

UNIVERSIDAD DE GRANADA

INSTITUTO DE PARASITOLOGÍA Y BIOMEDICINA “LÓPEZ-NEYRA”
(CSIC)

***Selección molecular in vitro como base
para el diseño de RNAs inhibidores frente a
la región IRES de HCV***

Cristina Romero López

Tesis Doctoral

UNIVERSIDAD DE GRANADA

INSTITUTO DE PARASITOLOGÍA Y BIOMEDICINA “LÓPEZ-NEYRA”
(CSIC)

***Selección molecular in vitro como base para el
diseño de RNAs inhibidores frente a la región
IRES de HCV***

Directores de Tesis

Alfredo Berzal Herranz

Alicia Barroso del Jesus

Investigador Científico

Investigadora

Consejo Superior de

Banco Andaluz de Líneas Celulares

Investigaciones Científicas

Memoria presentada por la Licenciada Cristina Romero López para optar al grado de Doctor

Cristina Romero López
Tesis Doctoral
Granada, 2005

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN.....	1
I.1.- ORIGEN DE LA VIDA EN LA TIERRA. EL MUNDO RNA	1
I.2.- RNAs <i>ANTISENSE</i> NATURALES	7
I.3.- RIBOZIMAS NATURALES	11
I.3.1.- <i>Intrones</i>	12
I.3.1.1.- Intrones grupo I.....	13
I.3.1.2.- Intrones grupo II	15
I.3.2.- <i>RNasa P</i>	16
I.3.3.- <i>RNAs catalíticos pequeños</i>	18
I.3.3.1.- Ribozima HDV	19
I.3.3.2.- Ribozima VS de Neurospora	21
I.3.3.3.- Ribozima hairpin.....	22
I.4.- RIBOZIMA HAMMERHEAD.....	24
I.4.1.- <i>Origen y función</i>	24
I.4.2.- <i>Estructura secundaria y requerimientos de secuencia</i>	26
I.4.3.- <i>Estructura terciaria</i>	29
I.5.- TERAPIA CON RNA	32
I.5.1.- <i>Ribozimas</i>	33
I.5.2.- <i>Antisense</i>	35
I.5.3.- <i>Aptámeros</i>	37
I.6.- SELECCIÓN MOLECULAR <i>IN VITRO</i>	38
I.6.1.- <i>Concepto</i>	38
I.6.2.- <i>Aplicaciones</i>	42
I.6.2.1.- Selección <i>in vitro</i> de ribozimas.....	43
I.6.2.1.1.- Intrones grupo I.....	43
I.6.2.1.2.- Ribozima hairpin.....	44
I.6.2.1.3.- Ribozima hammerhead	47
I.6.2.1.4.- <i>RNasa P</i>	50

I.6.2.1.5.- Nuevas actividades catalíticas identificadas mediante selección <i>in vitro</i>	50
I.6.2.2.- Selección <i>in vitro</i> de aptámeros de RNA.....	52
I.7.- BIOLOGÍA DE HCV	54
I.7.1.- Organización genética.....	55
I.7.2.- Región 5'UTR de HCV	57
I.7.3.- Estrategias terapéuticas	62
I.7.3.1.- Ribozimas	64
I.7.3.2.- Antisense	65
I.7.3.3.- Aptámeros.....	65
O.- OBJETIVOS:.....	69
M.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
M.1.- MATERIALES.....	71
M.1.1.- Productos químicos	71
M.1.2.- Enzimas de restricción y modificadoras de DNA y de RNA.....	71
M.1.3.- Isótopos radiactivos	71
M.1.4.- Películas autorradiográficas.....	72
M.1.5.- Medios de cultivo.....	72
M.1.6.- Tampones.....	72
M.1.7.- Construcciones de DNA	75
M.1.7.1.- pBSHH363	75
M.1.7.2.- pU5'HCV-691	76
M.1.7.3.- pU5'HCV-691gg.....	77
M.1.7.4.- pU5'HCV-356	78
M.1.7.5.- pGT-P _n	78
M.1.8.- Cepas bacterianas	79
M.1.9.- Marcadores de masa molecular	79
M.1.9.1.- Para DNA	79
M.1.9.2.- Para RNA	79

M.1.10.- <i>Programas informáticos</i>	80
M.2.- MÉTODOS	81
M.2.1.- <i>Cultivo de células procariotas</i>	81
M.2.2.- <i>Crioconservación de células procariotas</i>	81
M.2.3.- <i>Transformación de E.coli con DNA plasmídico</i>	81
M.2.3.1.- Preparación de células competentes	81
M.2.3.2.- Transformación.....	82
M.2.4.- <i>Selección de colonias recombinantes de E. coli</i>	82
M.2.5.- <i>Síntesis de ácidos nucleicos</i>	83
M.2.5.1.- Síntesis química de oligonucleótidos.....	83
M.2.5.2.- Síntesis por hibridación de oligonucleótidos y extensión.....	83
M.2.5.3.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	84
M.2.5.4.- Transcripción <i>in vitro</i>	85
M.2.5.5.- RT-PCR	86
M.2.6.- <i>Aislamiento de DNA plasmídico de E.coli</i>	87
M.2.6.1.- Pequeña escala	87
M.2.6.1.1.- Método de extracción rápida	87
M.2.6.1.2.- Método <i>kit</i> “High Pure Plasmid Isolation”	87
M.2.6.2.- Gran escala	88
M.2.7.- <i>Electroforesis</i>	88
M.2.7.1.- De ácidos nucleicos	88
M.2.7.1.1.- En geles de agarosa.....	88
M.2.7.1.2.- En geles desnaturalizantes de poliacrilamida	89
M.2.7.1.3.- En geles nativos de poliacrilamida	89
M.2.7.2.- De proteínas	90
M.2.8.- <i>Purificación de ácidos nucleicos</i>	90
M.2.8.1.- Extracción fenólica y precipitación	90
M.2.8.2.- Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.....	91
M.2.8.2.1.- Método de congelación con fenol.....	91
M.2.8.2.2.- Método Wizard SV Gel Clean Up®.....	91
M.2.8.3.- Purificación de ácidos nucleicos a partir de geles de poliacrilamida	92
M.2.8.4.- Cromatografía por exclusión de tamaños	92
M.2.9.- <i>Inmovilización de ácidos nucleicos a un soporte sólido</i>	93

