

RNA interferente: del descubrimiento a sus aplicaciones

MARIANO ESTEBAN RODRÍGUEZ *

Profesor de Investigación del CSIC, Centro Nacional de Biotecnología y Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

El día 2 de octubre de 2006, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska de Suecia anunciaba la concesión del Premio Nobel de Fisiología y Medicina, de forma conjunta, a los investigadores estadounidenses Profesores Andrew Z. Fire, de la Universidad de Stanford en California, y Craig C. Mello, de la Escuela de Medicina en la Universidad de Massachussets, por el descubrimiento del RNA de doble banda o bicatenario (dsRNA) que actúa como supresor específico de genes y que recibe el nombre de RNA interferente (RNAi) (Figura 1). El mecanismo de RNAi se pone en funcionamiento cuando se producen en la célula moléculas de dsRNA que activan la maquinaria bioquímica que degrada aquellas moléculas de RNA mensajero (mRNA) que llevan la misma información genética que el dsRNA. Cuando estas moléculas de mRNA desaparecen, el gen correspondiente es silenciado y la proteína no se produce. La Academia sueca resalta que este nuevo mecanismo de regulación genética y la enzimología del mismo juegan un papel fundamental en muchos de los procesos celulares, desde la función fisiológica de células y tejidos hasta el desarrollo de un organismo. Además el RNAi está presente en plantas, animales y humanos, protege contra las infecciones virales, y asegura la estabilidad genómica mediante el silenciamiento de los elementos móviles o transposones. Actualmente el RNAi de doble banda está siendo utilizado como herramienta para

* Email: mesteban@cnb.uam.es; Teléfono: 91 585 45 53. Fax: 91 585 45 06; www.cnb.uam.es

definir la función de cualquier gen celular, teniendo un gran impacto en la investigación biomédica, con posibilidades de aplicación clínica en un futuro.

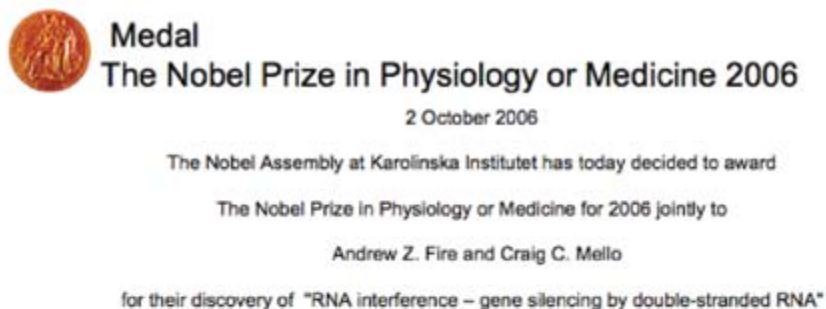


FIGURA 1. Los descubridores del RNAi, Craig C. Mello (a la izquierda) y Andrew Z. Fire (derecha).

Los investigadores americanos publicaron el descubrimiento del RNAi en la revista *Nature* en 1998 (1) (Figura 2), y en un tiempo récord este hallazgo ha trascendido a todos los campos de las ciencias de la salud. En palabras de Mello, al anunciarle la concesión del Nobel: «aunque hay muchas aplicaciones para el RNAi, aún desconocemos sus mecanismos...; el observar que el silenciamiento fuera transmitido de una generación a otra y se extendiera de un tejido a otro fueron momentos maravillosos...; un aspecto apasionante es su papel en los cambios evolutivos». Para Fire: «el beneficio más importante es que se harán muchos experimentos que nos dirán cosas importantes...; hay en marcha varios estudios estupendos de ensayos

en modelos animales y clínicos...; aunque es una investigación básica tiene la ventana abierta a su aplicación terapéutica». Es de resaltar que han transcurrido sólo ocho años desde el descubrimiento del RNAi a la concesión del Nobel a dos jóvenes investigadores en la plenitud de sus carreras científicas.

Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*

Andrew Fire^{*}, SiQun Xu^{*}, Mary K. Montgomery^{*}, Steven A. Kostas^{††}, Samuel E. Driver[‡] & Craig C. Mello[‡]

^{*} *Carnegie Institution of Washington, Department of Embryology, 115 West University Parkway, Baltimore, Maryland 21210, USA*

[†] *Biology Graduate Program, Johns Hopkins University, 3400 North Charles Street, Baltimore, Maryland 21218, USA*

[‡] *Program in Molecular Medicine, Department of Cell Biology, University of Massachusetts Cancer Center, Two Biotech Suite 213, 373 Plantation Street, Worcester, Massachusetts 01605, USA*

Experimental introduction of RNA into cells can be used in certain biological systems to interfere with the function of an endogenous gene^{1,2}. Such effects have been proposed to result from a simple antisense mechanism that depends on hybridization between the injected RNA and endogenous messenger RNA transcripts. RNA interference has been used in the nematode *Caenorhabditis elegans* to manipulate gene expression^{3,4}. Here we investigate the requirements for structure and delivery of the interfering RNA. To our surprise, we found that double-stranded RNA was substantially more effective at producing interference than was either strand individually. After injection into adult animals, purified single strands had at most a modest effect, whereas double-stranded mixtures caused potent and specific interference. The effects of this interference were evident in both the injected animals and their progeny. Only a few molecules of injected double-stranded RNA were required per affected cell, arguing against stoichiometric interference with endogenous mRNA and suggesting that there could be a catalytic or amplification component in the interference process.

NATURE | VOL 391 | 19 FEBRUARY 1998

FIGURA 2. Artículo en «Nature» (1998) donde se describe el descubrimiento del RNAi.

Andrew Fire nació en abril de 1959 en Palo Alto, California, creció en Sunnyvale, fue al Instituto Fremont, luego estudió en la Universidad de California donde se graduó en matemáticas en 1978 con diecinueve años. Posteriormente se trasladó al Massachusetts Institute of Technology (MIT) donde obtuvo el grado de Doctor en 1983. Su etapa postdoctoral la realizó en el laboratorio de Biología Molecular, Medical Research Council, dirigido por el Nobel Sydney Brenner, «padre» de *C. elegans*. Desde 1986-2003 fue Profesor del Departamento de Embriología de la Carnegie Institution de Washington en Baltimore y posteriormente Profesor de Patología en la Escuela de Medicina de la Universidad de Stanford. Los estudios de su laboratorio se centran en los mecanismos por los que las células y organismos responden a cambios genéticos, y especialmente en entender los mecanismos moleculares de la maquinaria de RNAi y su papel en la célula, usando el gusano *C. elegans* como modelo.

Craig Mello nació en 1960, estudió en la Universidad de Brown, obtuvo su doctorado en 1990 por la Universidad de Harvard y realizó su etapa postdoctoral en el Fred Hutchinson Cancer Research Center de Seattle en el laboratorio de James Priess. Desde 1994 es miembro del Centro del Cáncer en la Escuela de Medicina de la Universidad de Massachusetts en Worcester, y el año 2000 fue nombrado Profesor del Instituto Médico Howard Hughes de la misma Universidad. El interés de su laboratorio se centra en la regulación de la expresión genética durante la embriogénesis del gusano *C. elegans*, con especial énfasis en los mecanismos de interferencia genética.

ANTECEDENTES

Desde que se identificó al material genético como DNA en 1944 y su estructura en doble hélice por Watson-Crick en 1953 ha sido fundamental entender cómo se produce el flujo de la información genética del núcleo al citoplasma. Varios Premios Nobel han obtenido el galardón por sus contribuciones: al entendimiento de la síntesis de RNA por Ochoa-Konrberg (1959), regulación de la expresión génica por Jacob-Monod (1965), desciframiento del código genético por Nirenberg-Khorana (1968), actividad catalítica del RNA por Altman-Cech (1989) y el concepto de ribozima, y existencia de mRNA

con secuencias interrumpidas (exones e intrones) por Sharp-Roberts (1993). En los años ochenta se observó en bacterias que moléculas pequeñas (unos 100 nucleótidos) de RNA pueden aparearse con secuencias complementarias e inhibir la síntesis de proteínas. Este proceso de activación antisentido también ocurre en células eucariotas, como se demostró por primera vez en 1993 con el gusano *C. elegans*. Durante años se pensó que este modelo de regulación no era común, hasta que se demostró la existencia de un gran número de moléculas pequeñas de RNA. Aunque solamente un 2% del genoma contiene secuencias codificantes para aproximadamente 30.000 genes, se transcribe cerca del 50% del genoma en RNA. Muchos de estos transcritos no contienen una señal de lectura ORF (open reading frame) por lo que no son traducidos a proteínas. Más bien se trata de RNAs no codificantes (ncRNAs), que sin embargo dan origen a RNAs biológicamente activos, incluyendo variantes que pueden regular o silenciar a los genes codificantes.

