mayor efectividad y superar las desventajas de otros métodos de liberación de siARN. En esta estrategia de liberación de siARN a partir de miARN se ha diseñado y evaluado experimentalmente en forma preliminar un modelo en el cual, miARN son generados desde un intron artificial insertado en el marco de lectura abierto del gen de resistencia a la Ouabaína, la cual funciona como un marcador de selección biológico. Para evaluar este modelo contra un blanco terapéutico relevante, se diseñaron miARN contra blancos del genoma del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1), y se compararon con shARN. La selección de células HeLa y 293T modificadas con estos constructos y resistentes a Ouabaína permitió comprobar el funcionamiento del mecanismo del splicing. Sin embargo, nuestro modelo no mostró el efecto de silenciamiento esperado contra ninguno de los dos blancos, probablemente por problemas en la liberación y procesamiento del miARN.

* Tesis de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

** Facultad de Salud. Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director de tesis: H. José Arteaga. MD, MSc, PhD.

MICRO RNA FOR THE GENE SILENCING OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1*

AUTOR: PABÓN-MARTÍNEZ, Y. Vladimir**

KEYWORDS: RNAi, micro RNA, post-transcriptional processing of RNA, Ouabain, HIV-1.

ABSTRACT:

RNA interference (RNAi) is a potent gene silencing mechanism induced by fragments of 21 base pairs of RNA, called small interfering (siRNA). The use of release mechanism of siRNA mediated by endogenous microRNAs (miRNAs) can be achieved more effectively and overcome the disadvantages that other methods of siRNA delivery. Here we present a release strategy of siRNA from miRNA, which has been designed and experimentally evaluated in preliminary form in a model in which miRNAs are generated from an artificial intron inserted into the open reading frame of the gene resistance to Ouabain, which functions as a biological selection marker. To evaluate this model against a relevant therapeutic target, we designed miRNA targets genome against Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1), and compared with shRNA. The selection of HeLa and 293T cells modified with these constructs and resistant to Ouabain allowed to checking the functioning of the mechanism of splicing. However, our model did not show the expected silencing effect against any of the two targets, probably because of problems in the release and processing of miRNA.

* Master's Thesis in Basic Biomedical Sciences

** Facultad de Salud. Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Supervisor: H. José Arteaga, MD, MSc, PhD.

INTRODUCCIÓN

La terapia génica es una aproximación terapéutica experimental que pudiera permitir el desarrollo de nuevas y diferentes estrategias terapéuticas contra la infección causada por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1). Una de estas potenciales estrategias hace uso de la tecnología del ARN de interferencia (ARNi), basada en un mecanismo biológico que permite la degradación o la represión de la traducción de ARN mensajeros (ARNm). RNAi es un mecanismo de inhibición de la expresión y de la replicación del virus. En este trabajo tratamos de inhibir la expresión de las proteínas virales Rev y Nef, como un modelo de este tipo de terapia. La proteína Rev ha sido un blanco eficiente para inhibir la replicación del VIH-1. Así mismo, el gen *Nef* es un blanco interesante del genoma del virus, el cual codifica para la proteína que participa en la regulación de la expresión de la molécula CD4 y de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II.

Sin embargo, uno de los factores que limitan el éxito de la terapia génica incluida la tecnología del ARNi, es la carencia de un método eficiente y seguro que permita el transporte, entrega y liberación de material genético al interior de la célula blanco. No obstante, la transfección con vectores virales es una herramienta que permite una alta eficiencia de transfección celular. Si bien, existen diferentes modelos de vectores virales para este propósito, aún no existe un vector ideal, que permita transportar y liberar material genético dentro de las células hospedera de forma eficiente, específica y sin generar toxicidad o una respuesta inmune adversa. En el grupo de los vectores virales, los lentivirus cuentan con algunas ventajas con respecto a otro tipo de vectores, como permitir la expresión estable del transgen a largo plazo tanto en células en división como en fase estacionaria y han sido exitosos en la transfección de diferentes tipos de células como las células madre, los linfocitos y las células dendríticas.

Una de las principales aproximaciones usadas para liberar ARN de interferencia en forma estable es la expresión de shARN bajo el control de promotores ARN Polimerasa III. Estos sistemas presentan algunas limitaciones como la pérdida de versatilidad para la expresión en tejidos específicos; por lo que la posibilidad de usar promotores ARN Polimerasa II para la expresión eficiente de shARN permite explotar todas las opciones de liberación de transgenes y desarrollar una tecnología de liberación. Los intrones son removidos durante el splicing desde los pre-mARN sintetizados por la Pol II durante el proceso de maduración del mARN.

Nuestra aproximación experimental se basa en la generación y liberación de micro ARN (miARN, del inglés *micro RNA*), dirigidos contra blancos estratégicos en el VIH-1 a partir de una secuencia intrónica artificial, aprovechando la biogénesis de miARN producidos a partir de intrones bajo el control de promotores ARN Pol II luego del proceso del splicing. El sistema probado utiliza el gen de resistencia a la Ouabaína (OuaSelect), que funciona como un marcador de selección biológica natural y el cual está fusionado a la proteína verde fluorescente aumentada (EGFP, del inglés *Enhanced Green Fluorescent Protein*). La selección de la Ouabaína permite la selección rápida y efectiva de una población de células transfectadas después de 48 horas. Por lo tanto, se eligió diseñar una secuencia intrónica artificial, insertada en el marco de lectura abierto del gen que codifica por la Ouabaína. Este intrón artificial contiene sitios de clonación para shARN, miARN y shRNAmir, y permite su liberación con un potencial terapéutico y al mismo tiempo, la expresión del marcador de selección OuaSelect que permite la selección exitosa de células genéticamente modificadas.

Esta nueva estrategia de liberación de liberación de miARN usando modelos como el que se propone pudiera ser una nueva manera eficiente para la modificación génica y la selección de células madre hematopoyéticas pluripotentes, utilizadas en trasplante de médula ósea y en otras aplicaciones clínicas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Diseñar, desarrollar y evaluar un nuevo sistema para la liberación de ARN interferentes a partir de miARN intrónicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Explorar las posibilidades de desarrollar un vector lentiviral para la liberación miARN a partir de ARN pequeños en forma de pinza o miARN generados a partir del clivaje de intrones insertados en el marco de lectura de un gen codificador para un marcador de selección biológico.

2.2.2 Desarrollar y evaluar secuencias específicas de siARN o miARN contra algunos blancos estratégicos en la secuencia del genoma del VIH-1.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 TERAPIA GÉNICA

3.1.1 Terapia génica y marcadores de selección La terapia génica ha sido exitosa en el tratamiento de algunas enfermedades oculares e inmunodeficiencias primarias. Sin embargo, el mayor obstáculo de la terapia génica es el rechazo inmune. Adicionalmente, uno de los factores que determinan el éxito pero que al mismo tiempo limitan la terapia génica es la baja eficiencia de transferencia de genes a una variedad de tejidos sin causar efecto tóxico en las células huéspedes, bien sean células en reposo o en división; y los requerimientos para lograr *in vitro* la selección de cultivos para obtener poblaciones puras y abundantes en células modificadas genéticamente (Treschow 2010).

Actualmente, existen dos opciones para la transferencia de genes, una el desarrollo de vectores virales y otra orientada a desarrollar sistemas sintéticos de liberación (vectores no virales). Los vectores virales hacen uso de las ventajas de los virus modificados biotecnológicamente, manipulando su genoma para hacerlos en principio no patogénicos. Estos vectores son hábiles para mediar eficientemente la transferencia genética con la posibilidad de lograr una expresión génica de largo término.

La terapia génica ofrece la promesa de prevenir la progresión de la infección por VIH mediante la sustancial interferencia de la replicación viral en ausencia de quimioterapia crónica. Así como también, tiene el potencial de complementar las terapias anti-retrovirales convencionales y aumentar los efectos de las tecnologías actualmente disponibles en pro de la disminución de la infección por el VIH.

Diferentes aproximaciones de terapia génica han sido desarrollados para la infección del VIH-1, entre ellos: (1) agentes basados en ARN: ARN antisentido, ribosimas, aptámeros y ARNi; y (2) agentes basados en proteínas: proteínas con acción negativa dominante, inhibidores de fusión y nucleasas de dedos de zinc. Pese a todas las opciones, una de las herramientas más usadas es el ARN de interferencia. A la fecha, se han iniciado 1703 ensayos clínicos en terapia génica, de los cuales 1035 se encuentran en fase I, 312 en fase I/II y 279 en fase II. La gran mayoría de ensayos clínicos (1098) están enfocados hacia el tratamiento del cáncer y 137 ensayos para el tratamiento de enfermedades infecciosas incluida la infección por el VIH. Actualmente, los vectores más usados en ensayos clínicos para terapia génica son los adenovirus y los retrovirus, con un total de 764; sin embargo los lentivirus son usados en 38 ensayos clínicos actualmente (Interscience 2011).

Existen básicamente dos categorías de marcadores de selección para células modificadas genéticamente en terapia génica: los marcadores de superficie celular y los marcadores de selección metabólica (Treschow 2010).

Los marcadores de superficie celular permiten la selección por procedimientos rápidos, pero existe el riesgo de una selección de falsos-positivos cuando la selección es realizada muy temprano, luego de la transducción, producto de la transferencia de la proteína marcador en la envoltura retroviral a la membrana plasmática de la célula blanco. Las células modificadas por genes de marcadores de superficie celular pueden ser seleccionadas por citometría o por técnicas inmuno-magnéticas. Sin embargo, la citometría presenta dificultades en el mantenimiento de la esterilidad y en el caso de la manipulación de grandes cantidades de células toma mucho tiempo. En las técnicas inmuno-magnéticas sólo las células con una alta expresión de transgenes son seleccionadas eficientemente, por lo que se requieren grandes volúmenes de muestra, lo cual es desfavorable económicamente (Treschow 2010).

Los marcadores metabólicos de selección permiten una eficiente selección de células modificadas genéticamente libre de impurezas, no obstante la duración de la selección es usualmente muy larga, por lo general entre una semana a diez días. Adicionalmente, los marcadores metabólicos de selección son a menudo de origen animal no mamíferos y causan problemas de inmunogenicidad (Treschow 2010).

Aprovechando la alta sensibilidad de la Na⁺/K⁺-ATPasa a la Ouabaína, ha sido desarrollada una variable genética de la subunidad alfa de la Na⁺, K⁺-ATPasa la cual tiene dos sustituciones en los aminoácidos Q118R y N129D que afecta la sensibilidad de esta proteína a la Ouabaína y confiere a las células que expresan esta variable una resistencia dos veces mayor a las dosis tóxicas de Ouabaína. Mas del 90% de las células modificadas con la variable genética de esta proteína sobreviven a dosis tóxicas de Ouabaína y el 99% de las células no modificadas fueron eliminadas en menos de 36 horas en experimentos *in vitro* (Aints, Belusa *et al.* 2002; Treschow, Unger *et al.* 2007).

3.2 SPLICING DE ARN

3.2.1 El splicing como forma de liberación de miARN y siARN El ARNi media el silenciamiento genético postranscripcional específico de secuencia en eucariotas. Por lo que es posible, ser usado como una herramienta de silenciamiento génico utilizando vectores de expresión. Recientemente han sido descritos vectores, que permiten la expresión de siARN generados a partir de precursores en forma de horquilla de miARN bajo el control de promotores ARN Polimerasa II. Estos miARN pueden ser fácilmente producidos *in vivo* y pueden ser diseñados específicamente para inactivar la expresión de genes blancos selectos en células humanas, estos modelos han sido creados basados en el precursor *miR-30* (Zeng, Wagner *et al.* 2002) (Stegmeier, Hu *et al.* 2005) y en el precursor *miR-155* (Du, Yonekubo *et al.* 2006). El *miR-30* fue utilizado como esqueleto de

miARN para insertar secuencias de siARN, los diseños en forma shARN basados en el esqueleto del *miR-30* son llamados (shRNAmir, del inglés *miR-30 –based shRNA*)(Chang, Elledge *et al.* 2006).

3.2.2 Intrones Los intrones son secuencias genómicas que son removidas del pre-ARNm y pueden ser clasificados en 3 grupos: (1) Intrones del grupo I, encontrados en ARN ribosomales en núcleos de hongos y protistas, y de los cuales han sido identificados 1.500 (Cannone, Subramanian *et al.* 2002); (2) Intrones del grupo II, en contraste solo identificados 200 (Cannone, Subramanian *et al.* 2002). (3) Intrones del grupo III (Intrones empalmosomales), poseen secuencias casi al azar y por lo general carecen de ORF. Sus longitudes varían ampliamente entre especies, desde decenas de pares de bases en protistas hasta cientos de kilo bases en mamíferos. Se encuentran en genomas eucariotas nucleares y están ausentes en procariotas. Varían en número entre especies eucariotas, desde menos de 100 intrones por genoma hasta cientos de miles por genoma en vertebrados y plantas; generalmente son más abundantes (>100.000 por genoma en los vertebrados) (Lander, Linton *et al.* 2001). Las secuencias intrónicas de los intrones empalmosomales son removidas del transcripto de ARN por un complejo de ARN-proteínas, llamado empalmosoma.

3.2.3 Secuencias de reconocimiento del empalmosoma El empalmosoma es la maquinaria encargada de regular el proceso del splicing y catalizar la remoción exacta de los intrones desde los ARN transcriptos.

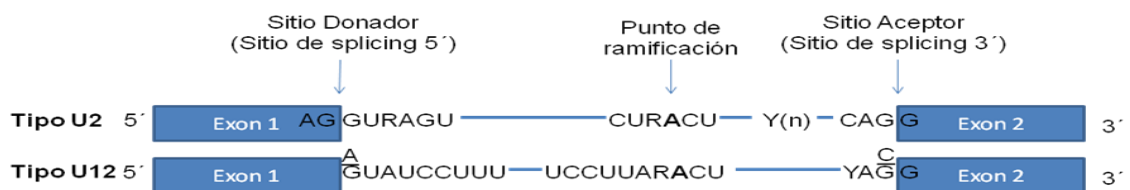
Los intrones normalmente se encuentran en transcriptos codificantes de proteínas, bien sea en la secuencia codificante, corriente arriba o corriente abajo de las regiones no traducidas (UTR, del inglés *untranslated region*) de los genes.

Existen dos tipos de empalmosomas, el mayor y menor, que difieren básicamente en las partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleares (snRNP, del inglés *small nuclear ribonucleoprotein particles*).

El empalmosoma mayor es casi universalmente conservado entre eucariotas, y es responsable del splicing de todos o la gran mayoría de intrones empalmosomales (>99%) en todos los linajes caracterizados. El procesamiento de los intrones con este empalmosoma requiere de las snRNP U1, U2, U4, U5 y U6. Son también llamados intrones clase mayor (del inglés, *major-class introns*), intrones canónicos o intrones tipo U2. Los intrones tipo U2 poseen las siguientes secuencias consenso: AG/GURAGU en el sitio de splicing 5', CURACU en el sitio de ramificación y YAG/G en el sitio de splicing 3'; donde "/" indica límite exón-intrón, A corresponde a una adenosina, R a purina y Y a pirimidina. Un tracto de polipirimidinas está localizado entre el punto de ramificación y el sitio de splicing 3', y la gran mayoría de intrones tipo U2 tienen los dinucleótidos GT y AG en los extremos 5' y 3', respectivamente (Will and Luhrmann 2005) (Patel and Steitz 2003) **(Figura 1)**.

El empalmosoma menor o U12 se encuentra solamente en un sub-conjunto de linajes. En este tipo de empalmosoma, el splicing requiere de las snRNP U11, U12, U4atac y U6atac. Así como también del U5, usados también en los empalmosoma mayores. Los intrones procesados así, son llamados: intrones clase menor (del inglés, *minor-class Introns*) o Intrones tipo U12. Los intrones tipo U12 poseen las siguientes secuencias consenso: –A (o G)UAUCCUUU en el sitio de splicing 5', la secuencia –UCCUUA CU en el sitio de ramificación y YAC/ o YAG/ en el sitio de splicing 3' (Will and Luhrmann 2005) (Patel and Steitz 2003) **(Figura 1)**.

Figura 1. Secuencia consenso en el sitio de splicing 5' y 3' y el sitio de ramificación de los intrones de pre-ARNm tipo U2 y U12



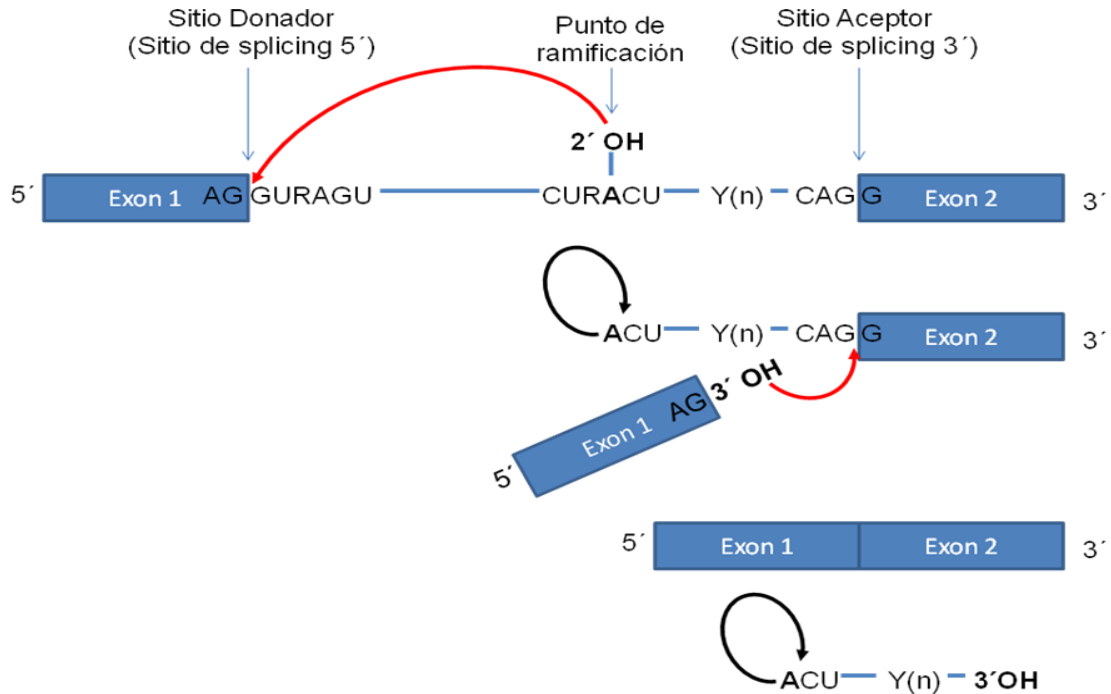
Fuente. Figura modificada de (Will and Luhrmann 2005)

El empalmosoma mayor realiza el splicing por medio de los complejos snRNPs, y está formado por los ARN nucleares pequeños U1, U2, U3, U4 y U5 asociados con varias proteínas. Los snARN U1, U2, U4 y U5 son transcritos por la ARN polimerasa II y el snARN U6 es transcrito por la ARN polimerasa III. Los snRNPs reconocen secuencias específicas en el intrón. El snRNP U1 reconoce el sitio de splicing 5' en el precursor del ARNm e inicia el ensamble del empalmosoma para la escisión del intrón (Oubridge, Ito *et al.* 1994) (Pomeranz Krummel, Oubridge *et al.* 2009).