M.2.9.1.- Inmovilización de RNA marcado internamente con biotina a una columna de sefarosa-estreptavidina	93
M.2.9.2.- Inmovilización de RNA a una columna de sefarosa-estreptavidina mediante hibridación con un ODN biotilado	93
M.2.10.- <i>Concentración de ácidos nucleicos</i>	94
M.2.11.- <i>Cuantificación de ácidos nucleicos</i>	94
M.2.11.1.- Mediante espectrofotometría	94
M.2.11.2.- Cuantificación de RNA marcado radiactivamente en solución.....	95
M.2.11.3.- Cuantificación de RNA radiactivo inmovilizado en geles de poliacrilamida.....	95
M.2.12.- <i>Secuenciación automática de DNA</i>	96
M.2.13.- <i>Digestión de ácidos nucleicos</i>	96
M.2.13.1.- DNA	96
M.2.13.1.1.- Enzimas de restricción.....	96
M.2.13.1.2.- RQ1 DNasa.....	97
M.2.13.2.- RNA.....	97
M.2.13.2.1.- RNasa A	97
M.2.13.2.2.- RNasa T1	98
M.2.13.2.3.- Degradación con RNasa H	98
M.2.13.2.4.- Degradación con plomo del RNA	99
M.2.13.2.5.- Hidrólisis alcalina del RNA	99
M.2.14.- <i>Ligación de DNA</i>	100
M.2.15.- <i>Desfosforilación de ácidos nucleicos</i>	101
M.2.15.1.- Desfosforilación de DNA	101
M.2.15.2.- Desfosforilación de RNA	101
M.2.16.- <i>Técnicas de marcaje de ácidos nucleicos</i>	101
M.2.16.1.- Marcaje radiactivo de RNA.....	101
M.2.16.1.1.- Marcaje radiactivo en el extremo 5'	101
M.2.16.1.2.- Marcaje radiactivo interno.....	102
M.2.16.2.- Marcaje interno con biotina de RNA	102
M.2.17.- <i>Reacciones de asociación</i>	103
M.2.18.- <i>Reacciones de corte con ribozimas</i>	104
M.2.19.- <i>Síntesis de proteínas</i>	105

R.- RESULTADOS	107
R.1.- RIBOZIMAS HAMMERHEAD DIRIGIDAS FRENTE A LA REGIÓN IRES DE HCV	107
R.1.1.- <i>Asociación de la ribozima hammerhead HH363 a la región IRES de HCV...</i>	108
R.1.2.- <i>Procesamiento in vitro del RNA sustrato por HH363</i>	110
R.1.3.- <i>Inhibición de la actividad del IRES por HH363</i>	112
R.2.- MÉTODO DE SELECCIÓN MOLECULAR <i>IN VITRO</i>	117
R.2.1.- <i>Diseño y construcción de la población inicial de moléculas de RNA</i>	118
R.2.2.- <i>Diseño y construcción de los sustratos utilizados en el método de selección.</i>	119
R.2.2.1.- Selección para la asociación. Diseño y construcción del sustrato 5'HCV-356	120
R.2.2.2.- Selección para el corte. Diseño y construcción del sustrato 5'HCV-691	121
R.2.3.- <i>Selección molecular in vitro</i>	121
R.2.3.1.- Primer paso de selección. Selección para la asociación a la región 5'UTR de HCV	123
R.2.3.2.- Segundo paso de selección. Selección para el procesamiento del sustrato 5'HCV-691	123
R.2.3.3.- Validación del método de selección	125
R.2.3.3.1.- Asociación de las poblaciones P ₀ , P ₃ y P ₆ a la región 5'UTR de HCV	125
R.2.3.3.2.- Actividad catalítica de las poblaciones P ₀ , P ₃ y P ₆ frente al sustrato 5'HCV-691	127
R.2.4.- <i>Análisis de las moléculas seleccionadas</i>	128
R.2.5.- Estudio teórico de los lugares de unión en el RNA sustrato	131
R.3.- ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA REGIÓN IRES <i>IN VITRO</i>	133
R.4.- ENSAYOS DE ASOCIACIÓN DE LOS RNAs INHIBIDORES AL SUSTRATO LARGO	136
R.5.- ENSAYOS DE PROCESAMIENTO <i>IN VITRO</i> DEL RNA SUSTRATO POR LOS RNAs QUIMÉRICOS	141
R.6.- DETERMINACIÓN DE LAS SECUENCIAS IMPLICADAS EN LA UNIÓN A LA REGIÓN 5'UTR	143
R.6.1.- <i>Estudio de los RNAs quiméricos</i>	145
R.6.1.1.- Grupo 1. Variante HH363-24	146