El fenómeno de silenciamiento de genes fue descrito en plantas en 1990 por el grupo de Rich Jorgensen, intentando aumentar el color púrpura de petunias por introducción de un gen clonado que producía un pigmento (2). Se observó que cuando se introducía en la planta una copia extra del gen que codifica para la enzima que participa en la producción de pigmentos de antocianina, chalcona sintasa, las flores resultantes tenían colores variados, desde púrpura a blanquecino. Debido a que tanto el gen introducido como el homólogo endógeno eran suprimidos, se llamó a este proceso co-supresión génica o silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS). Otros científicos trabajando en la Universidad de Roma con el hongo *Neurospora crassa* observaron que cuando introducían copias adicionales del gen que codifica para el pigmento naranja que sintetiza el hongo, los hongos transgénicos perdían su color naranja y se producían hongos blanquecinos. A este fenómeno lo llamaron «quelling» o supresión (3). En 1995 el estudiante Sue Guo del laboratorio de Kempthues en la Universidad de Cornell, estudiando la influencia de genes específicos en desarrollo, demostró que cuando introducía secuencias en forma de oligonucleótidos antisentido y sentido juntos en *C. elegans* la supresión del gen de interés era mayor que cuando introducía los oligos sentido o antisentido de forma individualizada (4). Ninguno de los grupos anteriores fue capaz de dar una expli-

cación al fenómeno de supresión que observaron en sus experimentos. Serían Fire-Mello los que demostrarían en 1998 la existencia del RNA interferente como explicación de este proceso de control selectivo de la expresión génica (1).

DESCUBRIMIENTO DEL RNA INTERFERENTE

La publicación en *Nature* (1998) del artículo de Fire-Mello y colaboradores, titulado «Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*» supuso un salto espectacular para entender el fenómeno de silenciamiento de genes. Aunque existían evidencias previas, como se indicó anteriormente, de que tanto el RNA antisentido como el RNA sentido podían silenciar genes de forma específica, sin embargo estos experimentos eran inconsistentes y de bajo rendimiento. Fire-Mello demostraron el efecto fenotípico de RNA inyectando en las gónadas del gusano *C. elegans* el gen *unc-22* que codifica para la proteína del miofilamento, que es abundante pero no esencial. Existen varios miles de copias de *unc-22* mRNA presentes en el músculo estriado del gusano y ya se sabía que una disminución en los niveles de este gen producían un aumento en la curvatura del gusano mientras que la supresión completa del gen resultaba en mayores defectos estructurales y pérdida de motilidad.

Observaron que los cambios fenotípicos en el gusano solamente se producían cuando se inyectaba el RNA sentido y antisentido en forma de dsRNA, pero no cuando cada RNA era incorporado en forma de cadena sencilla. Además demostraron que la secuencia del RNA a inactivar y la contenida en el RNA bicatenario tenían que ser complementarias, lo que aportaba especificidad en el silenciamiento. Muy pocas moléculas eran necesarias para obtener silenciamiento. Para explicar el silenciamiento llevaron a cabo experimentos de hibridación *in situ* del gen abundante *mex-3* RNA inyectado en las gónadas de animales adultos, y observando que después de añadir RNA bicatenario complementario al gen *mex-3* desaparece el mensajero, lo que les llevó a proponer un efecto a nivel de transcripción o de estabilidad del gen. Finalmente la inyección de RNA bicatenario *unc-22*, y *gfp-LacZ* en la cabeza o cola de animales transgénicos para la proteína fluores-

cente GFP, demostró también producir interferencia pronunciada en la progenie y en todos los tejidos, indicando que el RNA bicatenario fue amplificado o que actuaba catalíticamente. En dicho artículo los autores indicaban que el RNAi explicaba el fenómeno estudiado previamente en plantas de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) y lo culminaban con la sentencia «la interferencia genética por dsRNA puede ser utilizado por el organismo como proceso fisiológico de silenciamiento génico». El fenómeno del RNAi se define en la Figura 3 con el anuncio del premio Nobel.

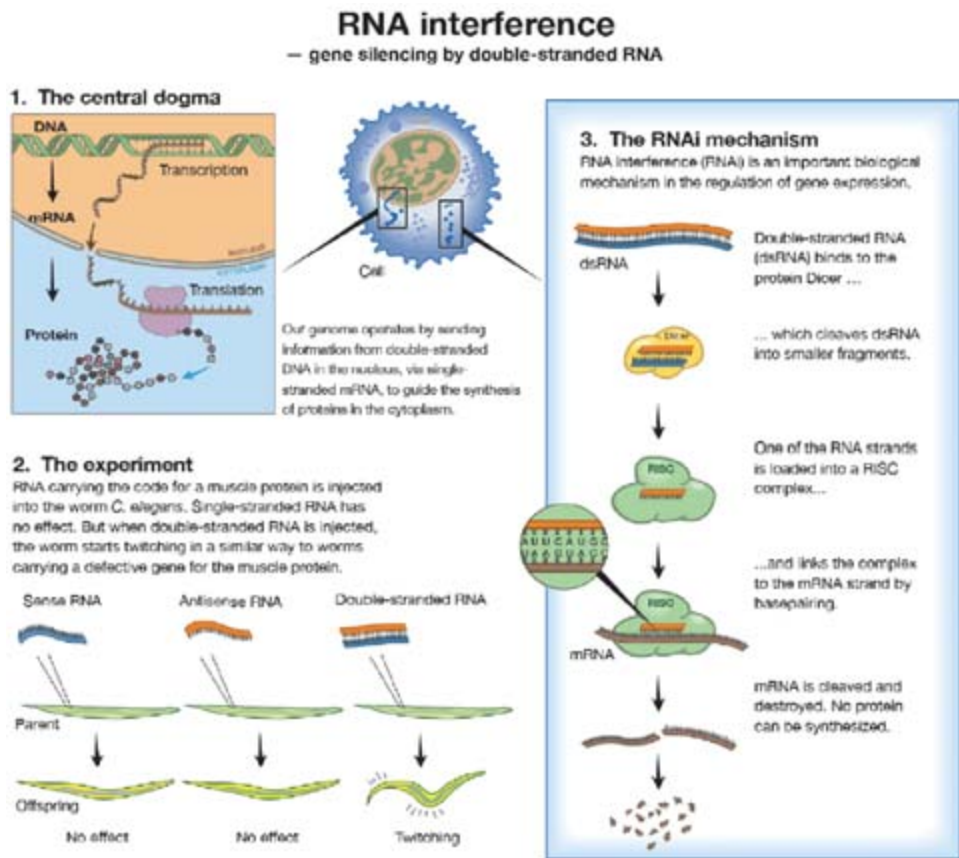


FIGURA 3. Esquema en el que la Academia sueca define el descubrimiento del silenciamiento génico por RNAi al anunciar la concesión del premio Nobel a Fire-Mello.

En un estudio posterior publicado en el PNAS del mismo año (5), Fire-Mello aportaron evidencia de que el mRNA es el sitio de acción del dsRNA por reconocimiento de las cadenas complementarias y que se degrada antes de su traducción en proteínas. También demostraron cómo el dsRNA actúa de forma catalítica sobre el mRNA homólogo mediante la interacción de una molécula lineal de RNA aportado por el dsRNA y el mRNA. Además indicaron que el RNAi puede servir como sistema táctico de defensa en organismos inferiores, de forma similar al sistema de defensa de los interferones en mamíferos.

En poco tiempo la presencia del RNAi fue rápidamente documentada en muchos otros organismos incluyendo la mosca del vinagre, tripanosomas, plantas, planaria, hidra y el pez cebra (6). Así pues, se considera al RNAi como un sistema que ha revolucionado la biología celular y se ha extendido a otras muchas áreas. La revista *Science*, en su edición de diciembre de 2002, consideró al RNAi como la molécula revelación del año (7), y la revista *Nature* dedicó en 2004 un número especial al RNAi (8).

