



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)



**Tesina de grado**

# **Estudio de la localización subcelular de diferentes construcciones de PIWIL1 en línea celular de cáncer de colon**

Sofía Montenegro

Orientadora: Dra. María Rosa García-Silva

Laboratorio de Genómica Funcional, Institut Pasteur de Montevideo

## Resumen

Recientemente, se ha reportado que las proteínas PIWI, especialmente PIWIL1, constituyen una vía no caracterizada previamente en el proceso oncogénico capaz de regular el ciclo celular de la célula tumoral. Esto provoca que resulte muy novedoso determinar cuáles son los mecanismos por los cuales PIWIL1 actúa ya que estos pueden significar la generación de nuevos biomarcadores diagnósticos y/o blancos terapéuticos en cáncer.

Aún queda mucho por conocer acerca de la expresión de las proteínas PIWI fuera de su contexto fisiológico canónico, en la línea germinal. Entre estas incógnitas, se encuentra la dinámica subcelular de PIWIL1 a lo largo del ciclo celular. Por ello, intentamos aproximarnos a la caracterización de la localización de PIWIL1 mediante el clonado de cuatro construcciones de dicha proteína *taggeada* tanto con eGFP y mRuby para su sobre-expresión en la línea celular modelo de cáncer de colon humano, Caco-2. Las construcciones consisten en: E1-E3 (Exones 1-3) que incluye la NLS (señal de localización nuclear) predicha, E10-E21 (Exones 10-21) que incluye el dominio PIWI pero no la NLS, E1-E21 (Exones 1-21) correspondiente a la Isoforma 1 completa de PIWIL1 que incluye la NLS, y E4-E21 (Exones 4-21) correspondiente a la Isoforma 2 que carece de la NLS.

A la hora de abordar los clonados propuestos, enfrentamos dificultades sobre todo en las construcciones de mayor tamaño. Se pudo llegar al clonado en vectores de expresión planteados para las construcciones E1-E3 y E10-E21, pero no así para E1-E21 y E4-E21. Los resultados obtenidos permitieron aproximarse a la localización subcelular de PIWIL1. Además se generó una herramienta que a futuro será utilizada por el grupo para realizar estudios del ciclo y división celular tanto *in vitro* como *in vivo*, profundizando así en la comprensión de esta proteína en el contexto oncogénico.

## **Palabras Claves**

piARNs

pequeños ARNs no codificantes

PIWI

PIWIL1

Argonauta

Señal de localización nuclear

Clonado

Vector

Construcciones

Transformación

Transfección

Ciclo Celular

Cáncer

Colon

Cáncer de colon

Cripta

Células madre cancerosas

# Índice

<b>1- Introducción.....</b>	<b>4</b>
1.1 Pequeños ARNs no codificantes.....	4
1.2 piARNs.....	5
1.3 Proteínas Argonautas.....	6
1.4 PIWI.....	8
1.4.1 Estructura y función de proteínas PIWI.....	8
1.4.2 PIWIL1.....	9
1.5 Cáncer de colon como modelo de estudio de PIWIL1.....	9
1.5.1 Estructura y función del colon.....	9
1.5.2 Cáncer de colon y PIWIL1.....	11
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivo General.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>15</b>
3.1 Diseño de cebadores.....	15
3.2 Extracción de ARN.....	16
3.3 Síntesis de cADN.....	17
3.4 PCR a tiempo final.....	17
3.5 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	17
3.6 Purificación del ADN.....	18
3.7 Digestión.....	18
3.8 Ligación.....	18
3.9 Transformación.....	20
3.10 “Colony” PCR.....	20
3.11 “Microcultivo” PCR.....	21
3.12 Electroforesis.....	21
3.13 Crecimiento de colonias.....	22
3.14 Extracción de ADN plasmídico en pequeña escala (“Miniprep”).....	22
3.15 Preparación de ADN plasmídico a gran escala (“Midiprep”).....	23
3.16 Cultivo celular: mantenimiento y propagación de las células.....	23
3.17 Recuento de células mediante un hemocitómetro.....	23
3.18 Transfección.....	24
3.19 Microscopía de fluorescencia.....	24
<b>4. Resultados.....</b>	<b>25</b>
4.1 Amplificación por PCR de las construcciones.....	25
4.2 Clonado en el plásmido pGEM-T y transformación de E. Coli.....	26
4.3 Purificación y digestión.....	28
4.4 Clonado en vectores de expresión y transformación de E. Coli.....	29
4.5 Purificación a gran escala del ADN plasmídico y Transfección de Caco-2.....	32
4.6 Obtención de imágenes mediante Confocal Zeiss 800.....	32
<b>5. Discusión.....</b>	<b>34</b>
<b>6. Conclusiones y perspectivas.....</b>	<b>36</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>37</b>

# 1- Introducción

## 1.1 Pequeños ARNs no codificantes.

Hasta principios de este nuevo siglo, el campo de estudio de la biología molecular se basaba mayoritariamente en la comprensión de aspectos que de alguna forma u otra estaban vinculados a las proteínas (Großhans & Filipowicz, 2008). Si bien se conocían ARNs funcionales como los tARNs (ARNs transferencias) y rARNs (ARNs ribosomales), estos participan en la síntesis proteica por lo que no había elementos contundentes que generarán un cambio de perspectiva. No fue hasta el momento en que se logró secuenciar el genoma humano, cuando se conoció que aproximadamente sólo un 1-2% corresponde a genes codificantes para proteínas (Djebali et al., 2012; Taft et al., 2007). La transcriptómica permitió notar como la mayoría del genoma se transcribe en ARNs que no se traducen (ARNs no codificantes), lo que abrió las puertas a la consideración de que estos ARNs en realidad tuvieran un rol funcional y/o regulatorio en el organismo.

En la actualidad se sabe que estos ARNs no codificantes actúan como componentes estructurales, enzimáticos y regulatorios para una variedad de procesos celulares y se los puede clasificar por su tamaño. En general, se consideran como ARNs pequeños aquellos con menos de 40 nucleótidos, y como ARNs no codificantes largos aquellos que superan los 70 nucleótidos. Los de mayor largo son muy variables en cuanto a su tamaño y participan en diversos procesos tales como *splicing* y producción de ribosomas (Großhans & Filipowicz, 2008). Por otro lado, los ARNs pequeños no codificantes se vinculan principalmente a mecanismos de silenciamiento génico mediante la asociación con proteínas de la familia Argonauta. Estas proteínas, son guiadas por estos pequeños ARNs no codificantes hacia ARNm, por ejemplo, reclutando así la maquinaria de silenciamiento y/o degradación de los mismos (Großhans & Filipowicz, 2008). Además, se ha reportado que en algunos casos reconocen ARNs que se están transcribiendo, induciendo la formación de heterocromatina específica en el ADN para inhibir la expresión de dicho gen. Entre estas modificaciones que pueden inducir en la cromatina se encuentran tanto cambios en las marcas epigenéticas, como re-arreglos cromosómicos (Siomi & Siomi, 2009).

**Tabla 1.** Principales tipos de ARNs producidos en las células y sus respectivas funciones descritas. Extraído de Molecular Biology of the Cell, 7th Edition.

TABLE 6-1 Principal Types of RNAs Produced in Cells	
Type of RNA	Function
mRNAs	Messenger RNAs, code for proteins
rRNAs	Ribosomal RNAs, form the basic structure of the ribosome and catalyze protein synthesis
tRNAs	Transfer RNAs, central to protein synthesis as the adaptors between mRNA and amino acids
Telomerase RNA	Serves as the template for the telomerase enzyme that extends the ends of chromosomes
snRNAs	Small nuclear RNAs, function in a variety of nuclear processes, including the splicing of pre-mRNA
snoRNAs	Small nucleolar RNAs, help to process and chemically modify rRNAs
lncRNAs	Long noncoding RNAs, not all of which appear to have a function; some serve as scaffolds and regulate diverse cell processes, including X-chromosome inactivation
miRNAs	MicroRNAs, regulate gene expression by blocking translation of specific mRNAs and causing their degradation
siRNAs	Small interfering RNAs, turn off gene expression by directing the degradation of selective mRNAs and helping to establish repressive chromatin structures
piRNAs	Piwi-interacting RNAs, bind to piwi proteins and protect the germ line from transposable elements

Los pequeños ARNs clásicos se clasifican en miARNs (microRNAs), siARNs (small interfering RNAs) y piARNs (piwi-interacting RNAs), basándose en su tamaño, el origen de su biogénesis, y tipos de proteínas asociadas (Ghildiyal & Zamore, 2009; Kim et al., 2009). En los últimos años ha cobrado relevancia una nueva subfamilia de pequeños ARNs, la cual consiste en los fragmentos de tARNs, tiARNs (ARNs derivados de ARN transferencia). Cabe destacar que nuestro grupo de trabajo ha sido pionero en la descripción de estos nuevos ARNs reguladores desde su inicio (Garcia-Silva et al., 2010a, 2012).

Sorprendentemente, en el mismo momento en que el grupo del Dr. Alfonso Cayota reportaba una nueva familia de pequeños ARNs no codificantes, también se observó que existía un ortólogo de la familia Argonauta (AGO/PIWI) en *Trypanosoma cruzi* y se propuso la designación genérica de PIWItryp para dicha proteína (Garcia-Silva et al., 2010a,b). Posteriormente, este informe, junto con otros, concluyó que la subfamilia de proteínas PIWI está altamente conservada en la evolución de procariotas a eucariotas. Siendo este trabajo uno de los primeros en describir los tiARNs como una nueva clase de ARNs que podrían estar asociados a proteínas Argonautas PIWI y liberarse al espacio extracelular (Garcia-Silva et al., 2010a,b, 2012, 2014).

## 1.2 piARNs

Los primeros piARNs fueron descubiertos en células de la línea germinal de *Drosophila melanogaster* en el año 2001, como ARNs implicados en el silenciamiento de genes y de elementos transponibles (Aravin et al., 2001). En dicho momento se consideró que lo observado era tan solo una variante del mecanismo general de interferencia, por lo que no se los expuso como un nuevo grupo hasta más adelante. En 2006, mediante inmunoprecipitación se comprobó que estos ARNs se asociaban a PIWI, un clado de proteínas Argonautas distinto al que los otros pequeños ARNs interactúan; esto se vió tanto en testículos de ratón (Aravin et al., 2006; Girard et al., 2006; Grivna et al., 2006) como en la línea germinal de *Drosophila* (Vagin et al. 2006). Además se reportó que los piARNs eran generados de forma independiente de las proteínas *Dicer* (Vagin et al. 2006), una diferencia particular con los otros pequeños ARNs. Estos hallazgos llevaron a la agrupación de estos ARNs en un nuevo grupo. Además, permitió que se especule la existencia de una maquinaria ancestral relacionada con piARNs que podría haber evolucionado hacia una vía más sofisticada en eucariotas evolucionados.

Los piARNs tienen aproximadamente 30 nucleótidos, siendo los más largos entre los pequeños ARNs clásicos. Con algunas pocas excepciones, todos los animales utilizan piARNs para reprimir transposones (Cecere et al., 2012; Gu et al., 2012; Ruby et al., 2006). Su función canónica es el silenciamiento (clivaje) de transcritos de TEs (elementos transponibles) en el citoplasma de células germinales. Los TEs constantemente invaden genomas eucariotas pudiendo incorporarse a los mismos. Es por ello que la vía de proteínas PIWI juega un rol clave en mantener la integridad del genoma del hospedero (Brennecke et al., 2007; Gunawardane et al., 2007; Reuter et al., 2011). En algunos animales, los piARNs operan a nivel nuclear silenciando TEs nacientes mediante metilación y cambios represivos en las histonas (Aravin et al., 2008; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008; Le Thomas et al., 2013). Otra función reportada para los piARNs es la defensa antiviral. Se ha observado que en metazoarios algunos elementos endógenos virales (EVEs) también producen piARNs (Ter Horst et al., 2019) sugiriendo que la célula puede usar la vía de

defensa contra transposones, para EVEs. De esta manera, se poseería memoria de inmunidad secuencia específica antiviral, análoga a la inmunidad de CRISPR-Cas en procariontes (Ophinni et al., 2019).

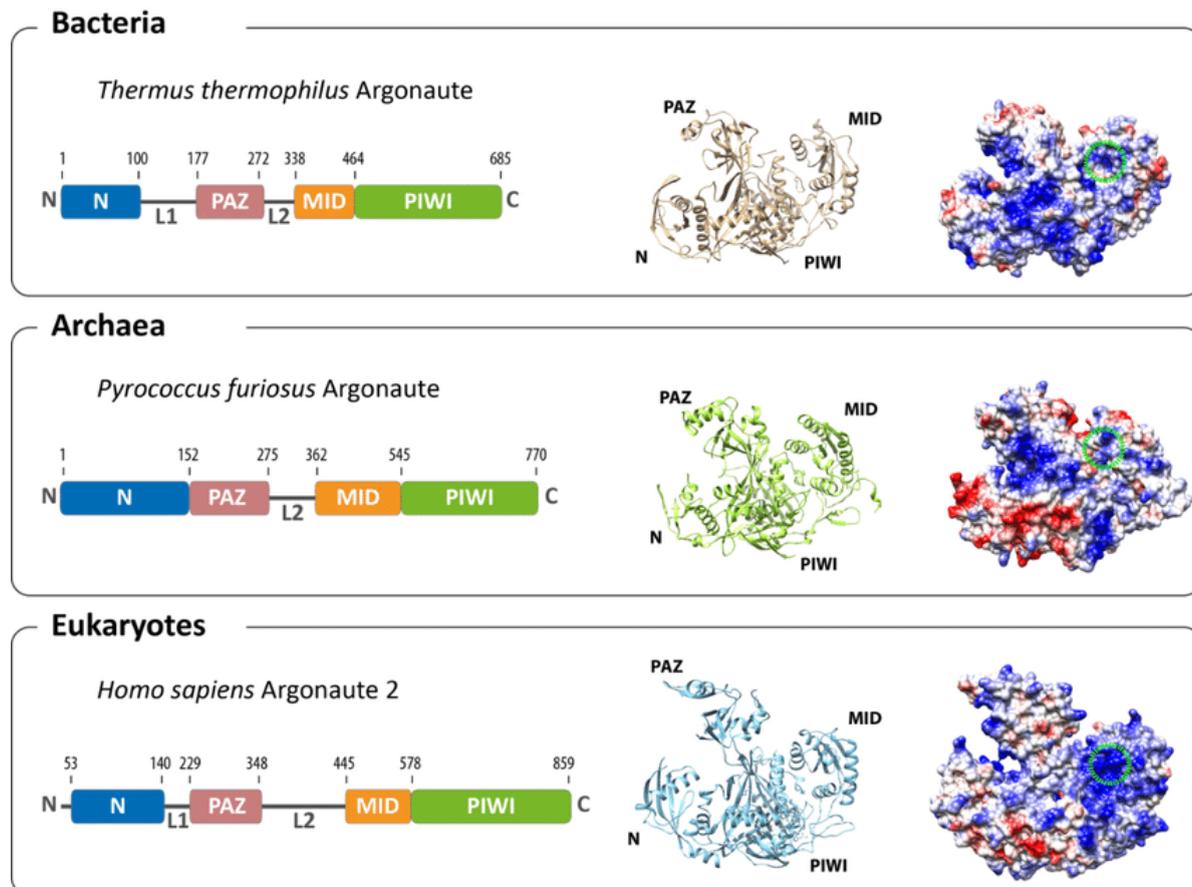
Otros estudios recientes también afirman que los piARNs tienen roles a nivel somático, entre ellos en *D. melanogaster* se detectó presencia de piARNs silenciando transposones en tejido graso (Jones et al., 2016) y en cerebro (Perrat et al., 2013). En otra revisión, se logró mostrar que en artrópodos hay presencia de piARNs a nivel somático, los cuales actúan atacando transposones (Lewis et al., 2017). En *Schmidtea mediterranea* (platelminto), se demostró que los piARNs son importantes para el mantenimiento y regeneración de células madre (Palakodeti et al. 2008; Reddit et al. 2005). También se reportó que estos ARNs contribuyen a la generación de memoria a nivel del sistema nervioso central del molusco *Aplysia californica* (Rajasethupathy et al., 2012). En *Caenorhabditis elegans*, una vía de piARNs inhibe la regeneración axonal (K. W. Kim et al., 2018). Estas revisiones dejan en evidencia la incompleta comprensión del campo de los piARNs, ya que estos pequeños ARNs abarcan más allá de la línea germinal y el silenciamiento de transposones en este contexto.

A diferencia de lo que sucede con los miARNs y siARNs, los piARNs canónicos son sintetizados en *locis* específicos llamados *clusters* de piARNs en el genoma. Se producen como largos transcritos de ARN simple hebra que después son clivados por enzimas especializadas, independiente de *Dicer*, en fragmentos de 23-32 nucleótidos (Vagin et al., 2006). Luego son covalentemente modificados a nivel de su extremo 3', añadiendo un grupo 2'O-metilo, y son reconocidos por las proteínas PIWI. De esta manera, los piARNs buscan ARNs complementarios, para poder clivarlos y/o establecer modificaciones a nivel de la cromatina para que adopte formas represivas, como ya se mencionó (Le Thomas et al., 2013; Sienski et al., 2012). Se ha propuesto que el sitio donde están los clusters de piARNs es inusualmente atractivo como sitio de "aterrijaje" de los TEs, actuando como trampas para estos (Malone et al., 2009), razón por la cual contienen un récord amplio de transposones que invadieron en el pasado. De esta forma el genoma contiene una *hit list* de transposones que necesitan ser inactivados durante el periodo vulnerable al ataque de estos en la gametogénesis.

### 1.3 Proteínas Argonautas

Las proteínas Argonauta se encuentran en Bacterias, Eucariotas y Archaea, las mismas basándose en su agrupación filogenética, se clasifican en la subfamilia Argonaute-like (AGO) y la subfamilia PIWI-like (PIWI) (Carmell et al., 2002).

Las proteínas Argonautas son de aproximadamente 100 kD y altamente básicas (Cerutti et al. 2000). Las mismas se componen de 800-1500 aminoácidos, y presentan 3 dominios principales: PAZ, MID y PIWI. Como ya se hizo una breve mención anteriormente, su función principal consiste en unir ARNs pequeños reguladores y silenciar la expresión génica. Al complejo que forman las proteínas Argonautas y las asociadas se le conoce como RISC (RNA-induced silencing complex).