R.6.1.2.- Grupo 2. Variante HH363-31.....	147
R.6.1.3.- Grupo 3. Variante HH363-53.....	148
R.6.1.4.- Grupo 4. Variante HH363-10.....	149
R.6.1.5.- Grupo 5. Variante HH363-50.....	151
R.2.1.6.- Grupo 6. Variante HH363-17.....	153
R.6.1.7.- Grupo 7. Variante HH363-18.....	154
R.6.1.7.1.- Variante HH363-32.....	156
R.6.2.- <i>Determinación de los lugares de unión en el RNA sustrato 5'HCV-356.....</i>	157
R.6.2.1.- Grupo 1. Variante HH363-24.....	158
R.6.2.2.- Grupo 2. Variante HH363-31.....	159
R.6.2.3.- Grupo 3. Variante HH363-53.....	159
R.6.2.4.-Grupo 4. Variante HH363-10.....	161
R.6.2.5.- Grupo 5. Variante HH363-50.....	163
R.6.2.6.- Grupo 6. Variante HH363-17.....	164
R.6.2.7.- Grupo 7. Variante HH363-18.....	166
R.6.2.7.1.- Variante HH363-32.....	167
R.6.3.- <i>Determinación del papel ejercido por HH363 en la interacción de los RNAs quiméricos a su sustrato.....</i>	168
R.6.4.- <i>Determinación de los nucleótidos implicados en la interacción. Conclusiones.....</i>	169
R.6.4.1.- Variante HH363-24.....	170
R.6.4.2.- Variante HH363-31.....	171
R.6.4.3.- Variante HH363-53.....	171
R.6.4.4.- Variante HH363-10.....	172
R.6.4.5.- Variante HH363-50.....	172
R.6.4.6.- Variante HH363-17.....	172
R.6.4.7.- Variante HH363-18.....	173
R.6.4.8.- Variante HH363-32.....	174

D.- DISCUSIÓN..... 175

D.1.- DISEÑO DE RIBOZIMAS DIRIGIDAS FRENTE A LA REGIÓN 5'UTR DE HCV 175

D.2.- DESARROLLO DEL MÉTODO DE SELECCIÓN MOLECULAR *IN VITRO* 178

D.3.- SECUENCIAS SELECCIONADAS	181
D.4.- IMPORTANCIA DE LOS MOTIVOS CONSENSO EN LA UNIÓN AL RNA SUSTRATO Y DETERMINACIÓN DE LOS LUGARES DE ANCLAJE.....	182
D.5.- ASOCIACIÓN DE RNAs QUIMÉRICOS Y APTÁMEROS AL SUSTRATO 5'HCV-691GG: ..	190
D.6.- PROCESAMIENTO <i>IN VITRO</i> DE LA REGIÓN IRES DE HCV.....	193
D.7.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-IRES DE LOS RNAs INHIBIDORES	195
C.- CONCLUSIONES	201
B.- BIBLIOGRAFÍA	203
A.- ABREVIATURAS	253

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- Origen de la vida en la Tierra. El mundo RNA

Durante el siglo pasado se han conseguido grandes avances en los campos de la biología y la bioquímica. Actualmente se producen vacunas y se desarrollan antibióticos que nos protegen de múltiples enfermedades, se manipulan alimentos para mejorar su calidad, se identifican nuevos genes implicados en el desarrollo de los organismos,... Sin embargo, el origen de la vida sobre la Tierra sigue siendo una pregunta sin responder. Desde Aristóteles hasta Darwin el fenómeno de la evolución de la vida en nuestro planeta ha sido ampliamente postulado y documentado gracias a la interacción de la biología con otras ciencias, como la paleontología, la anatomía comparada, la embriología, la biogeografía y, más recientemente, la biología molecular.

A pesar de los destacados avances llevados a cabo en el campo de la evolución de las especies, poco se sabe de la evolución química, es decir, el desarrollo de materia viva a partir de materia “no viva”. En este proceso se hace necesario, primeramente, la síntesis y acumulación de moléculas orgánicas sencillas. Su generación espontánea fue propuesta inicialmente durante los años 20 por Oparin y Haldane (Oparin, 1924; Haldane, 1929; Oparin, 1936; Oparin, 1938) y finalmente demostrada en 1952 por Urey y Miller (Urey, 1952; Miller, 1953), quienes consiguieron simular las condiciones existentes en la Tierra primitiva. Hace aproximadamente 4500 millones de años, la Tierra se formó como consecuencia de la compactación de materia mediada por fuerzas gravitacionales (Fig. I.1); como consecuencia, la temperatura inicialmente baja fue ascendiendo y el calor acumulado se liberó a través de manantiales térmicos y volcanes. Esto provocó la emanación de gases (CO_2 , CO , N_2 , H_2 y vapor de agua) que conformaron la atmósfera inicial. Cuando la temperatura disminuyó, el vapor de agua se condensó ocasionando lluvias torrenciales que dieron lugar a los mares y océanos. Éste es el ambiente en el que se inició la síntesis de los monómeros sencillos que finalmente condujeron a la generación de sistemas vivos.