La primera secuencia consenso es llamada sitio de splicing 5' y es relativamente corta. En mamíferos solo las dos primeras bases del intrón son universalmente conservadas (Lander, Linton *et al.* 2001). La segunda secuencia consenso es el sitio de splicing 3' que está definida por tres elementos separados: el sitio de ramificación (BPS, del inglés *branch point sequence*), el tracto de polipirimidina (PT, del inglés *polypyrimidine tract*) y el sitio de splicing 3' (AG). El PT está localizado en el intrón entre la secuencia BPS y los nucleótidos (AG) del sitio de splicing 3' (Sharma, Kohlstaedt *et al.* 2008).

Los sitios exactos para la reacción trans-esterificación son definidos por las secuencias consenso, primeramente dentro del intrón, alrededor del sitio de splicing del extremo 5' y del extremo 3'. La reacción de trans-esterificación consta de dos pasos: (1) el clivaje de la unión exón-intrón del extremo 5'. Este clivaje es el resultado del ataque nucleofílico de un grupo 2'hidroxil de un residuo de Adenosina del sitio de ramificación, ubicado corriente arriba del sitio de splicing 3', lo que genera un grupo hidroxilo libre en el extremo 3' corriente arriba del exón, así como una rama o lariat intermedio; (2) la unión intrón-exón del extremo 3' es atacada por un grupo 3-hidroxilo del extremo 5' del exón, desplazando al intrón en forma de lariat y generando la ligación de los exones (**Figura 2**).

Figura 2. Reacción de trans-esterificación durante el splicing para la liberación de un intron



Fuente. Figura modificada de (Patel and Steitz 2003).

La secuencia consenso que reconoce el U1 corresponde a CAG en el extremo 3' del exón 5', en el intrón en el sitio donador reconoce la denominada secuencia GURAGU (donde R, puede ser una Timina (T) o un Uracilo (U)). La secuencia consenso CAG↑G precedida por el tracto de polipirimidina es típica del sitio de splicing aceptor (extremo 3' del exón 5'), AG es reconocida por el U5. (Chiara, Palandjian *et al.* 1997). La secuencia consenso que reconoce el U6 es también GURAGU (con especial importancia el segundo y los dos últimos nucleótidos en la secuencia GURAGU). Para que un splicing ocurra correctamente estas secuencias deben estar presentes y ser reconocidas por la maquinaria del empalmosoma, resultando esto en la unión de los exones y en la escisión de los Intrones.

Para los Intrones de clase mayor, el ensamble del empalmosoma inicia por interacciones de apareamiento de bases con la unión de los snRNPs U1 y U2 con las secuencias conservadas del sitio de splicing 5´ y el sitio de ramificación, respectivamente. El dúplex U2 del sitio de ramificación reconoce la Adenosina; el grupo 2´ hidroxilo del residuo de Adenosina participa en el primer ataque nucleofílico. El complejo tri-snRNP, compuesto por U5 y los snRNP U4 y U6 estabilizan la unión del pre-empalmosoma, sin embargo existe evidencia que sugiere que el U5 interactúa corriente arriba del sitio de splicing 5´ mucho más temprano. A continuación, ocurren re-arreglos que son promovidos por factores proteicos hidrolizando ATP yuxtaponiendo el sitio de splicing 5´ y 3´, formando el núcleo catalítico. Específicamente, el dúplex U4-U6 desenrollados y el U4 y U1 son desplazados, lo que permite que el U6 forme interacciones de apareamiento de bases con el sitio de splicing 5´ y con la una región del U2 que está cerca al brazo dúplex del sitio de ramificación. El U5 se aparea con secuencias en los extremos de los exones 5´ y 3´, y se cree que la posición es el extremo de los dos exones para el segundo paso del splicing. Después que el segundo paso ha sido completado, los exones son ligados y el intrón en forma de rama es liberado, y los componentes del empalmosoma son disociados y reciclados para nuevos splicing. Existe un tipo especial de splicing, el splicing alternativo, el cual permite obtener varias proteínas a partir de una única secuencia de ADN.

3.3 MIARN y ARN DE INTERFERENCIA

3.3.1 MiARN Los miARN son ARN pequeños ~22 nucleótidos de longitud, no codificantes para proteínas y generados de transcritos endógenos que pueden formar estructuras en forma de horquilla (Lee, Kim *et al.* 2004). Los miARN

conforman una gran familia de genes reguladores postranscripcionales que controlan muchos procesos celulares y del desarrollo en eucariotas, cumpliendo una gran cantidad de funciones. Se estima que la expresión de 30% de los genes humanos es controlada postranscripcionalmente por mecanismos dependientes de miARN (Lewis, Burge *et al.* 2005) (Rajewsky 2006). Muchos genes de miARN humanos están frecuentemente localizados en sitios frágiles y regiones genómicas asociada con cáncer (Calin, Sevignani *et al.* 2004), por cuanto su alteración está asociada con su desarrollo. Gracias a métodos computacionales y al uso de la bioinformática ha sido posible determinar su amplia distribución en el genoma y sus funciones en diferentes tejidos y en la regulación de la expresión de los genes. Actualmente, existe una gran cantidad de datos e información sobre miARN, prueba de ello son las 1424 secuencias de miARN de Homo sapiens que han sido descritas y almacenadas en la base de datos miRBase (revisado octubre 2011) (Kozomara and Griffiths-Jones 2011). Revisado en (Pabon-Martinez 2011)

3.3.1.1 Localización y estructura de miARN en el genoma Los genes codificadores para miARN pueden estar localizados en diferentes regiones del genoma (Rodriguez, Griffiths-Jones *et al.* 2004) (Baskerville and Bartel 2005) (Hsu, Huang *et al.* 2006). Por lo cual, pueden ser clasificados en: (i) miARN exónicos localizados en transcritos no codificantes, (ii) miARN intrónicos localizados en transcritos no codificantes, (iii) miARN intrónicos localizados en transcritos codificantes para proteínas, (iv) miARN exónicos localizados en transcritos codificantes para proteínas (Kim and Nam 2006; Kim, Han *et al.* 2009). Adicionalmente, existen también algunos miARN ubicados en unidades transcripcionales que son expresados en grupo (Lee, Jeon *et al.* 2002).

3.3.1.2 Biogénesis y procesamiento de miARN En una gran proporción los miARN son generados a partir de un transcripto primario largo, en un proceso secuencial de dos reacciones las cuales son guiadas por la enzima Drosha y Dicer, en la llamada vía canónica de generación de miARN. Sin embargo, actualmente han sido descritos miARN generados por vías alternas llamadas vías no canónicas, muchos de los miARN procesados por estas vías no satisfacen la definición clásica de miARN.

3.3.1.2.1 Vía canónica de generación de miARN En la vía canónica los miARN son inicialmente transcriptos en el núcleo a partir de precursores largos de ARN llamados miARN primarios (pri-miARN, del inglés *primary transcripts*). La transcripción de los genes de miARN generalmente es mediada por la ARN polimerasa II (pol II) (Lee, Kim *et al.* 2004); sin embargo, un grupo menor de miARN asociados con repeticiones *Alu* pueden ser transcriptos por la ARN Polimerasa III (pol III) (Borchert, Lanier *et al.* 2006). Los (pri-miARN) generados por la pol II tienen usualmente varios kilobases de longitud y contienen estructuras locales en forma tallo – bucle.

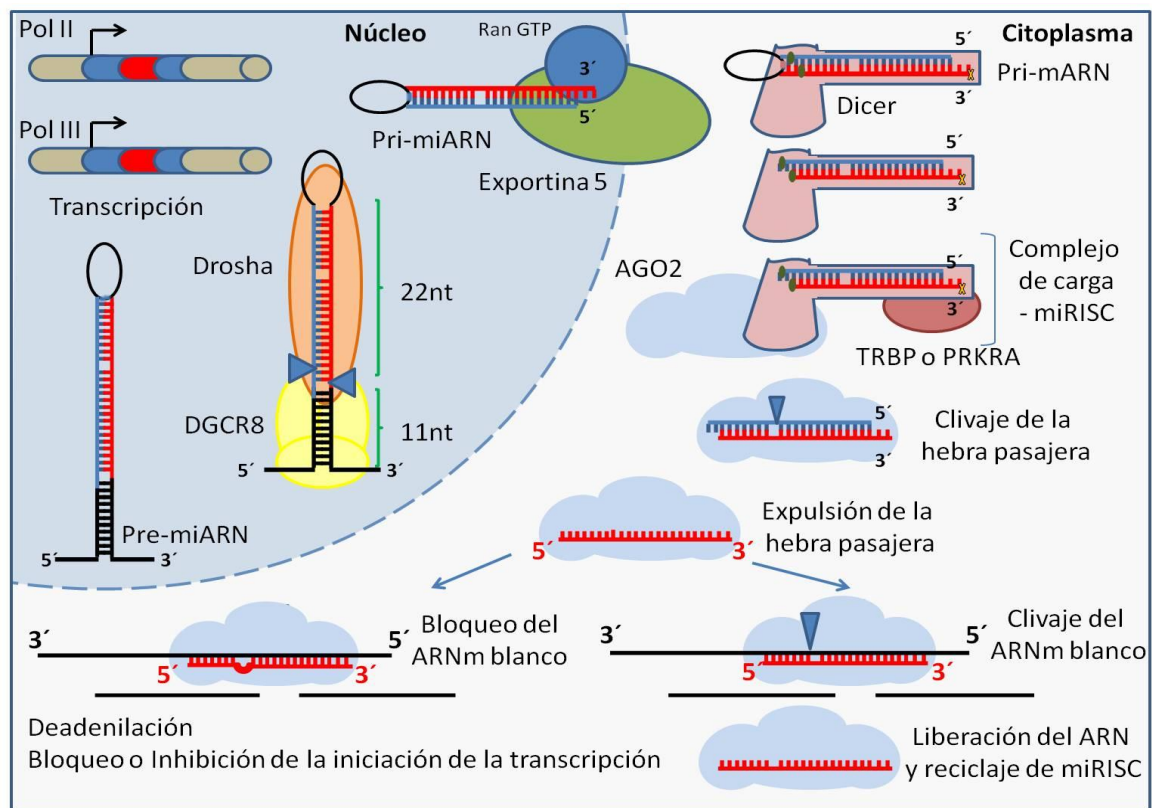
En el primer paso de la maduración de los pri-miARN, Drosha cliva el tallo de la estructura larga de ARN en forma de una pequeña horquilla y permite su liberación (Lee, Ahn *et al.* 2003). Para ello, Drosha necesita un cofactor, la proteína de la región crítica del gen 8 del síndrome de DiGeorge (DGCR8, del inglés *DiGeorge syndrome critical region gene 8 protein*) (Landthaler, Yalcin *et al.* 2004); juntos Drosha y DGCR8 forman el complejo microprocesador (Denli, Tops *et al.* 2004; Gregory, Yan *et al.* 2004) (Han, Lee *et al.* 2004). Un pri-miARN típico en metazoos consiste de un tallo de ~33pb, un bucle terminal y segmentos flanqueantes de ARN de cadena sencilla (ssARN). La proteína DGRC8 interactúa con los pri-miARN a través de los segmentos de ssARN y el tallo, permitiendo que Drosha realice el clivaje aproximadamente 11 pares de base, contados a partir de la unión

ssARN-dsARN. El complejo microprocesador genera una horquilla de 70 nucleótidos, llamado precursor de miARN (pre-miARN, del inglés *precursor miRNA*). Los pre-miARN poseen dos nucleótidos colgantes en su extremo 3' y un grupo fosfato en el extremo 5', lo cual es característico de los ARN procesados por ARNasas tipo III. Finalmente, los pre-miARN son exportados del núcleo al citoplasma por medio de la exportina 5 (Yi, Qin *et al.* 2003) (Lund, Guttinger *et al.* 2004).

En el citoplasma, los pre-miARN son reconocidos por el complejo de procesamiento de pre-miARN formado por Dicer, la proteína de unión a ARN en respuesta a trans-activación (TRBP, del inglés *TAR RNA-binding protein*) (Lund and Dahlberg 2006) y la proteína quinasa activadora dependiente de ARN de doble cadena inducible por interferón (PRKRA, del inglés *protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator*). En el complejo de procesamiento de pre-miARN, Dicer cliva el pre-miARN cerca del bucle terminal, generando un dúplex de miARN maduro de ~22 nucleótidos (miARN:miARN*), este dúplex contiene una cadena madura de miARN y su cadena complementaria, la cadena pasajera (miARN*) (Hutvagner, McLachlan *et al.* 2001) (Bernstein, Caudy *et al.* 2001). Posteriormente, este complejo se ensambla con la proteína Argonauta 2, para formar el complejo de silenciamiento inducido por miARN (miRISC, del inglés *miRNA-induced silencing complexes*), el cual selecciona la cadena madura o guía (Chendrimada, Gregory *et al.* 2005). La cadena guía es la responsable de dirigir el silenciamiento. Notablemente, la estabilidad termodinámica del extremo 5' de las cadenas que conforman el dúplex de miARN maduro determina la identidad de la cadena guía y la cadena pasajera (Khvorova, Reynolds *et al.* 2003) (Han, Lee *et al.* 2006). Sin embargo, dependiendo de la complementariedad perfecta o incompleta de la cadena de miARN a su blanco, el complejo miRNP puede conducir al clivaje y degradación del ARNm o a la inhibición de la transcripción. En caso de la inhibición de la transcripción el ARNm reprimido es traslocado a los cuerpos P, donde puede ser destruido o relocalizado en la maquinaria de la

transcripción bajo la expresión de una señal celular específica (Liu, Rivas *et al.* 2005). La complementariedad perfecta de bases entre la secuencia semilla del miARN (del segundo al octavo nucleótido del extremo 5') y la secuencia complementaria extremo 3'UTR es lo que permite que los miARN modulen la expresión génica (Bartel 2009). El complejo miRISC puede inhibir la expresión de los ARNm blancos por dos mecanismos: (1) Remoción del tallo de poli A (deadenilación) fomentando la actividad de las deadenilasas, seguidas por la degradación del ARNm; y (2) Bloqueando el paso de la iniciación o elongación de la traducción, inhibiendo un factor eucariótico de la elongación o causando un estancamiento del ribosoma (**Figura 3**).

Figura 3. Vía canónica de generación de miARN



Fuente: Figura modificada de (Inui, Martello *et al.* 2010) y (Kohler and Hurt 2007)

3.3.1.2.1.1 Principales proteínas involucradas en la generación de miARN Los miARN necesitan de diferentes proteínas en su generación y procesamiento. Las principales proteínas que participan en la vía de generación de los miARN son: Drosha, Dicer, Argonata 2. (Perron and Provost 2009).

Drosha Es una proteína de la familia RNasa III y es la encargada de catalizar el primer clivaje del pri-miARN para producir el pre-miARN. Posee un dominio rico en Prolina (P-rich, del inglés *proline-rich*), un dominio rico en Arginina-Serina (del inglés *RS-rich*), dos dominios catalíticos RNasa III y un dsRBD C-terminal. Los dsRBD son los encargados de hacer el reconocimiento de los dsARN (Han, Lee *et al.* 2004) (Mueller, Miller *et al.* 2010).

Dicer Es una proteína de la familia RNasa III como Drosha. Dicer es la encargada de procesar inicialmente los dsARN en pequeños fragmentos de siARN o miARN; así como también de cargar los ARN pequeños en RISC. Dicer posee un dominio DEAD, un dominio helicasa, un dominio DUF283, un dominio PAZ (Piwi–Argonaute–Zwille), dos dominios RNasa III en tándem y un dominio de unión a ARN de doble cadena (dsRBD, del inglés *dsRNA-binding domain*) (Macrae, Zhou *et al.* 2006) (Du, Lee *et al.* 2008). El dominio PAZ se encuentra en Dicer y en las proteínas de la familia Argonata, es el sitio de anclaje para el extremo 3' de la cadena guía (Ma, Ye *et al.* 2004). La longitud de los miARN y siARN producidos por Dicer es fijada por la distancia entre el dominio PAZ y los dominios RNasa III, la cual es determinada por la longitud de la hélice del dominio conector formado en la estructura tridimensional de la molécula (Macrae, Zhou *et al.* 2006).

Argonata 2 Existen cuatro proteínas Argonata en humanos. Sin embargo, solo la Argonata 2 tiene la capacidad de clivaje y en el complejo RISC es la encargada de clivar el miARN* (Liu, Carmell *et al.* 2004) (Meister, Landthaler *et al.* 2004). Las proteínas Argonautas están compuestas de tres dominios: dominio PAZ, dominio MID y dominio PIWI. El dominio PAZ es el encargado de anclar el extremo 3' de la cadena de ARN tanto en miARN como en siARN (Ma, Ye *et al.*

2004; Song and Joshua-Tor 2006). A su vez, el dominio MID ancla el nucleótido terminal del 5' (Wang, Juranek *et al.* 2008) (Tolia and Joshua-Tor 2007).

Cuerpos P Los cuerpos P o cuerpos GW, son gránulos localizados en el citoplasma de las células eucariotas. Estos gránulos son ricos en proteínas implicadas en el catabolismo del ARNm (deadenilación, hidrolisis del capping y degradación del ARNm) y represión de la traducción (Filipowicz, Bhattacharyya *et al.* 2008)

3.3.1.2.1.2 Proteínas accesorias involucradas en la generación de miARN

Algunas proteínas accesorias juegan un papel importante en la acción y biogénesis de los miARN, ayudando a las proteínas mayores en sus funciones. Entre ellas: DGCR8, Exportina 5, TRBP y PRKRA (Perron and Provost 2009).

Proteína del gen de la región crítica 8 del síndrome de DiGeorge (DGCR8, del inglés *DiGeorge syndrome critical region gene 8 protein*) Es una proteína de unión a dsARN, inicialmente fue identificada en humanos como una proteína codificada por un gen localizado en el cromosoma 22 que está deletado en pacientes con la enfermedad congénita del Síndrome de DiGeorge (Wilson, Burn *et al.* 1993) (Shiohama, Sasaki *et al.* 2003). DGCR8 es la encargada de proveer el anclaje para Drosha, durante el procesamiento inicial de clivaje de los pri-miARN. El análisis de la estructura cristalina de DGCR8, demostró que la proteína DGCR8 posee un dominio WW y dos dominios de unión a dsARN (dsRBDs, del inglés *double-stranded RNA-binding domains*); los dsRBDs tienen una estructura en plegamiento $\alpha\beta\beta\alpha$ y es la región encargada de interaccionar con el dsARN. DGCR8 tiene su proteína homóloga en plantas, Pasha. (Sohn, Bae *et al.* 2007).