**Figura 1.** Imagen extraída de Willkomm et al., 2015 donde se muestra la estructura de algunas proteínas Argonautas, cada una representante de uno de los tres dominios de la vida. Se observa la composición del dominio (izquierda), estructuras (medio), y la distribución de cargas de superficie (derecha) (azul: cargado positivamente, rojo: cargado negativamente).

En la primera fila se representan las bacterias, basándose en *Thermus thermophilus* (PDB: 3DLH), en la segunda fila, Archaea basándose en *Pyrococcus furiosus* (PDB: 1U04) y en la tercera fila, Eucariotas, basándose en la Argonauta 2 del ser humano (PDB: 4EI3) Se evidencia una arquitectura evolutivamente conservada en todas las Argonautas. (Willkomm et al., 2015).

A nivel tridimensional, los dominios MID y PIWI interaccionan en gran parte de su extensión. El dominio PAZ es llamado así por encontrarse tanto en proteínas PIWI, Argonautas, y Zwiille. PAZ es responsable de anclar el extremo 3' del ARN guía, mientras que el dominio MID une al fosfato 5' del ARN guía. El dominio PIWI posee una estructura terciaria tipo ARNasa H con un centro catalítico (Hutvagner & Simard, 2008). Este dominio es el que realiza el clivaje del ARN blanco mediante su actividad nucleasa dada por una triada catalítica que suele ser DDH (Asp-Asp-His), aunque puede haber variaciones en el tercer aminoácido (Rivas et al., 2005; Saito et al., 2006). La sustitución de alguno de dichos residuos en la PIWI de ratón (MIWI) genera pérdida de función en la actividad endonucleasa contra el ARN blanco (De Fazio et al., 2011; Reuter et al., 2011) evidenciando la importancia de este motivo para la función del sistema.

Cabe recalcar que interesantemente hay proteínas Argonautas que su actividad endonucleotídica está inactivada, a pesar de tener sus residuos catalíticos conservados. Esto permite especular que poseen modificaciones post-traduccionales que contribuyen a la actividad de clivaje del dominio PIWI (Höck & Meister, 2008).

## 1.4 PIWI

### 1.4.1 Estructura y función de proteínas PIWI

Todas las proteínas de la familia PIWI presentan un dominio PIWI altamente conservado enriquecido por residuos altamente cargados y básicos (Cox et al., 1998). Las proteínas PIWI (P-element induced wimpy testis) deben su nombre a que en *Drosophila* la mutación de PIWI inducía deficiencias funcionales en los testículos. Las PIWI son altamente conservadas evolutivamente y desempeñan un papel crucial en la auto renovación de células madre y gametogénesis (Cox et al., 1998; Sharma et al., 2001).

El genoma humano codifica para 4 proteínas PIWI, PIWI-like 1 a 4, codificadas en el cromosoma 12, 11, 22 y 8 respectivamente (Aravin et al., 2006; Ross et al., 2014; Sasaki et al., 2003).

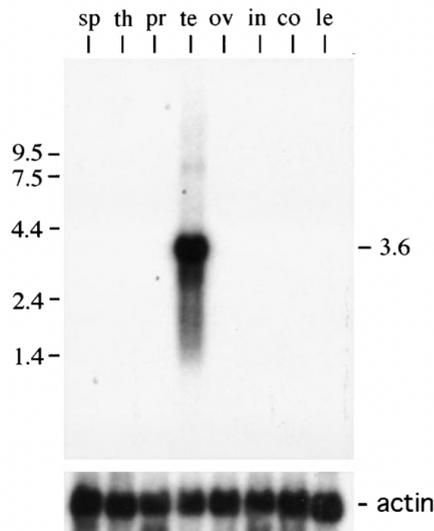
Dentro de la línea germinal, las proteínas PIWIs son muy abundantes como así también los piARNs. Como se hizo mención anteriormente, dichos ARNs garantizan la integridad del genoma de las células germinales (Czech et al., 2018; Jeong et al., 2021) por lo que no sorprende que se encuentren en mayor nivel en estos contextos.

Un aspecto interesante de las PIWIs es que, frente a mutaciones en sitios específicos del ARN blanco, el clivaje realizado por PIWI no se ve reducido. Esto se debe a que la complementariedad parcial de bases del blanco con los piARNs es suficiente para activar su actividad ARNasa (Gainetdinov et al., 2023). Lo que determina que, a diferencia del clado AGO y el reconocimiento de sus ARN blanco, cuando se trata de PIWI los transposones enfrentan una mayor dificultad para evadir el silenciamiento (Gainetdinov et al., 2023).

En el caso de las AGO de plantas y animales, se requiere de una región semilla canónica ubicada en el ARN blanco hacia 5' (nucleótidos g2–g8), y el apareamiento debe ser ininterrumpido desde dicha semilla hasta los nucleótidos más allá del enlace escindible (Becker et al., 2019). En cambio, las proteínas PIWI se unen a los ARN haya o no complementariedad con la semilla canónica 5' de su guía, pudiendo el complejo piARNs-RISC escindir eficientemente blancos que carecen de complementariedad total con la semilla 5' canónica (Gainetdinov et al., 2023). El clivaje realizado por PIWI requiere de al menos 15 nucleótidos contiguos que estén apareados con el ARN guía. Cuanto mayor sea la extensión de dicha complementariedad, se podrán tolerar *mismatches* guía:blanco esencialmente en cualquier posición (Gainetdinov et al., 2023). Dicha cualidad de PIWI le confiere una mejor capacidad para procesar nuevos y divergentes transposones endógenos, sin la necesidad de que aparezcan nuevos pequeños ARN guías.

Las propiedades catalíticas de las proteínas PIWI evolucionaron para evitar que los transposones escapen del silenciamiento a través de mutaciones y, al mismo tiempo, conservan suficiente especificidad para evitar que las transcripciones endógenas del hospedero, tales como ARNm e lncRNAs, sufran de una represión inapropiada (Gainetdinov et al., 2023). Esta particularidad, muestra capacidad de distinguir lo propio de lo no propio tal como lo hace el sistema inmune. Se desconocen cuales son los mecanismos subyacentes que impiden el ataque de ARN endógeno.

## 1.4.2 PIWIL1



**Figura 2.** Northern Blot de PIWIL1 en diferentes muestras de tejido humano adulto con su respectivo control de actina (inferior). Bazo (sp), timo (th), próstata (pr), testículos (te), ovario (ov), intestino delgado (in), colon (co), leucocitos sangre periférica (le). Extraído de Qiao et al., 2002.

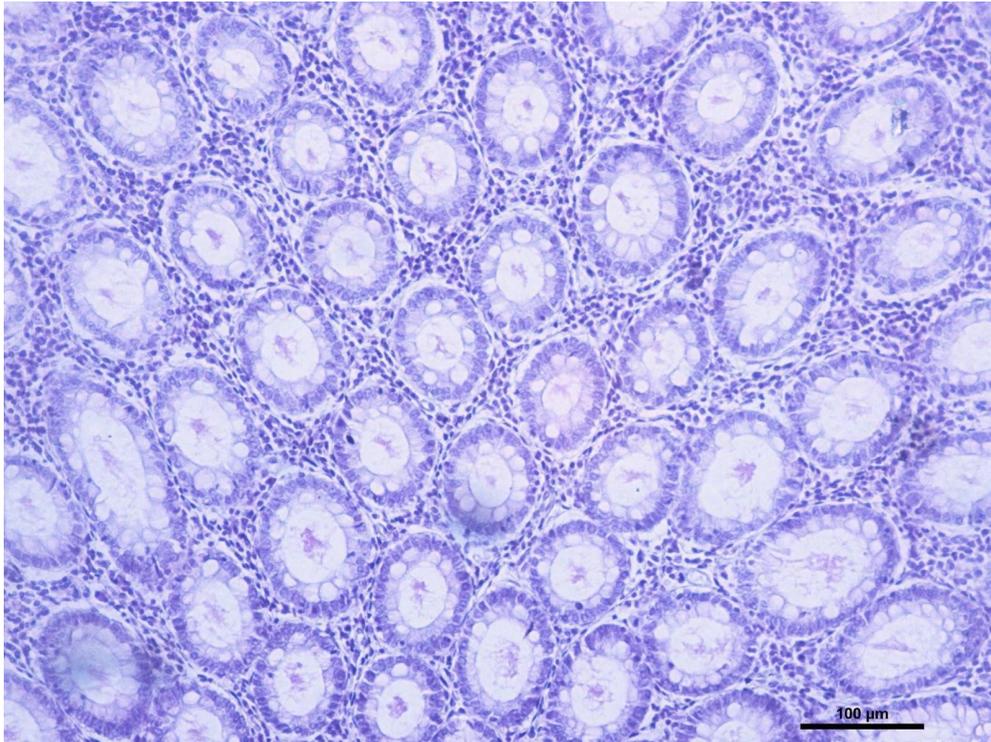
PIWIL1 en humanos, codifica un transcrito de 3,6 kb que se detecta en gran nivel en testículos tal como se ve en la figura 2. El gen para PIWIL1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 12, banda q24.33 (Qiao et al., 2002). La expresión de esta proteína es específica de células germinales durante la espermatogénesis (Qiao et al., 2002).

## 1.5 Cáncer de colon como modelo de estudio de PIWIL1

### 1.5.1 Estructura y función del colon

Para introducir las bases fundamentales del modelo de estudio en el presente trabajo, es necesario hacer una breve mención a su estructura histológica y sus funciones en un contexto anatomofisiológico. En este sentido, se denomina colon a la porción del intestino grueso que procede al ciego y precede al recto. Consta el mismo de tres partes, colon ascendente, transversal y descendente. Su principal rol se basa en la reabsorción de fluidos y electrolitos, así como la formación de heces.

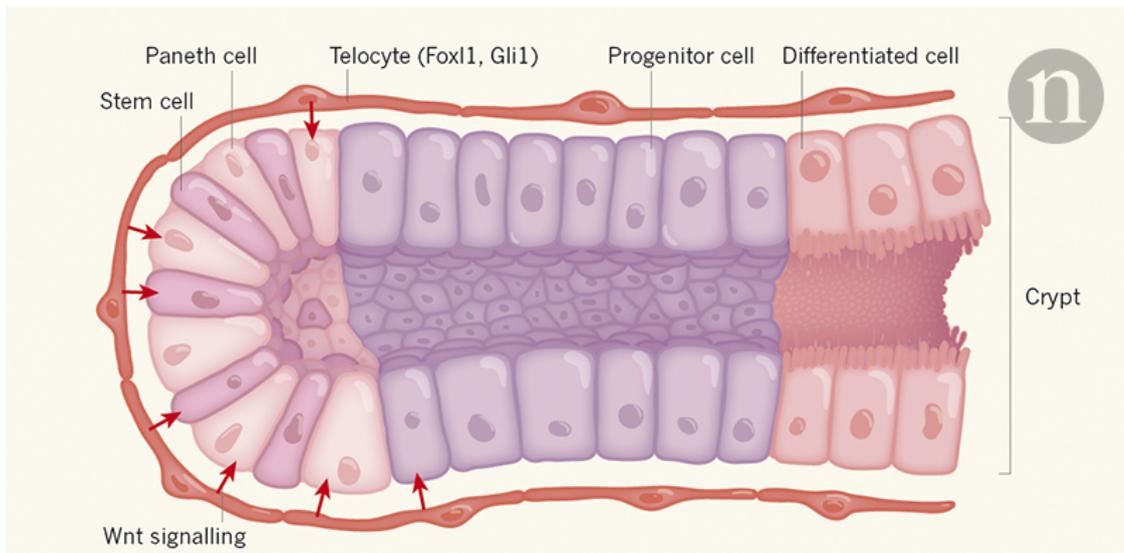
A nivel estructural microscópico, el colon se compone de las cuatro capas características del tracto gastrointestinal: capa mucosa, capa submucosa, capa muscular y capa adventicia o serosa. Las mucosas, que revisten las paredes de órganos huecos, se encuentran en contacto directo con la luz tubular. Posee dicha mucosa, un epitelio de revestimiento que está en contacto con la luz del órgano, luego una lámina propia de tejido fibrocolagenoso laxo. En el caso de los órganos que componen el tubo digestivo, se cuenta con una mucosa muscular compuesta de músculo liso.



**Figura 3.** Mucosa del colon, glándulas de Lieberkühn en corte transversal. Técnica: Hematoxilina-Eosina. Preparado disponible en el microscopio virtual del Departamento de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina, Universidad de la República.

Las Criptas de Lieberkühn, también llamadas glándulas intestinales, son glándulas exocrinas tubulares de epitelio simple que corresponden a las invaginaciones de forma tubular del epitelio intestinal observadas en la figura 3 y 4. Ocupan desde la luz del tubo digestivo hasta la capa muscular de la mucosa. En la parte inferior de cada cripta tal como se ve en la figura 4, se encuentran una pequeña cantidad de células madre dividiéndose constantemente para dar lugar a células progenitoras amplificadoras (Samuelson, 2018). Estas células progenitoras se dividen en varios tipos de células epiteliales que forman el revestimiento intestinal. Las células diferenciadas continúan migrando hasta alcanzar la región apical de la luz de la cripta, y son responsables de producir enzimas digestivas, sustancias bactericidas y péptidos reguladores.

En colon a las Criptas de Lieberkühn se les refiere como criptas colónicas. Una de las principales diferencias con las situadas en el intestino delgado, es que las células caliciformes (que secretan moco) se vuelven más frecuentes y carecen de células de Paneth (células inmunitarias especializadas) (Samuelson, 2018). En colon tampoco hay presencia de vellosidades intestinales (que sí están presentes en el intestino delgado).



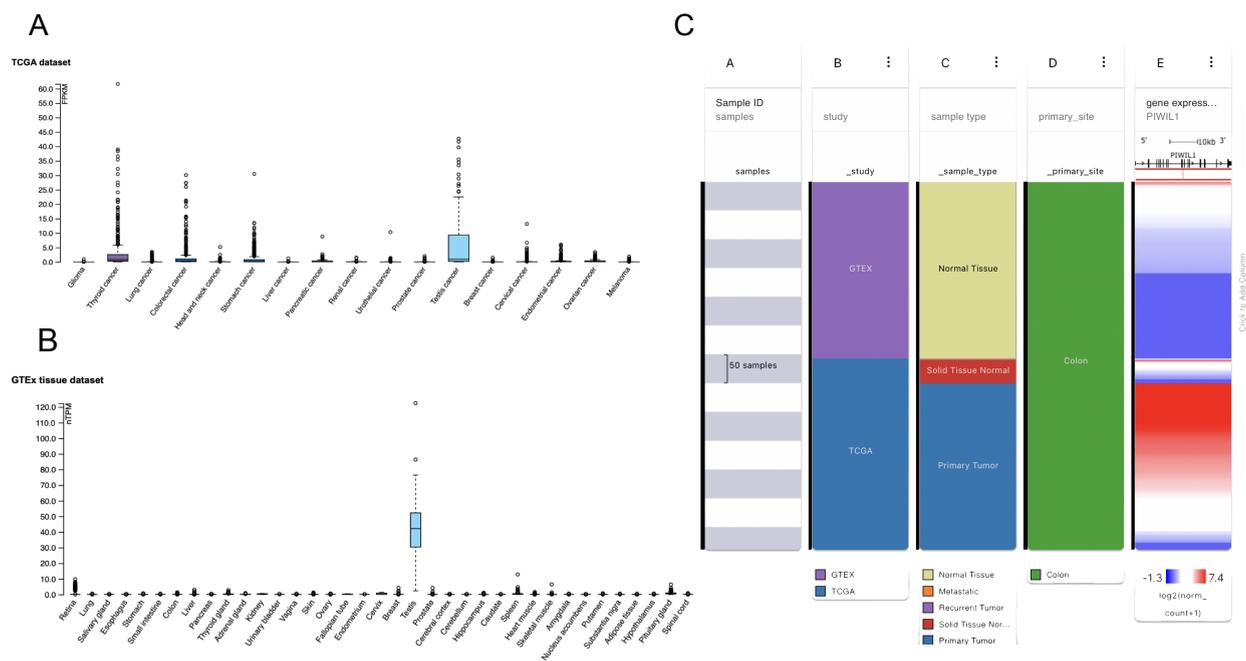
**Figura 4.** Estructura genérica de Cripta de Lieberkühn, extraído de Nature, Samuelson, L. C, 2018. En la misma se observa la base con el nicho de células madre intestinales, las cuales generan hijas altamente progenitoras capaces de diferenciarse en los distintos tipos celulares característicos de las criptas.

### 1.5.2 Cáncer de colon y PIWIL1

El cáncer por su parte, es un grupo de enfermedades genéticas y/o epigenéticas. Estas enfermedades son multicausales y tienen en común que involucran el crecimiento celular descontrolado. Cada cáncer tiene sus características únicas, y esta variabilidad implica que virtualmente el mismo puede desarrollarse en cualquier tejido corporal. Hay dos categorías principales de genes cuya expresión y modulación juega un rol muy importante en el desarrollo del cáncer. En sus formas normales estos controlan el ciclo celular ya sea promoviendo el crecimiento y división celular (protooncogenes), o inhibiendo (supresores tumorales).