MECANISMO DE SILENCIAMIENTO GÉNICO POR dsRNA

Poco después del descubrimiento del RNAi se demostró en plantas que el proceso de silenciamiento PTGS se correlacionaba con la presencia de moléculas pequeñas de RNA (de unos 25 nucleótidos) y que este RNA contiene secuencias sentido y antisentido, por lo que se propuso que este RNA pequeño es el responsable de PTGS (9). Varios grupos de investigación se lanzaron al estudio bioquímico del proceso de RNAi, demostrando con embriones de *Drosophila* que el dsRNA es procesado a un tamaño de 21-23 nucleótidos, semejante al descrito en plantas (10, 11). Se propuso que este dsRNA, llamado RNA pequeño de interferencia (small-interfering RNA, siRNA) actúa como guía para la rotura del mRNA. En estudios posteriores, Fire-Mello establecieron por ensayos *in vivo*, que el dsRNA de largo tamaño es cortado en fragmentos de unos 25 nucleótidos y que el RNA antisentido activa la degradación del mRNA por apareamiento de las bases (8, 12) (Figura 4). Posteriormente, por ensayos *in vitro* con cultivos celulares de *Drosophila*, se descubrió la maquinaria del RNAi. Se demostró la existencia de un complejo llamado RISC (RNA-

induced silencing complex) que interacciona con el mRNA a través del RNA antisentido de bajo tamaño donde el mRNA es fragmentado y posteriormente degradado (13). Este complejo contiene al menos un miembro de la familia de proteínas llamadas Argonauta, que actúan como endonucleasas, cortando el mRNA (se conoce como función Slicer). También se demostró que una enzima como la ribonucleasa III, llamada Dicer, es responsable del procesamiento del dsRNA largo a corto (14). En ciertos sistemas como las plantas, gusanos y hongos, la presencia de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) juega un papel importante en la generación y amplificación del siRNA (15). El avance importante de la formación de estas moléculas pequeñas de 21-23 nucleótidos es que evitan la activación del sistema de defensa de los interferones, que requiere mayores tamaños del dsRNA por encima de los 30 nucleótidos. Estudios recientes han demostrado que los dsRNAs entre 25-30 nucleótidos son 100 veces más potentes efectores del silenciamiento génico que los de 21 nucleótidos (16), parece ser por favorecer la eficiencia del papel secundario de Dicer al introducir más siRNAs en el complejo RISC. Los miembros de la familia Dicer contienen varios motivos en la secuencia, incluyendo el dominio de unión a dsRNA (dsRBMs), dominio de ribonucleasa III (RNasa III) y el motivo RNA helicasa con el consenso DExH. Dicer procesa moléculas largas de dsRNA y precursores de miRNAs en pequeñas moléculas de dsRNA con un extremo 5' fosfato y el extremo 3' con dos nucleótidos libres, cuyas cadenas se desaparean y la cadena antisentido se localiza preferentemente en complejos de silenciamiento que median funciones posteriores (14, 17). Es de interés que en muchos organismos, incluyendo *C. elegans*, un solo gen Dicer (DCR-1) es suficiente para mediar el procesamiento de dsRNA por distintas rutas (18). Mediante estudios proteómicos de análisis de proteínas que interaccionan con Dicer (19) llevados a cabo por el grupo de Mello, se ha demostrado que además de los factores necesarios para las rutas de procesamiento de RNAi y de miRNA, DCR-1 interacciona con una serie de proteínas necesarias para la segregación cromosómica de RNAi y la acumulación de varias especies de endo-siRNA. Tanto DCR-1 como el homólogo de la RNA-fosfatasa PIR-1 son necesarios para la acumulación de siRNA y para el procesamiento del sustrato de RdRP derivado de DCR-1. Hay al menos cuatro factores de interacción, incluyendo los conocidos como ERI-1 y RRF-3, necesarios para la

acumulación de especies endógenas de RNAs pequeños. Estos resultados sugieren un papel de ERI-1 y RRF-3 en la producción de sustratos endógenos para DCR-1 y apoyan el modelo por el que moléculas específicas de la actividad de DCR-1 compiten con rutas de silenciamiento de RNAs.

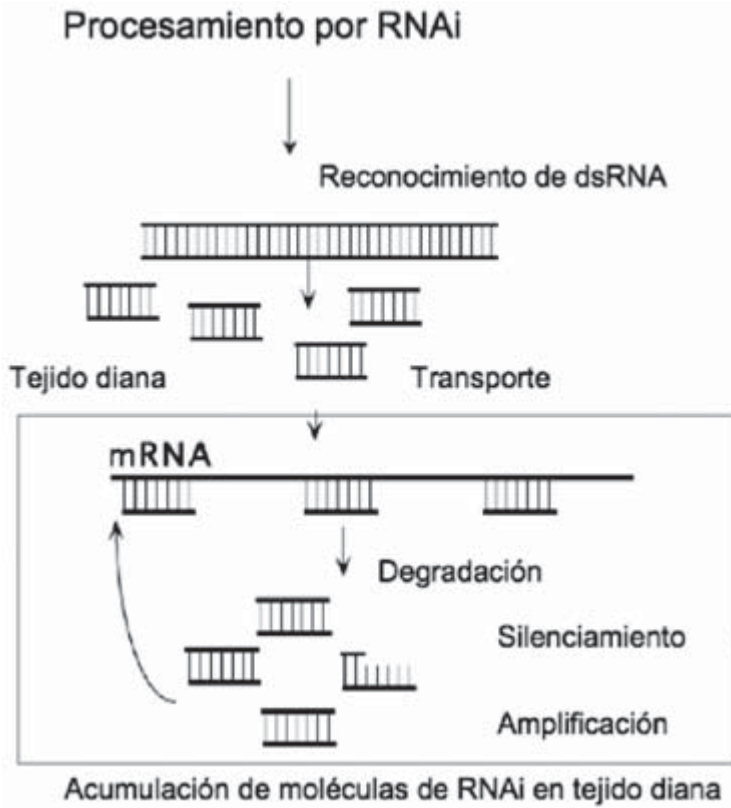


FIGURA 4. Esquema del procesamiento por RNAi.

MICRO RNAs COMO REGULADORES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Los micro RNAs (miRNAs) son una clase de RNAs no codificantes que funcionan como activadores endógenos de la ruta del RNAi (20,

21) (Figura 5). En palabras de Mello al conocer la concesión del Nobel: «pienso que el Comité Nobel, en un futuro próximo, debe de reconocer el descubrimiento de microRNAs, que son moléculas distintas a los siRNAs que descubrimos nosotros, para su consideración al Nobel de Química o Fisiología por su relevancia en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo». Aunque fueron descubiertos inicialmente en *C. elegans*, el primero de ellos fue *lin-4* (22) y luego *let-7* (23) como controladores del desarrollo larvario, estas moléculas pequeñas son de gran interés en biología por su aparente papel en la determinación y mantenimiento del linaje celular. Los miRNAs, con un tamaño medio de unos 22 nucleótidos, se originan como resultado de la transcripción por RNA polimerasa II de regiones del genoma que dan lugar a un transcrito primario (pri-miRNA) que varía en tamaño de unos cientos a miles de nucleótidos, que sufre procesamiento por «splicing», «capping» y «poliadenilación, semejándose al mRNA, aunque puede o no contener un ORF (open reading frame). El componente funcional es una estructura en forma de orquilla con las dos cadenas apareadas por complementariedad en su secuencia terminando en un bucle (stem-loop) y que puede localizarse en un exón o intrón. El precursor es procesado por enzimas nucleares como Droscha o Pasha (DGCR en humanos) para producir una estructura termodinámicamente estable de orquilla con bucle, denominada pre-miRNA de unos 70 pares de bases, con un extremo 5'-fosfato y con 2 nucleótidos terminales en el extremo 3', que es exportada del núcleo al citoplasma por la proteína Exportin-5. La estructura dúplex en forma de bucle es posteriormente procesada por las ribonucleasa III citoplásmica Dicer para producir el miRNA maduro de 22 nucleótidos que se asemeja al siRNA, con un extremo 5'-fosfato y 2 nucleótidos libres en el extremo 3'. Este RNA en forma de dúplex se traslada al complejo efector RISC donde se va a producir el silenciamiento de los mRNAs con secuencia complementaria (Figura 6). Se desconoce el mecanismo de separación de las dos cadenas por una helicasa. La cadena activa, llamada guía, se incorpora en el complejo efector RNAi-RISC que lo va a guiar hasta encontrar el homólogo mRNA y provocar la supresión en la traducción por degradación del mRNA. RISC corta el mRNA en el medio de la región complementaria, 10 nucleótidos más arriba del nucleótido apareado con el extremo 5' del siRNA guía. Esta reacción no requiere ATP (ver revisiones 17, 18). Considerando que la secuencia madura es corta y que no se necesita complementarie-

dad absoluta para silenciamiento, un gran número de mRNAs pueden involucrar una especie única de miRNA. Esto se apoya en métodos computacionales diseñados para predecir estructuras objeto de silenciamiento que pueden variar desde docenas a centenas de mRNAs por miRNA (24). Se han identificado miles de miRNAs en el genoma de plantas y animales. De momento se han confirmado 326 miRNAs en humanos aunque los métodos computacionales predicen un total de cerca de mil (24). Se conoce poco acerca de las rutas que regulan los miRNAs.