Exportina 5 (EXP5, del inglés *Exportin 5*) Es una proteína miembro de la familia de las carioferinas que son proteínas encargadas de transporte nuclear, tanto de la exportación como de la importación de moléculas hacia y desde el núcleo al

citoplasma. La exportina 5 hace parte de las proteínas exportadores y está encargada de transportar a través del poro nuclear, los miARN desde el núcleo hacia el citoplasma en la presencia del cofactor Ran-GTP (Bohnsack, Czaplinski *et al.* 2004). La exportina 5 reconoce los tallos de dsARN >14 de pares de base junto con un corto extremo colgante 3' (1–8 nt) (Lund, Guttinger *et al.* 2004) (Zeng and Cullen 2004) (Kohler and Hurt 2007). La exportina 5 se une cooperativamente al miARN y al cofactor Ran-GTP, una vez en el citoplasma, el miARN es liberado y el GTP es hidrolizado (Yi, Qin *et al.* 2003).

Proteína de unión a ARN en respuesta a trans-activación (TRBP, del inglés *TAR RNA-binding protein*) y **La proteína quinasa activadora dependiente de ARN de doble cadena inducible por interferón** (PRKRA, del inglés *protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator*) Actúan como cofactores de Dicer, estabilizándolo y contribuyendo a la formación de RISC (Chendrimada, Gregory *et al.* 2005) (Haase, Jaskiewicz *et al.* 2005) (Lee, Hur *et al.* 2006). Ha sido descrito un modelo en el cual las dos proteínas interactúan directamente la una con la otra asociadas a Dicer, sin embargo este modelo no es aceptado totalmente debido a que se ha observado experimentalmente que el procesamiento de los miARN ocurre en la presencia o ausencia de estas dos proteínas (Kok, Ng *et al.* 2007).

3.3.1.2.2 Vías no canónicas de generación de miARN Gracias al avance en las tecnologías de secuenciación ha sido posible generar gran cantidad de información que ha sido analizada, ordenada y procesada obteniéndose datos valiosos sobre las subclases de miARN en diversos tipos de células de diferentes organismos, muchos de los cuales sólo cumplen parcialmente la definición de miARN. La mayoría de estos análisis, clasifican los miARN teniendo en cuenta únicamente, dos criterios: la expresión de una ARN de aproximadamente 22 nucleótidos y la presencia de un precursor en forma de horquilla (Berezikov, van

Tetering *et al.* 2006). Actualmente, se ha descrito que la mayoría de los mamíferos, y la especie *H. sapiens*, utilizan la vía canónica para la generación de miARN. Sin embargo, para organismos como *Drosophila megaloblaster*, *Giardia lamblia*, *Zebrafish* y *Murine Gamma-herpesvirus 68* se ha descrito la producción de miARN por vías no canónicas. Por lo cual, es de esperar que las células usen una variedad de transcritos como fuentes de miARN y utilicen diferentes mecanismos de generación. Las vías no canónicas son una prueba de la flexibilidad y habilidad de las células para generar estructuras en forma de horquilla como pre-miARN (Miyoshi, Miyoshi *et al.* 2010) **(Tabla 2)**.

3.3.1.2.3 Diferencias y similitudes entre la vía canónica y no canónica de generación de miARN Las vías canónicas y no canónicas de generación de miARN incluyen en su maquinaria dos enzimas: Drosha y Dicer, que realizan su efecto a nivel del núcleo y citoplasma, respectivamente. Sin embargo, la principal diferencia entre la vía canónica y las vías no canónicas, es que tan solo los miARN producidos por la vía canónica requieren para la generación de los miARN de las proteínas Drosha y Dicer; a diferencia de esta vía, las vías no canónicas, utilizan tan solo alguna de estas dos proteínas. De acuerdo a la utilización de la enzima Drosha o Dicer, los miARN generados por vías no canónicas pueden ser agrupados en dos grandes categorías: (i) miARN producidos por vías no canónicas independientes de Drosha (Berezikov, Chung *et al.* 2007; Kim and Kim 2007; Okamura, Hagen *et al.* 2007; Ruby, Jan *et al.* 2007; Babiarz, Ruby *et al.* 2008; Ender, Krek *et al.* 2008; Saraiya and Wang 2008; Bogerd, Karnowski *et al.* 2010; Miyoshi, Miyoshi *et al.* 2010) y (ii) miARN producidos por vías no canónicas independientes de Dicer (Cifuentes, Xue *et al.* 2010) (Mayer, Schiffer *et al.* 2000) **(Tabla 2)**.

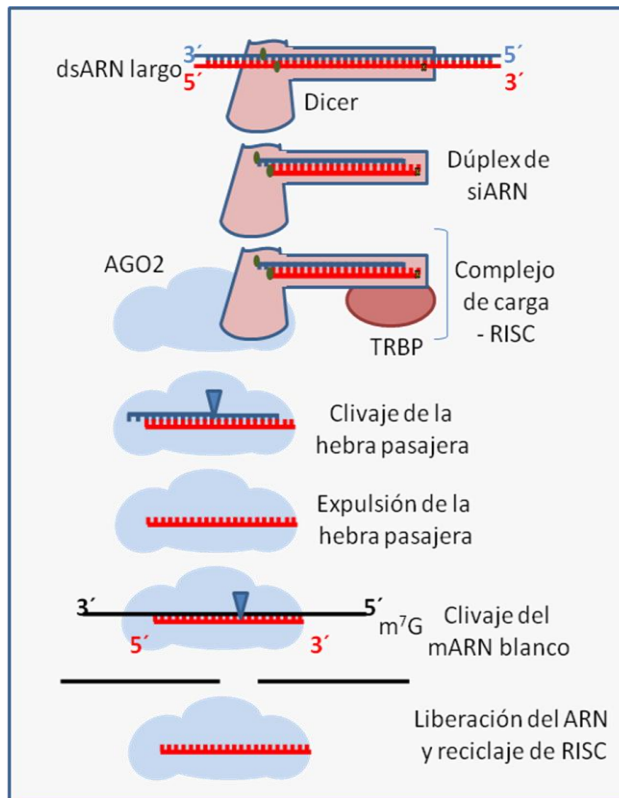
Tabla 1. Resumen de las vías no canónicas de generación de miARN

MAQUINARIA	VÍA	REFERENCIA
Vías independientes de Drosha	Mirtrones	(Okamura, Hagen <i>et al.</i> 2007) (Berezikov, Chung <i>et al.</i> 2007) (Ruby, Jan <i>et al.</i> 2007) (Kim and Kim 2007)
	MiARN derivados de ARN nucleolar pequeño (snoARN, del inglés <i>small nucleolar RNA</i>)	(Ender, Krek <i>et al.</i> 2008) (Saraiya and Wang 2008)
	MiARN derivados de ARN de transferencia (tARN, del inglés <i>transfer RNA</i>)	(Babiarz, Ruby <i>et al.</i> 2008)
	MiARN derivados de ARN endógenos de horquilla pequeña (shARN, del inglés <i>small hairpin RNA</i>)	(Babiarz, Ruby <i>et al.</i> 2008) (Ender, Krek <i>et al.</i> 2008)
	Vía dependiente de ribonucleasa de transferencia Z (tRNasaZ, del inglés <i>transfer ribonuclease Z</i>)	(Bogerd, Karnowski <i>et al.</i> 2010)
	miARN derivados de horquilla terminal de un precursor de ARN interferente pequeño endógenos (endo-siARN, del inglés <i>endogenous-small interfering RNA</i>)	(Miyoshi, Miyoshi <i>et al.</i> 2010)
Vías independientes de Dicer	Vía dependiente de Argonauta	(Cifuentes, Xue <i>et al.</i> 2010)
	Vía dependiente de ribonucleasa de transferencia Z (tRNasaZ del inglés, <i>transfer ribonuclease Z</i>)	(Mayer, Schiffer <i>et al.</i> 2000)

Fuente. Tabla extractada de la información de artículo de (Miyoshi, Miyoshi *et al.* 2010)

3.3.2 ARN de interferencia Es un mecanismo de silenciamiento génico celular natural, altamente conservado en respuesta a ARN de doble cadena (dsARN, del inglés *double-stranded RNA*). El ARNi actúa a nivel postranscripcional mediante la degradación específica de ARNm homólogo. Normalmente, dsARN largos son reconocidos por Dicer, una enzima con actividad de RNasa III, y clivados en segmentos de 21-23 pares de base, los llamados siARN (Hohjoh 2002). Estos segmentos cortos de ARN son reconocidos por un el enzimático Complejo de Silenciamiento Inducido de ARN (RISC, del inglés *RNA-Induced Silencing Complex*) que incluye una nucleasa y una helicasa; el cual transporta la cadena guía a su secuencia complementaria en el ARNm, para que este sea clivado y degradado (**Figura 4**).

Figura 4. siARN en humanos



Fuente. Figura modificada de (Jinek and Doudna 2009).

3.3.3 Características comunes de las vías de generación de miARN y siARN

Una característica común del ARNi y todas las vías de silenciamiento mediado por ARN pequeños es la asociación de un pequeño ARN silenciador (ARN guía) con una proteína de la familia Argonauta (Ghildiyal and Zamore 2009). Luego de la producción de los pre-miARN (Diederichs and Haber 2007) y los precursores de siARN, ambos son procesados por Argonauta, el corazón de RISC. En este paso la cadena guía es cargada en Argonauta, y la cadena pasajera es disociada y destruida (Diederichs and Haber 2007). RISC utiliza la cadena guía de ARN, como una guía para el apareamiento de bases con la secuencia blanco específica en el ARNm, con el propósito de inhibir la traducción o inducir la degradación del ARN blanco.

La incorporación de los siARN y los miARN en RISC requiere la presencia de grupos fosfato en el extremo 5' y de dos nucleótidos colgantes en el extremo 3' (Ma, Ye *et al.* 2004). El descubrimiento que el dominio PAZ es un dominio de unión a ARN que específicamente reconoce el extremo 3' de ssARN sugirió que este funcionaba como un módulo de anclaje al 3' de la cadena guía de ARN dentro de RISC. El grupo fosfato del 5' de siARN y miARN, resultante del mecanismo de biogénesis, es crucial para el ensamble eficiente de estos ARN pequeños en RISC. Además, el grupo fosfato es esencial para la fidelidad de la degradación del ARNm blanco porque la posición del sitio de clivaje en el ARN blanco es determinada por la distancia desde el grupo fosfato 5' de la cadena de ARN guía (Carthew and Sontheimer 2009). Vale la pena destacar que durante los últimos años gracias al conocimiento de los miARN ha sido posible diseñar diferentes modelos y estrategias de silenciamiento que combinadas con la tecnología del ARN interferente han permitido mejorar y aumentar el porcentaje de inhibición sin mayores dificultades (Fewell and Schmitt 2006; Liu, Haasnoot *et al.* 2008; Wu, Bonsra *et al.* 2009; Lambeth, Van Hateren *et al.* 2010).

3.4 VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

3.4.1 Introducción El VIH es un Lentivirus del grupo de los Retrovirus y es el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Actualmente, se conocen dos tipos: tipo 1 (VIH-1) y tipo 2 (VIH-2). Los lentivirus pueden infectar muchas especies, como primates, gatos, ovejas, y causan sub-infecciones clínicas con una viremia persistente, respuesta neutralizante débil de anticuerpos y una continua mutación del virus. El conocimiento de su estructura, genoma y ciclo de replicación son fundamentales para el diseño de nuevos y mejores blancos terapéuticos.

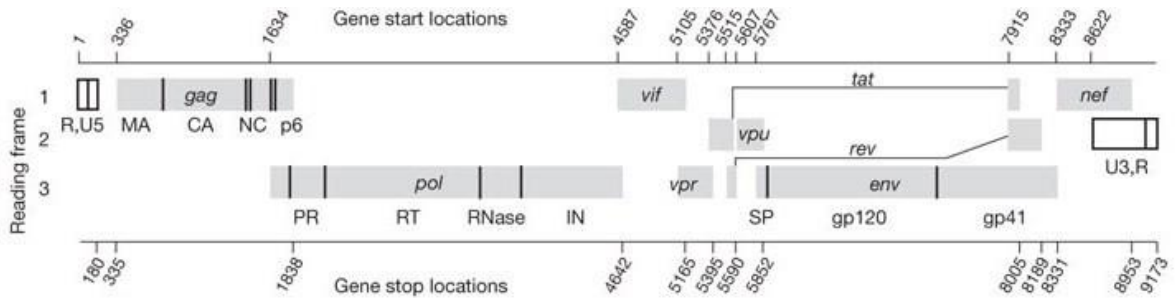
3.4.2 Estructura El virión es esférico con un diámetro de aproximadamente 100nm. Su parte externa consiste de una membrana lipídica, la envoltura, la cual es derivada de la membrana de la célula hospedera y por lo tanto contiene proteínas específicas del hospedero, así como también el Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Adicionalmente, la envoltura está equipada con glicoproteínas codificadas por el virus, gp120 y gp41 unidas no covalentemente entre sí. Tres heterodímeros gp120-gp41 forman una especie de espiga, la cual es anclada a la envoltura a través de las moléculas gp41, mientras que la gp120 forma un capuchón en el exterior del virión (Kowalski, Potz *et al.* 1987). Se encuentran aproximadamente 70 espigas en la superficie del VIH-1. Debajo de la envoltura se encuentra un estrato de proteínas de la matriz, p17, circundando la cápside viral. La cápside tiene forma de cono truncado y está construido de proteínas de la cápside, p24. Al interior de la cápside está el núcleo viral que contiene dos moléculas de ARN monocatenario positivo (ARNs o RNAs, del inglés *positive-strand RNA*). El núcleo también contiene enzimas virales esenciales para la

replicación: la transcriptasa reversa (RT, del inglés *reverse transcriptase*), la proteasa (PR, del inglés *protease*) y la integrasa (IN, del inglés *integrase*).

3.4.3 Genoma del VIH El genoma del VIH-1 consiste de dos cadenas de ARN monocatenario retro transcripto, cada una de una longitud de ~9.2 Kb de longitud, con solo nueve genes que codifican para 15 proteínas. La estructura compacta del genoma del VIH-1 se logra por el uso de los tres ORFs y el uso de splicing diferencial. Tres de sus genes codifican las poliproteínas Gag, Pol y Env, comunes a todos los Retrovirus. El gen *gag* codifica para la poliproteína p55, la cual es clivada en la proteína de la cápside (CA; p24), la proteína de la matriz (MA, p17), la proteína de la nucleocápside (NC, p7), la proteína p2 y la p1. El principal propósito de las proteínas p24, p17, p7 y p6 es construir la matriz viral y las estructuras de la cápside y actuar en el proceso de ensamble viral. El gen *pol* codifica para tres enzimas virales necesarias para la replicación viral: la proteasa (PR; p31), la integrasa (IN; p32) y la transcriptasa reversa (RT; p66/p51). El gen *env* codifica para la poliproteína viral gp160, la cual es clivada para formar las glicoproteínas de la envoltura gp120 y gp41, esenciales para la adhesión viral y la entrada en la célula huésped (Kwong, Wyatt *et al.* 1998). El VIH-1 tiene también dos genes regulatorios *tat* y *rev*, que codifican para las proteínas Tat (p14/p16) y Rev (p19), con funciones regulatorias. Y tiene también cuatro genes accesorios *nef*, *vif*, *vpr*, y *vpu*, que codifican para las proteínas Nef (p25/p27), Vif (p23), Vpr (p12/p10) y Vpu (p16) (Frankel and Young 1998).

Las regiones codificantes del genoma del VIH-1 son limitadas por repeticiones terminales largas (LTRs, del inglés *long terminal repeats*), las cuales son regiones no codificantes que contienen promotores, potenciadores y otros elementos esenciales para la replicación viral y su interacción con factores de transcripción celular (**Figura 5**).

Figura 5. Organización del genoma del VIH-1

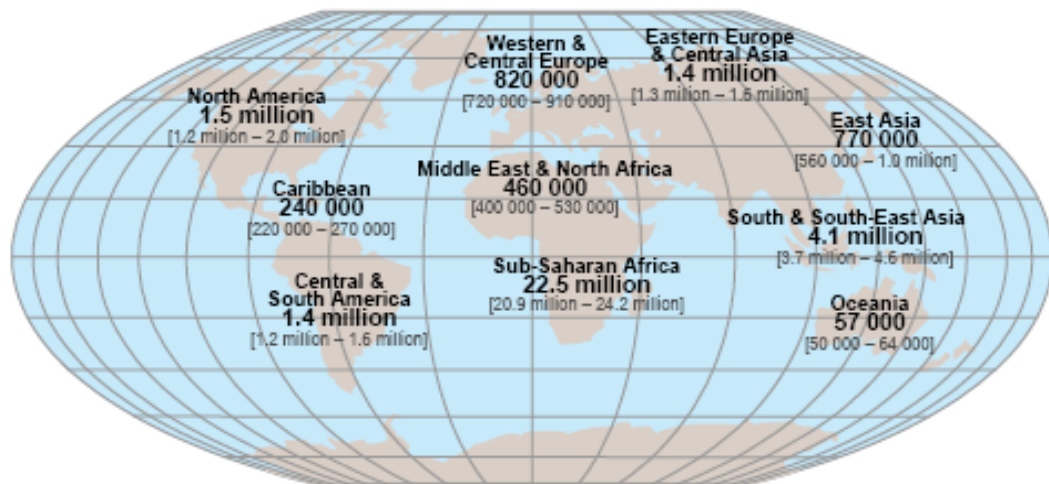


Fuente. Figura adaptada de (Watts, Dang *et al.* 2009)

3.4.4 Ciclo de replicación La infección inicia cuando la proteína gp120 se une a la molécula del CD4 en las células diana, células T, monocitos y células dendríticas (Dalglish, Beverley *et al.* 1984). Esto causa un cambio conformacional de la proteína, permitiendo que la gp120 se una al co-receptor de quimioquina CXCR4 y CCR5. Esta interacción provoca que el virus se acerque a la célula y permite que la proteína gp41 penetre la membrana celular resultando en la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula. Cuando esta entra en el citoplasma, la RT del virus convierte el ARNs a un ADNds el cual luego es integrado en el genoma de la célula hospedera por la IN. La RT no tiene la capacidad de hacer corrección de errores (como las polimerasas celulares) es por eso que se produce una alta frecuencia de mutaciones. Algunos de los genes del VIH-1 son primero transcritos y traducidos en precursores de proteínas, lo cual potencia la transcripción y la traducción de los genes estructurales tardíos. La proteína gp160 es glicosilada en el retículo endoplásmico (ER, del inglés *endoplasmic reticulum*) y clivada en la proteína gp120 y gp41 en el aparato de Golgi. Posteriormente las proteínas son ensambladas por la membrana celular. Los genes *pol* y *gag* son transcritos y traducidos en las poliproteínas p160pol y p55gag. Las proteínas recién formadas son clivadas y ensambladas en la membrana celular. A partir de ahí, geman los nuevos virus de la superficie.