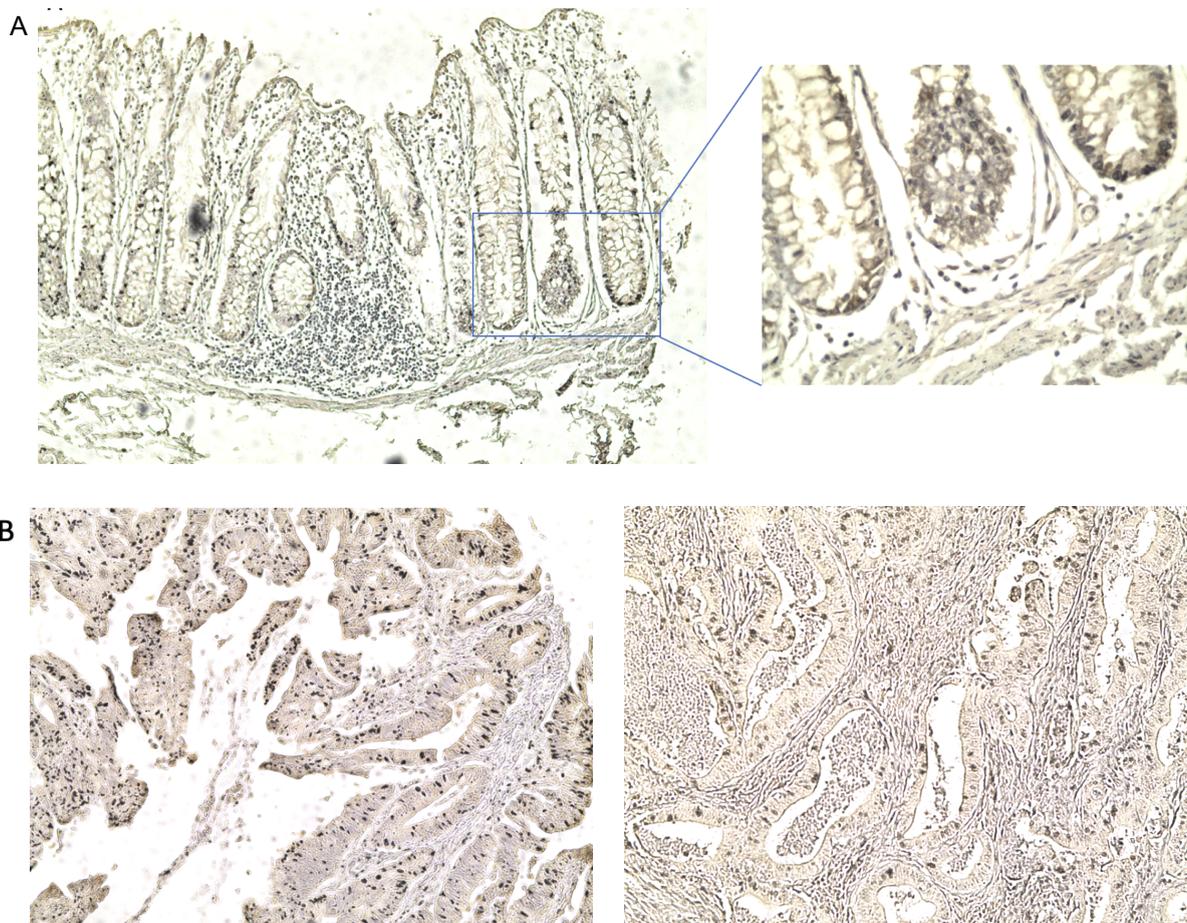
Dentro de los distintos cánceres, el cáncer colorrectal (CCR) es uno de los que mayor incidencia y mortalidad posee, tanto a nivel mundial como en nuestro país. De hecho, en Uruguay si se consideran ambos sexos en conjunto, ocupa el segundo lugar tanto en incidencia como en mortalidad. Tomando en cuenta datos del Ministerio de Salud Pública, cada año, se diagnostican en todo el territorio nacional unos 2000 casos por año y fallecen aproximadamente 1000 personas a causa de CCR. Aproximadamente un 4% de los uruguayos serán diagnosticados con CCR en algún momento de sus vidas.

La mayoría de los CCR son adenocarcinomas, los cuales se forman en las células epiteliales que secretan líquido o moco. Se estima que el proceso de transformación maligna de los adenomas (tumor benigno) podría ser de aproximadamente 10 años. Se trata de un cáncer potencialmente evitable o detectable en una etapa temprana de su desarrollo (Mandel et al., 1993).



**Figura 5.** En A y B se grafica la Expresión de PIWIL1 en distintos órganos, extraído de The Protein Atlas. En A se observa la expresión de PIWIL1 en pacientes oncológicos de la base de datos TCGA (The Cancer Genome Atlas). En B se observa lo mismo pero para pacientes sanos de la base de datos GTEx (Genotype-Tissue Expression). En C, se esquematiza la correspondencia entre las muestras (samples) de pacientes de TCGA, el tumor primario a nivel de colon y un aumento en la expresión relativa de PIWIL1 (en rojo). Los pacientes de GTEx se corresponden con el tejido normal (Solid Normal Tissue) y una menor expresión relativa de PIWIL1 (azul). Con respecto a tejido sólido normal (solid tissue normals) indica tejido cercanos al tumor de pacientes con CCR (dichas muestras son limitadas).

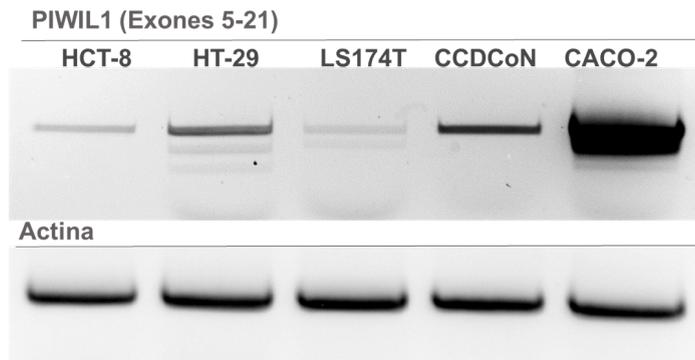
La expresión aberrante de PIWIL1 y otras proteínas pertenecientes a la vía de los piARNs han sido reportadas en cáncer (Li et al., 2020; Shi et al., 2020), incluido en CCR (Genzor et al., 2019; Wang et al., 2015). Entre otras proteínas que se han encontrado aumentadas se encuentra HENMT1, enzima que genera el marcaje del extremo 3' con la O metilación de los piARNs (Begik et al., 2020). El aumento en los niveles de expresión de PIWIL1 en cáncer se puede apreciar en la figura 5 A y B donde se muestra información obtenida a partir de dos bases de datos diferentes, TCGA, de pacientes oncológicos y GTEx, de pacientes sanos. Se observa como PIWIL1 está aumentada en pacientes con CCR (así como en otros tipos de cáncer como testículos, tiroides y gástricos). En la figura 5C se esquematiza la correlación entre los pacientes no sanos con CCR y la mayor expresión de PIWIL1.



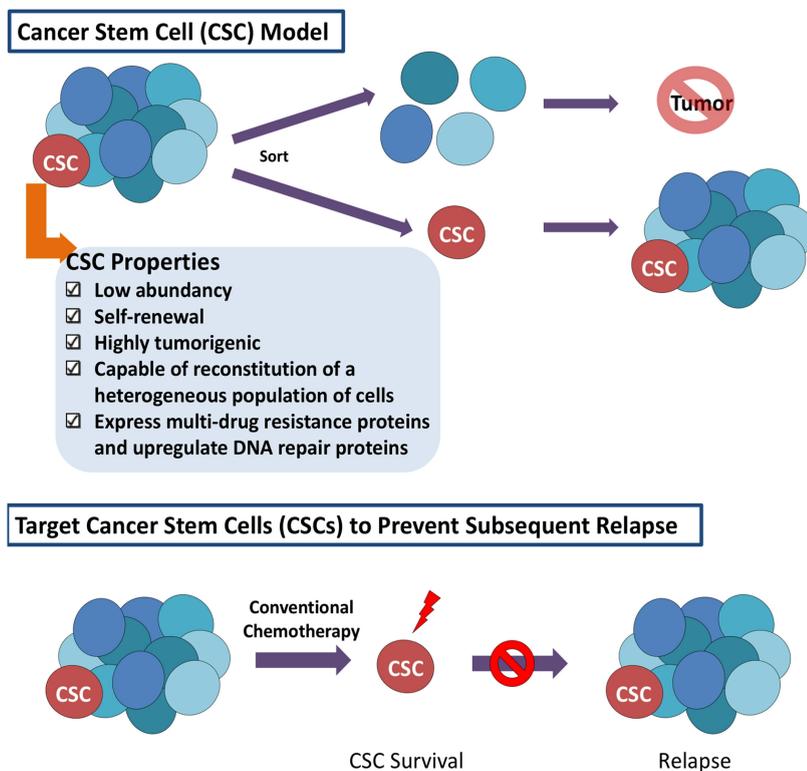
**Figura 6.** Expresión de PIWIL1 en pacientes sanos (A) donde se encuentra localizada principalmente en las bases de las criptas vs pacientes con CCR (B) donde se observa su amplia distribución en el Adenocarcinoma (muestras de Tissue Array, tinción realizada mediante inmunohistoquímica por García-Silva et al., en preparación).

Tal como se aprecia en la figura 6A en muestras de tejido normal derivadas de colon, PIWIL1 se observa en el nivel del nicho de la cripta del colon, asemejándose a la localización canónica de PIWIL1 en células madre de *Drosophila* (King et al., 2001; Szakmary et al., 2009).

Resultados preliminares del grupo arrojan indicios de que PIWI, concretamente PIWIL1, desempeña un papel clave en regular la progresión del ciclo celular en CCR. La expresión de PIWIL1 se puede detectar en distintos linajes celulares derivados de CCR, tal como se ve en la figura 7 (García-Silva et al., en preparación). También se observó que cuando estos linajes se someten a diferenciación, se pierde la expresión de PIWIL1 (García-Silva et al., en preparación). Esto sugiere que la expresión de esta proteína podría estar restringida a células pluripotenciales y cancerosas .



**Figura 7.** RT-PCR de los exones 5-21 para PIWIL1 en diferentes Líneas Celulares de Cáncer de Colon las cuales se indican en cada carril. Hacia inferior se observa un control de actina para cada una de las líneas correspondientes (García-Silva et al., en preparación)



**Figura 8.** Extraído de Desai et al., 2019. Se muestra el concepto de las células madre cancerosas (CSC). Las células tumorales son sumamente heterogéneas y contienen en su mayoría células pobremente tumorigénicas y una pequeña población de CSC. Estas CSC se distinguen funcionalmente de otras poblaciones por su habilidad de poder reconstruir un tumor si fueran trasplantadas en un ratón inmunocomprometido.

Es probable que las células cancerosas que se dividen rápidamente adopten y utilicen mecanismos de auto renovación similares a los que se utilizan en las células madre y germinales (resumidos en figura 8). Estas células madre cancerosas (CSC) se caracterizan por su capacidad de autoregeneración y habilidad de reconstituir una población sumamente heterogénea, contribuyendo así a los mecanismos moleculares de la carcinogénesis. Se

cree que las CSC tienen un papel fundamental en la iniciación, progresión y resistencia al tratamiento del cáncer. La reactivación de las vías biológicas que regulan las células madre y germinales permiten dirigir al tumor a evitar mecanismos como muerte celular programada y adquirir resistencia a quimioterapia y radioterapias, como a otros fármacos. Las CSC han sido reportadas en distintos tipos de cáncer, incluidos el CCR (Desai et al., 2019), por lo que poder identificar marcadores específicos de las CSC representa una estrategia terapéutica prometedora.

Teniendo en cuenta la reactivación de la vía de las PIWI encontrada en CCR consideramos que este modelo nos permite explorar la intrincada relación potencial entre PIWIL1 y la pluripotencialidad en el contexto del tejido colorrectal.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Obtención y estudio de localización subcelular de diferentes construcciones de PIWIL1 etiquetadas con proteínas fluorescentes en línea celular de cáncer de colon.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Obtención mediante clonado de diferentes construcciones basadas en la secuencia de la isoforma principal de PIWIL1 obtenida en el genoma de referencia.
2. Caracterizar la localización subcelular de dichas construcciones mediante microscopía confocal.
3. Acercarnos a determinar la localización subcelular de PIWIL1 empleando diferentes marcadores celulares para su co-localización.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1 Diseño de cebadores

Los cebadores para realizar las diferentes construcciones se diseñaron utilizando SnapGene Viewer basándose en el genoma de referencia (secuencia codificante). Los 4 pares de cebadores debían amplificar: una región que contiene la NLS (señal de localización nuclear) predicha<sup>1</sup> (Exones 1 al 3), Dominio PIWI (Exones 10-21) que carece de la NLS, Isoforma 1 PIWI completa (Exones 1-21) e Isoforma 2, que carece de la NLS (Exones 4-21).

Después de seleccionar las secuencias que se utilizarían como cebadores para cada uno de los amplicones, se les agregó la secuencia correspondiente para el reconocimiento de

---

<sup>1</sup> La predicción de la NLS fue obtenida a partir del programa "NLS mapper".

las ER (enzimas de restricción) por medio de funciones de SnapGene. Este agregado de dichas secuencias era necesario para el posterior clonado, y consistió en el sitio de reconocimiento de EcoR1 para los cebadores directos y de BamH1 para los reversos. Se consideró que el porcentaje GC sea el acorde (entre 40 y 60%) y que las temperaturas de fusión de cada par sean similares, y estén en el rango apropiado (cerca a los 60°C). Para evaluar la propensión a la formación de dímeros entre ambos cebadores u horquillas se utilizó la herramienta bioinformática OligoAnalyzer de IDT (Integrated DNA Technologies Inc, USA). También se hizo uso de Primer-BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para evaluar si dichos cebadores podrían solaparse con otras regiones de genes. Los cebadores diseñados fueron sintetizados por IDT.

El diseño de los cebadores utilizados puede verse en la Tabla 2, donde también se detalla la región que flanqueaban cada par de cebadores, el largo del amplicón correspondiente y si poseía la señal de localización nuclear.

**Tabla 2.** En la primera columna se observan las regiones que flanqueaban cada par de cebadores, representando cada par una construcción. En la segunda columna, se ven las secuencias correspondientes a cada cebador en sentido 5'→3'. Dentro de cada par las secuencias superiores corresponden a los cebadores directos (indicadas con "F"), mientras que los inferiores corresponden a los cebadores reversos ("R"). La tercera columna muestra el tamaño del amplicón en pares de bases (pb) y la última columna indica si hay presencia de NLS en el amplicón.

Construcción (exones)	Secuencia 5'→3'	Largo del amplicón (pb)	NLS
1-21	F GAATTCTATGGCGTACAGACACGAGGC R GGATCCTAAGCAGAATTCCAGTGACAGATTTGGCTCTCTG	2823	si
4-21	F GAATTCCATGATCTTGGTGTGAATACAAGG R GGATCCTAAGCAGAATTCCAGTGACAGATTTGGCTCTCTG	2304	no
1-3	F GAATTCTATGGCGTACAGACACGAGGC R GGATCCGCTGAATATAACCAGGTTGCTGACT	364	si
10-21	F GAATTCAGAGATCACCGACTTGAAGCA R GGATCCTAAGCAGAATTCCAGTGACAGATTTGGCTCTCTG	1507	no

### 3.2 Extracción de ARN

Para extraer el ARN de las Caco-2 que disponía previamente el laboratorio, en primer lugar se llevó a cabo un lisado celular en las placas de cultivo utilizando tri-reactivo (Tri reagent o trizol). Este reactivo se dejó actuar 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió cloroformo para obtener la separación de fases: la acuosa (ARN), la interfase (ADN) y la fase inferior roja orgánica (proteínas). Se aspiró la fase acuosa, y se añadió isopropanol

para precipitar el ARN. Después de sacar el sobrenadante, se le añadió etanol 70%. Tras centrifugar y secar el pellet, se resuspendió en agua. El ARN total obtenido se cuantificó por espectrofotometría (A260).

### 3.3 Síntesis de cADN

Para la retrotranscripción se tomó como molde 2 ug del ARN previamente extraído y cuantificado. Inicialmente, se colocaron 11  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O junto con 1  $\mu$ L de Oligo (dt) a 500  $\mu$ g/ml y se sometió a 70°C por 10 minutos, luego se enfrió en hielo. Se continuó preparando la reacción a un volumen final de 20  $\mu$ L, utilizando 1  $\mu$ L de transcriptasa reversa (M-MLV de Promega), 4  $\mu$ L del Buffer 5x específico para la transcriptasa reversa, y 2  $\mu$ L de dNTPs (10mM).

La mezcla total se incubó por 50 minutos a 42°C. Luego se detuvo la reacción por calentamiento a 70°C por 15 minutos.

### 3.4 PCR a tiempo final

Tanto los amplicones de interés como los controles de los clonados se amplificaron mediante PCR a tiempo final. En el caso de los amplicones, se partió de cADN de Caco-2, mientras que para el control de los clonados se utilizó como ADN molde el plásmido purificado. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando la ADN taq polimerasa de NZYtaq II de alta fidelidad. En todos los casos se realizó la reacción en un volumen final de 50  $\mu$ L, 5 U por reacción de la Taq polimerasa (concentración stock de 5 U/ $\mu$ L), los cebadores a una concentración final de 0,5  $\mu$ M, los dNTPs a una concentración final de 0,5 mM cada uno, Reaction Buffer a 1x y MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM concentración final.

En todos los casos se preparó un "mastermix" para todas las reacciones y luego se dividió en los tubos correspondientes, con el fin de evitar errores experimentales.

Las condiciones en las que se llevaron a cabo las reacciones fueron las establecidas por el protocolo, inicial 95°C 3 minutos, luego 94°C 30 segundos, 60°C 30 segundos, 72°C 2-4 minutos (dependiendo el tamaño del amplicón) durante 30 ciclos. Y por último 10 minutos a 72°C.

### 3.5 Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración de ácidos nucleicos en solución incluyendo los productos de PCR, el ADN plasmídico purificado y el ARN fue determinada por espectrofotometría. Para ello se empleó el espectrofotómetro DeNovix DS-11. En el análisis por espectrofotometría, se mide la absorbancia de la muestra en diferentes longitudes de onda para obtener un espectro de absorción. Mediante este aparato se midió la absorción de luz a 260 nm dado que a esta longitud de onda las bases púricas y pirimidínicas de ácidos nucleicos presentan un máximo de absorción. Se considera que una unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 50 g/mL de ADN de doble cadena. Se cuantificó también la absorción a 280 nm, ya que las proteínas presentan absorbancia máxima para dicha longitud, y estableciendo la relación con de absorbancia 260/280 se puede estimar la pureza de los ácidos nucleicos. Se considera que la solución está en el rango de la pureza si la relación ronda entre 1.8 y 2.1.