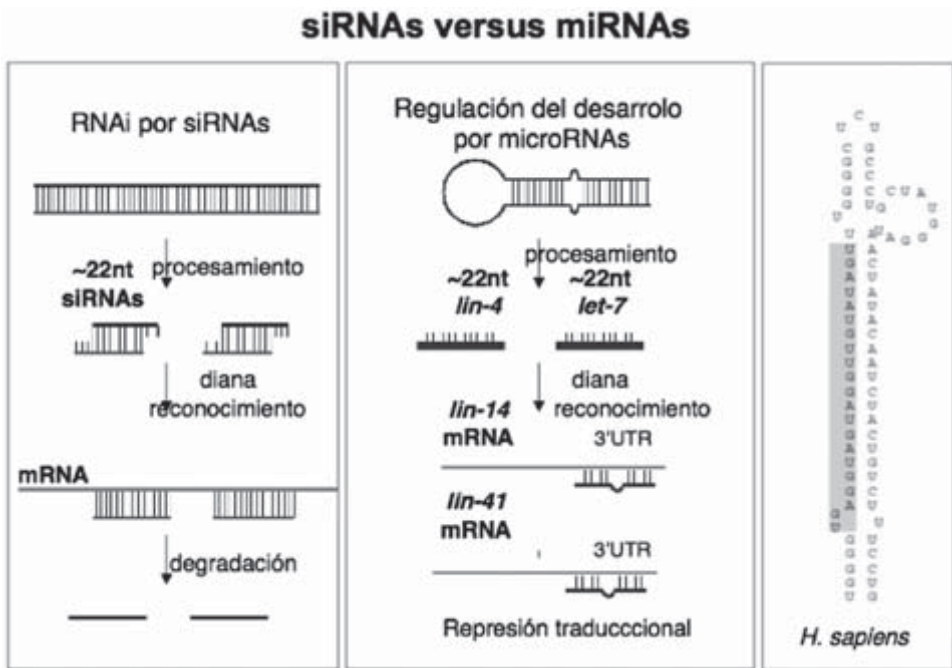


FIGURA 5. **Las dos formas de dsRNA que intervienen en el silenciamiento génico.** El siRNA se forma a partir de dsRNA con sus dos cadenas perfectamente complementarias, mientras que el miRNA se forma a partir de estructuras en forma de bucle (hairpin) con alguna secuencia no apareada. El procesamiento de ambas estructuras, siRNA como miRNA, da lugar al mismo tamaño en la secuencia, unos 22 nucleótidos, con dos nucleótidos libres en el extremo 3'. La estructura de un miRNA humano se indica a la derecha.

Generación de miRNAs & siRNAs

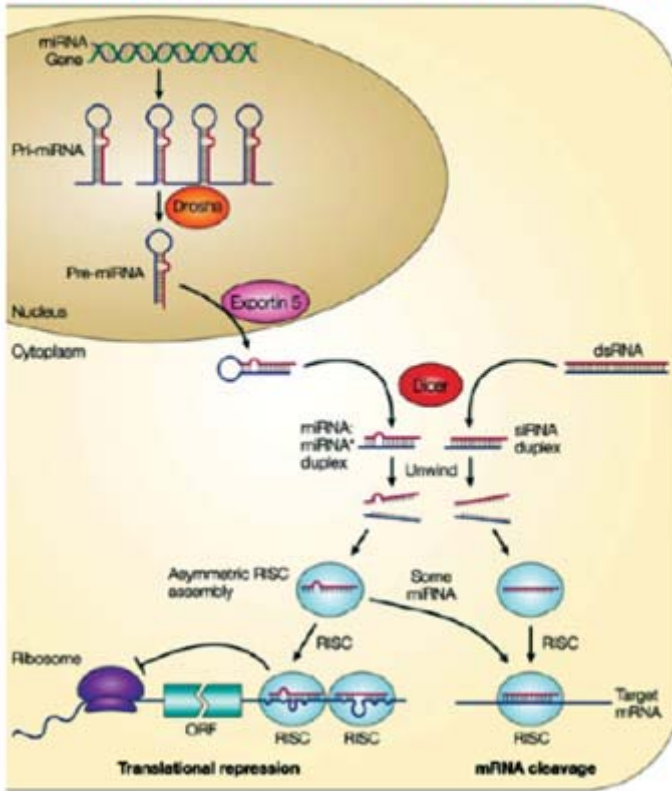


FIGURA 6. *Esquema sobre la generación de miRNA y siRNA y su acción en silenciamiento.* La transcripción por RNA pol II produce moléculas con secuencias que pueden formar bucles y que son procesadas por endorribonucleasas como Drosha. Los fragmentos generados son exportados por exportina del núcleo al citoplasma donde entran en la maquinaria de Dicer-RISC para culminar en el silenciamiento génico bien por degradación del mRNA (caso de siRNA) o por inhibición de la traducción (caso de miRNA).

BIOQUÍMICA DEL RNA INTERFERENTE

En el mecanismo de silenciamiento de genes por RNAi intervienen una serie de factores cuyas funciones se han ido elucidando y otras son desconocidas (8, 17, 18). Analizaremos los factores más relevantes en el complejo Dicer y RISC. La maduración de los RNAs

pequeños es un proceso secuencial catalizado por endonucleasas del tipo RNasa III llamadas Drosha y Dicer que contienen dominios catalíticos de RNasa III y dominios de unión con dsRNA (dsRBD). Como hemos indicado anteriormente, Drosha es requerida para el procesamiento de los precursores de miRNA que luego son transportados del núcleo al citoplasma para luego interactuar con Dicer y procesarlos en fragmentos de 21 nucleótidos. Existen varios genes Dicer en función de los organismos. Por ejemplo, *Drosophila melanogaster* tiene dos genes semejantes: DICER-1, que procesa preferentemente miRNA, y DICER-2, que procesa dsRNA de largo tamaño. El procesamiento es dependiente de ATP y requiere el dominio funcional helicasa de DCR-2. En el caso de *Arabidopsis thaliana*, se han identificado cuatro proteínas semejantes a Dicer que están involucradas en procesamiento (DCL-1 a DCL-4). En *C. elegans* sólo una proteína Dicer ha sido identificada, lo mismo que en humanos. El modelo catalítico más actual de Dicer propone que el dominio PAZ se une al extremo 3' del dsRNA con los dos nucleótidos libres. Los dos dominios de RNase III en DICER1 se asocian intramolecularmente formando un pseudodímero creando un lugar activo de forma semejante a la RNasa III de *E. coli*. Cada uno de los dominios hidroliza una de las cadenas del RNA bicatenario generando un nuevo extremo terminal con los dos nucleótidos libres en el extremo 3'. La longitud del producto final con 21 nucleótidos se mide por la distancia entre el dominio terminal de unión a PAZ y el lugar activo de corte (Figura 7). La importancia de Dicer en la funcionalidad de un organismo se ha demostrado con ratones a los que se les ha inactivado el gen correspondiente, lo que resulta en letalidad embrionaria (25). Mientras que tanto Dicer como Drosha contienen el dominio RNasa III, la interacción con dsRNA requiere cofactores. En *Drosophila* tanto DICER-1, DICER-2 y Drosha se asocian con los factores Loquacious, R2D2 y Pasha, que parece dirigen la incorporación específica de la cadena del siRNA al complejo multiproteico RISC que es el encargado de llevar a cabo la destrucción nucleolítica del mRNA target. Una vez que se han producido los siRNA y miRNA en forma de complejo ribonucleoproteico (RNP), estos son incorporados en otro complejo de silenciamiento RNA-inducido, RISC.