3.4.5 Epidemiología La infección por VIH es una pandemia en crecimiento constante en muchos países del mundo, especialmente en países pobres o en vías de desarrollo. Se estima que existen 33 millones de personas (31.4 – 35.3 millones) en el mundo viviendo con VIH. Se estima que en el 2009 fueron infectadas 2.6 millones de personas (2.3 – 2.8 millones), de las cuales 370.000 (230.000 – 510.000) fueron niños. En Centro y Sur América se estima que 1.4 millones de personas (1.2 – 1.6 millones) viven con VIH. Una de cada tres personas viviendo con VIH en Centro y Sur América vive en Brasil (UNAIDS 2010) (Figura 6).

Figura 6. Visión global de la infección por VIH-1



Fuente. UNAIDS 2010.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 DISEÑO DE UNA SECUENCIA INTRÓNICA ARTIFICIAL. Lin, Chang *et al.* 2003 diseñaron una secuencia intrónica artificial imitando la estructura natural de un intrón de pre-ARNm con la posibilidad de ser procesado durante el splicing al cual llamaron SpRNAi. Este es un modelo con nucleótidos consenso de los elementos representativos de una secuencia intrónica; con un sitio donador y sitio aceptor, un dominio del punto de ramificación, un tracto de polipirimidina y adicionalmente, contiene sitios de clonación para la inserción de constructos genéticos (secuencias de ADN). Este modelo también posee una secuencia que codifica para un miARN complementario a un exón blanco, localizada dentro del intrón artificial entre el sitio donador y el dominio del punto de ramificación. De acuerdo al diseño del modelo se esperaba que la porción del intrón representara una región reconocida normalmente por las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas durante el splicing y fuera procesada por la maquinaria del empalmosoma. Para garantizar la observación exitosa del splicing del ARN, el SpRNAi también contenía un codón de parada de traducción en la región proximal del extremo 3', el cual funcionaba como una señal de desviación del pre-ARNm defectuoso para la vía de degradación del ARN mensajero mediada por mutaciones terminadoras (NMD, del inglés *nonsense-mediated mRNA decay*). Adicionalmente, el SpRNAi fue insertado en el gen codificante para la proteína roja fluorescente (rGFP, del inglés *red-Green Fluorescent Protein*) para evaluar la expresión intracelular.

Con el propósito de diseñar una secuencia intrónica artificial, fue modificada y mejorada la secuencia previamente probada y descrita por Lin, Chang *et al.* 2003; la nueva secuencia fue modificada y se realizaron algunos ajustes para mejorarla de acuerdo a las secuencias consenso descritas para intrones tipo empalmosoma de clase mayor (Patel and Steitz 2003). Esta secuencia intrónica artificial fue

construida teniendo en cuenta las secuencias consenso reportadas para las diferentes regiones que están ubicadas en un intrón y que permiten su reconocimiento por las ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares que son las encargadas de formar la maquinaria del empalmosoma para que se lleve a cabo el proceso del splicing.

La primera región modificada fue el sitio de splicing 5'. Esta secuencia corresponde a la secuencia denominada GURAGU. En la posición 1 y 2 de esta región, siempre deben estar presentes los nucleótidos GU, que son los dos nucleótidos reconocidos por el snRNP U1. Los nucleótidos que están con mayor frecuencia en las posiciones 3-6 pueden ser: A/G en la posición 3, A en la posición 4, G en la posición 5 y T en la posición 6. (Lin, Chang et al. 2003) usaron la secuencia GTAAGA, en su primera secuencia reportada, GTAAGT. La secuencia elegida por nosotros fue GTAAGT, la cual incluye los nucleótidos que aparecen con frecuencia en la secuencia consenso y conserva una gran similitud con la segunda secuencia reportada por Lin y Ying. 2003 (**Figura 8 y 9**).

La segunda región modificada fue el punto de ramificación. Los nucleótidos más frecuentes en esta región son C T A/G/C A C T. (Lin, Chang et al. 2003), utilizaron para esta región tanto en la primera como en la segunda secuencia reportadas TACTAAC. Nosotros utilizamos la misma secuencia, ya que no solo es igual en sus dos diseños sino que también utiliza los nucleótidos que se utilizan con mayor frecuencia en la secuencia consenso (**Figura 8 y 9**).

La tercera región modificada fue el tracto de polipiriminidas. La extensión reportada en la secuencia consenso es de 10 nucleótidos, con la siguiente frecuencia de nucleótidos en cada una de estas posiciones de T/C T/C T/C T/C C/T C/T C/T T/C C/A/T/G C/T. Lin, y Chang et al. 2003 utilizaron en la primera secuencia reportada 11 timinas, y en la segunda secuencia reportada 8 timinas. Para este modelo fue utilizada una secuencia de longitud de 10 nucleótidos como

la de la secuencia consenso, pero elegimos en todas las posiciones timinas, como lo hizo Lin y Chang. 2003 en las dos ocasiones (**Figura 8 y 9**).

La última región modificada fue el sitio de splicing 3'. De acuerdo a la frecuencia de nucleótidos en la secuencia consenso los nucleótidos son C/T A G. Teniendo A y G un 100% de frecuencia en estas posiciones. Lin y Chang. 2003 en sus trabajos reportaron CAG, igualmente elegido para este trabajo, debido al 100% de frecuencia de AG y porque C presenta la mayor frecuencia en esta posición (**Figura 8 y 9**).

Finalmente, fueron insertadas en el intrón entre el sitio de splicing 5' y el punto de ramificación una secuencia de ADN codificante para un miARN dirigido contra el gen codificador de la proteína DsRed. La secuencia intrónica artificial conteniendo el ARN contra la proteína DsRed se insertó en el marco de lectura abierto del gen de resistencia a la Ouabaína en la posición 2424 mediante un segmento de ADN sintetizado por la compañía Genscript, que contenía los segmentos: exón del gen de resistencia a la Ouabaína, intron artificial, exón del gen de resistencia a la Ouabaína en sentido 5' - 3'.

La secuencia diseñada en este trabajo tiene una longitud de 116 nucleótidos.

4.2 DISEÑO DE SECUENCIAS DE miARN y shRNAmir

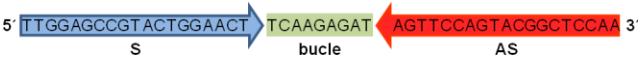

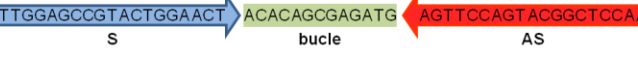
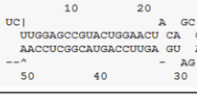
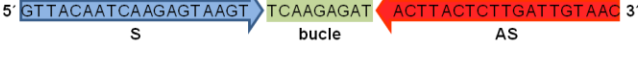
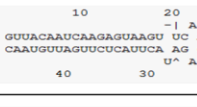
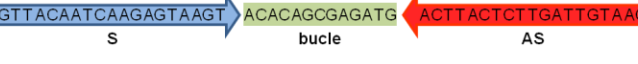
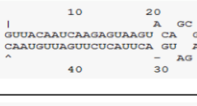
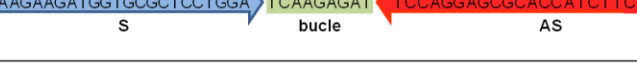

Diseño de secuencias de miARN. Se diseñaron secuencias de miARN contra la proteína fluorescente verde (miGFP), la proteína fluorescente roja (miDsRed) y el gen *Rev* (miRev), de acuerdo al modelo de Lin, Chang *et al.* 2003. Las secuencias dirigidas contra GFP y DsRed fueron diseñadas con el propósito de ser usadas como controles positivos, permitiendo evaluar la inhibición de los genes reporteros respectivos. Las secuencias diseñadas son presentadas en la **Tabla 3**.

miDsRed. Fueron diseñadas dos versiones. La región seleccionada como blanco fue elegida a partir de una secuencia de siARN previamente reportada (Krichevsky and Kosik 2002), pero se utilizaron dos bucles diferentes. El miARN con el primer bucle fue insertado y enviado a sintetizar directamente en el secuencia intrónica diseñada.

miRev. Fueron diseñadas dos versiones. La región seleccionada como blanco fue elegida a partir de una secuencia de shARN previamente reportada (Arteaga, Hinkula *et al.* 2003); (Lin and Ying 2006) para cada una de las versiones se usó un bucle diferente.

miGFP. Solo fue diseñada una versión. Fue usada la secuencia de Lin y Ying 2006 previamente reportada, sin ninguna modificación.

Tabla 2. Características de las secuencias de miARN

Nombre	Secuencia Blanco	Secuencia de ADN codificante para los miARN 5' - 3'	Estructura mas probable usando el programa The mfold Web Server (versión 3.5)
miDsRed versión 1	Proteína roja fluorescente (DsRed)	5'  3'	
miDsRed versión 2	Proteína roja fluorescente (DsRed)	5'  3'	
miRev 1 versión 1	Proteína Rev del VIH-1	5'  3'	
miRev Versión 2	Proteína Rev del VIH-1	5'  3'	
miGFP	Proteína verde fluorescente (GFP)	5'  3'	

Fuente: Datos del autor.

Las secuencias de miARN fueron sintetizadas por The Midland Certified Reagent Company (USA). Las secuencias de ADN sentido y antisentido fueron anilladas en un buffer que contenía 100mM NaCl y 50 mM HEPES pH 7.4 a 90°C durante 4 minutos y a 70°C durante 10 minutos y finalmente la mezcla fue enfriada rápidamente a 10°C.

Diseño de secuencias de shRNAmir. Las secuencias de shRNAmir fueron diseñadas de acuerdo al modelo de Chang y Elledge. 2006. La secuencia del miARN, *miR-30* fue utilizado como esqueleto de miARN para insertar las respectivas secuencias de siARN. Los diseños en forma shARN basados en el esqueleto del miR-30 (shRNAmir, del inglés *miR-30* –based shRNA) poseen un tamaño total de (97nt) (Chang, Elledge *et al.* 2006). Las secuencias de shRNAmir fueron diseñadas contra secuencias blanco en el ARNm codificante para: La proteínas Nef y GFP (**Tabla 4**). Las secuencias usadas como siARN han sido previamente descritas mostrando un porcentaje de inhibición entre el 70% y el 90%. El proceso de diseño fue el siguiente:

Inicialmente se realizo una búsqueda y selección de secuencias de siARN previamente evaluadas, con porcentaje de inhibición mayor al 70%. Posteriormente, con el propósito insertar las secuencias de siARN en el esqueleto del shRNAmir fueron realizados análisis utilizando el programa RNAi central. Finalmente, utilizando la herramienta “RNA Folding Form” del programa “The mfold Web Server” (Zuker 2003), fueron verificadas y predichas la estructura más probablemente formada de la secuencia diseñada y los valores de la energía libre de Gibbs. La secuencia dirigida contra GFP fue diseñada con el propósito de ser usada como control positivo, permitiendo evaluar la inhibición del gen reportero de la GFP.

shRNAmir Nef v1. La región seleccionada como blanco fue elegida a partir de una secuencia de siARN previamente reportada (5´-

GTGCCTGGCTAGAAGCACA-3') (Jacque, Triques *et al.* 2002; Das, Brummelkamp *et al.* 2004).

shRNAmir Nef v2. Para la construcción de este vector se utilizó una secuencia de siARN contra la región PxxP4 de la proteína Nef del VIH-1 (5'-CACACCTCAGGTACCTTTA-3'), la cual ha sido diseñada y evaluada, previamente (Alvarez 2009).

shRNAmir GFP. Contra este blanco se diseñó solo una versión. Se utilizó una secuencia previamente reportada y comercializada por la compañía OpenBiosystems, como un control positivo, sin ninguna modificación. Esta es comercializada en el plásmido vector pSM2, con el nombre "*shRNA eGFP positive pSM2 vector control*".

Tabla 3. Características de las secuencias de shRNAmir

Nombre	Secuencia Blanco (N° de acceso en el Genbank)	Secuencia obtenida en el programa	Estructura mas probable usando el programa The mfold Web Server (versión 3.5)
shRNAmir Nef v1	Proteina Nef del VIH-1 (K03455)	5'- TGCTGTTGACAGTGAGCGATTGTGCCTGGCTAGA AGCACATAGTGAAGCCACAGATGTATGTGCTTCTA GCCAGGCACAAGTGCCTACTGCCTCGGA-3'	<pre> 10 20 30 40 ----- A UG UUGA A A ----- A CUG CAGUG GCG UUGUGCCUGGCUAGAAGCACAU GUG A GGC GUCAU CGU AACACGGACCGAUUCUGUGUAU CAC G A- UCC- C G ----- A 90 80 70 60 50 </pre>
shRNAmir Nef v2	Proteina Nef del VIH-1 (K03455)	5'- TGCTGTTGACAGTGAGCGCGTCACACCTCAGGTA CCTTTATAGTGAAGCCACAGATGTATAAAGGTACCT GAGGTGTGACTTGCCTACTGCCTCGGA-3'	<pre> 10 20 30 40 ----- A UG UUGA A C ----- A CUG CAGUG GCG GUCACACCUCAGGUACCUUUAU GUG A GGC GUCAU CGU CAGUGUGGAGUCCAUGGAUAU CAC G A- UCC- C U ----- A 90 80 70 60 50 </pre>
shRNAmir GFP	Proteina verde fluorescente GFP (U76561.1)	5'- TGCTGTTGACAGTGAGCGAGCACAAAGCTGGAGTA CAACTATAGTGAAGCCACAGATGTATAGTTGACTC CAGCTTGTGCCTGCCTACTGCCTCGGA-3'	<pre> 10 20 30 40 ----- A UG UUGA A A ----- A CUG CAGUG GCG GCACAAGCUGGAGUACAACUAU GUG A GGC GUCAU CGU CGUGUUCGACCCUCAUGUUAU CAC G A- UCC- C C ----- A 90 80 70 60 50 </pre>

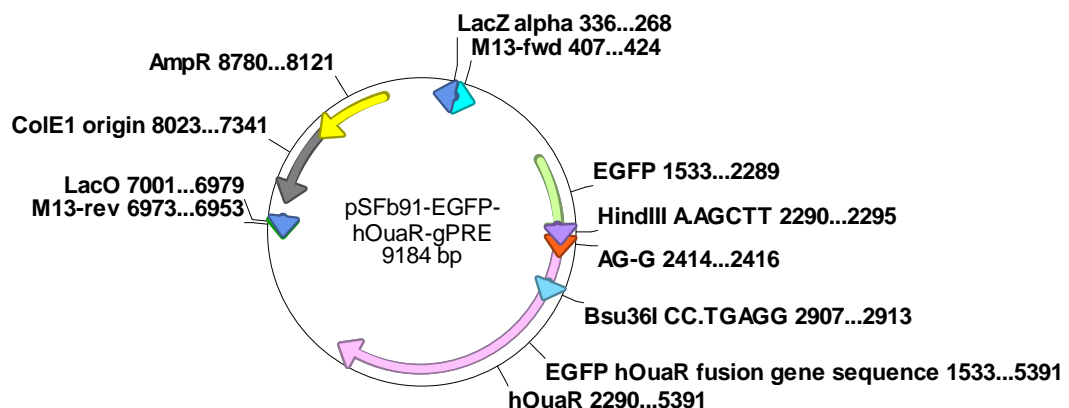
Fuente: Datos del autor.

4.3 CONSTRUCCIÓN DE VECTORES Todas las clonaciones fueron inicialmente realizadas *in silico* utilizando el software ApE- A plasmid Editor v1.10.4 (Davis 2003-2008).

4.3.1 Construcción de vectores con secuencias de miARN

El plásmido vector pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre, fue donado por Alexandra Treschow del Instituto Karolinska y fue utilizado inicialmente para hacer las diferentes sub-clonaciones. Este plásmido vector contiene un marcador genético humano, el OuaSelect. El OuaSelect es una mutante de resistencia a la Ouabaína con dos sustituciones de aminoácidos (Q118R y N129D) en la subunidad α 1 de la Bomba Na⁺/K⁺-ATPasa. Este plásmido también cuenta en su secuencia con la proteína fluorescente verde aumentada (EGFP). El OuaSelect y la EGFP están fusionadas en una proteína de fusión, la proteína EGFP-OuaSelect. Esto permite la selección eficiente de células modificadas genéticamente 48 horas después de la exposición a Ouabaína (Treschow, Unger et al. 2007) (**Figura 7**)

Figura 7. Plásmido vector pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre



El plásmido pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre I miDsRed 1 fue generado de la siguiente manera.

El plásmido pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre fue utilizado con el propósito de insertar en el marco de lectura abierta del gen *OuaSelect* un intrón artificial que permitiera la liberación de miARN.

El plásmido vector pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre fue cortado en las posiciones 2291 y 2909 con las enzimas de restricción HindIII y Bsu36I, respectivamente. Al mismo tiempo el plásmido pUC57 portador del segmento que contiene la secuencia intrónica artificial fue digerido con las mismas enzimas, y el segmento liberado fue purificado.

El vector recombinante y ligado fue usado para transformar la bacteria *E.coli* DH5 α . Las bacterias transformantes se seleccionaron en medio de cultivo LB suplementado con Ampicilina. El ADN plasmídico fue extraído usando un estuche comercial (QIAprep® Spin miniprep kit, QIAGEN) y la presencia del inserto en el ADN plasmídico de algunas colonias fue verificada por digestión con la enzima *MluI*.

Posteriormente, el plásmido pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre I miDsRed 1 fue digerido con las enzimas *Clal* y *MluI*, y se utilizó para insertar las diferentes secuencias de miARN. Obteniéndose los plásmidos:

- pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre I miDsRed 2;
- pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre I miRev 1;
- pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre I miRev 2;
- pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre I miGFP.

Para facilitar los ensayos de co-transfección de los plásmidos portadores de los diferentes miARN y los genes que con la secuencia blanco, el gen *OuaSelect*. Fueron sub-clonados en el plásmido pcDNA, debido a que el plásmido pSF91 es de un gran tamaño y esto dificulta la realización de las co-transfecciones con las proporciones de ADN apropiadas para lo anterior.

El plásmido pSFb91-EGFP-OuaSelect-gPRE fue digerido con las enzimas HindIII y Sall, con el propósito de liberar el OuaSelect. Al mismo tiempo el plásmido pcDNA3 fue digerido con XhoI y Sall. Posteriormente, el segmento OuaSelect y el pcDNA3 linearizado fueron ligados y se obtuvo el plásmido pcDNA3-OuaSelect. Finalmente, con el propósito de clonar la secuencia intrónica artificial en el OuaSelect, los plásmidos anteriormente obtenidos y el pcDNA3-OuaSelect fueron digeridos con HindIII y Bsu36I. El pcDNA3-OuaSelect linearizado fue utilizado para clonar los segmentos liberados de los plásmidos pUC57. Obteniéndose los plásmidos:

- pcDNA3 OuaSelect I miRev 1;
- pcDNA3 OuaSelect I miRev 2;
- pcDNA3 OuaSelect I miGFP 1;
- pcDNA3 OuaSelect I miDsRed 2.