En este esquema clásicamente admitido queda por identificar la naturaleza de las primeras moléculas orgánicas. Existen numerosas hipótesis para ello, pero una de las más aceptadas es la que postula la evolución de la vida basada en el RNA (*RNA world*). Esta

idea general fue propuesta hace casi 40 años por Woese, Orgel y Crick (Woese, 1967; Crick, 1968; Orgel, 1968). En ella se proponía la ubicuidad del RNA como material genético capaz de replicarse gracias a apareamientos Watson-Crick. El descubrimiento posterior, a principios de la década de los 80, de la capacidad catalítica del RNA (ribozimas; Kruger *et al.*, 1982; Guerrier-Takada *et al.*, 1983) confería al ácido ribonucleico un gran potencial no sólo como codificador, sino también como responsable de manifestaciones fenotípicas. En el mundo actual, dominado por el DNA y las proteínas, aún se pueden apreciar vestigios de este período, el más evidente de los cuales recae en el RNA ribosómico que cataliza la formación del enlace peptídico.

El término “mundo RNA” define un período hipotético de la biosfera temprana que abarca aproximadamente 200 millones de años (Fig. I.1), en el que la información y las actividades catalíticas necesarias para la vida se encontraban incluidas en el RNA. En este concepto se incluyen tres aspectos básicos:

- 1º El RNA garantiza la continuidad genética para que la vida pueda evolucionar.
- 2º Los apareamientos tipo Watson-Crick resultan esenciales para la replicación y, en consecuencia, para la evolución.
- 3º Las primeras proteínas codificadas genéticamente no ejercieron un papel como catalizadores.

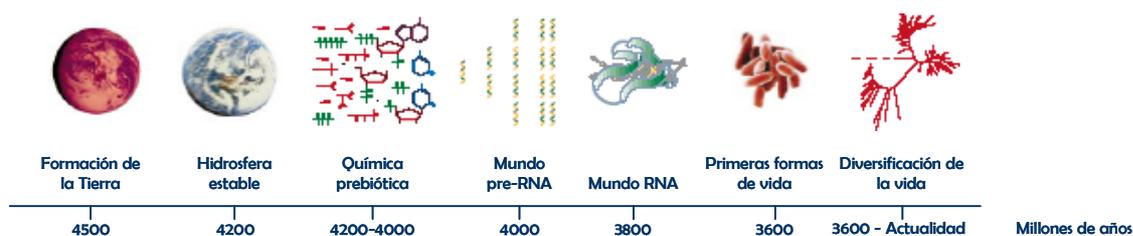


Fig. I.1.- Historia cronológica del desarrollo de la vida sobre la Tierra. En la figura se muestran las etapas hipotéticas a través de las cuales se originó la vida en la Tierra. Figura tomada de (Joyce, 2002).

El RNA presenta una serie de características que lo convierten en una molécula idónea para ser sometida a un proceso de selección natural (es decir, encuadrada en un sistema darwiniano):

- Composición sencilla, únicamente cuatro monómeros de propiedades físicas y químicas similares.
- Fácil polimerización de sus monómeros convenientemente activados.
- Solubilidad en medio acuoso gracias a su carácter polianiónico.
- Adopta estructuras flexibles que aceptan cambios secuenciales.
- Posibilidad de autorreplicación debido al establecimiento de uniones específicas Watson-Crick entre los monómeros que lo componen.

Si se supone la existencia de nucleótidos en un ambiente prebiótico capaces de combinarse espontáneamente para formar polímeros, y estos a su vez capaces de replicarse, entonces se puede concebir que el RNA fuera el iniciador de la vida sobre la Tierra. Sin embargo, los conocimientos de los que se disponen sobre química prebiótica indican que esto es poco probable (revisado en (Hughes *et al.*, 2004)). Esto lleva a plantear la siguiente cuestión: ¿existió un mundo previo al mundo RNA? Y si es así, ¿cómo ocurrió la progresión hacia el RNA, y posteriormente al DNA y las proteínas? En la figura I.2 se muestra un esquema que resume las distintas rutas a través de las cuales pudo ocurrir esta transición. En cualquiera de los casos se mantiene la hipótesis de que el RNA jugó un papel fundamental en el desarrollo y origen de los primeros seres vivos sobre la Tierra.

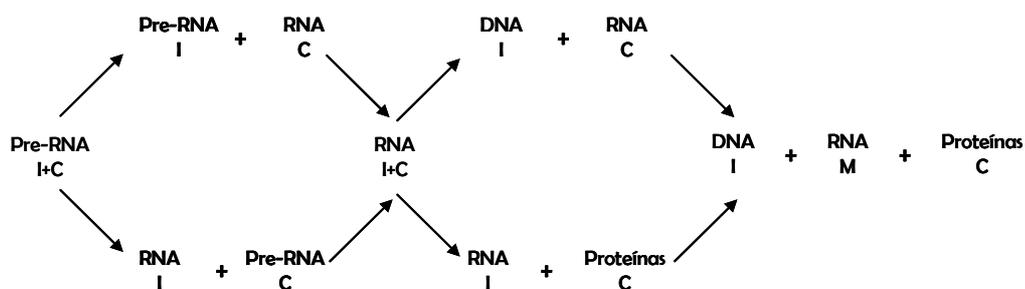


Fig. I.2.- Esquema representativo de las posibles rutas seguidas para el desarrollo del mundo RNA, según Nielsen (Nielsen, 1993). I = información; C = catálisis; M = molécula mediadora auxiliar. Figura tomada de (Dworkin *et al.*, 2003).