### 3.6 Purificación del ADN

La purificación de los productos de los PCR se realizó utilizando el kit de NucleoSpin “Gel and PCR Clean-up, Mini kit”. Se siguió el protocolo administrado por el kit, obteniendo el ADN purificado que eluye por las columnas.

### 3.7 Digestión

Se utilizaron las enzimas de restricción BamH1 y EcoR1 20 U/μL. Tal como indicaba el NebCalculator, se utilizó el buffer r3.1 de Neb. Se incubó la reacción por 1 hora a 37 °C.

Secuencia que reconoce EcoR1:



Secuencia que reconoce BamH1:



El corte se realiza en cada una de las hebras, en las posiciones señaladas por las flechas en cada una de las hebras que conforman el ADN doble hebra. En ambas secuencias se generan extremos cohesivos.

**Tabla 3.** Reactivos utilizados para las digestiones

Reactivo	Concentración Stock	Volumen Pipeteado
EcoR1	20 U/ μL	1 μL
BamH1	20 U/ μL	1 μL
Buffer r 3.1	10x	5.0 μl
ADN	-	-
Agua Estéril	-	c.s.p 50 μl

### 3.8 Ligación

El plásmido pGEM®-T Easy (Promega) es un vector de clonado AT. Esto implica que en su conformación lineal posee en ambos extremos 3' timidinas, lo que lo hace apropiado para la inserción y ligación de productos de PCR en cuyos extremos poseen adeninas terminales. El kit provee de una ligasa T4 y un buffer de ligación, que permite que la reacción se

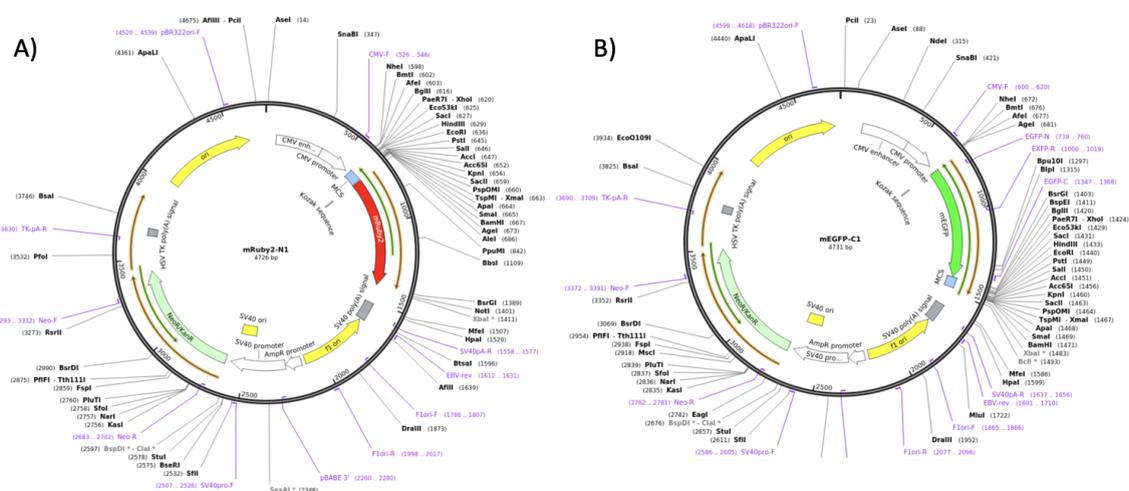
complete en 1 hora incubando a temperatura ambiente. Además, la secuencia nucleotídica del vector contiene los promotores T7 y SP6. Ambos promotores se encuentran flanqueando la región de multiclonaje, que contiene el gen lacZ. Esto último implica que si el gen de interés se inserta en esta región, las bacterias transformadas pueden ser identificadas a través del sistema alfa-complementación (Blanco/azul). Esto se debe a que, si lacZ se interrumpe y no se expresa Beta-galactosidasa, no se hidroliza el X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) adicionado, que es quien en última instancia produce la coloración azul.

La inducción de la expresión de lacZ se lleva a cabo utilizando el inductor gratuito IPTG (isopropil-B-D-1-tiogalactopiranosido). IPTG permite inactivar el represor LAC, dado que IPTG tiene función análoga estructuralmente a la alolactosa. La ventaja de usar IPTG radica en que es un inductor cuya concentración permanece constante en el medio de cultivo ya que la bacteria no lo metaboliza. Una vez dada la unión entre IPTG y el represor, la ARN polimerasa puede unirse al promotor y comenzar a transcribir las secuencias codificadas.

**Tabla 4.** Reactivos utilizados para las ligaciones

Reactivo	Concentración Stock	Volumen Pipeteado
Buffer	2x	5.0 μl
ADN (inserto)	-	-
Vector	100 ng/μl	1
Ligasa T4	400 U/ μl	1
Agua Estéril	-	c.s.p 10 μl

Por otro lado, en el caso de los vectores de expresión mEGFP-C1 y mRuby2-N1 (Addgene), la enzima utilizada para ligar los insertos en ambos vectores fue la ADN ligasa T4 (Neb). Se incubó la reacción toda la noche a 4 °C. La relación inserto:vector fue de 3:1 para todos los casos.



**Figura 9.** Secuencias de los vectores de expresión utilizados. A) mRuby2-N1, disponible en <https://www.addgene.org/54614/>. B) mEGFP-C1, disponible en <https://www.addgene.org/54759/>.

El vector mEGFP-C1 (Addgene Plasmid #54759) contiene en el sector de clonado múltiple hacia 5' un sitio de reconocimiento para EcoR1 y hacia 3' un sitio de reconocimiento para BamH1. Además luego la secuencia de Kosak, codifica para mEGFP, una proteína fluorescente verde derivada de *Aequorea victoria*. La misma presenta un pico de excitación en 488 nm y un pico de emisión en 511 nm.

El plásmido mRuby2-N1 (Addgene Plasmid #54614) es un vector de expresión que al igual que mEGFP-C1 contiene en el sector de clonado múltiple hacia 5' un sitio de reconocimiento para EcoR1 y hacia 3' un sitio de reconocimiento para BamH1. Presenta esta proteína fluorescente un pico de excitación de 560 nm y un pico de emisión de 600 nm.

### 3.9 Transformación

Para introducir el ADN plasmídico en células bacterianas se utilizaron células quimiocompetentes. Se utilizó la cepa DH5-alfa de *E. coli* de alta eficiencia (Neb) dado que el laboratorio tenía a su disposición stocks de las mismas.

Para transformar las bacterias químicamente competentes en cultivo se utilizó la técnica de shock térmico. Esta consiste en la aplicación de cambios contundentes en la temperatura que generan la apertura de poros transitorios por donde se da la entrada del ADN exógeno, en este caso ADN plasmídico.

Las bacterias *E. coli* competentes mantenidas a -80 °C, se colocaron en una cubeta con hielo por 10 minutos. Se tomaron 5 uL del producto de las ligaciones previas y se mezclaron con las células competentes. La mezcla se incubó por 30 minutos en hielo. Luego, se introdujo la mezcla en un baño de agua destilada a 42°C por 30 segundos. Inmediatamente se le volvió a la cubeta con hielo donde se lo dejó 5 minutos. Una vez cumplido el tiempo, se añadió 1 mL de medio SOC (Super Optimal Broth) y se cultivaron en tubos falcon 15 mL en shaker a 37°C por 1 hora. El medio SOC contiene triptona 20 g/L y extracto de levadura a una concentración de 5 g/L, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM glucosa.

Por último, se transfirieron entre 100 y 300 uL del cultivo a placas de Petri conteniendo medio semisólido LB (Luria-Bertani) con agar 1,5% y el antibiótico correspondiente. El medio LB contiene triptona a una concentración de 10 g/L y extracto de levadura a una concentración de 5 g/L. Para mantener el equilibrio osmótico óptimo se utiliza NaCl a una concentración de 10 g/L.

Para el caso del plásmido pGem-T se utilizó el antibiótico ampicilina a una concentración final de 25 µg/µL para la selección del vector incorporado. Para seleccionar las colonias en medio semi sólido, además de la resistencia a antibiótico se utilizó la Selección Blanco-Azul, con IPTG y X-Gal. Como ya se menciono aquellas que hayan incorporado el vector con el inserto de interés se visualizaban de color blanco. En el caso de eGFP y mRuby estas se utilizó kanamicina a una concentración final de 25 µg/µL. No se utilizó IPTG porque ambos plásmidos carecían del gen lacZ.

### 3.10 "Colony" PCR

Luego de transformar las bacterias con las ligaciones, se empleó esta técnica para corroborar la presencia de clones positivos (que contengan las secuencias de interés).

El ADN molde se introduce tocando con la punta para micropipeta una colonia transformada y crecida en una placa de Petri con LB agar, e introduciendo luego la punta en el tubo de reacción de la PCR el cual contiene 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O. Se expone a 94°C por 10 minutos, donde las bacterias se lisan por el aumento de temperatura liberando el ADN para poder ser amplificado. Después, se prepara la reacción con los reactivos faltantes (cebadores, Taq, Buffer) a un volumen final de 25  $\mu$ L. Para el caso de las colonias transformadas con pGEM-T Easy se utilizó el cebador "M13 Forward", el cual ya disponía el laboratorio. Para las "Colony PCR" de mEGFP-C1 se utilizaron cebadores que ya disponía el laboratorio, un cebador directo específico del vector y un cebador reverso del exón 9 (solo para E1-E21 y E4-E21).

Se utilizó para esto la ADN polimerasa OneTaq de Neb, cebadores a una concentración final de 0,5  $\mu$ M, DNTPs a una concentración final de 200  $\mu$ M y el OneTaq Standard Reaction Buffer a 1x que ya contiene el MgCl<sub>2</sub>. Las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción fueron las siguientes:

En primer lugar 94°C 30 segundos. Luego 94°C 30 segundos, 60°C segundos por 30 ciclos y una extensión a 68 °C dependiendo del tamaño del amplicón por 30 ciclos. Por último una extensión final a 68 °C por 5 minutos seguida de 10°C por 15 minutos. Para los amplicones de mayor tamaño (E1-E21 y E4-E21) se sometió a 4 minutos de extensión mientras que para los de menor tamaño (E1-E3 y E10-E21) fueron 2 minutos de extensión.

### 3.11 "Microcultivo" PCR

Similar a lo que se realizó con la "Colony PCR" en placas de Petri con LB agar, en este caso se tomó 1  $\mu$ L de cada colonia que habían crecido en placas de 96 pocillos y se introduce en 10  $\mu$ L de agua contenidos en un tubo de reacción de PCR. Se exponen por 10 minutos a 94°C y se procede de la misma manera que en en la PCR a tiempo final de la "Colony" PCR, a un volumen final 25  $\mu$ L.

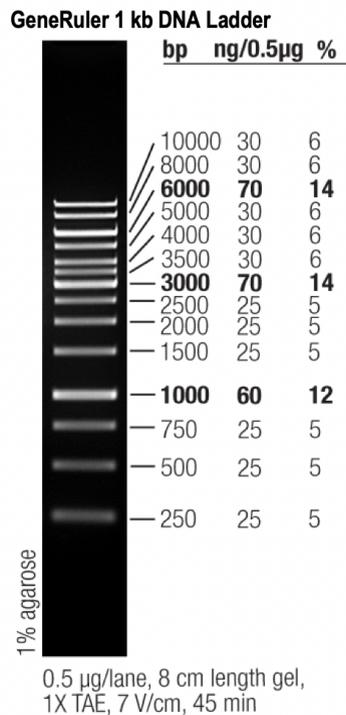
### 3.12 Electroforesis

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica utilizada para separar fragmentos de ADN. Al someterse a un campo eléctrico, las moléculas migran a distintas velocidades basándose en el tamaño en pares de bases y la conformación estructural del ADN. Otros determinantes de la velocidad son el voltaje aplicado, la temperatura, la composición del buffer de corrida y la concentración de la agarosa en el gel. Mediante el agregado de un agente intercalante de ADN y su posterior visualización bajo luz ultravioleta se visualizan la separación de los fragmentos de ADN.

En todas las corridas electroforéticas realizadas se utilizaron geles de agarosa al 1 %. Para la preparación del mismo, la agarosa se disolvió completamente en buffer TAE 1x utilizando microondas. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió el agente intercalante, que fue SYBR safe (Invitrogen). Luego de gelificada la agarosa las muestras se cargaron con buffer azul de carga (Invitrogen). Para la corrida electroforética se aplicó un voltaje de 1 a 5 V/cm. El Buffer de corrida utilizado fue TAE, que se trabajó a 1x a partir de

solución stock 50x. La solución stock 50X posee una concentración de 250 g/L de Tris base, 5,7 % ácido acético glacial y 0,05 M EDTA.

Para la corrida de las muestras se utilizó el marcador de peso molecular de GeneRuler 1kb el cual se muestra en la figura 10.



**Figura 10.** Marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder utilizado para visualizar el tamaño del ADN en todas las corridas electroforéticas en gel de agarosa 1%. Imagen extraída de Thermo scientific.

### 3.13 Crecimiento de colonias

Aquellas colonias que por PCR eran positivas se cultivaron en tubos falcon 15 mL en shaker a 37°C por 12 horas, con 4 mL de medio LB (con la misma composición que ya se detallo en la transformación, solo que sin agar) y el antibiótico correspondiente.

### 3.14 Extracción de ADN plasmídico en pequeña escala (“Miniprep”)

Para la extracción de los plásmidos de interés se utilizó el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel).

Se partió de 4 mL de cultivo de bacterias incubadas con medio LB durante 12 horas con el antibiótico correspondiente para la selección del plásmido y se lo centrifugó a 12000 rpm por 3 minutos. Luego se continuó como indica el protocolo del kit. Se eluyó en todos los casos con 35 µL de agua destilada libre de ADNasas, a 70 °C.

En síntesis, se siguió el protocolo que provee el kit comercial que permite aislar el ADN plasmídico con baja cantidad de contaminantes.

### 3.15 Preparación de ADN plasmídico a gran escala (“Midiprep”)

Para la extracción de los plásmidos de interés se utilizó el kit comercial PureLink HiPure Plasmid Midiprep (Invitrogen). Se siguió el protocolo tal cual se indicaba en el kit.

Se partió de 200 mL de cultivo de bacterias incubadas con medio LB durante 12 horas con el antibiótico correspondiente para la selección del plásmido y se lo centrifugó a 12000 rpm y 4°C por 10 minutos.

### 3.16 Cultivo celular: mantenimiento y propagación de las células

Se utilizó la línea celular Caco-2 el cual corresponde a células epiteliales derivadas de tejido colónico extraído de un hombre de 72 años con adenocarcinoma colorrectal. En Caco-2 se refleja el complejo repertorio de células encontradas en la capa epitelial intestinal (Dey & Bradbury, 2018). Esta línea celular es el utilizado como modelo en cáncer de colon (Sambuy et al., 2005). Se utiliza para investigación tanto de transporte lipídico y de drogas, estudio del ciclo celular e infecciones virales. Esta línea celular crece como una monocapa confluyente en soportes de distintos materiales como por ejemplo de plástico.

Como medio de cultivo para las mismas se utilizó DMEM-GlutaMax de Gibbco con suero bovino fetal 10% de Gibbco, el cual se le fue renovando cada 2-3 días. Para todos los casos siempre que se utilizó el medio este fue previamente termostatzado a 37 °C en un baño de agua. Para el mantenimiento adecuado de las células se hicieron “pasajes” a medida que la población aumentaba y se encontraba en crecimiento exponencial. Esto se realizó utilizando tripsina 0,25% (Invitrogen) actuando 5 minutos. Se verificó que las células la disgregación de las células mediante observación al microscopio óptico.

### 3.17 Recuento de células mediante un hemocitómetro

Para luego poder realizar la transfección de los plásmidos, se sembró  $2 \times 10^5$  células Caco-2 en cada pocillo de una placa de 6 wells, 24 horas previas al experimento. Para ello fue necesario cuantificar las células, dado que usar un número adecuado de estas asegura un crecimiento óptimo, ayuda a tener una mayor eficiencia de transfección y favorece una mejor reproducibilidad de los resultados a futuro.

Para el recuento se utilizó un hemocitómetro de 10 cuadrados de  $0,1 \text{ mm}^3$  cada uno.

$$\text{Células totales} = \frac{(\text{células totales contadas} \times \text{factor de dilución} \times 10.000 \text{ células/ml})}{\text{cuadrados contados}}$$

El factor de correlación  $10^4$  convierte  $0,1 \text{ mm}^3$  a 1 mL.

### 3.18 Transfección

La transfección celular es un método que permite incorporar ácidos nucleicos en células eucariotas. Se utilizó tanto TurboFectina 8.0 (OriGene) y Lipofectamina 3000 (Invitrogen). La selección de las células transfectadas fue realizada con el antibiótico G418 (Sigma).

La TurboFectina 8.0 consiste en una mezcla de lípidos/histonas que se suministra en un 80% de alcohol. Para las transfecciones con turbofectina se procedió de la siguiente manera: se agregaron 1000 ng del plásmido correspondiente en 250  $\mu$ L de Opti-MEM de Gibbco junto con 4  $\mu$ L de turbofectina. Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó la mezcla por goteo utilizando una micropipeta en un pocillo de placas de 6 pocillos. Dicho pocillo contenía las células plaqueadas previamente y 1 mL de medio DMEM con SBF. Después de 48 horas, se comenzó a adicionar el antibiótico de selección.

La lipofectamina corresponde a una mezcla de lípidos catiónicos que forma agregados lípido-ADN que podrían fusionarse sin problemas con la bicapa de fosfolípidos de la célula huésped e ingresa por endocitosis (Chong et al., 2021). Se utilizaron 600 ng del plásmido de interés en medio 250  $\mu$ L Opti-MEM de Gibbco y 1  $\mu$ L del reactivo P3000 Reagent (Invitrogen). Luego se le agregó 100  $\mu$ L de lipofectamina a una concentración de 2  $\mu$ L/mL y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó la mezcla por goteo utilizando una micropipeta en un pocillo de placas de 6 pocillos. Dicho pocillo contenía las células plaqueadas previamente y 1 mL de medio DMEM con SBF. Después de 48 horas se comenzó a adicionar el antibiótico de selección.