4.3.2 Construcción de vectores con secuencias de shRNAmir

Utilizando unos de los plásmidos previamente obtenidos de genescript (pUC57-Segto OuaSelect I miARN(NN)), fueron clonados por esta compañía las secuencias diseñadas de shRNAmir y obtenidos los siguientes plásmidos:

- pUC57-Segto OuaSelect I shRNAmir Nef 1;
- pUC57-Segto OuaSelect I shRNAmir Nef 2;
- pUC57-Segto OuaSelect I shRNAmir GFP.

Posteriormente, con el propósito de clonar la secuencia intrónica artificial con los shRNAmir en el OuaSelect, los plásmidos anteriormente obtenidos y el pcDNA3-OuaSelect fueron digeridos con HindIII y Bsu36I. El pcDNA3-OuaSelect linearizado fue utilizado para clonar los segmentos liberados de los plásmidos pUC57. Y se obtuvieron los siguientes plásmidos:

- pcDNA3-OuaSelect I shRNAmir Nef 1;

- pcDNA3-OuaSelect I shRNAmir Nef 2;
- pcDNA3-OuaSelect I shRNAmir GFP.

En la siguiente tabla, se citan con más detalle las características de cada construcción realizada.

Tabla 4. Detalle de las construcciones realizadas durante este trabajo

	Nombre de la construcción	Origen / obtención del inserto	Insertado en
1	pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre I miDsRed 1	miDsRed	pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre
2	pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre I miDsRed 2	miDsRed	pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre
3	pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre I miRev 1	miRev	pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre
4	pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre I miRev 2	miRev	pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre
5	pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre I miGFP	miGFP	pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre
6	pUC57-Segto OuaSelect I miDsRed 2	miDsRed 2	pUC57-Segto OuaSelect I
7	pUC57-Segto OuaSelect I miRev 1	miRev 1	pUC57-Segto OuaSelect I
8	pUC57-Segto OuaSelect I miRev 2	miRev 2	pUC57-Segto OuaSelect I
9	pUC57-Segto OuaSelect I miGFP	miGFP	pUC57-Segto OuaSelect I
10	pcDNA3-OuaSelect	OuaSelect	pcDNA3
11	pcDNA3-OuaSelect I miDsRed 2	I miDsRed 2	pcDNA3
12	pcDNA3-OuaSelect I miRev 1	I miRev 1	pcDNA3
13	pcDNA3-OuaSelect I miRev 2	I miRev 2	pcDNA3
14	pcDNA3-OuaSelect I miGFP	I miGFP	pcDNA3
15	pcDNA3-OuaSelect I shRNAmir Nef 1	I shRNAmir Nef 1	pUC57-Segto OuaSelect I shRNAmir Nef 1
16	pcDNA3-OuaSelect I shRNAmir Nef 2	I shRNAmir Nef 2	pUC57-Segto OuaSelect I shRNAmir Nef 2
17	pcDNA3-OuaSelect I shRNAmir GFP	I shRNAmir GFP	pUC57-Segto OuaSelect I shRNAmir GFP

Fuente: Datos del autor.

4.4 PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS Y PURIFICACIÓN

Todos los plásmidos fueron introducidos para ser amplificados en bacterias competentes *E. coli* por el método de choque térmico y las clonas de bacterias transformadas fueron seleccionadas en medio LB suplementado con el antibiótico

apropiado. Posteriormente, el ADN plasmídico fue extraído con un estuche comercial (Qiagen Plasmid Maxi Prep y Qiaprep® Miniprep). La cuantificación de ADN se realizó por espectrofotometría y fue probada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar su calidad y pureza.

Digestión de ADN plasmídico. Los plásmidos fueron digeridos con enzimas de restricción de la casa comercial Fermentas o New England Biolabs, La cantidad de ADN digerido fue de 1µg en un volumen de 30 µl. La cantidad de la enzima y el buffer dependía de la reacción y de la enzima. El tiempo de digestión fue de 3 horas para ensayos de ligación y de 1 hora para screening de colonias.

Electroforesis en geles de agarosa. Luego de las digestiones y extracciones de ADN de colonias transformadas, se realizaron electroforesis generalmente usando agarosa al 1% en buffer TAE 1x usando el marcador de peso molecular según las bandas esperadas y corriendo el gel entre 900 y 100v, durante un tiempo entre 45 minutos y una hora y media dependiendo el fragmento esperado. Las digestiones fueron verificadas por el sistema de foto-documentación E-Box VX2 de Vilber, con sistema óptico y cámara de Sony chip CCD.

Extracción de ADN a partir de gel. Para purificar los fragmentos deseados, se recortaron las bandas deseadas y se extrajo el ADN plasmídico utilizando el QIAquick® Gel extraction kit, QIAGEN

Ligación. Una vez se obtuvo los segmentos a clonar y el vector correctamente linearizado, se realizaban los ensayos de ligación. La reacción se llevaba a cabo en un volumen final de 20 µl, con el buffer apropiado y enzima T4 Ligasa de Fermentas, Promega o Invitrogen. Se incuban durante más de 12 horas a temperatura ambiente, a 4°C y a 16°C. La mejor temperatura fue 16°C.

4.5 CULTIVO CELULAR Y TRANSFECCIONES

Células HeLa fueron mantenidas en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de GIBCO, suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal, 2 mM L-glutamina y Gentamicina, en atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C. Las células fueron transfectadas a una confluencia de 40–50% aproximadamente, usando Fugene-6 (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Usando la proporción vector reportero vector miARN 1µg: 2µg o 0,75µg: 2,25µg. Las células fueron incubadas por 24, 48 y 72 horas.

Posteriormente, la expresión de los plásmidos pSF91β-eGFP-OuaSelect-wpre y pSF91β-eGFP-OuaSelect-wpre I miDsRed 1 fue evaluada en ensayos de transfección transitoria de células HeLa.

La funcionalidad del plásmido pSF91β-eGFP-OuaSelect-wpre I miDsRed 1 se evaluó con ensayos de co-transfección con el plásmido pDsRed-C1 en células HeLa, seguido de un ensayo de citometría de flujo.

La funcionalidad del plásmido pcDNA3-OuaSelect se evaluó mediante ensayos de transfección transitoria de células HeLa y de células transfectantes seleccionadas con Ouabaína.

Finalmente, los plásmidos portadores de las diferentes secuencias de miARN fueron evaluados en ensayos de co-transfección transitoria de células HeLa usando los siguientes plásmidos:

- pcDNA3-OuaSelect I miDsRed 2 con pDsRed C1;
- pcDNA3-OuaSelect I miGFP con pEGFP;
- pcDNA3 OuaSelect I miRev 1 con pRev-GFP;
- pcDNA3 OuaSelect I miRev 2 con pRev-GFP.

Otros ensayos se realizaron usando células 293T, mediante co-transfecciones transitorias, usando los siguientes plásmidos:

- pcDNA3-OuaSelect I shRNAmir Nef 1 con pNef-d2EGFPN3;
- pcDNA3-OuaSelect I shRNAmir Nef 2 con pNef-d2EGFPN3;
- pcDNA3-OuaSelect I shRNAmir GFP con pEGFP.

4.6 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA. La expresión de las proteína GFP, DsRed, y de la proteína fusión GFP-OuaSelect de los plásmidos, fueron observadas por microscopia de fluorescencia con el microscopio IX81. Las células HeLa fueron observadas y fotografiadas después de 24, 48 y ocasionalmente 72 horas de transfección.

4.7 CITOMETRÍA DE FLUJO

La expresión de los vectores portadores de las diferentes secuencias blancos co-transfectados con los plásmidos portadores de los diferentes miARN y shRNAmir se realizó mediante citometría de flujo utilizando el equipo BD FACSCalibur system con filtros (emisión, 507 nm; excitación, 488 nm) y el equipo Cyflow SL de PARTEC con filtros (emisión, 507 nm; excitación, 488 nm).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ESTRATEGIA PARA LA INSERCIÓN DEL INTRÓN ARTIFICIAL DENTRO DEL MARCO DE LECTURA DEL GEN DE RESISTENCIA A LA OUABAÍNA

Con el propósito de insertar la secuencia intrónica artificial dentro del marco de lectura del gen *OuaSelect*, del plásmido pSF91 β -eGFP-*OuaSelect*-wpre, se identificaron los sitios que contenían la secuencia AGG con el propósito de elegir la posición para ubicar la secuencia intrónica artificial entre los nucleótidos AG y G. Ya que los nucleótidos AG, son los encontrados con mayor frecuencia en el extremo 3' del exón 5' y el nucleótido G es el más frecuentemente encontrado en la primera posición del extremo 5' del exón en sentido 3'. Fueron identificados 54 sitios AGG en el marco de lectura del gen *OuaSelect*. El intrón artificial se insertó en la posición 2414 del plásmido pSF91 β -eGFP-*OuaSelect*-wpre.

5.2 DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA INTRÓNICA ARTIFICIAL

5.2.1 Sitios de multi-clonación insertados en la secuencia intrónica artificial

Una vez seleccionado el sitio de inserción del intrón artificial, utilizando el software ApE- A plasmid Editor v1.10.4 (Davis 2003-2008) fueron determinados los sitios de restricción para las enzimas de restricción ausentes en el plásmido vector con el propósito de elegir dos enzimas que servirían para insertar la secuencia de miARN y shRNAmir en el ORF del *OuaSelect*.

Las enzimas ausentes en la secuencia del plásmido fueron:

AccIII *AvrII* *BclI* *BstBI* ***ClaI*** *FseI* *FspAI* *MboI* ***MluI*** *NruI* ***NsiI***

Pacl Pmel PmlI PshAI Psil SanDI SbfI SexAI Sgfl SnaBI SrfI

Del anterior grupo de enzimas fueron seleccionadas tres, de acuerdo a los siguientes criterios de exclusión: (1) enzimas de corte romo, (2) enzimas con actividad “star”, (3) enzimas poco comunes, (4) enzimas con sitios de reconocimiento ambiguo o con más de dos posibilidades de un nucleótido por posición, (5) enzimas con sitios de reconocimiento muy largos. Considerando lo anterior fueron seleccionadas las enzimas *Clal*, *MluI* y *NsiI*. Sin embargo, entre los criterios de selección del sitio de restricción para la enzima por omisión involuntaria no se tuvo en cuenta las enzimas susceptibles de metilación.

La secuencia intrónica artificial diseñada contiene las siguientes regiones (en sentido 5' a 3') que normalmente se encuentran en un intron y son indispensables para su liberación durante el splicing, tales como: **(Figura 8 y Figura 10)**:

Sitio donador (sitio de splicing 5'): secuencia GURAGU

Punto de ramificación

Tracto de polipirimidina

Sitio aceptor (sitio de splicing 3'): secuencia CAG

Ademas, de la secuencia intrónica artificial se inserto las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción (*Clal*, *MluI* y *NsiI*), usadas como sitios de inserción de miARN y shARNmi.

Finalmente, fueron diseñadas dos secuencias intrónicas artificiales:

1. Secuencia intrónica artificial con sitios de reconocimiento para las enzimas *MluI* y *Clal*, conteniendo una secuencia codificante para un miARN dirigido contra la proteína DsRed **(Figura 8)**.
2. Secuencia intrónica artificial con sitios de reconocimiento para las enzimas

MluI, *Clal* y *Nsil*, conteniendo una secuencia codificante para un shRNAmir dirigido (en este caso) contra la proteína GFP (**Figura 10**).

De acuerdo al modelo diseñado, las co-transfecciones transitorias de los plásmidos portadores de secuencias intrónicas con miARN o shRNAmir junto con los plásmidos portadores de genes con las secuencias blanco permiten evidenciar la liberación de la secuencia intrónica artificial al reconstituir el gen *OuaSelect* y liberar los miARN o shARNmir contra los ARNm blanco. La **figura 9 y 11** muestran una representación esquemática del diseño experimental del intron artificial con el miARN y el shARNmir, respectivamente, así como la predicción del mecanismo y el resultado final en cada uno de los diseños.

Figura 8. Diseño de una secuencia intrónica artificial con un segmento codificante para un miARN

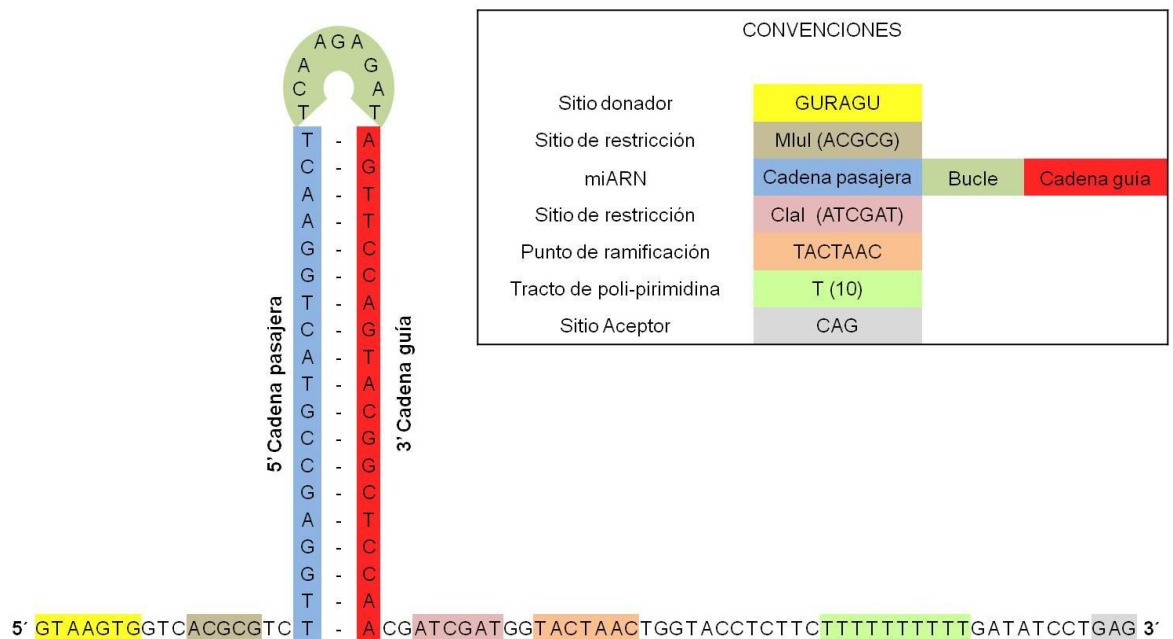
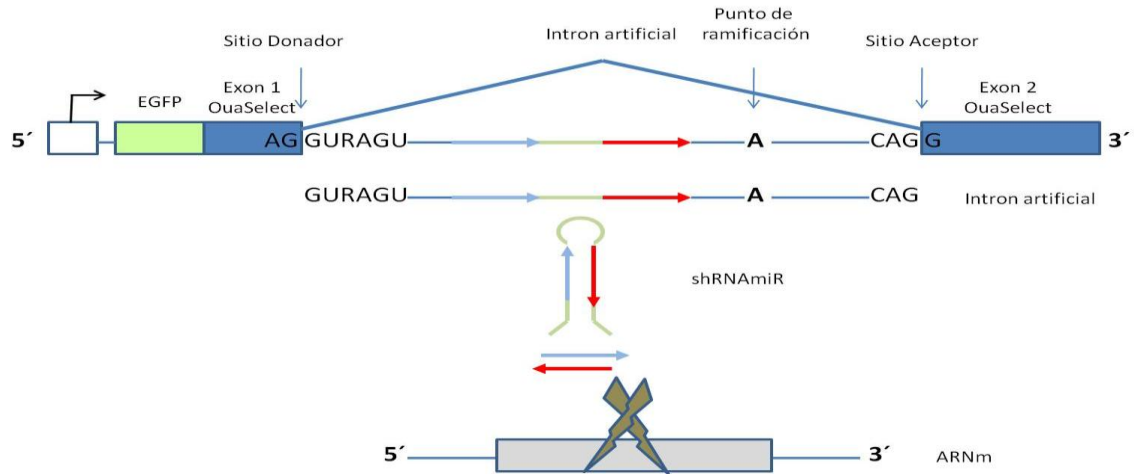


Figura 11. Representación esquemática del funcionamiento de un modelo de shRNAmir

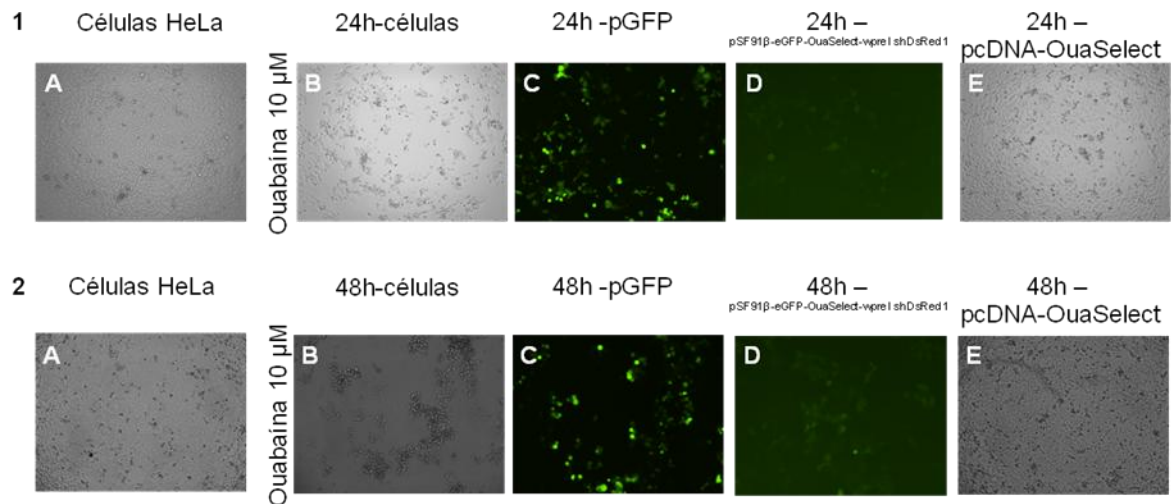


5.3 EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DEL MECANISMO DEL SPLICING Y EXPRESIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA A LA OUABAÍNA

La secuencia intrónica artificial fue insertada en el marco de lectura del OuaSelect, esta inserción permitió: (i) La verificación de la expresión en cultivo celular del *OuaSelect* modificado con el intrón artificial y (ii) la ocurrencia del splicing del intrón. Se documentó por la supervivencia de las células transfectadas con estos plásmidos al ser seleccionadas con 10 μ M de Ouabaína y fue documentada la viabilidad después de 24 y 48 horas de la selección. Este tratamiento induce muerte celular de células HeLa normales. Los plásmidos pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre I miDsRed 1 y pcDNA3-OuaSelect transfectados en las células confirieron resistencia a la Ouabaína. La expresión de la proteína de fusión GFP-OuaSelect se evidenció además por citometría de flujo y por microscopía de

fluorescencia. Poste las células transfectadas con los diferentes plásmidos fueron seleccionas con 10 μ M de Ouabaína (**Figura 12**).