La ruta pre-RNA/RNA fue propuesta por Nielsen en 1993 (Nielsen, 1993) e incluye la existencia de moléculas compuestas por unidades de aminoetil-glicina a las que quedan unidas las bases nitrogenadas. La concatenación de varios de estos monómeros a través de enlaces similares al peptídico da lugar a un polímero conocido como PNA (*peptide nucleic*

acid) (Fig. I.3). Esta hipótesis ha sido ampliamente aceptada y se ha visto engrosada por la incorporación de nuevos polímeros como potenciales precursores del RNA. Es el caso del TNA (*threose nucleic acid*) y de otros análogos de ácidos nucleicos en los que la molécula de d-ribosa es sustituida por glicerol o piranosa (revisado en (Joyce, 2002)).

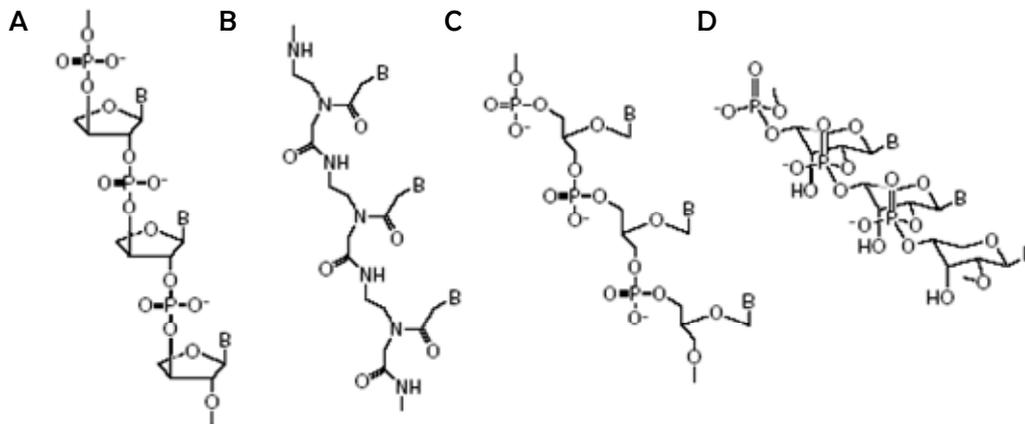


Fig. I.3.- Posibles precursores del RNA. A) TNA (*threose nucleic acid*); B) PNA (*peptide nucleic acid*); C) Análogos de glicerol; D) Piranosil-RNA. B = base nucleotídica. Figura tomada de (Joyce, 2002).

Una vez generadas las primeras moléculas de RNA, es necesario que el polímero se pueda propagar y sufrir presión selectiva, para lo cual se hace imprescindible el desarrollo de una actividad replicasa. El fenómeno de la elongación y/o replicación del RNA en la Tierra primitiva ha sido explicado por varios modelos:

a) Replicación no enzimática:

La unión de ribonucleótidos en ausencia de un catalizador puede generar enlaces del tipo 5'-5' pirofosfato, 2'-5' fosfodiéster y 3'-5' fosfodiéster, siendo poco probable la formación mayoritaria de éste último. La formación del nuevo polímero no requiere de una molécula que actúe como molde. Este modelo ha sido descartado.

b) Replicación enzimática:

Esta hipótesis es la más aceptada. El esquema más simple que permitiría la propagación de moléculas de RNA implicaría la existencia de una ribozima con capacidad replicasa y su secuencia complementaria, que podría actuar como cebador durante la reacción de polimerización. La ausencia, en los organismos actuales, de ribozimas capaces de catalizar reacciones de polimerización frenó inicialmente el desarrollo de este modelo.

Sin embargo, el empleo de métodos de selección molecular *in vitro* (apartado I.7) ha permitido la obtención de ribozimas capaces de catalizar la polimerización de nucleótidos. En la tabla I.1 se encuentran resumidas sus características.

Ribozima	Actividad	Tipo de enlace	Complementariedad	Referencia
RNA ligasas				
Clase I	Ligación de un cebador al extremo 5' de la ribozima	3'-5' fosfodiéster	+	(Bartel y Szostak, 1993; Ekland <i>et al.</i> , 1995)
Clase II	Ligación de un cebador al extremo 5' de la ribozima	2'-5' fosfodiéster	+	(Bartel y Szostak, 1993; Ekland <i>et al.</i> , 1995)
Clase III	Ligación de un cebador al extremo 5' de la ribozima	2'-5' fosfodiéster	+	(Bartel y Szostak, 1993; Ekland <i>et al.</i> , 1995)
L1	Ligación de un cebador al extremo 5' de la ribozima	3'-5' fosfodiéster	+	(Robertson y Ellington, 1999)
R3/R3C	Ligación de un cebador al extremo 5' de la ribozima	3'-5' fosfodiéster	+	(Rogers y Joyce, 2001)
Clase hc	Ligación de un cebador al extremo 5' de la ribozima	3'-5' fosfodiéster	+	(Jaeger <i>et al.</i> , 1999)
18-2 (Clase hc)	Ligación de dos moléculas de RNA Adición de NTPs a un RNA molde	3'-5' fosfodiéster	-	(McGinness y Joyce, 2002)
Aptazima	Ligación de dos moléculas de RNA en presencia de péptidos	3'-5' fosfodiéster	+	(Robertson <i>et al.</i> , 2004)
RNA polimerasas				
Clase I	Elongación de un cebador en tres residuos	3'-5' fosfodiéster	+	(Ekland y Bartel, 1996; Johnston <i>et al.</i> , 2001)
RNA replicasas				
Clase I	Elongación de un cebador	3'-5' fosfodiéster	-	(Johnston <i>et al.</i> , 2001)

Tabla I.1.- Ribozimas no naturales generadas mediante selección molecular *in vitro* con actividad RNA ligasa, RNA polimerasa y RNA replicasa. “Complementariedad” hace referencia al requerimiento de apareamiento con el complejo cebador-molde por parte del RNA catalítico.