### 3.19 Microscopía de fluorescencia

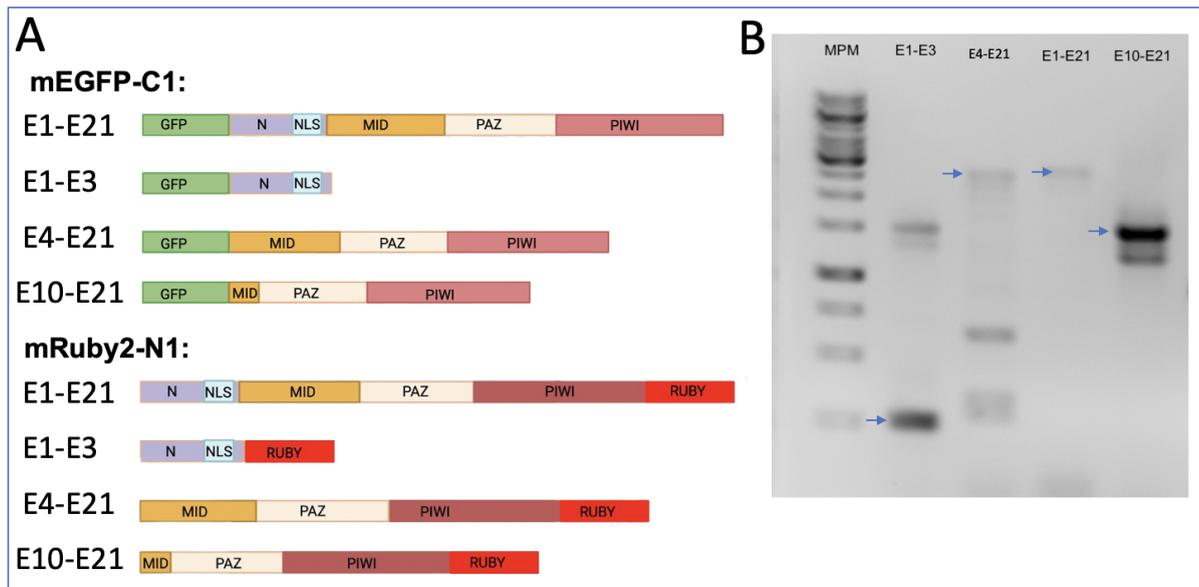
La microscopía de fluorescencia, en sus distintas variedades es una técnica que permite la observación de estructuras específicas a nivel tisular y celular mediante la utilización de moléculas fluorescentes. Al combinar fluorocromos con distinta longitud de onda de excitación y emisión se pueden identificar simultáneamente múltiples estructuras celulares de forma específica. La imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y reemitido una luz con mayor longitud de onda. Para dejar pasar sólo la emisión secundaria deseada, se deben colocar filtros apropiados debajo del condensador y encima del objetivo. Entre esas variedades se encuentra epifluorescencia, microscopía confocal, etc. El microscopio utilizado fue el Zeiss LSM 800 que es un confocal láser de barrido que obtiene imágenes precisas, en tres dimensiones, de las microestructuras y superficies.

Para tomar las imágenes, previamente se le agregó 1  $\mu$ L de Cell Mask (Invitrogen) ya sea deep red o green según correspondiera. Luego se removió el medio de cada pocillo, se fijó con paraformaldehído (PFA) 4% durante 15 minutos. Luego, las muestras se lavaron con PBS 1X y se tiñeron 5 minutos con 3  $\mu$ L de DAPI (a partir de un stock a 300  $\mu$ M; Santa Cruz-Biotech). El montaje se realizó con VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium. Las imágenes se capturaron utilizando un microscopio confocal Zeiss (LSM 800) con el objetivo 63X de inmersión en aceite. Todos los parámetros de adquisición fueron iguales entre todas las muestras procesadas en un mismo día, y solo se compararon directamente

imágenes obtenidas de esta forma. Las imágenes se analizaron utilizando el programa ImageJ.

## 4. Resultados

### 4.1 Amplificación por PCR de las construcciones

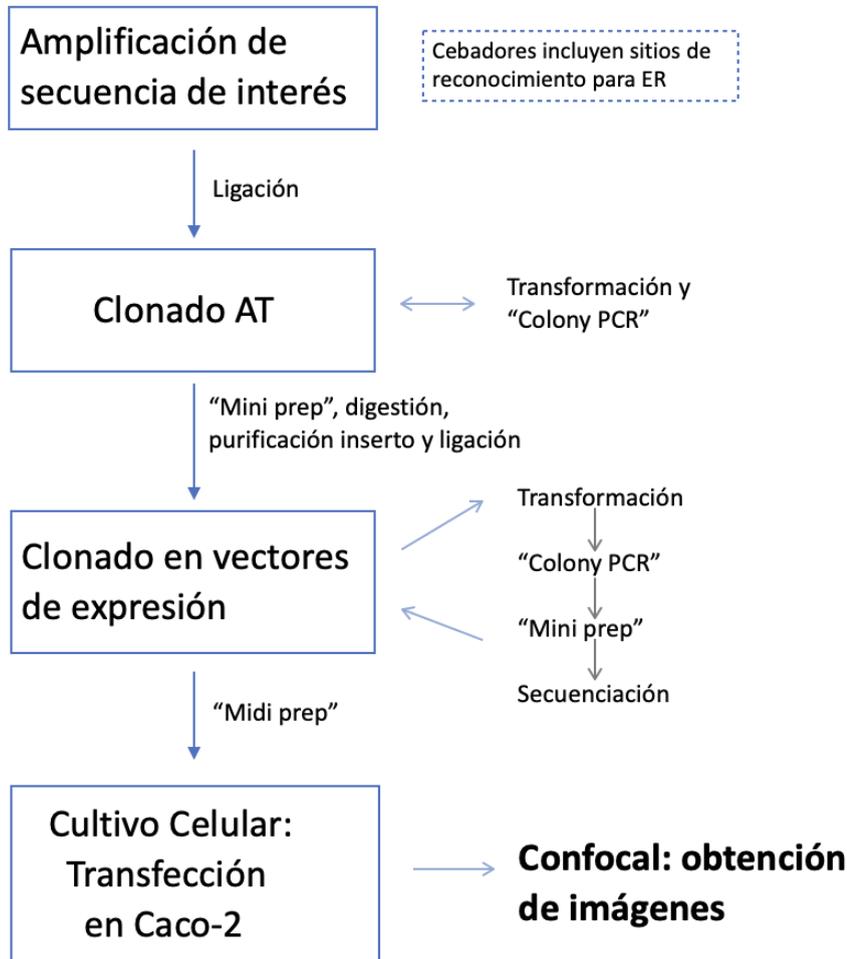


**Figura 11.** Constructos de PIWIL1 recombinantes A) Esquema de proteínas recombinantes de PIWIL1 *taggeadas* a proteínas fluorescentes (mEGFP-C1 y mRuby2-N1) para su seguimiento por microscopía confocal. B) Gel de Agarosa 1% teñido con SYBR-Safe del producto de PCR de las diferentes construcciones de PIWIL1 en cADN de Caco-2. Las flechas señalan las bandas correspondientes al tamaño del amplicón esperado (los tamaños en pares de bases esperados se encuentran en la tabla 2).

Partiendo de ARN total de Caco-2 se realizó una retrotranscripción del mismo con oligodT. Una vez obtenido el cADN de Caco-2, se procedió a amplificar las secuencias de interés. Las 4 construcciones corresponden a diferentes regiones. En primer lugar una región que contiene la señal de localización nuclear (NLS) predicha (Exones 1-3), región con dominio PIWI (Exones 10-21), Isoforma 1 PIWI completa (Exones 1-21) e Isoforma 2, que carece de la Señal de localización nuclear (Exones 4-21). En la figura 11 A se esquematizan las construcciones objetivo *taggeadas* a proteínas fluorescentes una vez clonadas en los vectores de expresión. En la figura 11 B, se observan los productos de PCR con los amplicones de interés en una corrida electroforética. En el caso presentado, se utilizó el mismo tiempo de extensión y temperatura de *annealing* para todos los amplicones, lo que explica la aparición de bandas inespecíficas. Se observa una banda acorde al tamaño esperado para todas las construcciones (indicadas por las flechas en Figura 11 B). Todas las reacciones fueron luego purificadas con el kit Nucleospin “Gel and PCR Clean-up”.

## 4.2 Clonado en el plásmido pGEM-T y transformación de *E. Coli*

Los diferentes amplicones purificados fueron ligados al vector de clonado pGEM-T easy. Como ya se mencionó en la sección de materiales y métodos, la ligación "T" se facilita mediante el agregado de adenosinas en los productos de PCRs por la Taq polimerasa.



**Figura 12.** Esquema general del protocolo utilizado para llegar a los plásmidos finales y luego obtener las imágenes de la localización subcelular de las proteínas recombinantes.

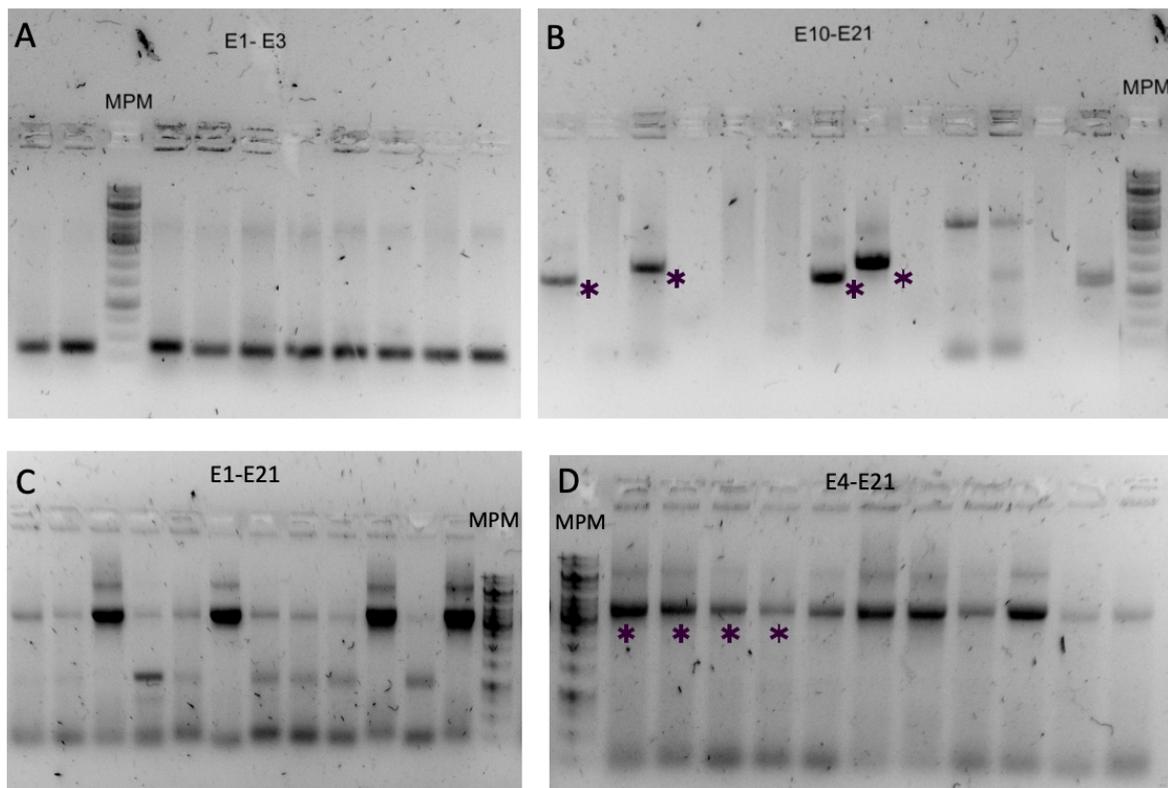
Como se indica en el esquema del protocolo de la figura 12, luego de obtenidos los productos de ligación, se transformaron células de *E. coli* cepa DH5-alfa quimiocompetentes. Las colonias transformadas con estos plásmidos fueron incubadas a 37°C por 12 horas y seleccionadas por el sistema de alfa-complementación y por resistencia al antibiótico ampicilina. Las colonias transformadas con estos plásmidos fueron seleccionadas tal como se menciona en la sección de materiales y métodos.

A partir de colonias blancas obtenidas se realizó "Colony PCR" tal como se ve en la figura 13. De esta manera se corroboró la presencia del inserto de interés en las colonias. Los productos de PCR se pueden visualizar en la figura 13 del gel de agarosa 1% teñido con SYBR safe. En la tabla 5 se puede observar el tamaño esperado para los amplicones.

**Tabla 5.** Tamaños esperados para la Colony PCR de las transformaciones con el vector pGEM-T Easy. Como cebador directo se utilizó el “M13 Forward” (Ver materiales y métodos).

Construcción	Amplicón (pb)
E1-E3	455
E10-E21	1598
E4-E21	2395
E1-E21	2914

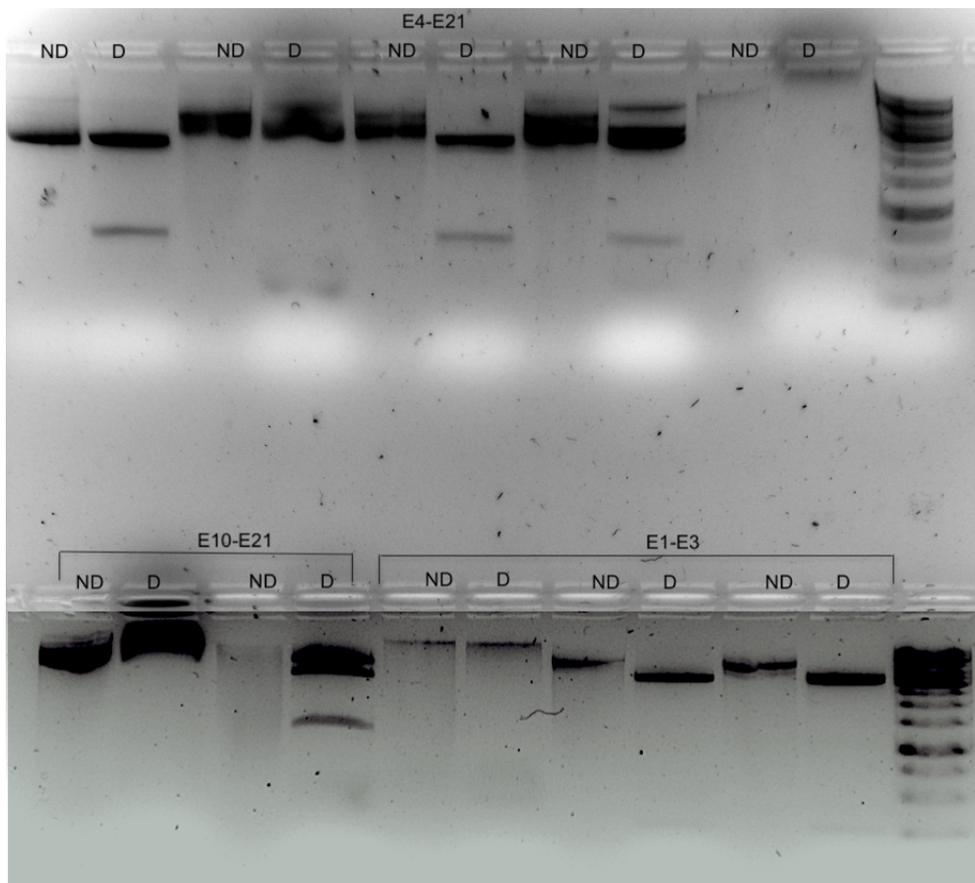
Tal como se observa en la figura 13 A, se obtuvo que para E1-E3 todas las colonias llevaban plásmidos con el inserto de interés (colonias positivas) dado que se visualiza una banda cercana a los 500 pb. En 13 B se observa que para el caso de E10-E21 se obtuvieron 4 colonias positivas, ya que la banda corresponde aproximadamente a 1500 pb. Se manifiesta claramente una diferencia en el tamaño entre algunas de las bandas E10-E21 que puede ser atribuida a la presencia de distintas isoformas de PIWIL1 expresadas en Caco-2. Para E4-E21, varias colonias eran posiblemente positivas, y se digirieron las señaladas con el asterisco. En el caso de E1-E21 ninguna fue positiva.



**Figura 13.** “Colony PCR” de las transformaciones de *E. Coli* con pGEM-T Easy y los insertos de interés. A) Construcción E1-E3 B) Construcción E10-E21 C) Construcción E1-E21 D) Construcción E4-E21.

### 4.3 Purificación y digestión

Una vez que se pudieron detectar colonias positivas mediante PCR, se procedió a realizar la preparación plasmídica a pequeña escala "miniprep". Se cuantificó el ADN extraído, y luego se procedió a digerir el mismo. Para ello se utilizaron las enzimas de restricción EcoR1 y BamH1. Si el plásmido posee el inserto de interés mediante la digestión doble de estas dos enzimas dicho inserto se libera, considerando que los mismos tenían incorporado los sitios de reconocimiento de dichas enzimas en sus cebadores. En la figura 14 se visualiza la corrida electroforética para las "miniprep" de las colonias tanto digeridas como no digeridas. En las "miniprep" digeridas se esperaba visualizar una banda correspondiente al inserto.

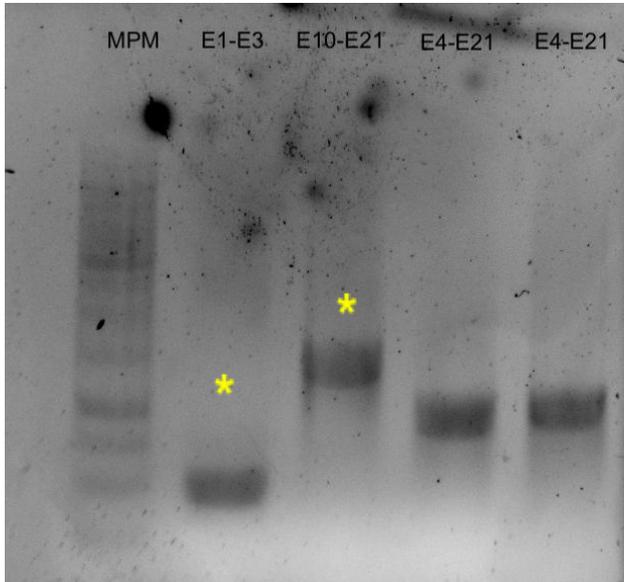


**Figura 14.** Digestión doble con EcoR1 y BamH1 de los plásmidos pGEM-T ligados a los insertos de interés. Plásmido Digerido: "D"; Plásmido No Digerido: "ND".