Figura 12. Imágenes de microscopia de fluorescencia de células HeLa transfectadas y sin transfectar, 24 horas y 48 horas después del tratamiento con Ouabaína



(Panel 1) Células HeLa 24 horas después del tratamiento con Ouabaína 10 μ M, (a) células sin transfectar y sin tratamiento con Ouabaína, (b) células sin transfectar, (c) células transfectadas con pEGFP, (d) células transfectadas con pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre I miDsRed 1, (e) células transfectadas con pcDNA3-OuaSelect. (Panel 2) Células HeLa 48 horas después del tratamiento con Ouabaína 10 μ M, (a) células sin transfectar y sin tratamiento con Ouabaína, (b) células sin transfectar, (c) células transfectadas con pEGFP, (d) células transfectadas con pSF91 β -eGFP-OuaSelect-wpre I miDsRed 1, (e) células transfectadas con pcDNA3-OuaSelect. Las células HeLa transfectadas con pcDNA3-OuaSelect mostraron supervivencia después del tratamiento con la Ouabaína tanto a las 24 horas como a las 48 horas. Las células transfectadas con pEGFP no mostraron la misma

supervivencia. El OuaSelect permite la selección de una población pura de células transfectadas transitoriamente utilizando Ouabaína como agente de selección después de 48 horas. El OuaSelect ha sido probado en diferentes tipos de células, líneas celulares humanas: HeLa, HEK293, Jurkat T, CEM, K562, U2OS; líneas celulares mamíferas: Cos-7, LLC-PK, MDCK; células primarias: células T humanas. Sin embargo, a pesar de todo esto no ha sido usado ampliamente desde su descripción en el 2007 (Treschow, Unger *et al.* 2007), probablemente porque no existe una necesidad real de este marcador de selección y es tan solo una alternativa, además el OuaSelect comparado con otros marcadores no biológicos, presenta una baja expresión de la proteína GFP, debido a que es una proteína fusión (GFP con el gen de resistencia a la Ouabaína), lo que lo podría hacerla un poco menos llamativa en términos de expresión de fluorescencia comparado con otros marcadores que expresan GFP u otros marcadores fluorescentes. En la **figura 12**, literal c y d, es posible hacer la comparación entre la expresión de la proteína GFP en células HeLa transfectadas con un plásmido expresando el OuaSelect y un plásmido expresando la proteína GFP.

Esta observación permite afirmar que el mecanismo de splicing en los transcritos generados a partir de estas construcciones genéticas fue exitoso.

5.4 EVALUACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE MIARN

Luego de haber verificado el funcionamiento del splicing en los vectores arriba mencionados se procedió a evaluar el funcionamiento de los Intrones liberados y del efecto inhibitorio de los diferentes miARN y shRNAmir.

Para lo anterior se realizarón co-transfecciones utilizando vectores reporteros y los plásmidos que expresan los diferentes miARN, de la siguiente manera:

pcDNA3-OuaSelect I miGFP + pEGFP;

pcDNA3-OuaSelect I miRev 1 + pRev-GFP;

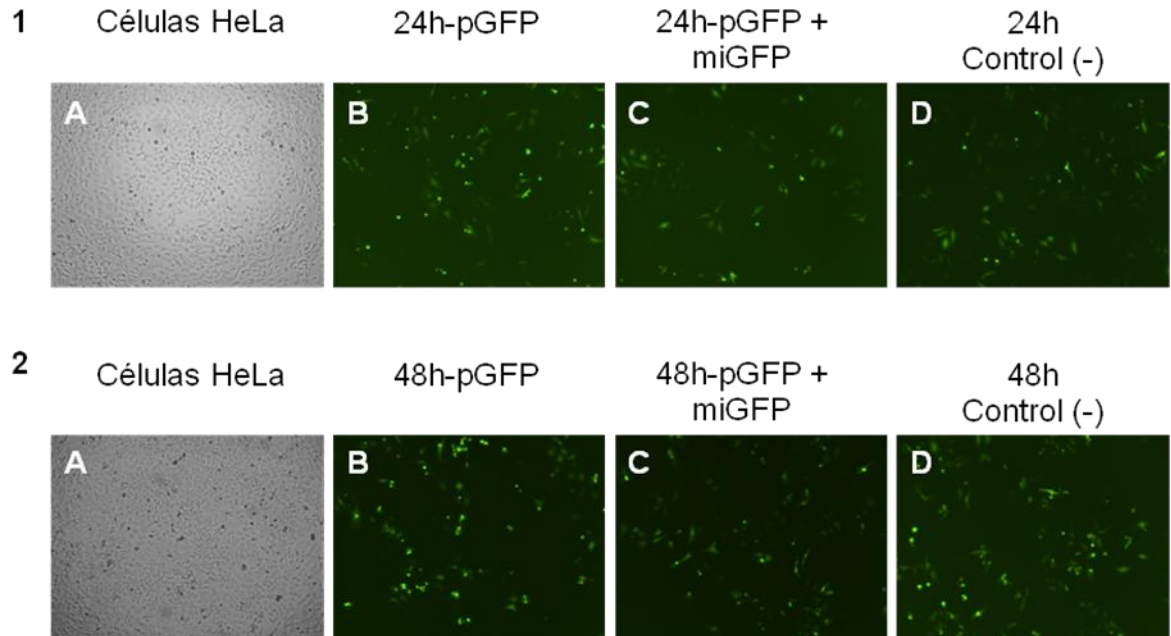
pcDNA3-OuaSelect I miRev 2 + pRev-GFP;

pcDNA3-OuaSelect I miDsRed 2 + pDsRed C1.

Inicialmente las co-transfecciones fueron evaluadas por microscopia fluorescente, 24 horas y 48 horas después de la transfección; Posteriormente fue cuantificada la inhibición causada por los miARN mediante citometría de flujo.

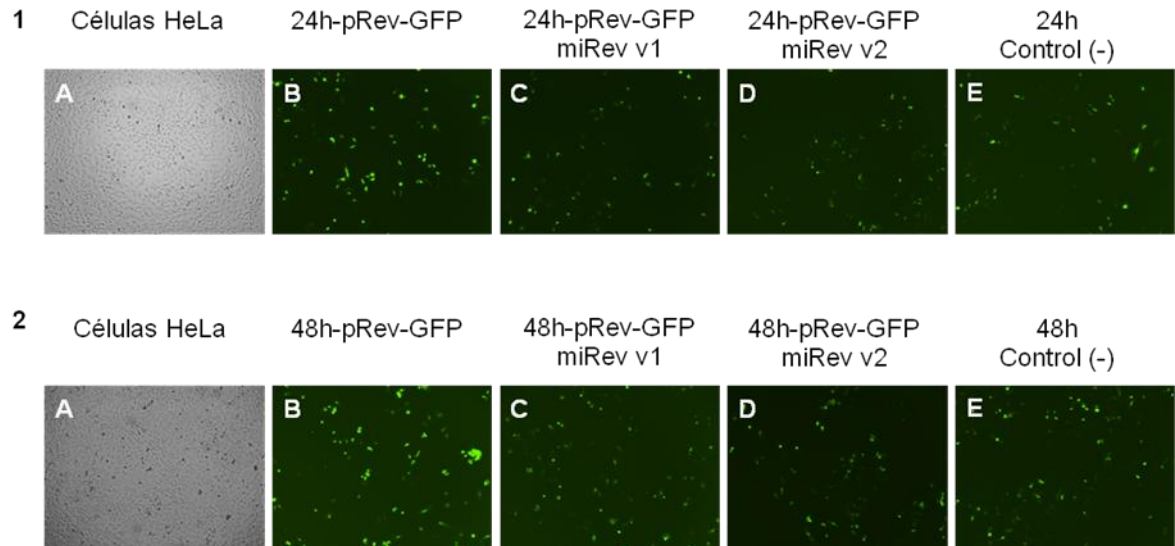
En la **figura 13** se puede observar: (Panel 1) células HeLa 24 horas después de la transfección, (a) células sin transfectar, (b) células transfectadas con pEGFP, (c) células transfectadas con pEGFP y pcDNA3-OuaSelect I miGFP, (d) células transfectadas con pEGFP y un miARN no relacionado. (Panel 2) Células HeLa 48 horas después de la transfección, (a) células sin transfectar, (b) células transfectadas con pEGFP, (c) células transfectadas con pEGFP y pcDNA3-OuaSelect I miGFP, (d) células transfectadas con pEGFP y un miARN no relacionado.

Figura 13. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa transfectadas con miARN dirigidos contra la proteína GFP, 24 horas y 48 horas después de la transfección



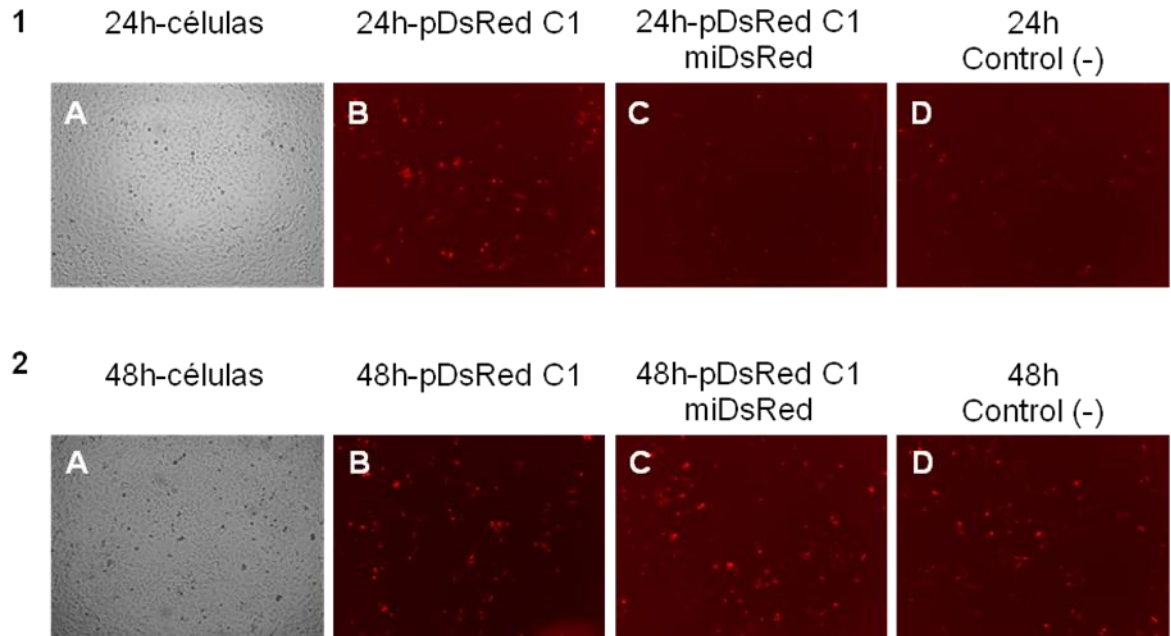
En la **figura 14** se puede observar: (Panel 1) Células HeLa 24 horas después de la transfección, (a) células sin transfectar, (b) células transfectadas con pRev-GFP, (c) células transfectadas con pRev-GFP y pcDNA3 OuaSelect I miRev versión 1, (d) células transfectadas con pRev-GFP y pcDNA3 OuaSelect I miRev versión 2, (e) células transfectadas con pRev-GFP y un miARN no relacionado. (Panel 2) Células HeLa 24 horas después de la transfección, (a) células sin transfectar, (b) células transfectadas con pRev-GFP, (c) células transfectadas con pRev-GFP y pcDNA3 OuaSelect I miRev versión 1, (d) células transfectadas con pRev-GFP y pcDNA3 OuaSelect I miRev versión 2, (e) células transfectadas con pRev-GFP y un miARN no relacionado.

Figura 14. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa transfectadas con miARN dirigidos contra la proteína Rev, 24 horas y 48 horas después de la transfección



En la **figura 15** se puede observar: (Panel 1) Células HeLa 24 horas después de la transfección, (a) células sin transfectar, (b) células transfectadas con pDsRed C1, (c) células transfectadas con pDsRed C1 y pcDNA3-OuaSelect I miDsRed 2, (d) células transfectadas con pDsRed C1 y un miARN no relacionado. (Panel 2) Células HeLa 24 horas después de la transfección, (a) células sin transfectar, (b) células transfectadas con pDsRed C1, (c) células transfectadas con pDsRed C1 y pcDNA3-OuaSelect I miDsRed 2, (d) células transfectadas con pDsRed C1 y un miARN no relacionado.

Figura 15. Imágenes de microscopia de fluorescencia de células HeLa transfectadas con miARN dirigidos contra la proteína DsRed, 24 horas y 48 horas después de la transfección



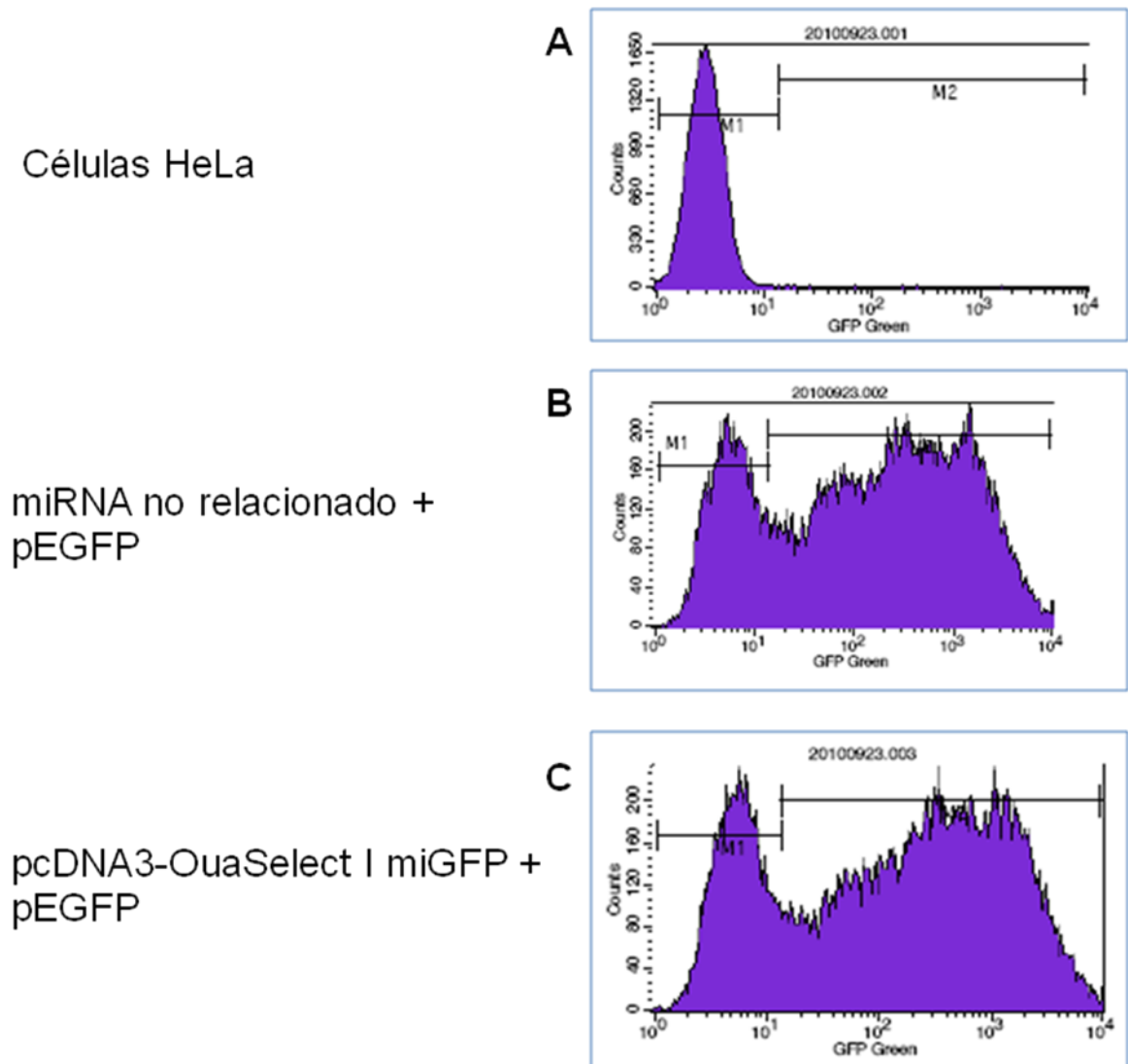
De acuerdo a las imágenes de microscopia de fluorescencia de células HeLa transfectadas con los miARN dirigidos contra las proteínas GFP, Rev y DsRed no se observó efecto inhibitorio.

Posteriormente, el efecto de silenciamiento de los miARN fue evaluado por medio de citometría de flujo.

Análisis de Citometría de la inhibición mediada por miGFP. (a) células HeLa, (b) control negativo, (c) células HeLa transfectadas con pEGFP y pcDNA3-OuaSelect I miGFP (**Figura 16**).

De acuerdo a los histogramas en el cultivo de células transfectadas con pcDNA3-OuaSelect I miGFP + pEGFP se observó un 75.94% de células GFP positivas y en el cultivo control 76.86%, por lo que podemos decir que este miARN no logro inhibir la expresión de la proteína GFP.