La principal conclusión que se puede extraer de estos estudios es que el RNA es una molécula con propiedades físicas y químicas únicas, y por tanto el empleo de enzimas proteicos como únicos modelos para la obtención de ribozimas con actividad replicasa es restrictivo y no permite extrapolar conclusiones acerca de la naturaleza de una hipotética RNA polimerasa primitiva.

Además del proceso de replicación cabe suponer la existencia de un metabolismo más o menos complejo que permitiría la síntesis de ribonucleótidos mediada por moléculas de RNA y su posterior incorporación a un RNA sustrato. Los métodos de selección molecular *in vitro* han permitido obtener ribozimas con actividad nucleótido sintasa (Unrau y Bartel, 1998) o polinucleótido fosforilasa (Lorsch y Szostak, 1994a; Huang y Yarus, 1997) (apartado I.7).

Si el desarrollo de una actividad replicasa es el primer paso necesario para la implantación de un mundo RNA eficaz, la evolución hacia la síntesis de proteínas supone el fin de los organismos compuestos únicamente por ácidos nucleicos. Parece lógico pensar que la síntesis de proteínas surgió inicialmente como un proceso sencillo en el que la unión de aminoácidos a moléculas de RNA confería cierta ventaja selectiva durante el fenómeno de replicación (Weiner y Maizels, 1987). En un segundo paso, varias moléculas de RNA aminoaciladas podrían unirse generando así los primeros péptidos sintetizados de una manera totalmente aleatoria. Finalmente, el desarrollo de ribozimas con actividad peptidil transferasa habría permitido la codificación de las proteínas y su actividad como catalizadores de reacciones contenidas en un metabolismo complejo. Esta teoría quedó claramente reforzada con el descubrimiento de una actividad peptidil transferasa en el rRNA 50S (Ban *et al.*, 2000), permitiendo así afirmar que “El ribosoma es una ribozima” (“The ribosome is a ribozyme”, (Cech, 2000)).

La aparición del DNA como portador del material genético supone un gran avance para el desarrollo de genomas complejos, debido a su mayor estabilidad con respecto al RNA. La síntesis de una molécula de DNA a partir de un molde resulta más compleja que para el RNA, ya que el grupo situado en 3' es menos ácido. En cualquier caso, aunque se desconoce si el DNA evolucionó antes o después que la síntesis de proteínas, parece obvio

que la compartimentalización funcional aporta una serie de ventajas a los organismos que la poseen.

Finalmente, cabe destacar que esta hipótesis se encuentra sustentada por las propiedades bioquímicas del RNA, así como por su papel funcional en algunas rutas metabólicas de los organismos actuales. A pesar del limitado número de reacciones catalizadas por las ribozimas existentes, el desarrollo de los métodos de selección molecular *in vitro* ha ofrecido una visión mucho más versátil del RNA y ha permitido identificar moléculas con nuevas e inesperadas propiedades catalíticas que respaldan esta hipótesis. No obstante, es necesario realizar nuevos estudios geológicos, bioquímicos y filogenéticos que permitan confirmar que hace 3800 millones de años existió vida basada en el RNA.

El descubrimiento de la actividad catalítica del RNA en 1982 (Kruger *et al.*, 1982; Guerrier-Takada *et al.*, 1983) permitió considerar a esta molécula como algo más que un mero intermediario en las funciones celulares e impulsó el resurgir de la hipótesis sobre el mundo RNA. Su mecanismo de acción y su alta especificidad permitió proponer su utilidad como herramientas de inactivación génica. A partir de entonces se inició una búsqueda ininterrumpida de genes para RNAs no codificantes (ncRNAs: *non-coding RNAs*, o también conocidos como fRNAs: *functional RNAs*), que han sido relacionados con múltiples procesos de regulación de funciones celulares, entre los que destaca la modulación de la expresión génica. Existe un grupo de RNAs no codificantes conocidos como RNAs *antisense* naturales, capaces de ejercer una actividad reguladora en ausencia de factores proteicos.

I.2.- RNAs *antisense* naturales

Los primeros RNAs *antisense* naturales fueron descubiertos en 1981 en los laboratorios del Dr. Tomizawa y del Dr. Nordström. En el primero investigaban el mecanismo de regulación del número de copias del plásmido ColE1 (Tomizawa y Itoh, 1981; Tomizawa *et al.*, 1981), mientras que en el segundo los datos se obtuvieron para el plásmido R1 (Stougaard *et al.*, 1981), ambos de *E. coli*.

Los RNAs *antisense* naturales se pueden definir como moléculas reguladoras de pequeño tamaño (en general entre 55 y 150 nt), no traducibles, altamente estructuradas y cuya función viene determinada por una unión rápida y específica a su diana, mediada por complementariedad de secuencia (Eguchi y Tomizawa, 1991). Aunque el efecto mayoritario provocado por RNAs *antisense* es el de la inhibición post-transcripcional, se ha descrito la existencia de sistemas reguladores que provocan la activación de sus dianas (Lease y Belfort, 2000; Sledjeski *et al.*, 1996). Esta versatilidad queda también reflejada por los distintos tipos de sistemas modulados por *antisense* que se pueden definir: en los sistemas codificados en *cis*, tanto el RNA *antisense* como su diana se encuentran codificados en el mismo locus, pero son transcritos en direcciones opuestas, por lo que sus secuencias resultan totalmente complementarias; por el contrario, los sistemas codificados en *trans* conservan distintos locus para el *antisense* y su diana correspondiente, de manera que la complementariedad entre ambos es sólo parcial.