Como se observa en la figura 15, posteriormente se realizó otro PCR de control de la "miniprep". Los tamaños esperados son los de la tabla 2, es decir la secuencia completa de cada uno de los insertos. Esto se realizó para corroborar que el inserto sea el correcto, sobre todo para los insertos de mayor tamaño. En el mismo pudimos ver que solo las construcciones con E1-E3 y E10-E21 eran efectivamente positivas (carriles indicados con asteriscos en figura 15).

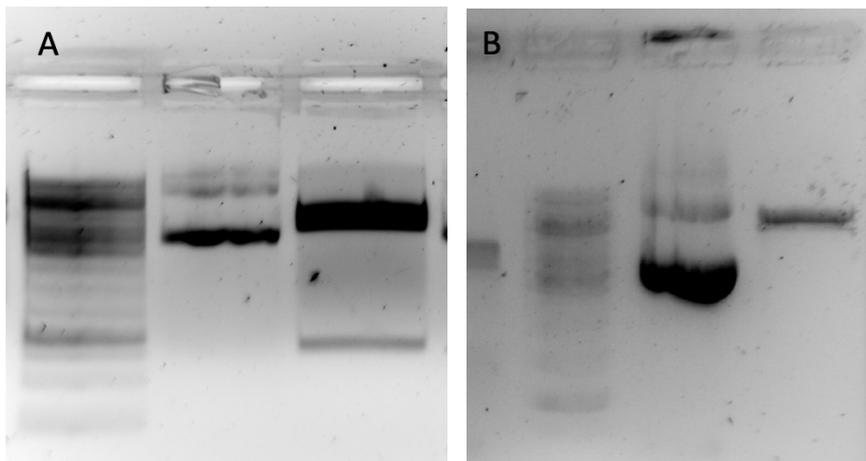
A los dos insertos que se comprobó su positividad en este PCR se los extrajo del gel de la figura 14, y se los purificó. En el caso de E1-E21 y E4-E21 si bien se intentó en reiteradas

oportunidades y con modificaciones en el método de *screening* ( "microcultivo PCR", ver materiales y métodos), no se logró obtener colonias positivas con los clonados en pGEM-T. Esto es probablemente debido al gran tamaño de estos insertos representando una dificultad para la ligación.



**Figura 15.** Gel de Agarosa del resultado de PCR para las colonias positivas por Colony PCR y que digeridas liberaron inserto. El asterisco señala los carriles donde las PCR fueron positivas.

#### 4.4 Clonado en vectores de expresión con tags fluorescentes y transformación de *E. Coli*

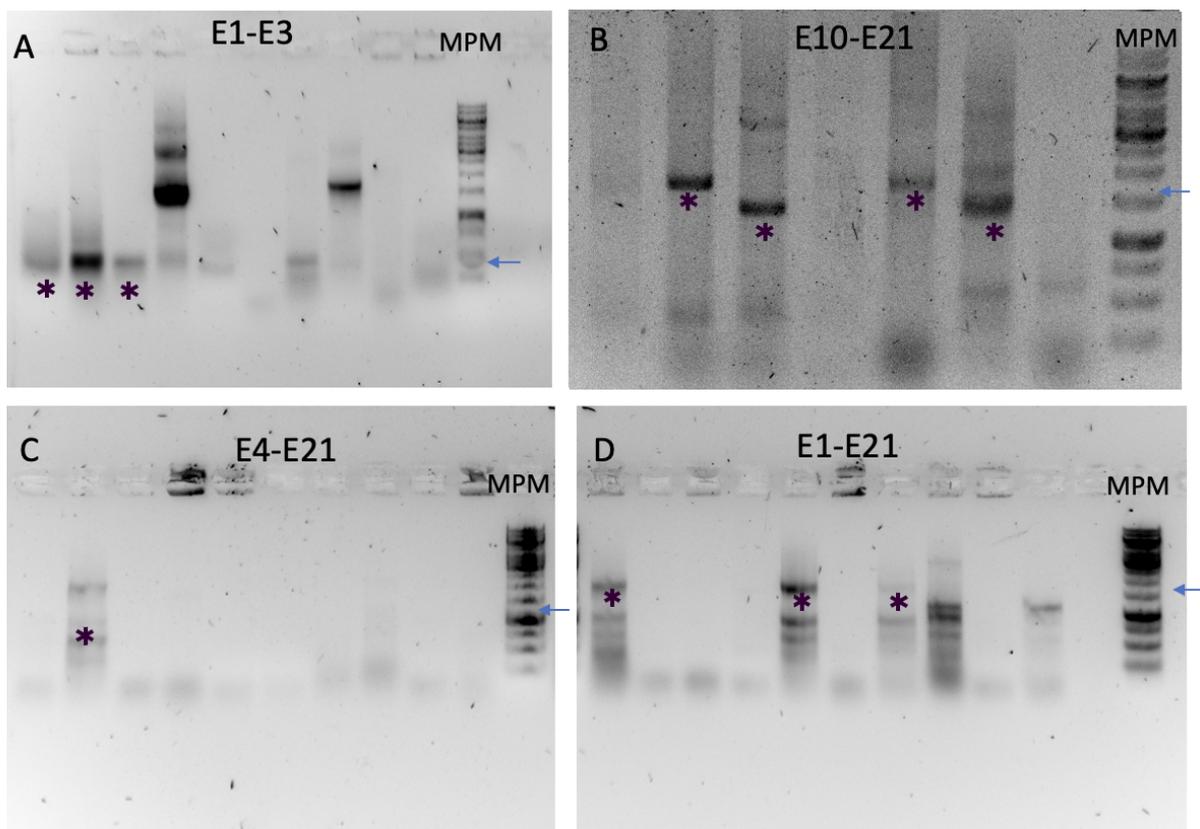


**Figura 16.** Digestión doble con EcoR1 y BamH1 de los vectores de expresión previo a la ligación con los insertos A) En el primer carril se observa el marcador de peso molecular, seguido por el plásmido mEGFPC1 no digerido, en el tercer carril se observa mEGFPC1 linearizado B) En el primer carril se observa el marcador de peso molecular, seguido por el plásmido mRuby2-N1 no digerido, en el tercer carril se observa mRuby2-N1 linearizado.

Para poder expresar las proteínas recombinantes en células eucariotas de mamíferos, tal como lo es Caco-2, se necesitan vectores adecuados (con promotor eucariota y con gen de resistencia al antibiótico G418) para estos tipos celulares, los cuales deben permitir clonados direccionales. Para ello las secuencias de las construcciones fueron ligadas a los vectores de expresión, *taggeados* a proteínas fluorescentes para poder seguir su localización subcelular y realizar los experimentos posteriores en cultivo celular.

Antes de la ligación, tal como se ve en la figura 16, se digirió ambos vectores de expresión para que así puedan generar los extremos cohesivos. En dicho gel, se observan en la fracción no digerida las bandas correspondientes a las distintas conformaciones plasmídicas.

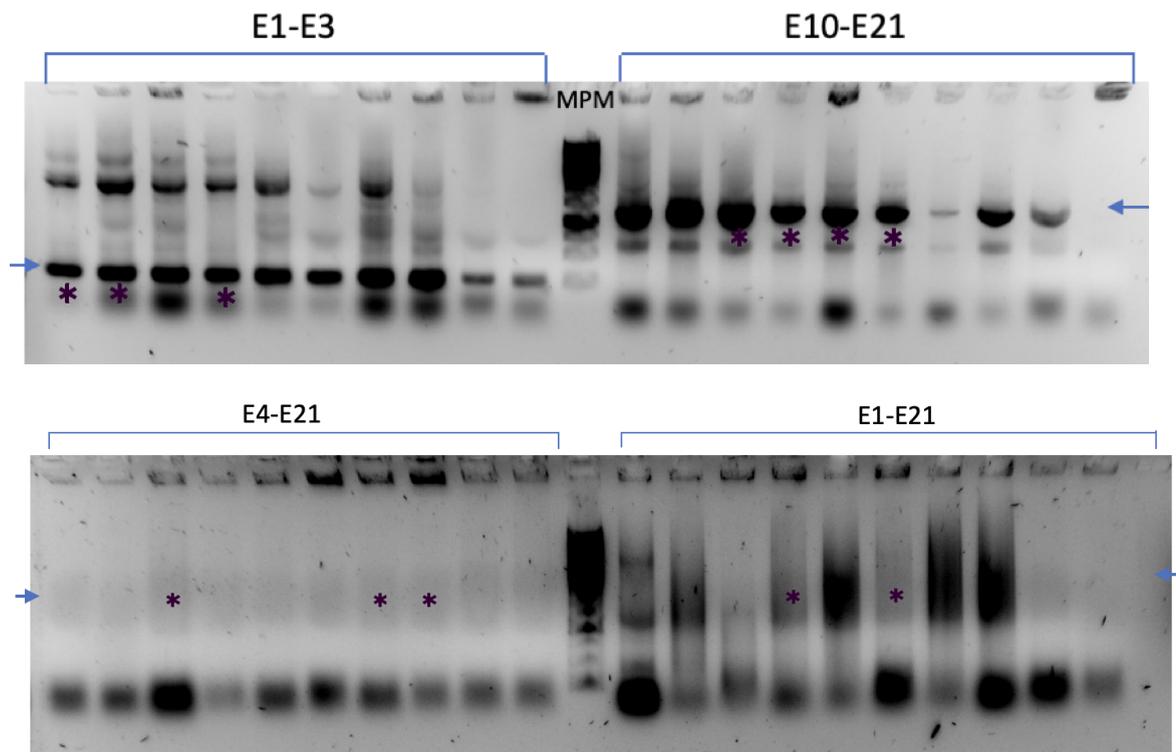
En el caso de E1-E21 y E4-E21 se ligó directamente con productos de PCR a partir de cADN y digeridos con EcoR1 y BamH1. Luego de la reacción de ligación entre las secuencias de las construcciones con los vectores de expresión, se procedió a transformar bacterias con los productos de ligación con el fin de propagar el plásmido y poder aislarlo en altas concentraciones. Se examinó por "Colony" PCR la presencia del inserto de interés en las colonias transformadas.



**Figura 17.** Resultado de la "Colony PCR" para el vector de expresión mEGFPC1 . Se observan los productos de PCR para cada una de las construcciones *taggeadas* a GFP: A) Construcción E1-E3 B) Construcción E10-E21 C) Construcción E4-E21 D) Construcción E1-E21.

**Tabla 6.** Tamaños esperados para la Colony PCR de las transformaciones con el vector mEGFPC1. Se utilizó para todos un cebador directo específico del vector. En el caso de E1-E21 y E4-E21 se utilizó un cebador reverso del exón 9.

Construcción	Amplicón (pb)
E1-E3	1114
E10-E21	2254
E4-E21	1486
E1-E21	2005



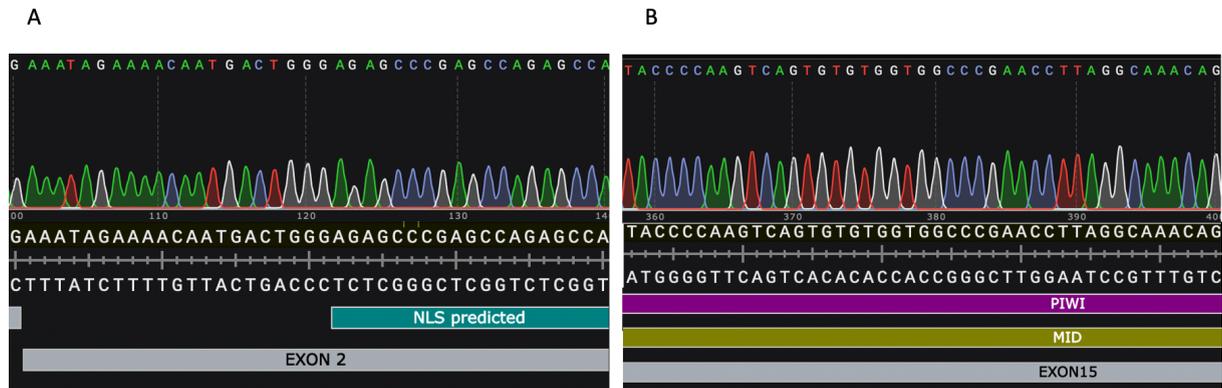
**Figura 18.** Resultado de la “Colony PCR” para vector de expresión mRuby2-N1. Superior: los primeros 10 carriles corresponden al vector ligado a la construcción E1-E3. El carril 11, corresponde al marcador de peso molecular, y los siguientes 10 carriles corresponden a la construcción E10-E21. Inferior: los primeros 10 carriles corresponden a E4-E21, el carril 11 al marcador de peso molecular, y los siguientes 10 al E1-E21.

Con respecto a mEGFPC1, los tamaños esperados se exponen en la tabla 6. Los tamaños esperados para mRuby son los expuestos en la tabla 2 (se amplificaron las secuencias completas).

En la figura 17 y 18 se observan gel de agarosa 1% teñido con SYBR safe de las “Colony PCR”. La altura de la banda esperada para cada construcción se indica con las flechas. En las mismas se señaló con asterisco las colonias que fueron luego purificadas y enviadas a secuenciar. Tal como se observa en la figura 18, para E1-E3 y E10-E21 ligada a mRuby2-N1 resultaron positivas casi en su totalidad, por lo que se eligieron las señaladas con asterisco. Las colonias señaladas con asterisco mediante “Colony PCR” fueron purificadas mediante “Miniprep” y se enviaron a secuenciar a Macrogen (por secuenciación

capilar). Lamentablemente, no pudimos obtener plásmidos positivos para las construcciones de mayor tamaño, E1-E21 y E4-21.

Las secuenciaciones para todos los plásmidos enviados de E1-E3 y E10-E21 resultaron positivas tanto para mEGFPC1 como para mRuby2-N1 y un ejemplo de las secuencias obtenidas con sus respectivos cromatogramas se muestran en la Figura 19.



**Figura 19.** Secuencia parciales de los plásmidos secuenciados superpuestas a la secuencia de PIWIL1. A) Se visualiza (arriba) la secuencia obtenida mediante secuenciación del plásmido eGFPC1/PIWIL1 E1-E3 superpuesta a la la secuencia parcial de PIWIL1 (abajo) B) Se visualiza (arriba) la secuencia obtenida mediante secuenciación del plásmido eGFPC1/PIWIL1 E10-E21 superpuesta a la la secuencia parcial de PIWIL1 (abajo). En el lado superior de la imagen se visualiza la secuencia obtenida mediante secuenciación del plásmido eGFPC1/PIWIL1 E10-E21, en la parte inferior la secuencia parcial de PIWIL1 (la esperada), esta vez correspondiente al exón 15 (Dominio PIWI y MID)

## 4.5 Purificación a gran escala del ADN plasmídico y Transfección de Caco-2

Luego, aquellos plásmidos que resultaron positivos mediante secuenciación fueron purificados, realizando la preparación plasmídica a gran escala "Midi prep". Se obtuvieron cantidades acordes para el paso siguiente, la transfección de células Caco-2.

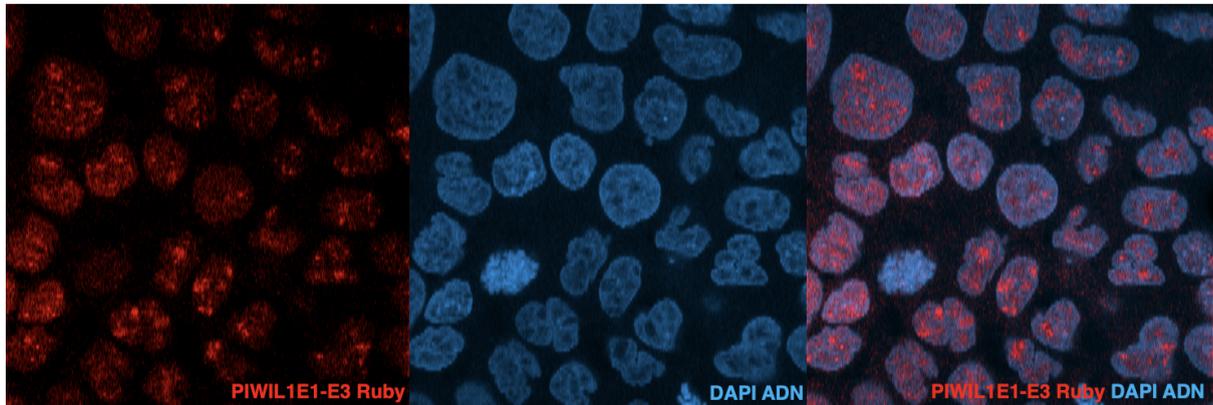
Dichas transfecciones fueron realizadas tanto con TurboFectina 8.0 de OriGene como con Lipofectamina 3000 de Invitrogen, tal como se expuso en materiales y métodos.

## 4.6 Obtención de imágenes mediante Confocal Zeiss 800

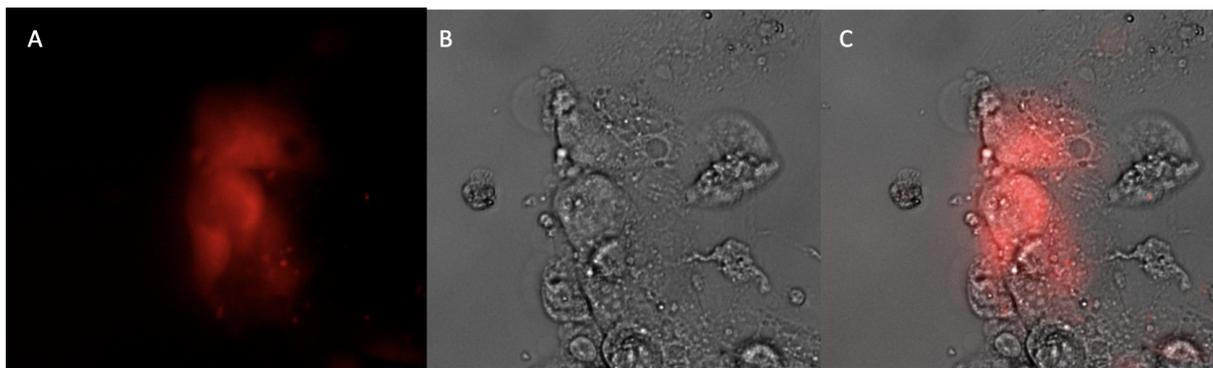
Una vez realizadas las transfecciones, se procedió a tomar las imágenes en el Confocal. Para ello se fijó las células y se realizaron los pasos correspondientes. Se utilizó Cell Mask y DAPI para poder visualizar membrana celular y núcleo, respectivamente.