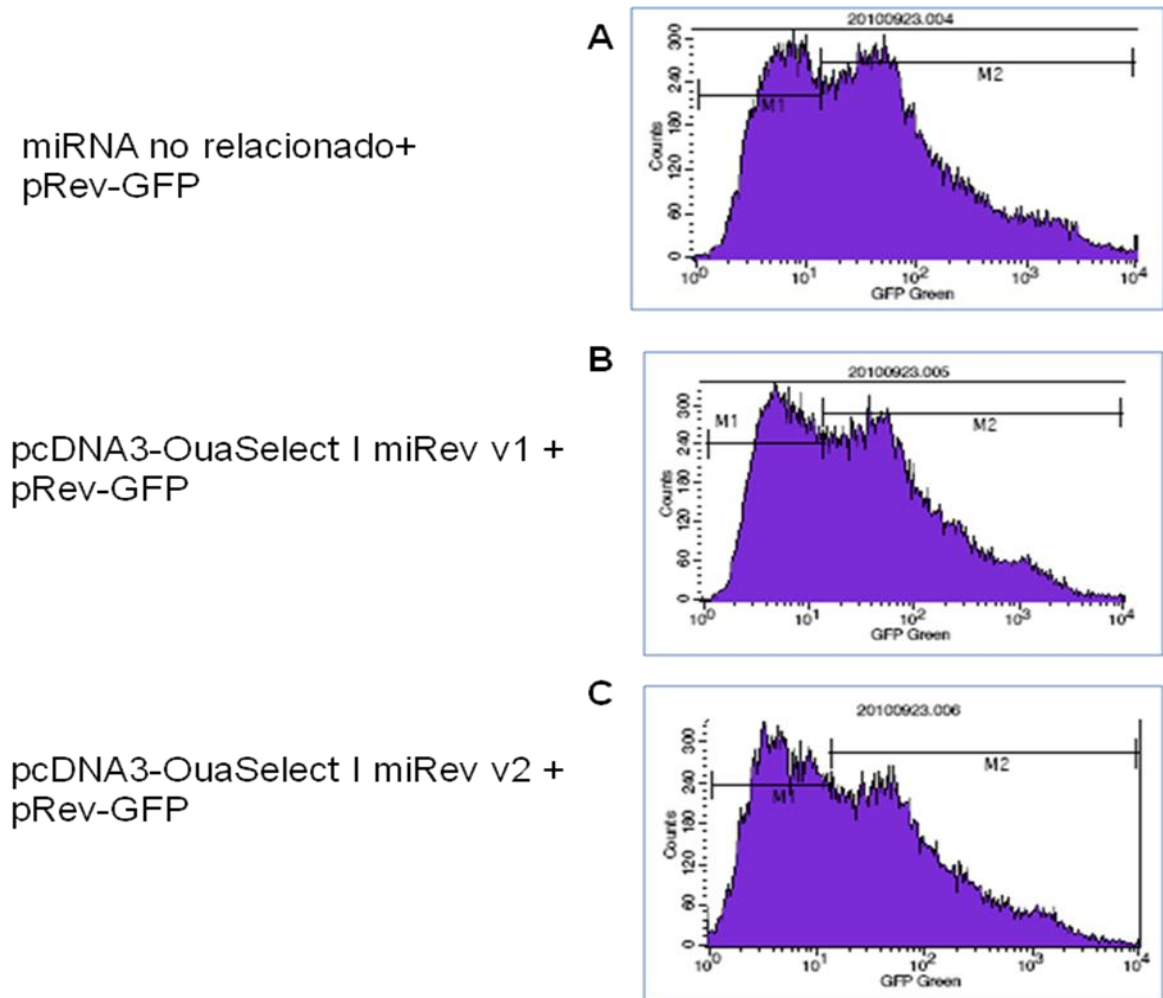
Figura 16. Evaluación por citometría de flujo de la expresión de un miARN dirigido contra la proteína GFP en células HeLa



Análisis de Citometría de la inhibición mediada por miRev. (a) control negativo, (b) células HeLa transfectadas con pcDNA3 OuaSelect I miRev versión 1 y pRev-GFP, (c) células HeLa transfectadas con pcDNA3 OuaSelect I miRev versión 2 y pRev-GFP (**Figura 17**).

De acuerdo a los histogramas en el cultivo de células transfectadas con pcDNA3 OuaSelect I miRev versión 1 +pRev-GFP se observó un 62.25% de células GFP positivas y en el cultivo de células transfectadas con pcDNA3 OuaSelect I miRev versión 2 +pRev-GFP se observó un 55.79% de células GFP positivas. En el cultivo control se observó un 65.50% de células GFP positivas, por lo que podemos decir que las dos versiones de miARN dirigidos contra la proteína Rev no lograron inhibir la expresión de la proteína GFP.

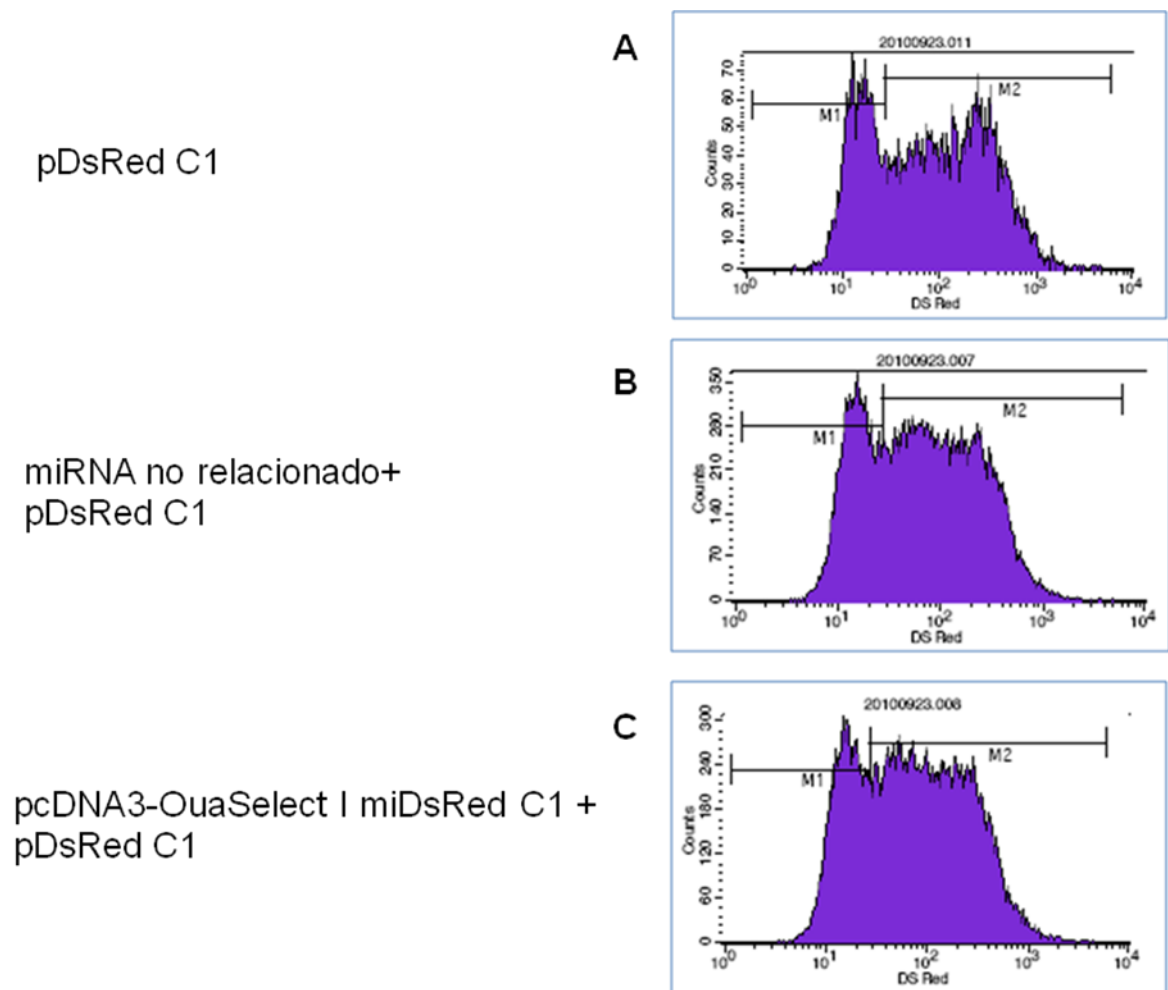
Figura 17. Evaluación por citometría de flujo de la expresión de un miARN dirigido contra la proteína Rev en células HeLa



Análisis de Citometría de la inhibición mediada por miGFP. (a) células HeLa transfectadas con pDsRed C1, (b) control negativo, (c) células HeLa transfectadas con pEGFP y pcDNA3-OuaSelect I miDsRed 2 (**Figura 18**).

De acuerdo a los histogramas en el cultivo de células transfectadas con pcDNA3-OuaSelect I miDsRed 2+ pDsRed C1 se observó un 74.23% de células DsRed positivas y en el cultivo control 71.43%, por lo que podemos decir que este miARN no logro inhibir la expresión de la proteína DsRed.

Figura 18. Evaluación por citometría de flujo de la expresión de un miARN dirigido contra la proteína DsRed en células HeLa

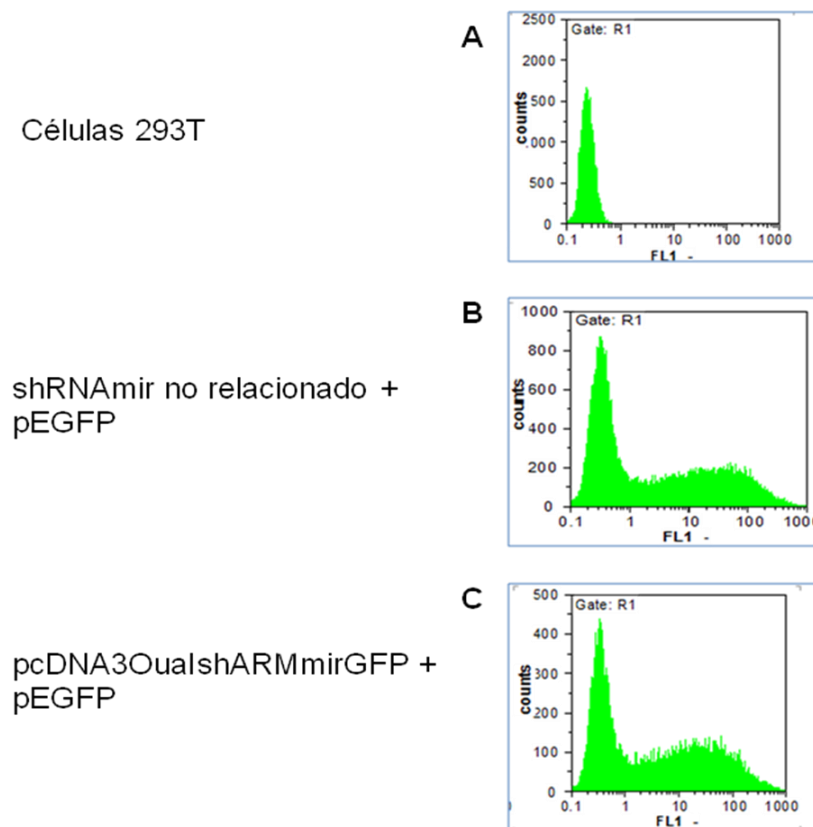


5.5 EVALUACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE shRNAmir

Análisis de Citometría de la inhibición mediada por shRNAmirGFP. (a) células 293T, (b) control negativo, (c) células 293T transfectadas con pEGFP y pcDNA3OualshRNAmirGFP (**Figura 19**).

De acuerdo a los histogramas en el cultivo de células transfectadas con pcDNA3 pcDNA3OualshRNAmirGFP + pEGFP se observó un 62.90% de células GFP positivas y en el cultivo control 59.39%, por lo que podemos decir que este miARN no logra inhibir la expresión de la proteína GFP.

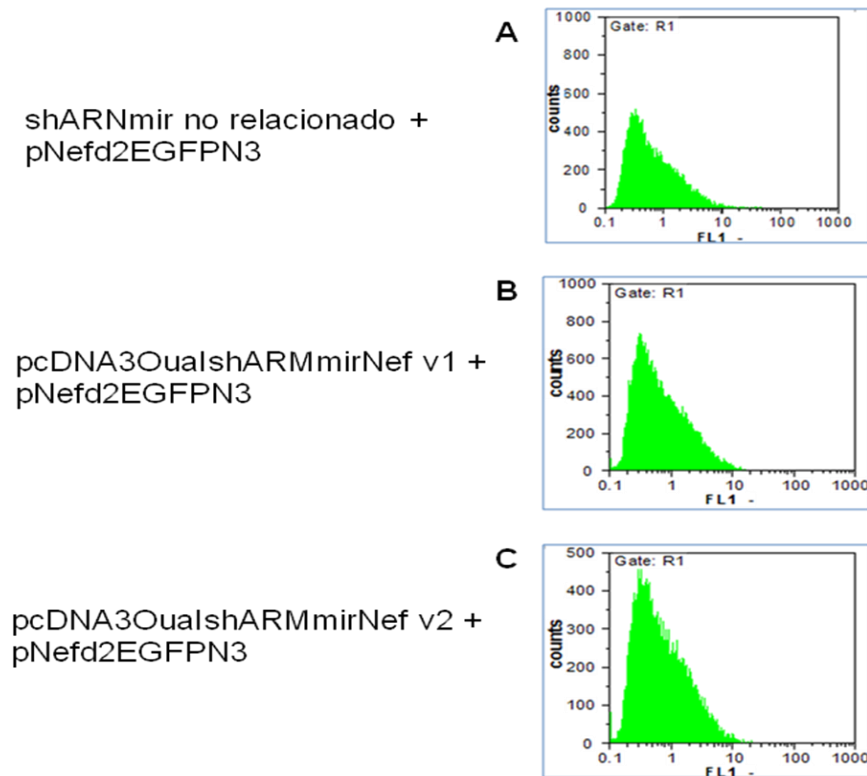
Figura 19. Evaluación por citometría de flujo de la expresión de un shRNAmir dirigido contra la proteína GFP en células 293T



Análisis de Citometría de la inhibición mediada por shRNAmirNef. (a) control negativo, (b) células 293T transfectadas con pcDNA3OualshRNAmiriNef versión 1 y pNefd2EGFPN3, (c) células 293T transfectadas con pcDNA3OualshRNAmiriNef versión 2 y pNefd2EGFPN3 (**Figura 20**).

De acuerdo a los histogramas en el cultivo de células transfectadas con pcDNA3OualshRNAmiriNef versión 1 y pNefd2EGFPN3 se observó un 50.09% de células GFP positivas y en el cultivo de células transfectadas con pcDNA3OualshRNAmiriNef versión 2 y pNefd2EGFPN3 se observó un 52.31 % de células GFP positivas. En el cultivo control se observó un 48.96% de células GFP positivas, por lo que podemos decir que las dos versiones de shRNAmir dirigidos contra la proteína Nef no lograron inhibir la expresión de la proteína GFP.

Figura 20. Evaluación por citometría de flujo de la expresión de un shRNAmir dirigido contra la proteína Nef en células 293T



Diferentes estrategias de inserción de miARN en vectores de expresión para ARN de interferencia en células mamíferas han sido reportadas. Una estrategia consiste en insertar un miARN entre el promotor del CMV y la EGFP (Wu, Bonsra *et al.* 2009); en este modelo los Pri-miARN son procesados en el núcleo por Drosha y posteriormente son exportados al citoplasma, donde son procesados como los siARN. Sin embargo, en esta estrategia, el proceso simultáneo bloquea la traducción del marcador EGFP, porque el fragmento resultante de ARNm pierde la estructura de CAP del extremo 5' y es rápidamente degradado. La EGFP puede ser traducida solo si los pri-miARN son exportados al citoplasma antes del clivaje de Drosha, pero los siARN no son producidos desde estos pri-miARN sin procesar (Du, Yonekubo *et al.* 2006). miARN también han sido insertados corriente arriba y corriente abajo del casete del gen reportero DsRed, obteniendo una expresión mucho más elevada del DsRed cuando el miARN estuvo ubicado corriente arriba del DsRed (Hu, Chen *et al.* 2010).

Así mismo diferentes estrategias que involucran Intrones han sido desarrolladas. . En sistemas de mamíferos, se ha demostrado que pre-miARN intrónicos en forma de horquilla son escindidos antes del splicing. Este preciso orden de procesamiento es esencial para los modelos de ARNi basados en Intrones. Adicionalmente, la inserción artificial de pre-miARN en intrones no obstaculiza la producción de ARNm y los intrones que albergan miARN son escindidos más lentamente que los intrones adyacentes (Kataoka, Fujita *et al.* 2009). Teniendo en cuenta esto han sido desarrollados diferentes modelos que involucran intrones, miARN que han sido insertados dentro de un intrón o en un exón y en la EGFP, siendo posible la co-expresión del miARN y la EGFP (Wu, Bonsra *et al.* 2009). En este diseño se simula la estructura y procesamiento natural de los miARN ubicados en secuencias intrónicas de transcritos codificantes para proteínas. La separación por splicing del miARN podría facilitar el procesamiento por Drosha de los miARN en vez de la exportación citoplasmática. Este diseño favorece la exportación citoplasmática y la traducción del ARN de la EGFP en vez de la

degradación. Otros marcadores de selección también han sido usados combinados con Intrones artificiales; existe un modelo en el cual un intrón artificial es insertado interrumpiendo el gen de la rGFP (Lin, Chang *et al.* 2003).

Adicionalmente, actualmente se conoce que los miARN intrónicos son una nueva clase de micARN derivados del procesamiento de los intrones en genes que codifican para proteínas, los cuales difieren únicamente de los miARN intergénicos previamente descritos en sus requerimientos de la ARN polimerasa II y los componentes del empalmosoma para su biogénesis (Ying and Lin 2005) (Lin and Ying 2006). Una nueva tecnología ha sido desarrollada a partir de los miARN intrónicos, la cual permite la liberación de miARN y shARN dentro de una célula induciendo silenciamiento genético. También se ha demostrado que es posible la liberación de intrones derivados de un miARN (SpRNAi-rGFP) con la capacidad de inducir un ARN de interferencia no solo en células humanas y de ratón, sino también en *zebrafish*, embriones de pollo, y ratones adultos tanto *in vivo* como *in vitro* (Lin, Chang *et al.* 2003; Lin, Chang *et al.* 2005; Lin and Ying 2006).

En *Drosophila*, también, han sido descritos vectores de expresión de siARN que aprovecha la expresión mediada por intrones de muchos miARN naturales. (Haley, Foys *et al.*) Estos vectores permiten la expresión de miARN artificiales desde un intrón modificado del gen *ftz* de la *Drosophila* fusionado a un gen reportero fluorescente que permite marcar con exactitud solo las células que estas produciendo un ARNi activo. Este sistema de expresión utiliza un pequeño intrón del gen de segmentación *dtz* en *Drosophila*. Este intrón aumenta la expresión del gen reportero ≥ 50 veces comparado con reporteros sin intrones en un sistema de cultivo de células de *Drosophila*. Más aún la expresión se ve aumentada por la inserción de uno o más miARN artificiales dentro del intrón del *ftz*. (Haley, Foys *et al.*). Existe también evidencia de que la posición del shARN dentro del intrón es crítica para que ocurra el splicing y sea alcanzados altos niveles de expresión de transgenes y una generación efectiva de siARN con una mínima inducción de la vía del Interferon (Samakoglu, Lisowski *et al.* 2006).

Nuestra estrategia consistió en insertar secuencias de miARN o siARN en una secuencia intrónica artificial, la cual fue sintetizada en el ORF de un marcador de selección biológica, el Ouaselect. Esta estrategia, busca permitir la liberación de miARN y siARN por el mecanismo del splicing, y permitir la selección de células transfectadas usando la Ouabaína como marcador de selección.