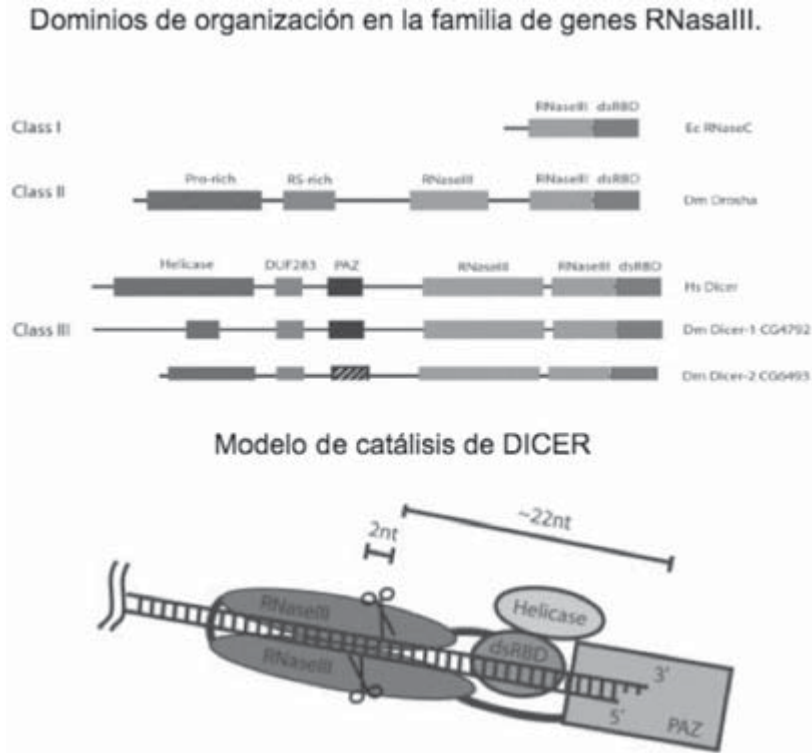


FIGURA 7. Dominios de organización de Dicer y modelo de acción para la generación de fragmentos dsRNA. Dicer pertenece a la familia de proteínas con acción RNasa III. Los dominios de RNasa III y de unión a dsRNA en esta familia de proteínas se indican para *E. coli* (*Ec*), *Drosophila* (*Dm*) y humano (*Hs*). En la parte inferior se indica el modelo de catálisis para Dicer que se describe en el texto (adaptación de la referencia 17).

Cada RISC contiene un miembro de la familia de proteínas Argonauta (Ago) que probablemente se une directamente con el RNA en el complejo (también recibe el nombre de Slicer). Por análisis de cromatografía de exclusión, se ha determinado que el tamaño de RISC varía entre 140 y 500 kDa (26-28). El número de proteínas Ago difiere entre las especies, variando entre una en *Schizosaccharomyces pombe* a más de 20 en *C. elegans*, comparado con 5 en *D. melanogaster* y 8 en humanos. Las diferentes variedades de Ago sugieren especificidad en la secuencia reconocida. El ensamblaje de RISC

es dependiente de ATP, lo que probablemente refleja la necesidad energética para el proceso de separación de las dos cadenas en el siRNA o miRNA. Las proteínas Ago tienen una masa molecular de unos 100 kDa y contienen dos dominios conservados, PAZ (piwi-argonaute-zwille) y PIWI. El dominio PIWI ha sido implicado en la interacción con Dicer. Los datos de cristalografía de la proteína Ago demuestran una gran semejanza entre el dominio PIWI y miembros de la familia de nucleasas RNasa H. Como RNasa H rompe el RNA en las cadenas dobles de RNA/DNA, se ha propuesto que Ago actúa cortando el RNA en los híbridos RNA/siRNA. El dominio PAZ específicamente reconoce el extremo terminal del apareamiento en el siRNA y miRNA con el característico dos nucleótidos libres en el extremo 3' (29-32) (Figura 8). Además de la proteína Ago, otras proteínas se han identificado en el complejo de RISC. En el caso de *D. melanogaster*, el producto Vasa del gen intrónico (VIG), la proteína relacionada con frágil-X (dFXR) y el dominio tudor de la nucleasa de estafilococo (Tudor-SN); en el caso de humanos, se han observado interacciones entre AGO2/eIF2C2 (factor de iniciación en la traducción) con FMRP (frágil X mental retardation protein) (17).

El siguiente paso es la rotura del mRNA y represión traduccional. La cadena sencilla del siRNA en RISC le guía de forma específica hacia la secuencia homóloga en el mRNA. RISC corta el mRNA en el medio de la región complementaria, 10 nucleótidos más arriba de los nucleótidos apareados con el extremo 5' del siRNA. Esta reacción no requiere ATP. El complejo RISC/miRNA cataliza la hidrólisis del mRNA produciendo extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo. Esta reacción de hidrólisis difiere de la clásica rotura endonucleolítica mediada por la actividad de la enzima pancreática RNasa. Esta reacción requiere de la presencia de magnesio y se asemeja a la que Dicer produce durante la generación del siRNA a partir de largos precursores de dsRNA. Se ha propuesto un modelo para explicar la actividad endonucleolítica de RISC a partir de la actividad catalítica de Ago (Slicer). El extremo 5' del siRNA se une al dominio PIWI de la Ago. El extremo 5'-fosfato que es importante para tener alta afinidad en la unión está coordinado por cuatro residuos conservados y separados de la cadena de mRNA. El extremo 3' del siRNA se extiende más allá de la interacción con el dominio PAZ de Ago. La afinidad en la unión con el mRNA depende del grado de apareamiento de las

dos cadenas con la región 3'. La maquinaria catalítica es la actividad RNasa H localizada en el dominio PIWI, originando extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo (ver revisiones 8, 17, 18) (Figura 8).

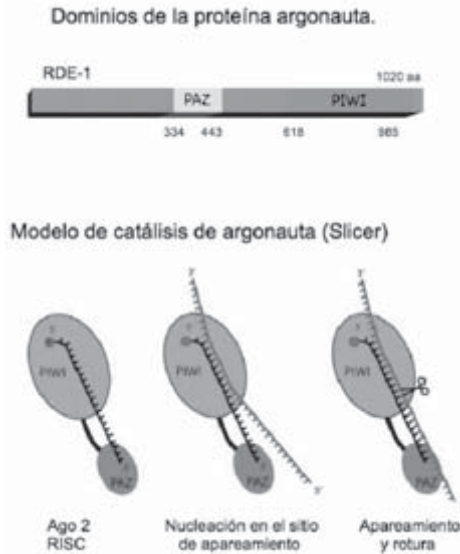


FIGURA 8. **Dominios de la proteína argonauta y modelo de acción de RISC para provocar la rotura del mRNA.** En la parte superior se indican los dominios PAZ y PIWI que caracterizan a la familia de proteínas que intervienen en la acción de RISC. Existe gran semejanza entre el dominio PIWI y miembros de la familia de nucleasas RNasa H. Una de las cadenas de RNA (de unos 22 nucleótidos) que ha entrado en el complejo RISC, se une por complementariedad al mRNA, con la zona PIWI favoreciendo el apareamiento en la zona central, mientras que el dominio PAZ une al extremo 3'. Como RNasa H rompe el RNA en las cadenas dobles de RNA/DNA, se ha propuesto que Ago actúa cortando el RNA en los híbridos RNA/siRNA (adaptación de la referencia 17).

SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL RNAI Y APLICACIONES

Desde un principio, al RNAi se le han ido asignando funciones biológicas con repercusiones muy importantes en regulación de la expresión génica, en desarrollo, evolución, así como sus posibles aplicaciones farmacológicas (33).