La mayoría de los RNAs *antisense* descritos hasta la fecha se encuentran en organismos procariontes, en los que regulan procesos relacionados con el control del número de plásmidos, la segregación y la conjugación (revisado en (Wagner *et al.*, 2002)). En eucariotas el fenómeno *antisense per se* es poco frecuente y va generalmente acompañado de la actividad de diversos complejos proteicos; es el caso de los procesos de edición, de *splicing*, o la interferencia.

La determinación de la estructura secundaria adoptada por un RNA *antisense* puede realizarse mediante estudios predictivos con diversos algoritmos matemáticos, y posteriormente confirmarse de manera experimental mediante ensayos de degradación con RNasas y agentes químicos específicos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Ohman y Wagner, 1989; van Biesen *et al.*, 1993; Asano *et al.*, 1998; Brantl y Wagner, 2000; Lindell *et al.*, 2002). Estos análisis se han llevado a cabo para un gran número de RNAs *antisense* diferentes, y se ha comprobado que todos ellos se pliegan para formar uno, dos o hasta tres dominios estructurales tipo tallo-lazo, importantes para el reconocimiento y posterior anclaje con el RNA diana. Los lazos presentan entre cinco y siete nt que contienen un motivo YUNR (Y: pirimidina; U: uracilo; R: purina; N: cualquier nucleótido), el cual adopta una estructura denominada giro de la uridina (*U-turn*; Fig. I.4), similar a la adquirida por el lazo del anticodón en los tRNAs (Asano *et al.*, 1998; Franch *et al.*, 1999).

La principal característica de este motivo es el giro y la retracción que se produce en el esqueleto azúcar-fosfato en el nucleótido N, que provoca la exposición al solvente de las bases situadas en 3' del mismo. Destaca también la formación de dos enlaces de hidrógeno, que implican al nucleótido de uracilo y al de purina. Como consecuencia se produce un incremento en la capacidad de apareamiento con otros residuos, contribuyendo al establecimiento de interacciones rápidas y específicas entre el RNA *antisense* y la diana. En cuanto al tallo, es necesario que los nucleótidos que componen la región próxima al lazo se encuentren parcialmente desestabilizados mediante la formación de burbujas (*bulges*, nucleótidos desapareados en una de las hebras) o lazos internos. Finalmente, es importante la presencia de regiones desapareadas situadas en 5' de la molécula o espaciadores entre dos estructuras tallo-lazo, ya que favorecen la estabilidad del complejo inicial y su progresión hacia estructuras más estables.

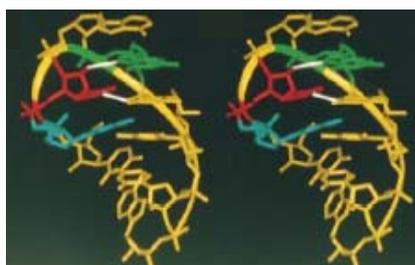


Fig. 1.4.-Imagen estereoscópica de la estructura propuesta para el lazo del RNA *antisense* Sok. Los nucleótidos invariables del motivo YUNR se muestran en azul, rojo y verde, respectivamente. Las líneas blancas representan enlaces de hidrógeno. Uno de los enlaces se establece entre el N3 del residuo de uracilo y el oxígeno del esqueleto azúcar-fosfato situado inmediatamente en 3' del motivo conservado; el otro enlace se forma por la interacción entre el N7 del nucleótido de purina y el grupo 2'-OH del residuo de uracilo. La estructura adquirida se denomina giro de la uridina y permite la exposición de las bases al medio. Figura tomada de (Franch *et al.*, 1999).

La alta eficiencia que presentan los RNAs *antisense* para regular la función de sus RNAs diana está determinada por dos parámetros: la velocidad de interacción entre ambos y la concentración de RNA *antisense* en el medio intracelular. Diversos estudios han demostrado que las cinéticas de unión no siguen un modelo saturante (Tomizawa, 1986; Persson *et al.*, 1990a;), a diferencia de lo que ocurre para los represores proteicos; esto quiere decir que incrementos en la concentración de RNA *antisense* conducen a una potenciación del efecto inhibitor. El paso limitante en el mecanismo de regulación queda restringido a la velocidad a la cual se establece el complejo entre las dos moléculas de

RNA. Los dominios estructurales tallo-lazo adoptados por los RNAs *antisense* y sus RNAs diana favorecen el establecimiento de uniones rápidas, efectivas y específicas a través de los nucleótidos expuestos en los lazos, debido a la conformación particular de esos motivos (giro de la uridina). Una vez ocurrida la unión inicial lazo-lazo, se requiere de una interacción entre regiones distales que consiguen desestabilizar la doble hélice del tallo y favorecen la progresión hacia un dúplex completo. Existen dos rutas alternativas a través de las cuales se puede formar un complejo estable (Fig. I.5):