El VIH-1 fue el primer agente infeccioso contra el que usó ARNi, tal vez porque el ciclo de vida y el patrón de expresión de genes son bien conocidos. En la actualidad, han sido diseñados siARN sintéticos y shARN expresados contra la mayoría de los ARN codificados por el virus, incluyendo *tat*, *rev*, *gag*, *pol*, *nef*, *vif*, *env*, *vpr* y el *LTR*, los cuales son susceptibles a la regulación negativa por ARNi en líneas celulares (Rossi, June *et al.* 2007). Una respuesta específica contra el VIH-1 puede ser inducida por la transfección de sintéticos siARN o por la expresión de transgenes intracelulares de shARN o miARN. La expresión de shARN y miARN resulta en la degradación del ARNm blanco (por el apareamiento perfecto de bases) o en la represión de la traducción (por el apareamiento parcial de bases) (Liu, Gruber *et al.* 2009). En este trabajo se ha probado un diseño con unas secuencias dirigidas contra *rev*, previamente reportadas (Arteaga, Hinkula *et al.* 2003), del mismo modo pero con el propósito de corroborar el diseño usamos dos blancos adicionales contra marcadores de selección EGFP y DsRed. Sin embargo, de acuerdo al resultado de los ensayos de citometría de flujo luego de las transfecciones realizadas usando los constructos diseñados, no se obtuvieron datos que nos permitan hablar de inhibición de los blancos elegidos. El miARN contra GFP, fue el mismo previamente usado y probado en células madre de ratón (Lin, Chang *et al.* 2003), y en otros organismos. Es probable que el sistema solo funcione bajo condiciones especiales que ellos pueden estar dando en sus experimentos; Sin embargo, nosotros proponemos como causa posible de la falla de nuestra estrategia, que el miARN usado contra GFP es demasiado pequeño y no podría ser reconocido en el núcleo por el complejo microprocesador formado por DGCR8 y Drosha, impidiendo por supuesto todo el procesamiento posterior y siendo probablemente degradado como normalmente ocurre con el lariat luego del

proceso del splicing. Otra causa probable de la falla de este miARN es que si consideramos la vía no canónica de generación de miARN como mirtrones, nuestra secuencia intrónica sería demasiado grande, lo que impediría que este miARN fuese procesado por esta vía. En el caso probable del shRNAmir dirigido contra la GFP es probable que se tengan problemas con la liberación y exportación del miARN desde el núcleo al citoplasma lo que impide su procesamiento y por ende el efecto de inhibición. Con respecto al miARN dirigido contra rev y nef, es probable que al ser usados inicialmente como siARN, en un modelo de liberación tradicional con el plásmido pSuper, no hayan sido correctamente procesado por la vía del miARN y probablemente haya sido degradado en el lariat, o que también debido a su tamaño no haya sido reconocido por la proteína Drosha antes del proceso del splicing. Con respecto al miDsRed, las circunstancias son un poco más claras, ya que si bien la secuencia usada como guía había sido probada previamente, realizando un análisis con herramientas de bioinformática se encontró que era carecía de los extremos colgantes en el 3', por lo cual a pesar de que la maquinaria de splicing y procesamiento de miARN en el núcleo hubiera funcionado correctamente no sería posible procesarlo porque no sería reconocido por RISC. Sin embargo a pesar de nuestros resultados y de acuerdo a hallazgos de otros autores consideramos que los miARN son mejores sustratos para la maquinaria del ARNi que los shARN (Silva, Li *et al.* 2005) y que las secuencias diseñadas como miARN son más eficientes en la represión de la activación traduccional porque estos son procesados por la vía natural de los miARN, mientras que los shARN saltan el paso del procesamiento del clivaje por Drosha. Finalmente, nuestra estrategia de liberación de Intrones a partir del marco de lectura de una proteína usada como marcador de selección demostró un buen funcionamiento al permitir la expresión del marcador de selección y por supuesto la selección de las células transfectadas con los plásmidos que contenían nuestro constructo con el fármaco Ouabaína, creemos que a pesar de los resultados es posible seguir diseñando estrategias

que involucren Intrones artificiales considerando las secuencias y características consenso de los Intrones naturales empalmosomales.

6. CONCLUSIONES

Diferentes métodos, técnicas y procedimientos fueron implementados para desarrollar un modelo de liberación de miARN y shRNAmir contra blancos en el genoma del VIH-1 a partir de un intron artificial insertado en un marcador de selección biológico (OuaSelect) generado durante el Splicing. En resumen de acuerdo a los resultados podemos concluir que:

1. Sería factible desarrollar nuevos modelos de liberación de siARN o miARN que involucren un intrón artificial como paso intermedio en su liberación.
2. La estrategia de inserción de secuencias intrónicas en el marco de lectura abierto del gen *OuaSelect* es una alternativa como mecanismo probable de liberación de secuencias de ARNs y la utilización de las ventajas de este marcador de selección.
3. Las secuencias usadas en nuestro proyecto, dirigidas contra el VIH-1 no funcionaron en nuestro modelo *in vitro*, aunque funcionan en modelos previamente publicados). Sin embargo, es posible que nuevos constructos, y diseños mejorados sean necesarios para lograr una inhibición del ARNm de la proteína Rev o de otras proteínas del VIH-1 utilizando nuestro modelo y estrategia de liberación.

7. RECOMENDACIONES

Se debe continuar experimentando con otros diseños de miARN ya que se podría una vez se cuente con las secuencias de ARNi funcionando podría ser desarrollar y evaluar el vector en células madre hematopoyéticas para posibles aplicaciones en un modelo de trasplante de células de células madre hematopoyéticas modificadas con estos vectores.

El mecanismo de ARN de interferencia debe continuar siendo explorado hasta lograr usar todas sus potencialidades y ventajas como una posible alternativa terapéutica para el tratamiento de la infección por el VIH.

8. BIBLIOGRAFÍA

Aints, A., R. Belusa, et al. (2002). "Enhanced ouabain resistance gene as a eukaryotic selection marker." Hum Gene Ther **13**(8): 969-77.

Alvarez, L. (2009). Design of siRNA sequences and in vitro evaluation against strategic targets of nef gene of human immunodeficiency virus type 1. Facultad de Salud. Bucaramanga, Universidad Industrial de Santander: 105.

Arteaga, H. J., J. Hinkula, et al. (2003). "Choosing CCR5 or Rev siRNA in HIV-1." Nat Biotechnol **21**(3): 230-1.

Babiarz, J. E., J. G. Ruby, et al. (2008). "Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs." Genes Dev **22**(20): 2773-85.

Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell **136**(2): 215-33.

Baskerville, S. and D. P. Bartel (2005). "Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes." Rna **11**(3): 241-7.

Berezikov, E., W. J. Chung, et al. (2007). "Mammalian mirtron genes." Mol Cell **28**(2): 328-36.

Berezikov, E., G. van Tetering, et al. (2006). "Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis." Genome Res **16**(10): 1289-98.

Bernstein, E., A. A. Caudy, et al. (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." Nature **409**(6818): 363-6.

Bogerd, H. P., H. W. Karnowski, et al. (2010). "A mammalian herpesvirus uses noncanonical expression and processing mechanisms to generate viral MicroRNAs." Mol Cell **37**(1): 135-42.

Bohnsack, M. T., K. Czaplinski, et al. (2004). "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs." Rna **10**(2): 185-91.

Borchert, G. M., W. Lanier, et al. (2006). "RNA polymerase III transcribes human microRNAs." Nat Struct Mol Biol **13**(12): 1097-101.

Calin, G. A., C. Sevignani, et al. (2004). "Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 2999-3004.

Cannone, J. J., S. Subramanian, et al. (2002). "The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs." BMC Bioinformatics **3**: 2.

Carthew, R. W. and E. J. Sontheimer (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." Cell **136**(4): 642-55.

Chang, K., S. J. Elledge, et al. (2006). "Lessons from Nature: microRNA-based shRNA libraries." Nat Methods **3**(9): 707-14.

Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, et al. (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." Nature **436**(7051): 740-4.

Chiara, M. D., L. Palandjian, et al. (1997). "Evidence that U5 snRNP recognizes the 3' splice site for catalytic step II in mammals." Embo J **16**(15): 4746-59.

Cifuentes, D., H. Xue, et al. (2010). "A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity." Science **328**(5986): 1694-8.

Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, et al. (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." Nature **312**(5996): 763-7.

Das, A. T., T. R. Brummelkamp, et al. (2004). "Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition." J Virol **78**(5): 2601-5.

Davis, M. W. (2003-2008). ApE-A plasmid Editor v1.17.

Denli, A. M., B. B. Tops, et al. (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." Nature **432**(7014): 231-5.

Diederichs, S. and D. A. Haber (2007). "Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression." Cell **131**(6): 1097-108.

Du, G., J. Yonekubo, et al. (2006). "Design of expression vectors for RNA interference based on miRNAs and RNA splicing." Febs J **273**(23): 5421-7.

Du, Z., J. K. Lee, et al. (2008). "Structural and biochemical insights into the dicing mechanism of mouse Dicer: a conserved lysine is critical for dsRNA cleavage." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(7): 2391-6.

Ender, C., A. Krek, et al. (2008). "A human snoRNA with microRNA-like functions." Mol Cell **32**(4): 519-28.

Fewell, G. D. and K. Schmitt (2006). "Vector-based RNAi approaches for stable, inducible and genome-wide screens." Drug Discov Today **11**(21-22): 975-82.

Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya, et al. (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" Nat Rev Genet **9**(2): 102-14.

Frankel, A. D. and J. A. Young (1998). "HIV-1: fifteen proteins and an RNA." Annu Rev Biochem **67**: 1-25.

Ghildiyal, M. and P. D. Zamore (2009). "Small silencing RNAs: an expanding universe." Nat Rev Genet **10**(2): 94-108.

Gregory, R. I., K. P. Yan, et al. (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." Nature **432**(7014): 235-40.

Haase, A. D., L. Jaskiewicz, et al. (2005). "TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing." EMBO Rep **6**(10): 961-7.

Haley, B., B. Foys, et al. "Vectors and parameters that enhance the efficacy of RNAi-mediated gene disruption in transgenic *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(25): 11435-40.

Han, J., Y. Lee, et al. (2004). "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing." Genes Dev **18**(24): 3016-27.

Han, J., Y. Lee, et al. (2006). "Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex." Cell **125**(5): 887-901.

Hohjoh, H. (2002). "RNA interference (RNA(i)) induction with various types of synthetic oligonucleotide duplexes in cultured human cells." FEBS Lett **521**(1-3): 195-9.

Hsu, P. W., H. D. Huang, et al. (2006). "miRNAMap: genomic maps of microRNA genes and their target genes in mammalian genomes." Nucleic Acids Res **34**(Database issue): D135-9.

Hu, T., P. Chen, et al. (2010). "Comparative Studies of Various Artificial microRNA Expression Vectors for RNAi in Mammalian Cells." Mol Biotechnol.

Hutvagner, G., J. McLachlan, et al. (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." Science **293**(5531): 834-8.

Interscience, W. (2011). The Journal of Gene Medicine Clinical Trial site.

Inui, M., G. Martello, et al. (2010). "MicroRNA control of signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(4): 252-63.

Jacque, J. M., K. Triques, et al. (2002). "Modulation of HIV-1 replication by RNA interference." Nature **418**(6896): 435-8.

Jinek, M. and J. A. Doudna (2009). "A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference." Nature **457**(7228): 405-12.

Kataoka, N., M. Fujita, et al. (2009). "Functional association of the Microprocessor complex with the spliceosome." Mol Cell Biol **29**(12): 3243-54.

Khvorova, A., A. Reynolds, et al. (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." Cell **115**(2): 209-16.

Kim, V. N., J. Han, et al. (2009). "Biogenesis of small RNAs in animals." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(2): 126-39.

Kim, V. N. and J. W. Nam (2006). "Genomics of microRNA." Trends Genet **22**(3): 165-73.

Kim, Y. K. and V. N. Kim (2007). "Processing of intronic microRNAs." Embo J **26**(3): 775-83.

Kohler, A. and E. Hurt (2007). "Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 761-73.

Kok, K. H., M. H. Ng, et al. (2007). "Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA." J Biol Chem **282**(24): 17649-57.

Kowalski, M., J. Potz, et al. (1987). "Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1." Science **237**(4820): 1351-5.

Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones (2011). "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D152-7.

Krichevsky, A. M. and K. S. Kosik (2002). "RNAi functions in cultured mammalian neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11926-9.

Kwong, P. D., R. Wyatt, et al. (1998). "Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody." Nature **393**(6686): 648-59.

Lambeth, L. S., N. J. Van Hateren, et al. (2010). "A direct comparison of strategies for combinatorial RNA interference." BMC Mol Biol **11**: 77.

Lander, E. S., L. M. Linton, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.

Landthaler, M., A. Yalcin, et al. (2004). "The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis." Curr Biol **14**(23): 2162-7.

Lee, Y., C. Ahn, et al. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-9.

Lee, Y., I. Hur, et al. (2006). "The role of PACT in the RNA silencing pathway." Embo J **25**(3): 522-32.

Lee, Y., K. Jeon, et al. (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." Embo J **21**(17): 4663-70.

Lee, Y., M. Kim, et al. (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." Embo J **23**(20): 4051-60.

Lewis, B. P., C. B. Burge, et al. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell **120**(1): 15-20.

Lin, S. L., D. Chang, et al. (2003). "A novel RNA splicing-mediated gene silencing mechanism potential for genome evolution." Biochem Biophys Res Commun **310**(3): 754-60.

Lin, S. L., D. Chang, et al. (2005). "Asymmetry of intronic pre-miRNA structures in functional RISC assembly." Gene **356**: 32-8.

Lin, S. L. and S. Y. Ying (2006). Gene silencing in vitro and in vivo using intronic microRNAs. Methods Mol Biol. **342**: 295-312.

Liu, J., M. A. Carmell, et al. (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." Science **305**(5689): 1437-41.

Liu, J., F. V. Rivas, et al. (2005). "A role for the P-body component GW182 in microRNA function." Nat Cell Biol **7**(12): 1261-6.

Liu, Y. P., J. Gruber, et al. (2009). "RNAi-mediated inhibition of HIV-1 by targeting partially complementary viral sequences." Nucleic Acids Res **37**(18): 6194-204.

Liu, Y. P., J. Haasnoot, et al. (2008). "Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron." Nucleic Acids Res **36**(9): 2811-24.

Lund, E. and J. E. Dahlberg (2006). "Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **71**: 59-66.

Lund, E., S. Guttinger, et al. (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." Science **303**(5654): 95-8.

Ma, J. B., K. Ye, et al. (2004). "Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain." Nature **429**(6989): 318-22.

Macrae, I. J., K. Zhou, et al. (2006). "Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer." Science **311**(5758): 195-8.

Mayer, M., S. Schiffer, et al. (2000). "tRNA 3' processing in plants: nuclear and mitochondrial activities differ." Biochemistry **39**(8): 2096-105.

Meister, G., M. Landthaler, et al. (2004). "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs." Mol Cell **15**(2): 185-97.

Miyoshi, K., T. Miyoshi, et al. (2010). "Molecular mechanisms that funnel RNA precursors into endogenous small-interfering RNA and microRNA biogenesis pathways in Drosophila." Rna **16**(3): 506-15.

Miyoshi, K., T. Miyoshi, et al. (2010). "Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production." Mol Genet Genomics **284**(2): 95-103.

Mueller, G. A., M. T. Miller, et al. (2010). "Solution structure of the Drosha double-stranded RNA-binding domain." Silence **1**(1): 2.

Okamura, K., J. W. Hagen, et al. (2007). "The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila." Cell **130**(1): 89-100.

Oubridge, C., N. Ito, et al. (1994). "Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin." Nature **372**(6505): 432-8.

Pabon-Martinez, Y. V. (2011). "MicroARNs: una vision molecular." Revista SaludUIS **43** (3): 289-297.

Patel, A. A. and J. A. Steitz (2003). "Splicing double: insights from the second spliceosome." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(12): 960-70.

Perron, M. P. and P. Provost (2009). "Protein components of the microRNA pathway and human diseases." Methods Mol Biol **487**: 369-85.

Pomeranz Krummel, D. A., C. Oubridge, et al. (2009). "Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution." Nature **458**(7237): 475-80.

Rajewsky, N. (2006). "microRNA target predictions in animals." Nat Genet **38** **Suppl**: S8-13.

Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, et al. (2004). "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units." Genome Res **14**(10A): 1902-10.

Rossi, J. J., C. H. June, et al. (2007). "Genetic therapies against HIV." Nat Biotechnol **25**(12): 1444-54.

Ruby, J. G., C. H. Jan, et al. (2007). "Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing." Nature **448**(7149): 83-6.

Samakoglu, S., L. Lisowski, et al. (2006). "A genetic strategy to treat sickle cell anemia by coregulating globin transgene expression and RNA interference." Nat Biotechnol **24**(1): 89-94.

Saraiya, A. A. and C. C. Wang (2008). "snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*." PLoS Pathog **4**(11): e1000224.

Sharma, S., L. A. Kohlstaedt, et al. (2008). "Polypyrimidine tract binding protein controls the transition from exon definition to an intron defined spliceosome." Nat Struct Mol Biol **15**(2): 183-91.

Shiohama, A., T. Sasaki, et al. (2003). "Molecular cloning and expression analysis of a novel gene DGCR8 located in the DiGeorge syndrome chromosomal region." Biochem Biophys Res Commun **304**(1): 184-90.

Silva, J. M., M. Z. Li, et al. (2005). "Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes." Nat Genet **37**(11): 1281-8.

Sohn, S. Y., W. J. Bae, et al. (2007). "Crystal structure of human DGCR8 core." Nat Struct Mol Biol **14**(9): 847-53.

Song, J. J. and L. Joshua-Tor (2006). "Argonaute and RNA--getting into the groove." Curr Opin Struct Biol **16**(1): 5-11.

Stegmeier, F., G. Hu, et al. (2005). "A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(37): 13212-7.

Tolia, N. H. and L. Joshua-Tor (2007). "Slicer and the argonautes." Nat Chem Biol **3**(1): 36-43.

Treschow, A., Dilber S and Aints. (2010). Cells having cardiac glucoside resistance. Huddinge (SE), Avaris AB.

Treschow, A., C. Unger, et al. (2007). "OuaSelect, a novel ouabain-resistant human marker gene that allows efficient cell selection within 48 h." Gene Ther **14**(22): 1564-72.

UNAIDS (2010). Chapter 2: Epidemic update. 2010 GLOBAL REPORT: 16-61.

- Wang, Y., S. Juranek, et al. (2008). "Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex." Nature **456**(7224): 921-6.
- Watts, J. M., K. K. Dang, et al. (2009). "Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome." Nature **460**(7256): 711-6.
- Will, C. L. and R. Luhrmann (2005). "Splicing of a rare class of introns by the U12-dependent spliceosome." Biol Chem **386**(8): 713-24.
- Wilson, D. I., J. Burn, et al. (1993). "DiGeorge syndrome: part of CATCH 22." J Med Genet **30**(10): 852-6.
- Wu, J., A. N. Bonsra, et al. (2009). "pSM155 and pSM30 vectors for miRNA and shRNA expression." Methods Mol Biol **487**: 205-19.
- Yi, R., Y. Qin, et al. (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Genes Dev **17**(24): 3011-6.
- Ying, S. Y. and S. L. Lin (2005). "Intronic microRNAs." Biochem Biophys Res Commun **326**(3): 515-20.
- Zeng, Y. and B. R. Cullen (2004). "Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5." Nucleic Acids Res **32**(16): 4776-85.
- Zeng, Y., E. J. Wagner, et al. (2002). "Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells." Mol Cell **9**(6): 1327-33.
- Zuker, M. (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction." Nucleic Acids Res **31**(13): 3406-15.