1. Efecto antiviral

Las observaciones pioneras en plantas indicaban un efecto protector contra infecciones virales cuando se producía el fenómeno de PTGS, lo que sugería que el RNAi podría proteger contra agresiones víricas en otros organismos. Se ha establecido de hecho que RNAi es un mecanismo de defensa antiviral que funciona en plantas, gusano y mosca, aunque no se ha establecido que este mecanismo exista en mamíferos. No obstante, los estudios llevados a cabo en el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con RNAi administrado de forma exógena, indican que formas sintéticas en dúplex apareado como siRNAs (34) o con estructura de horquilla (hairpin, shRNAs) introducidas en las células y dirigidas contra varios de los mRNAs que codifican por proteínas víricas estructurales (env-gag-pol) y no estructurales (rev-tat-vif-nef) y contra factores celulares como son los co-receptores CXCR4 y CCR5 para la entrada del VIH, pueden interferir eficazmente la infección por VIH en distintos cultivos celulares (33). Se han llevado a cabo aproximaciones semejantes contra los virus de la hepatitis B y C, mediante la introducción de siRNAs o shRNAs dirigidos frente a mRNAs que codifican por proteínas virales. También se están utilizando miRNAs humanos como herramienta contra la patogénesis del virus de la gripe. El potencial del siRNA para tratar infecciones virales se ha demostrado en ratones frente al virus de la gripe, parainfluenza y el virus respiratorio sincitial (35-37), así como en primates desafiados con el coronavirus del SARS (34). Estos experimentos en animales han estimulado el comienzo de un ensayo clínico en fase I frente al virus respiratorio sincitial, enfermedad que puede causar la muerte en niños recién nacidos. No obstante los virus pueden utilizar mecanismos de defensa para evadir el silenciamiento por RNAi (38). También los virus pueden codificar por miRNAs para regular su propia expresión génica (39). Se han descubierto microRNAs en retrovirus (VIH), papovavirus (SV40) y herpesvirus (herpes simplex, Epstein Barr, citomegalovirus, Kaposi-associated herpes) (40, 41). Esta novedosa línea de investigación nos va a permitir avanzar en el conocimiento de la capacidad evolutiva que han adquirido los virus para evadir el sistema de RNAi como mecanismo de defensa frente al hospedador. La dificultad en el uso de siRNAs o shRNAs en terapia radica en la limitación para llevar este

tipo de moléculas al lugar deseado, como puede ser el hígado, células linfoides, células madre, etc. Existe un gran esfuerzo investigador para desarrollar vehículos (como son vectores virales basados en lentivirus, adenovirus y adenoasociado, vectores de DNA con promotores de pol III, encapsulación en liposomas, conjugación con anticuerpos por receptores celulares, etc.) que transporten en el organismo estas moléculas a sus lugares de acción. Los mayores impedimentos son la dificultad para que el siRNA atraviese la membrana celular y su corta vida media, debido a la rapidez con la que se elimina por el riñón y su digestión por ribonucleasas endógenas. La incorporación intravenosa de siRNA modificado químicamente e incorporado en liposomas reduce la replicación del virus de la hepatitis B en modelo murino (42). Indudablemente es necesario hacer mucha más experimentación antes de decidir su aplicación terapéutica en humanos para resolver los problemas de estabilidad, especificidad, resistencia celular y de no interferencia con procesos celulares. A corto plazo es más factible la aplicación del RNAi en animales de granja para contrarrestar infecciones virales con incidencia en la industria alimenticia.

2. Cáncer y enfermedades genéticas

Existe gran interés en utilizar la tecnología del RNAi en el tratamiento de tumores. La evidencia indica que muchos miRNAs están altamente expresados en tejidos diferenciados, pero su expresión está reducida en tumores. Se ha sugerido que si los miRNAs contribuyen al cáncer, la supresión de los mismos puede servir como terapia antitumoral (43). Esta aproximación puede funcionar, ya que estudios en ratón han demostrado inhibición de miRNAs con antagonistas llamados «antagonomics» (44).

También, la posibilidad de poder regular la expresión de genes de forma específica por RNAi en organismos, abrió las puertas a su posible uso como agente terapéutico para el control de enfermedades con deficiencia génica conocida (33). Así pues, se está aplicando la tecnología de RNAi como terapia de enfermedades neurodegenerativas como Huntington, Ataxia, Alzheimer, entre otras (45). Varios estudios han demostrado que la terapia del RNAi mejora el fenotipo

de enfermedades humanas en modelos animales. Recientemente, utilizando siRNAs introducidos por vía sistémica en forma de liposomas se ha demostrado que se puede silenciar (90%) en macacos el gen de la apolipoproteína B (APOB) en el hígado durante 48 horas después de su administración, con la consiguiente reducción en los niveles de colesterol (46). Hace falta realizar más experimentación para demostrar carencia en toxicidad del producto y que se obtiene silenciamiento completo y de larga duración en genes implicados en enfermedades neurodegenerativas (ejemplo, hungtintina, Sca I, ataxia, B-amiloide, tau y otros).

3. Represión específica de genes y regulación del desarrollo de organismos

Una de las grandes aplicaciones del RNAi ha sido su utilización para reprimir de forma específica la funcionalidad de genes celulares y asignar funciones a los mismos, lo que ha supuesto un salto espectacular en genómica funcional y en biología del desarrollo. Básicamente, el producto es introducido en una célula en forma de siRNA o shRNA, actuando de vehículo un vector no viral o viral, y llevando en su secuencia promotores adecuados para su producción intracelular y silenciamiento del gen específico al activarse el sistema Dicer-RISC (47). De esta manera se ha conseguido silenciar multitud de genes en células en cultivo y esencialmente se podrá silenciar cualquier gen de interés en un organismo. Un ejemplo se indica en la Figura 9, donde el RNAi se puede utilizar para silenciar mRNAs que codifican para proteínas involucradas en la ruta endocítica de procesamiento de moléculas. Mediante RNAi se puede discriminar qué parte de la maquinaria endocítica es necesaria para la morfogénesis y salida de virus de la célula.

4. Control de la expresión de la cromatina por RNAi

Después del descubrimiento del RNAi, se observó que el proceso de regulación transcripcional en plantas, PTGS, se debía a una supresión en la transcripción de la heterocromatina (48), fenómeno que luego se extendió a *S. Pombe*, *Drosophila* y vertebrados (47, 49).

Además, se observó que el RNAi regula la actividad de genes en la región próxima a la cromatina condensada. Este fenómeno no está aún caracterizado a nivel molecular, aunque está claro que modificaciones en la cromatina, como son los niveles de metilación y mediante la unión de proteínas específicas a la cromatina, juegan un papel importante en la regulación transcripcional. Se considera que estas funciones son relevantes para definir cómo funciona el genoma y el mantenimiento de su integridad, así como su evolución.

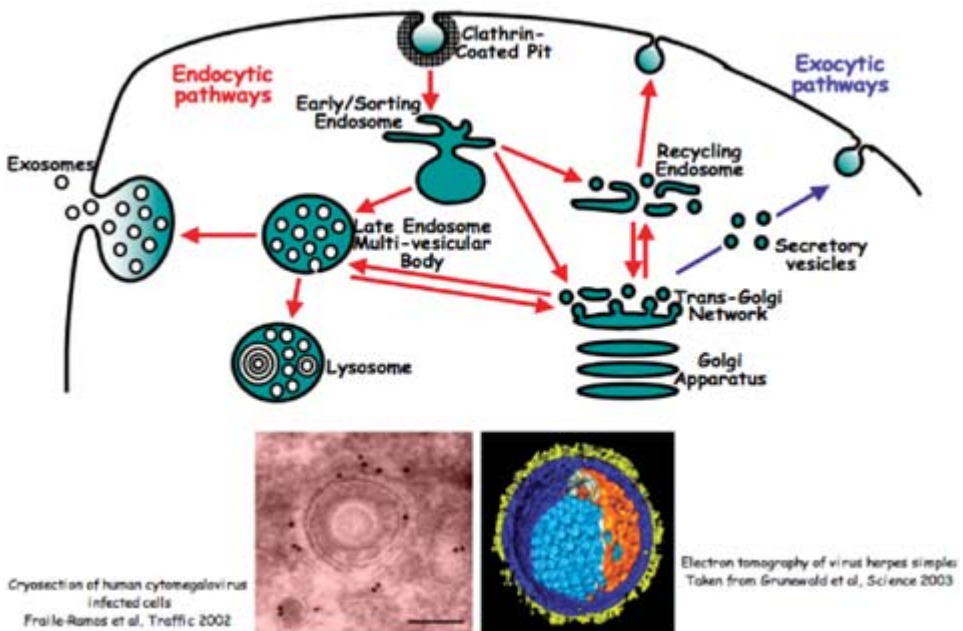


FIGURA 9. Esquema del procesamiento endocítico y su bloqueo por RNAi.
 La entrada de moléculas o virus en una célula está controlada por el sistema endocítico que procesa complejos proteicos y los lleva a distintos compartimentos celulares. En estos complejos intervienen una serie de proteínas, por lo que la inhibición en la síntesis de alguna de estas proteínas por siRNA altera la formación de partículas virales. La incorporación intracelular de siRNA específico para proteínas que actúan en distintos compartimentos nos ayuda a conocer en qué medida estas rutas intervienen en la morfogénesis de virus complejos, como el citomegalovirus, que pertenece a la familia de los herpesvirus.
 Esquema adaptado por Alberto Fraile en mi laboratorio del CNB.