En la figura 20 se visualiza E1-E3 *taggeada* a mRuby. Se observa localización nuclear de la construcción E1-E3. También resulta interesante destacar que se aprecian focos de señal dentro del núcleo, evidenciando una distribución no uniforme de la proteína recombinante E1-E3. Además, resulta destacable que en dichos sectores donde se detecta E1-E3, hay ausencia de señal de DAPI. En la figura 21, se observa un control donde se transfectó con

mRuby2-N1 sin inserto. En dicha imagen se destaca la presencia de señal en toda la célula, no solo a nivel nuclear. A partir de estas figuras, se puede concluir que efectivamente hay una NLS en esa región de la secuencia.



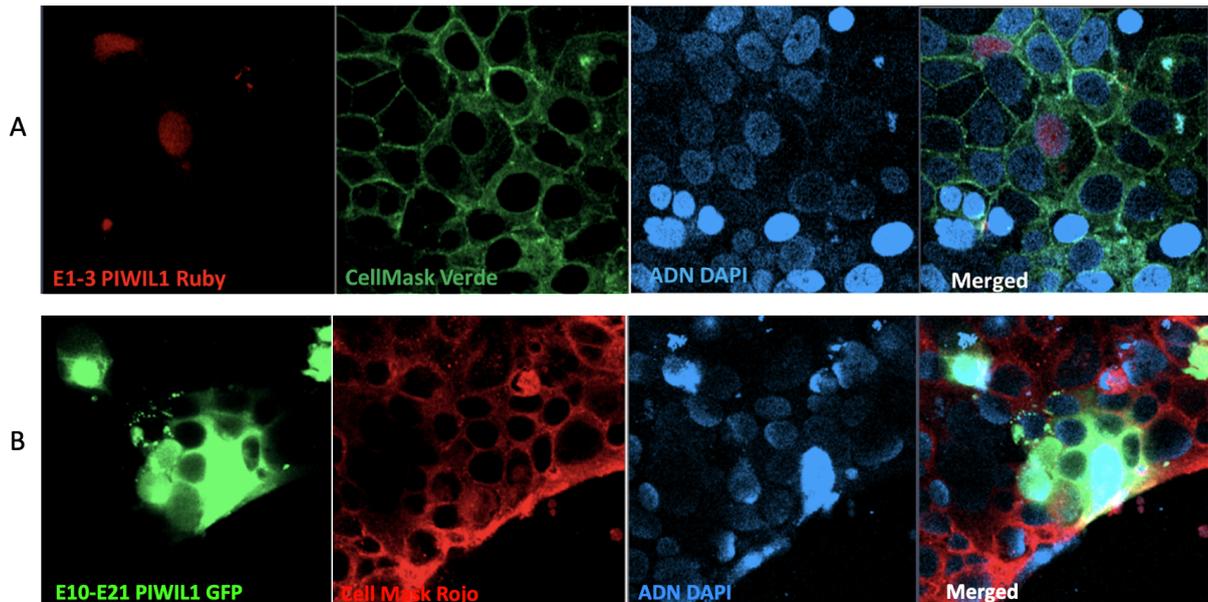
**Figura 20.** Localización de E1-E3 mRuby2-N1, imagen tomada con Confocal Zeiss 800. Transfección realizada mediante Lipofectamina 3000



**Figura 21.** Control de mRuby2-N1. Transfección realizada mediante Lipofectamina 3000. A) Canal rojo B) Campo Claro C) Ambos canales de rojo y campo claro superpuestos.

Tal como se muestra en la figura 22 se transfectó con E1-E3 *taggeada* a mRuby2-N1 y E10-E21 *taggeada* a mEGFPC1. Se utilizó DAPI como marcador nuclear, y el marcador de membranas plasmáticas Cell Mask, tanto rojo como verde dependiendo del plásmido y su proteína fluorescente (para mRuby2-N1- Verde, para mEGFPC1 - Rojo). Al igual que para la figura 20, se puede observar como con la construcción E1-E3 hay señal únicamente a nivel nuclear. Sin embargo, E10-E21 se observa tanto a nivel citoplasmático como nuclear.

Se visualiza un número pequeño de células expresando las proteínas recombinantes en ambos cultivos celulares debido a la baja eficiencia de transfección, sumado a que el antibiótico de selección no había actuado aún.



**Figura 22.** Evaluación de la localización subcelular de las construcciones *taggeadas* a proteínas fluorescentes mediante Confocal Zeiss 800. Transfección realizada mediante turbofectina 8.0. A) E1-E3 mRuby2-N1. B) E10-E21 mEGFP-C1

## 5. Discusión

Las proteínas PIWIs se expresan en una amplia variedad de organismos y su expresión se puede detectar en células madre pluripotentes y totipotentes (Denker et al., 2008; Palakodeti et al., 2008; Seipel et al., 2004). A pesar de que las proteínas PIWI han sido reportadas en diversos organismos y tipos celulares, todavía quedan muchas interrogantes, como es el grado de expresión de estas proteínas en los tejidos somáticos de los mamíferos (Ross et al., 2014). Los eucariotas primitivos, donde se están logrando rápidos avances en este tema, proporcionan un excelente campo para estas investigaciones (Ross et al., 2014).

En el contexto de la maestría de la Dra. María Rosa García el grupo observó cómo la maquinaria de silenciamiento génico puede ser rastreada hasta un ancestro común eucariota (García-Silva et al., 2010b). Posteriormente, durante el desarrollo del doctorado de la Dra. García, el grupo continuó estudiando tripanosomátidos en los cuales se reportó que PIWI estaría interaccionando con tiARNs. Además, se pudo comprobar que estos tiARNs son secretados al espacio extracelular en microvesículas, teniendo roles significativos en la patogénesis del organismo y comunicación celular (García-Silva et al., 2010a, 2012, 2014). Estos hallazgos respaldan la idea de que PIWI está altamente conservada evolutivamente en el Dominio Eukarya, y que en un estado ancestral tuvo funciones independientes del mantenimiento de la vía germinal (Horjales et al., 2023).

Cuando se descubrió PIWI en *Drosophila*, se reportó como esencial para la regeneración de células madre (Cox et al., 1998). De hecho, la función de silenciamiento de transposones de PIWI se puede separar genéticamente de su papel en el mantenimiento de las células madre germinales eliminando una región amino terminal de la proteína donde se encuentra una señal de localización nuclear (Klenov et al., 2011). Las hembras con dicha mutación en

PIWI conservan la capacidad de autorrenovación de células madre, pero muestran una drástica bajada en la capacidad de reprimir elementos transponibles, lo que resulta en esterilidad (Klenov et al., 2011). Klenov et al. propusieron que su función en la renovación de células madre en *Drosophila* normalmente se realizaría en el citoplasma y que es independiente de la represión de transposones.

En relación con la expresión de la vía piARNs/PIWI a nivel somático, se ha reportado cada vez más su presencia fuera de la línea germinal. Estudios han reportado presencia de PIWIL1 en células madre hematopoyéticas CD34+ pero no así en las poblaciones más diferenciadas, lo que podría ser indicio de que PIWIL1 tenga un rol en la regulación del desarrollo de células madre hematopoyéticas (Sharma et al., 2001). Esto establece una correlación intrigante entre PIWIL1 y estados indiferenciados de estas células.

En una línea celular leucémica, la expresión transitoria de PIWIL1 resultó en una drástica disminución de las habilidades proliferativas de estas células (Sharma et al., 2001). Sin embargo en otro estudio en ratón, la sobre-expresión del homólogo de PIWIL2 en cultivo de células hematopoyéticas mostró un aumento en la proliferación celular (Chen et al., 2007).

Para evaluar estas observaciones conflictivas, se realizó un triple knockout en ratón de los homólogos de PIWIL1, PIWIL2 y PIWIL4, para el estudio de la posible función de las proteínas PIWI en la hematopoyesis. En dicho estudio, se observó que ninguna de las PIWIs era requerida para la hematopoyesis adulta normal (Nolde et al., 2013). A pesar de ello, no se puede descartar por completo que las PIWI tengan un rol en la hematopoyesis. Surgen preguntas tales, como ¿Es posible que la función de las PIWIs sea redundante con otras proteínas, como podrían ser las AGO?, ¿Podría ser que el contexto fisiológico y ambiental en el que se requieren las proteínas PIWIs sea diferente al del ensayo realizado?

Por otro lado, numerosos estudios demuestran la expresión aberrante de las proteínas PIWI en una amplia variedad de cánceres humanos; sin embargo, estos datos son, en el mejor de los casos, correlativos y es demasiado pronto para decir si las PIWI tienen algún papel en el cáncer (Liu et al., 2006; Qiao et al., 2002; Taubert et al., 2007). En este contexto, resulta relevante mencionar que si bien no toda expresión aberrante resulta en productos funcionales con impacto biológico, se puede considerar que la desregulación epigenética característica de células tumorales es análoga en ciertos aspectos a la que ocurre en células germinales o en células que se encuentran levemente diferenciadas. Por lo tanto, esto podría justificar la reactivación de la maquinaria de las PIWI.

La razón subyacente a la expresión ectópica de las proteínas PIWI en muchos cánceres humanos plantea interrogantes cruciales. ¿Las proteínas PIWI tienen algún papel activo en el proceso oncogénico?, ¿Los piARNs se expresan ectópicamente en el contexto tumoral? En caso afirmativo, ¿cuál es su función?

Tampoco hay certezas absolutas de expresión de piARNs en tejidos somáticos. Las proteínas PIWI, al ser expresadas aberrantemente en cáncer podrían en ausencia de piARNs canónicos, estar reclutando circunstancialmente transcritos celulares alternativos, los piARNs misceláneos como expuso nuestro grupo (Tosar et al., 2021). Esta interacción entre las proteínas PIWI y los misceláneos-piARNs podría ser en parte responsable de los efectos pro-tumorales de estas proteínas, al abrir la posibilidad de interacciones con otros

tipos de moléculas. Si PIWIL1 está actuando con piARNs canónicos, piARNs misceláneos, o independiente de cualquier tipo de ARN no codificante, es una incógnita.

Poco se conoce de PIWIL1 fuera de la línea germinal, y ello incluye su localización subcelular. En humanos, PIWIL1 se ha detectado predominantemente en el citoplasma tanto en el contexto fisiológico normal como en cáncer (Aravin et al., 2009; Deng & Lin, 2002; Liu et al., 2006, p. 200; Siddiqi et al., 2012). En otras revisiones, donde se estudió cáncer esofágico (He et al., 2009) y páncreas (Grochola et al., 2008) se ha descrito a PIWIL1 tanto en el núcleo como en el citoplasma. La localización en estos dos compartimentos es consistente con su ubicación en células germinales de *Drosophila* (Cox et al., 2000).

Hasta la fecha no se ha reportado una NLS para PIWIL1 ni alcanzado una conclusión definitiva sobre la relevancia funcional de esta distribución subcelular dual observada en el contexto oncogénico. ¿Su localización en todos los tipos de cáncer se asemeja a la reportada en el contexto germinal? Considerando lo anterior y sumado a que tampoco existe evidencia de si los diferentes transcritos reportados para dichas proteínas son responsables de dicha localización, es relevante determinar la localización subcelular de la proteína. Basándose en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede especular que hay presencia de una NLS en la región específica planteada. Sin embargo, al observar la distribución de la proteína recombinante E10-E21, la cual presentó tanto localización nuclear y citoplasmática, no se puede descartar la presencia de otras posibles NLS en diferentes regiones de la secuencia de PIWIL1.

## 6. Conclusiones y perspectivas

En el presente trabajo de grado, se pudo generar una herramienta que en experimentos futuros podrá ser utilizada para realizar estudios del ciclo y división celular, así como para evaluar el interactoma de las construcciones recombinantes. La herramienta generada se destaca, especialmente, considerando que aún no se ha reportado una NLS para PIWIL1. Por lo tanto, haber clonado una región (E1-E3) que se localiza en el modelo utilizado a nivel nuclear es de suma relevancia, ya que dicha localización sugiere que efectivamente hay presencia de una NLS en dicha región de la proteína. Es conveniente señalar que, como se mencionó previamente, no se puede excluir la existencia de otras NLS en otros dominios de PIWIL1.

También resulta destacable el hecho de que se logró obtener E1-E3 y E10-E21 ligada a ambos plásmidos utilizados. Como se puede observar en la figura 11, la posición de las proteínas fluorescentes en relación con las construcciones recombinantes no es la misma para ambos plásmidos. En el caso de eGFP, dicha proteína fluorescente está ubicada en la región N-terminal, mientras que mRuby se ubica en la región C terminal. Esta diferencia podría influir en el plegamiento tridimensional de las proteínas resultantes de manera distinta. La función biológica de las proteínas está determinada en gran parte por su plegamiento tridimensional, por lo que la disposición terminal puede afectar la exposición de dominios importantes para la interacción con otras moléculas celulares. Se podrán comparar diversos aspectos entre las mismas construcciones *taggeadas* con distintas proteínas, como por ejemplo la localización subcelular de ambas construcciones recombinantes.

Adicionalmente, el hecho de poseer las construcciones recombinantes *taggeadas* a diferentes proteínas fluorescentes ofrece la posibilidad de realizar co-transfecciones y poder discernir entre ambas a través de la capacidad de separación y registro independiente en los canales específicos de fluorescencia del microscopio confocal. La evaluación simultánea de las dos proteínas recombinantes podría arrojar nuevos datos que aún no hemos estudiado.

Lamentablemente, en estos meses durante los cuales realicé mi tesina, no se logró obtener el clonado de las construcciones E1-E21 y 4-21. El grupo continuará trabajando para lograr clonar estas dos construcciones en los vectores de expresión mediante sistemas de clonado alternativos al clonado “clásico” como lo es “Gibson Assembly”. Por lo tanto, la caracterización de la localización de la construcción completa de PIWIL1 se llevará a cabo prontamente.

Tampoco fue posible realizar el seguimiento en vivo (“live”) de la dinámica de las proteínas recombinantes debido a que el Confocal Zeiss 880 del Instituto desafortunadamente está fuera de servicio. Una vez que el mismo se vea reparado, será utilizado para seguir la localización subcelular de las construcciones ya logradas y de las dos restantes.

## 7. Bibliografía

Alberts, B., Heald, R., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Wilson, J.

H., & Hunt, T. (2022). *Molecular biology of the cell* (Seventh edition, international student edition). W.W. Norton & Company.

Aravin, A. A., Naumova, N. M., Tulin, A. V., Vagin, V. V., Rozovsky, Y. M., & Gvozdev, V. A.

(2001). Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Current Biology*, 11(13), 1017-1027. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00299-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00299-8)

Aravin, A. A., Sachidanandam, R., Bourc’his, D., Schaefer, C., Pezic, D., Toth, K. F., Bestor,

T., & Hannon, G. J. (2008). A piRNA Pathway Primed by Individual Transposons Is Linked to De Novo DNA Methylation in Mice. *Molecular Cell*, 31(6), 785-799.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.09.003>

Aravin, A. A., Van Der Heijden, G. W., Castañeda, J., Vagin, V. V., Hannon, G. J., & Bortvin,

A. (2009). Cytoplasmic Compartmentalization of the Fetal piRNA Pathway in Mice.

*PLoS Genetics*, 5(12), e1000764. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000764>

Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Iovino, N., Morris, P.,

- Brownstein, M. J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., Sheridan, R., Sander, C., Zavolan, M., & Tuschl, T. (2006). A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, *442*(7099), 203-207.  
<https://doi.org/10.1038/nature04916>
- Becker, W. R., Ober-Reynolds, B., Jouravleva, K., Jolly, S. M., Zamore, P. D., & Greenleaf, W. J. (2019). High-Throughput Analysis Reveals Rules for Target RNA Binding and Cleavage by AGO2. *Molecular Cell*, *75*(4), 741-755.e11.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.012>
- Begik, O., Lucas, M. C., Liu, H., Ramirez, J. M., Mattick, J. S., & Novoa, E. M. (2020). Integrative analyses of the RNA modification machinery reveal tissue- and cancer-specific signatures. *Genome Biology*, *21*(1), 97.  
<https://doi.org/10.1186/s13059-020-02009-z>
- Brennecke, J., Aravin, A. A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., & Hannon, G. J. (2007). Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in *Drosophila*. *Cell*, *128*(6), 1089-1103.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.043>
- Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q., & Hannon, G. J. (2002). The Argonaute family: Tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes & Development*, *16*(21), 2733-2742.  
<https://doi.org/10.1101/gad.1026102>
- Cecere, G., Zheng, G. X. Y., Mansisidor, A. R., Klymko, K. E., & Grishok, A. (2012). Promoters Recognized by Forkhead Proteins Exist for Individual 21U-RNAs. *Molecular Cell*, *47*(5), 734-745. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.021>
- Chen, L., Shen, R., Ye, Y., Pu, X.-A., Liu, X., Duan, W., Wen, J., Zimmerer, J., Wang, Y., Liu, Y., Lasky, L. C., Heerema, N. A., Perrotti, D., Ozato, K., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Yates, A. J., Carson Iii, W. E., Lin, H., ... Gao, J.-X. (2007). Precancerous Stem Cells Have the Potential for both Benign and Malignant Differentiation. *PLoS ONE*, *2*(3), e293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000293>