5. El RNAi asegura la estabilidad genómica manteniendo el silenciamiento de los elementos móviles

Durante el proceso de transcripción del genoma de una célula se expresa cerca de un 50% de su información genética en forma de elementos móviles (transposones) y en secuencias virales (retrotransposones). Estos elementos serían nocivos a la célula a no ser que existiera un sistema de regulación de los mismos. Se propuso inicialmente en plantas y *C. elegans* que se producía silenciamiento de estos elementos móviles, ya que cuando se introducen formas mutadas en la maquinaria de RNAi ocurren alteraciones en la función del genoma (50, 51). En este proceso, las regiones del genoma que codifican para transposones dan lugar a dsRNA debido a la transcripción de las dos cadenas complementarias del DNA. Un mecanismo que tiene la célula para mantener bajo control el dsRNA producido por los transposones es activar el sistema RNAi. Lo mismo ocurre con el dsRNA subproducto de la transcripción de secuencias virales no codificantes que dan lugar a dsRNA activando el RNAi y eliminando la acción de estas secuencias virales. Aún desconocemos a nivel molecular el sistema de regulación de los transposones y secuencias virales no codificantes y las consecuencias que pueden tener en la función celular, desarrollo y evolución de nuestro genoma.

6. El RNAi y el sistema de los interferones como reguladores de la síntesis de proteínas

Se propuso inicialmente que el RNAi actuaba como un sistema de defensa del genoma contra elementos nocivos para el huésped, como son los virus. Con anterioridad se conocía otro sistema de defensa del organismo, los interferones (IFN), como primera línea de lucha contra los virus. Existe un denominador común entre RNAi y los IFN, cual es la activación de ambos sistemas por dsRNA. Sin embargo, mientras que RNAi es activado por moléculas de dsRNA con un tamaño medio de 22 nucleótidos, sin embargo el sistema de los interferones es activado por dsRNAs con un tamaño superior a 30 nucleótidos. En ambos casos se produce una inhibición en la síntesis de proteínas al suprimirse la traducción de los mRNA, aunque en el caso de RNAi esta inhibición es específica, mientras que

la activación de IFN da lugar a una inhibición no específica, es decir, el bloqueo en la traducción de mRNAs virales y celulares sin especificidad. La inhibición de la síntesis de proteínas por la activación del sistema de IFN se debe a la acción de enzimas inducidas: el sistema 2-5A sintetasa/RNasa L y la proteína quinasa PKR. En el primer caso, la enzima 2', 5'oligoadenilato sintetasa es activada por dsRNA, que sintetiza en presencia de ATP oligonucleótidos pequeños (pp)p5A2'(p5'A2')n, que se unen a la enzima endoribonucleasa L (RNasa L) dando lugar a la degradación de cualquier mRNA a su alrededor (52, 53). En el caso de la proteína quinasa PKR, ésta se activa por la unión de dsRNA, lo que provoca fosforilación de la pequeña subunidad del factor de iniciación eIF-2 α con la consiguiente inhibición en la síntesis de proteínas por ser este un factor esencial en la iniciación. La proteína PKR además activa el factor transcripcional NF-kB, jugando un papel muy relevante en el control de infecciones virales y en proliferación celular (54). Así pues existe complementariedad en la acción de los dos sistemas de defensa del organismo, RNAi e IFN, para actuar tan pronto como la célula encuentra en su citoplasma dsRNA (Figura 10). Hacen falta más investigaciones para demostrar la relevancia de la actuación conjunta de estos dos importantes mecanismos, RNAi e IFN, como mecanismos de defensa del organismo contra patógenos.

CONCLUSIONES

El descubrimiento por Fire-Mello de que las células disponen de un mecanismo especial, RNAi, para suprimir la expresión de genes propios por mediación de dsRNA, fue algo totalmente inesperado y que ha supuesto un cambio radical en nuestro entendimiento del control de la expresión génica en los organismos. El RNAi no solamente protege contra las infecciones virales, sino que además asegura la estabilidad genómica silenciando los elementos móviles (transposones y retrotransposones), controla la síntesis de proteínas, regula el desarrollo de organismos, mantiene la cromatina condensada suprimiendo la transcripción, y controla procesos evolutivos. Así pues, el RNAi es una herramienta eficaz para suprimir la expresión de genes de forma específica, por lo que su aplicación en medicina ha despertado un gran interés. La demostración de siRNA/ shRNA

como vehículo para reprimir en modelos animales infecciones virales, cáncer y trastornos genéticos, augura un horizonte de esperanza para aplicar esta tecnología como arma terapéutica contra muchas enfermedades. Es predecible que el número de ensayos clínicos aumentará en los próximos años y que eventualmente se aplicará el RNAi como procedimiento clínico.

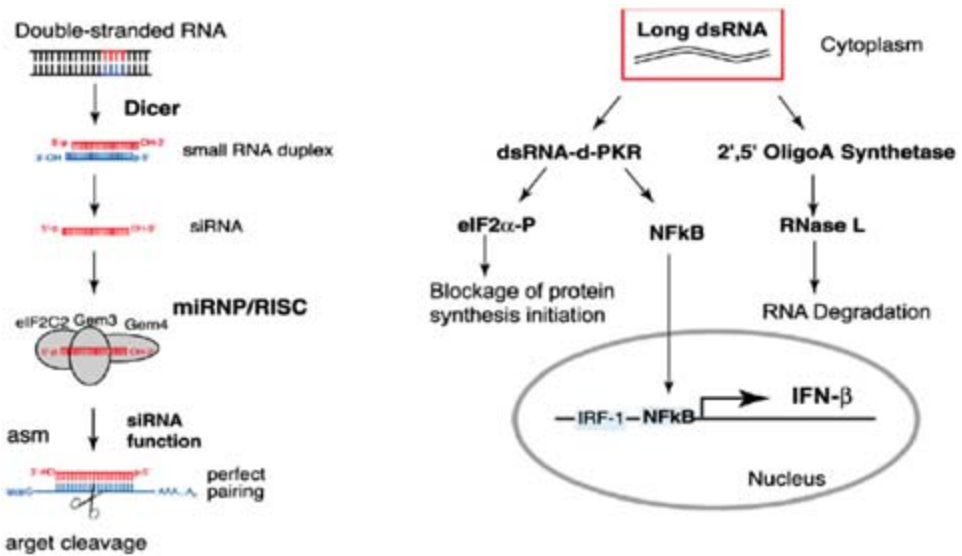


FIGURA 10. *Esquema comparativo de los dos mecanismos de defensa del organismo que utilizan dsRNA como activador. En la parte izquierda se indica la acción del sistema RNAi, mientras que en el lado derecho se presenta la activación de las dos rutas enzimáticas inducidas por los interferones. El resultado final es la inhibición de la síntesis de proteínas, bien por degradación del mRNA o por bloqueo de la iniciación.*

REFERENCIAS

- (1) FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E. and MELLO, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391: 806-811.
- (2) NAPOLI, C.; LEMIEUX, C. and JORGENSEN, R. (1990): Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 2: 279-289.

- (3) ROMANO, N. and MACINO, G. (1992): Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6: 3343-3353.
- (4) GUO, S. and KEMPHUES, K. J. (1995): par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell.* 81: 611-620.
- (5) MONTGOMERY, M. K.; XU, S. and FIRE, A. (1998): RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 15502-15507.
- (6) TUSCHL, T.; ZAMORE, P. D.; LEHMANN, R.; BARTEL, D. P. and SHARP, P. A. (1999): Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev.* 13: 3191-3197.
- (7) COUZIN, J. (2002): Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science.* 298: 2296-2297.
- (8) MELLO, C. C. and CONTE, D. JR. (2004): Revealing the world of RNA interference. *Nature.* 431: 338-342.
- (9) HAMILTON, A. J. and BAULCOMBE, D. C. (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.* 286: 950-952.
- (10) ELBASHIR, S. M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YALCIN, A.; WEBER, K. and TUSCHL, T. (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411: 494-498.
- (11) ZAMORE, P. D.; TUSCHL, T.; SHARP, P. A. and BARTEL, D. P. (2000): RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* 101: 25-33.
- (12) PARRISH, S.; FLEENOR, J.; XU, S.; MELLO, C. and FIRE, A. (2000): Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell.* 6: 1077-1087.
- (13) HAMMOND, S. M.; BERNSTEIN, E.; BEACH, D. and HANNON, G. J. (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 404: 293-296.
- (14) BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M. and HANNON, G. J. (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 409: 363-366.
- (15) COGONI, C. and MACINO, G. (1999): Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature.* 399: 166-169.
- (16) KIM, D. H.; BEHLKE, M. A.; ROSE, S. D.; CHANG, M. S.; CHOI, S. and ROSSI, J. J. (2005): Synthetic dsRNADicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat. Biotechnol.* 23: 222-226.
- (17) HAMMOND, S. M. (2005): Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett.* 579: 5822-5829.
- (18) MEISTER, G. and TUSCHL, T. (2004): Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature.* 431: 343-349.
- (19) DUCHAINE, T. F.; WOHLSCHEGEL, J. A.; KENNEDY, S.; BEI, Y., CONTE, D. JR.; PANG, K. *et al.* (2006): Functional proteomics reveals the biochemical niche of *C. elegans* DCR-1 in multiple small-RNA-mediated pathways. *Cell.* 124: 343-354.

- (20) BARTEL, D. P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116: 281-297.
- (21) LEE, R. C. and AMBROS, V. (2001): An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 294: 862-864.
- (22) LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L. and AMBROS, V. (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75: 843-854.
- (23) REINHART, B. J.; SLACK, F. J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A. E.; BETTINGER, J. C.; ROUVIE, A. E. *et al.* (2000): The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403: 901-906.
- (24) LEWIS, B. P.; BURGE, C. B. and BARTEL, D. P. (2005): Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 120: 15-20.
- (25) BERNSTEIN, E.; KIM, S. Y.; CARMELL, M. A.; MURCHISON, E. P.; ALCORN, H., LI, M. Z. *et al.* (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.* 35: 215-217.
- (26) NYKANEN, A.; HALEY, B. and ZAMORE, P. D. (2001): ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*. 107: 309-321.
- (27) HAMMOND, S. M.; BOETTCHER, S.; CAUDY, A. A.; KOBAYASHI, R. and HANNON, G. J. (2001): Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*. 293: 1146-1150.
- (28) MARTÍNEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; URLAUB, H.; LUHRMANN, R. and TUSCHL, T. (2002): Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*. 110: 563-574.
- (29) LINGEL, A.; SIMON, B.; IZAURRALDE, E. and SATTLER, M. (2004): Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 576-577.
- (30) MA, J. B. YE, K. and PATEL, D. J. (2004): Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*. 429: 318-322.
- (31) SONG, J. J.; LIU, J.; TOLIA, N. H.; SCHNEIDERMAN, J.; SMITH, S. K.; MARTIENSSEN, R. A. *et al.* (2003): The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat. Struct. Biol.* 10: 1026-1032.
- (32) YAN, K. S.; YAN, S.; FAROOQ, A.; HAN, A.; ZENG, L. and ZHOU, M. M. (2003): Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*. 426: 468-474.
- (33) HANNON, G. J. and ROSSI, J. J. (2004): Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature*. 431: 371-378.
- (34) LI, B. J.; TANG, Q.; CHENG, D.; QIN, C.; XIE, F. Y.; WEI, Q. *et al.* (2005): Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in *Rhesus macaque*. *Nat. Med.* 11: 944-951.
- (35) GRIMM, D.; STREETZ, K. L.; JOPLING, C. L.; STORM, T. A.; PANDEY, K.; DAVIS, C. R. *et al.* (2006): Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*. 441: 537-541.

- (36) BITKO, V.; MUSIYENKO, A.; SHULYAYEVA, O. and BARIK, S. (2005): Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat. Med.* 11: 50-55.
- (37) Tompkins, S. M.; Lo, C. Y.; Tumpey, T. M. and Epstein, S. L. (2004): Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 8682-8686.
- (38) LAKATOS, L.; CSORBA, T.; PANTALEO, V.; CHAPMAN, E. J.; CARRINGTON, J. C.; LIU, Y. P. *et al.* (2006): Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* 25: 2768-2780.
- (39) SULLIVAN, C. S.; GRUNDHOFF, A. T.; TEVETHIA, S.; PIPAS, J. M. and GANEM, D. (2005): SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature.* 435: 682-686.
- (40) GRUNDHOFF, A.; SULLIVAN, C. S. and GANEM, D. (2006): A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpes viruses. *RNA.* 12: 733-750.
- (41) PFEFFER, S.; SEWER, A.; LAGOS-QUINTANA, M.; SHERIDAN, R.; SANDER, C.; GRASSER, F. A. *et al.* (2005): Identification of microRNAs of the herpes virus family. *Nat. Methods.* 2: 269-276.
- (42) MORRISSEY, D. V.; LOCKRIDGE, J. A.; SHAW, L.; BLANCHARD, K.; JENSEN, K.; BREEN, W. *et al.* (2005): Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat. Biotechnol.* 23: 1002-1007.
- (43) HAMMOND, S. M. (2006): RNAi, microRNAs, and human disease. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 58: 63-68.
- (44) KRUTZFELDT, J.; RAJEWSKY, N.; BRAICH, R.; RAJEEV, K. G.; TUSCHL, T.; MANOHARAN, M. *et al.* (2005): Silencing of microRNAs *in vivo* with «antagomirs». *Nature.* 438: 685-689.
- (45) BOUDREAU, R. L. and DAVIDSON, B. L. (2006): RNAi therapy for neurodegenerative diseases. *Curr. Top. Dev. Biol.* 75: 73-92.
- (46) ZIMMERMANN, T. S.; LEE, A. C.; AKINC, A.; BRAMLAGE, B.; BUMCROT, D.; FEDORUK, M. N. *et al.* (2006): RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature.* 441: 111-114.
- (47) SIJEN, T.; VIJN, I.; REBOCHO, A.; VAN BLOKLAND, R.; ROELOFS, D.; MOL, J. N. *et al.* (2001): Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr. Biol.* 11: 436-440.
- (48) METTE, M. F.; AUFSATZ, W.; VAN DER WINDEN, J.; MATZKE, M. A. and MATZKE, A. J. (2000): Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* 19: 5194-5201.
- (49) HALL, I. M.; SHANKARANARAYANA, G. D.; NOMA, K.; AYOUB, N.; COHEN, A. and GREWAL, S. I. (2002): Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science.* 297: 2232-2237.
- (50) KETTING, R. F.; HAVERKAMP, T. H.; VAN LUENEN, H. G. and PLASTERK, R. H. (1999): Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell.* 99: 133-141.
- (51) TABARA, H.; SARKISSIAN, M.; KELLY, W. G.; FLEENOR, J.; GRISHOK, A.; TIMMONS, L. *et al.* (1999): The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell.* 99: 123-132.

- (52) PLAYER, M. R. and TORRENCE, P. F. (1998): The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacol. Ther.* 78: 55-113.
- (53) SEN, G. C. and SARKAR, S. N. (2005): Hitching RIG to action. *Nat. Immunol.* 6: 1074-1076.
- (54) GARCÍA, M. A.; GIL, J.; VENTOSO, I.; GUERRA, S.; DOMINGO, E.; RIVAS, C. *et al.* (2006): Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to anti-proliferative action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 1032-1060.