- Cox, D. N., Chao, A., Baker, J., Chang, L., Qiao, D., & Lin, H. (1998). A novel class of evolutionarily conserved genes defined by *piwi* are essential for stem cell self-renewal. *Genes & Development*, *12*(23), 3715-3727.  
<https://doi.org/10.1101/gad.12.23.3715>
- Cox, D. N., Chao, A., & Lin, H. (2000). *Piwi* encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development*, *127*(3), 503-514. <https://doi.org/10.1242/dev.127.3.503>
- Czech, B., Munafò, M., Ciabrelli, F., Eastwood, E. L., Fabry, M. H., Kneuss, E., & Hannon, G. J. (2018). piRNA-Guided Genome Defense: From Biogenesis to Silencing. *Annual Review of Genetics*, *52*(1), 131-157.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031441>
- De Fazio, S., Bartonicek, N., Di Giacomo, M., Abreu-Goodger, C., Sankar, A., Funaya, C., Antony, C., Moreira, P. N., Enright, A. J., & O'Carroll, D. (2011). The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature*, *480*(7376), 259-263. <https://doi.org/10.1038/nature10547>
- Deng, W., & Lin, H. (2002). Miwi, a Murine Homolog of piwi, Encodes a Cytoplasmic Protein Essential for Spermatogenesis. *Developmental Cell*, *2*(6), 819-830.  
[https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00165-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00165-X)
- Denker, E., Manuel, M., Leclère, L., Le Guyader, H., & Rabet, N. (2008). Ordered progression of nematogenesis from stem cells through differentiation stages in the tentacle bulb of *Clytia hemisphaerica* (Hydrozoa, Cnidaria). *Developmental Biology*, *315*(1), 99-113. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.12.023>
- Desai, A., Yan, Y., & Gerson, S. L. (2019). Concise Reviews: Cancer Stem Cell Targeted Therapies: Toward Clinical Success. *Stem Cells Translational Medicine*, *8*(1), 75-81.  
<https://doi.org/10.1002/sctm.18-0123>
- Dey, I., & Bradbury, N. A. (2018). Physiology of the Gut. En *Current Topics in Membranes* (Vol. 81, pp. 337-381). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2018.08.003>
- Djebali, S., Davis, C. A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A.,

- Lagarde, J., Lin, W., Schlesinger, F., Xue, C., Marinov, G. K., Khatun, J., Williams, B. A., Zaleski, C., Rozowsky, J., Röder, M., Kokocinski, F., Abdelhamid, R. F., ... Gingeras, T. R. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature*, *489*(7414), 101-108. <https://doi.org/10.1038/nature11233>
- Gainetdinov, I., Vega-Badillo, J., Cecchini, K., Bagci, A., Colpan, C., De, D., Bailey, S., Arif, A., Wu, P.-H., MacRae, I. J., & Zamore, P. D. (2023). Relaxed targeting rules help PIWI proteins silence transposons. *Nature*, *619*(7969), 394-402. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06257-4>
- Garcia-Silva, M. R., Cabrera-Cabrera, F., Güida, M. C., & Cayota, A. (2012). Hints of tRNA-Derived Small RNAs Role in RNA Silencing Mechanisms. *Genes*, *3*(4), 603-614. <https://doi.org/10.3390/genes3040603>
- Garcia-Silva, M. R., Cura Das Neves, R. F., Cabrera-Cabrera, F., Sanguinetti, J., Medeiros, L. C., Robello, C., Naya, H., Fernandez-Calero, T., Souto-Padron, T., De Souza, W., & Cayota, A. (2014). Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. *Parasitology Research*, *113*(1), 285-304. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3655-1>
- Garcia-Silva, M. R., Frugier, M., Tosar, J. P., Correa-Dominguez, A., Ronalte-Alves, L., Parodi-Talice, A., Rovira, C., Robello, C., Goldenberg, S., & Cayota, A. (2010a). A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *171*(2), 64-73. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.02.003>
- Garcia Silva, M. R., Tosar, J. P., Frugier, M., Pantano, S., Bonilla, B., Esteban, L., Serra, E., Rovira, C., Robello, C., & Cayota, A. (2010b). Cloning, characterization and subcellular localization of a *Trypanosoma cruzi* argonaute protein defining a new subfamily distinctive of trypanosomatids. *Gene*, *466*(1-2), 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.06.012>
- Genzor, P., Cordts, S. C., Bokil, N. V., & Haase, A. D. (2019). Aberrant expression of select

- piRNA-pathway genes does not reactivate piRNA silencing in cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(23), 11111-11112. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904498116>
- Ghildiyal, M., & Zamore, P. D. (2009). Small silencing RNAs: An expanding universe. *Nature Reviews Genetics*, 10(2), 94-108. <https://doi.org/10.1038/nrg2504>
- Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G. J., & Carmell, M. A. (2006). A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 442(7099), 199-202. <https://doi.org/10.1038/nature04917>
- Grivna, S. T., Beyret, E., Wang, Z., & Lin, H. (2006). A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes & Development*, 20(13), 1709-1714. <https://doi.org/10.1101/gad.1434406>
- Grochola, L. F., Greither, T., Taubert, H., Möller, P., Knippschild, U., Udelnow, A., Henne-Bruns, D., & Würfl, P. (2008). The stem cell-associated Hiwi gene in human adenocarcinoma of the pancreas: Expression and risk of tumour-related death. *British Journal of Cancer*, 99(7), 1083-1088. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604653>
- Großhans, H., & Filipowicz, W. (2008). The expanding world of small RNAs. *Nature*, 451(7177), 414-416. <https://doi.org/10.1038/451414a>
- Gu, W., Lee, H.-C., Chaves, D., Youngman, E. M., Pazour, G. J., Conte, D., & Mello, C. C. (2012). CapSeq and CIP-TAP Identify Pol II Start Sites and Reveal Capped Small RNAs as *C. elegans* piRNA Precursors. *Cell*, 151(7), 1488-1500. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.023>
- Gunawardane, L. S., Saito, K., Nishida, K. M., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H., & Siomi, M. C. (2007). A Slicer-Mediated Mechanism for Repeat-Associated siRNA 5' End Formation in *Drosophila*. *Science*, 315(5818), 1587-1590. <https://doi.org/10.1126/science.1140494>
- He, W., Wang, Z., Wang, Q., Fan, Q., Shou, C., Wang, J., Giercksky, K.-E., Nesland, J. M., & Suo, Z. (2009). Expression of HIWI in human esophageal squamous cell carcinoma is significantly associated with poorer prognosis. *BMC Cancer*, 9(1), 426.

- <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-426>
- Höck, J., & Meister, G. (2008). The Argonaute protein family. *Genome Biology*, 9(2), 210.  
<https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-2-210>
- Horjales, S., Li Calzi, M., Francia, M. E., Cayota, A., & Garcia-Silva, M. R. (2023). piRNA pathway evolution beyond gonad context: Perspectives from apicomplexa and trypanosomatids. *Frontiers in Genetics*, 14, 1129194.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1129194>
- Hutvagner, G., & Simard, M. J. (2008). Argonaute proteins: Key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 22-32. <https://doi.org/10.1038/nrm2321>
- Jeong, H., Park, K. H., Lee, Y., Jeong, A., Choi, S., & Kim, K. W. (2021). The Regulation and Role of piRNAs and PIWI Proteins in Cancer. *Processes*, 9(7), 1208.  
<https://doi.org/10.3390/pr9071208>
- Jones, B. C., Wood, J. G., Chang, C., Tam, A. D., Franklin, M. J., Siegel, E. R., & Helfand, S. L. (2016). A somatic piRNA pathway in the Drosophila fat body ensures metabolic homeostasis and normal lifespan. *Nature Communications*, 7(1), 13856.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms13856>
- Kim, K. W., Tang, N. H., Andrusiak, M. G., Wu, Z., Chisholm, A. D., & Jin, Y. (2018). A Neuronal piRNA Pathway Inhibits Axon Regeneration in *C. elegans*. *Neuron*, 97(3), 511-519.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.014>
- Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2), 126-139. <https://doi.org/10.1038/nrm2632>
- King, F. J., Szakmary, A., Cox, D. N., & Lin, H. (2001). Yb Modulates the Divisions of Both Germline and Somatic Stem Cells through piwi- and hh-Mediated Mechanisms in the Drosophila Ovary. *Molecular Cell*, 7(3), 497-508.  
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00197-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00197-6)
- Klenov, M. S., Sokolova, O. A., Yakushev, E. Y., Stolyarenko, A. D., Mikhaleva, E. A., Lavrov, S. A., & Gvozdev, V. A. (2011). Separation of stem cell maintenance and transposon silencing functions of Piwi protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

108(46), 18760-18765. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106676108>

Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M., Asada, N., Kojima, K., Yamaguchi, Y., Ijiri, T. W., Hata, K., Li, E., Matsuda, Y., Kimura, T., Okabe, M., Sakaki, Y., Sasaki, H., & Nakano, T. (2008). DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes & Development*, 22(7), 908-917.

<https://doi.org/10.1101/gad.1640708>

Le Thomas, A., Rogers, A. K., Webster, A., Marinov, G. K., Liao, S. E., Perkins, E. M., Hur, J. K., Aravin, A. A., & Tóth, K. F. (2013). Piwi induces piRNA-guided transcriptional silencing and establishment of a repressive chromatin state. *Genes & Development*, 27(4), 390-399. <https://doi.org/10.1101/gad.209841.112>

Lewis, S. H., Quarles, K. A., Yang, Y., Tanguy, M., Frézal, L., Smith, S. A., Sharma, P. P., Cordaux, R., Gilbert, C., Giraud, I., Collins, D. H., Zamore, P. D., Miska, E. A., Sarkies, P., & Jiggins, F. M. (2017). Pan-arthropod analysis reveals somatic piRNAs as an ancestral defence against transposable elements. *Nature Ecology & Evolution*, 2(1), 174-181. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0403-4>

Li, F., Yuan, P., Rao, M., Jin, C.-H., Tang, W., Rong, Y.-F., Hu, Y.-P., Zhang, F., Wei, T., Yin, Q., Liang, T., Wu, L., Li, J., Li, D., Liu, Y., Lou, W., Zhao, S., & Liu, M.-F. (2020). piRNA-independent function of PIWIL1 as a co-activator for anaphase promoting complex/cyclosome to drive pancreatic cancer metastasis. *Nature Cell Biology*, 22(4), 425-438. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0486-z>

Liu, X., Sun, Y., Guo, J., Ma, H., Li, J., Dong, B., Jin, G., Zhang, J., Wu, J., Meng, L., & Shou, C. (2006). Expression of *hiwi* gene in human gastric cancer was associated with proliferation of cancer cells. *International Journal of Cancer*, 118(8), 1922-1929. <https://doi.org/10.1002/ijc.21575>

Malone, C. D., Brennecke, J., Dus, M., Stark, A., McCombie, W. R., Sachidanandam, R., & Hannon, G. J. (2009). Specialized piRNA Pathways Act in Germline and Somatic Tissues of the *Drosophila* Ovary. *Cell*, 137(3), 522-535.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.040>

Mandel, J. S., Bond, J. H., Church, T. R., Snover, D. C., Bradley, G. M., Schuman, L. M., & Ederer, F. (1993). Reducing Mortality from Colorectal Cancer by Screening for Fecal Occult Blood. *New England Journal of Medicine*, 328(19), 1365-1371.

<https://doi.org/10.1056/NEJM199305133281901>

Nolde, M. J., Cheng, E., Guo, S., & Lin, H. (2013). Piwi Genes Are Dispensable for Normal Hematopoiesis in Mice. *PLoS ONE*, 8(8), e71950.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071950>

Ophinni, Y., Palatini, U., Hayashi, Y., & Parrish, N. F. (2019). piRNA-Guided CRISPR-like Immunity in Eukaryotes. *Trends in Immunology*, 40(11), 998-1010.

<https://doi.org/10.1016/j.it.2019.09.003>

Palakodeti, D., Smielewska, M., Lu, Y.-C., Yeo, G. W., & Graveley, B. R. (2008). The PIWI proteins SMEDWI-2 and SMEDWI-3 are required for stem cell function and piRNA expression in planarians. *RNA*, 14(6), 1174-1186.

<https://doi.org/10.1261/rna.1085008>

Perrat, P. N., DasGupta, S., Wang, J., Theurkauf, W., Weng, Z., Rosbash, M., & Waddell, S. (2013). Transposition-Driven Genomic Heterogeneity in the *Drosophila* Brain.

*Science*, 340(6128), 91-95. <https://doi.org/10.1126/science.1231965>

Qiao, D., Zeeman, A.-M., Deng, W., Looijenga, L. H. J., & Lin, H. (2002). Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene*, 21(25), 3988-3999.

<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205505>

Rajasethupathy, P., Antonov, I., Sheridan, R., Frey, S., Sander, C., Tuschl, T., & Kandel, E. R. (2012). A Role for Neuronal piRNAs in the Epigenetic Control of Memory-Related Synaptic Plasticity. *Cell*, 149(3), 693-707. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.057>

Reuter, M., Berninger, P., Chuma, S., Shah, H., Hosokawa, M., Funaya, C., Antony, C.,

Sachidanandam, R., & Pillai, R. S. (2011). Miwi catalysis is required for piRNA

amplification-independent LINE1 transposon silencing. *Nature*, 480(7376), 264-267.

<https://doi.org/10.1038/nature10672>

- Rivas, F. V., Tolia, N. H., Song, J.-J., Aragon, J. P., Liu, J., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(4), 340-349. <https://doi.org/10.1038/nsmb918>
- Ross, R. J., Weiner, M. M., & Lin, H. (2014). PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. *Nature*, 505(7483), 353-359. <https://doi.org/10.1038/nature12987>
- Ruby, J. G., Jan, C., Player, C., Axtell, M. J., Lee, W., Nusbaum, C., Ge, H., & Bartel, D. P. (2006). Large-Scale Sequencing Reveals 21U-RNAs and Additional MicroRNAs and Endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell*, 127(6), 1193-1207. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.040>
- Saito, K., Nishida, K. M., Mori, T., Kawamura, Y., Miyoshi, K., Nagami, T., Siomi, H., & Siomi, M. C. (2006). Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes & Development*, 20(16), 2214-2222. <https://doi.org/10.1101/gad.1454806>
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stamatii, A., & Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, 21(1), 1-26. <https://doi.org/10.1007/s10565-005-0085-6>
- Samuelson, L. C. (2018). Debate over the identity of an intestinal niche-cell population settled. *Nature*, 558(7710), 380-381. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05281-z>
- Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S., & Shimizu, N. (2003). Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome☆. *Genomics*, 82(3), 323-330. [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(03\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(03)00129-0)
- Seipel, K., Yanze, N., & Schmid, V. (2004). The germ line and somatic stem cell gene Cniwi in the jellyfish *Podocoryne carnea*. *The International Journal of Developmental Biology*, 48(1), 1-7. <https://doi.org/10.1387/ijdb.15005568>
- Sharma, A. K., Nelson, M. C., Brandt, J. E., Wessman, M., Mahmud, N., Weller, K. P., & Hoffman, R. (2001). Human CD34+ stem cells express the hiwigene, a human

- homologue of the *Drosophila* gene piwi. *Blood*, 97(2), 426-434.  
<https://doi.org/10.1182/blood.V97.2.426>
- Shi, S., Yang, Z.-Z., Liu, S., Yang, F., & Lin, H. (2020). PIWIL1 promotes gastric cancer via a piRNA-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(36), 22390-22401. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008724117>
- Siddiqi, S., Terry, M., & Matushansky, I. (2012). Hiwi Mediated Tumorigenesis Is Associated with DNA Hypermethylation. *PLoS ONE*, 7(3), e33711.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033711>
- Sienski, G., Dönertas, D., & Brennecke, J. (2012). Transcriptional Silencing of Transposons by Piwi and Maelstrom and Its Impact on Chromatin State and Gene Expression. *Cell*, 151(5), 964-980. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.040>
- Siomi, H., & Siomi, M. C. (2009). On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457(7228), 396-404. <https://doi.org/10.1038/nature07754>
- Szakmary, A., Reedy, M., Qi, H., & Lin, H. (2009). The Yb protein defines a novel organelle and regulates male germline stem cell self-renewal in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Biology*, 185(4), 613-627. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903034>
- Taft, R. J., Pheasant, M., & Mattick, J. S. (2007). The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays*, 29(3), 288-299.  
<https://doi.org/10.1002/bies.20544>
- Taubert, H., Greither, T., Kaushal, D., Würfl, P., Bache, M., Bartel, F., Kehlen, A., Lautenschläger, C., Harris, L., Kraemer, K., Meye, A., Kappler, M., Schmidt, H., Holzhausen, H.-J., & Hauptmann, S. (2007). Expression of the stem cell self-renewal gene Hiwi and risk of tumour-related death in patients with soft-tissue sarcoma. *Oncogene*, 26(7), 1098-1100. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209880>
- Ter Horst, A. M., Nigg, J. C., Dekker, F. M., & Falk, B. W. (2019). Endogenous Viral Elements Are Widespread in Arthropod Genomes and Commonly Give Rise to PIWI-Interacting RNAs. *Journal of Virology*, 93(6), e02124-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.02124-18>
- Tosar, J. P., García-Silva, M. R., & Cayota, A. (2021). Circulating SNORD57 rather than

piR-54265 is a promising biomarker for colorectal cancer: Common pitfalls in the study of somatic piRNAs in cancer. *RNA*, 27(4), 403-410.

<https://doi.org/10.1261/rna.078444.120>

Vagin, V. V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V., & Zamore, P. D. (2006). A Distinct Small RNA Pathway Silences Selfish Genetic Elements in the Germline. *Science*, 313(5785), 320-324. <https://doi.org/10.1126/science.1129333>

Wang, H., Chen, B., Cao, X., Wang, J., Hu, X., Mu, X., & Chen, X. (2015). The clinical significances of the abnormal expressions of Piwil1 and Piwil2 in colonic adenoma and adenocarcinoma. *Oncotargets and Therapy*, 1259.

<https://doi.org/10.2147/OTT.S77003>

Willkomm, S., Zander, A., Gust, A., & Grohmann, D. (2015). A Prokaryotic Twist on Argonaute Function. *Life*, 5(1), 538-553. <https://doi.org/10.3390/life5010538>