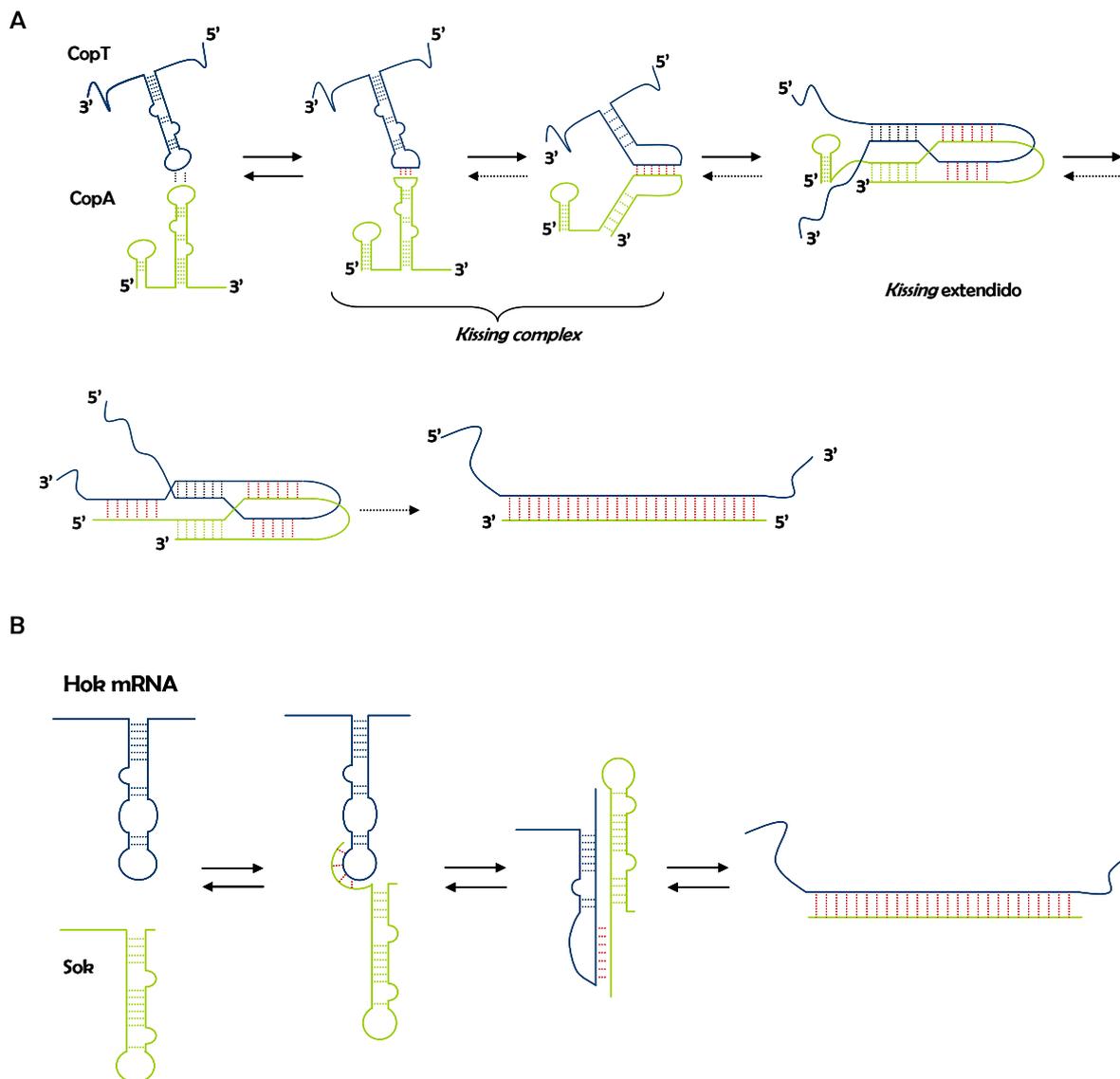


Fig. I.5.- Mecanismos de interacción entre un RNA *antisense* y su diana. El RNA diana se muestra en azul, en verde el RNA *antisense*. A) Ruta de interacción en dos pasos propuesta para el RNA *antisense* CopA y su diana CopT. B) Ruta de interacción en un paso para el sistema Hok/Sok.

- Ruta en dos pasos:

La interacción inicial se establece entre los nucleótidos de uno o dos lazos del RNA *antisense* con sus residuos complementarios en el RNA *sense* (Fig. I.5A). El complejo formado es reversible e inestable, y se denomina *kissing complex*. Esta estructura evoluciona por la interacción entre los residuos que flanquean los lazos hacia un complejo más estable, conocido como *kissing* extendido, constituido por cuatro hélices: dos intramoleculares y dos intermoleculares, conectadas por regiones de cadena sencilla. Para su formación es necesario que existan nucleótidos desapareados en la zona del tallo próxima al lazo, en forma de burbujas (*bulges*) o de lazos internos, ya que de otro modo la torsión que debería de producirse generaría una tensión estructural en la molécula que impediría la estabilización del complejo (Hjalt y Wagner, 1995). Éste ahora puede progresar hacia una estructura compuesta por cinco hélices, tres intermoleculares y dos intramoleculares. Finalmente las dos moléculas de RNA quedan apareadas formando un dúplex. Aunque esta ruta puede ocurrir en su totalidad, se ha comprobado que el dúplex completo no se forma *in vitro*, y que la inhibición puede producirse únicamente con la formación del *kissing* extendido (Wagner *et al.*, 1992; Malmgren *et al.*, 1996). Este modelo ha sido propuesto para los pares *sense/antisense* RNAI/RNAII del plásmido ColE1 (Tomizawa, 1990) y CopA/CopT del plásmido R1 (Kolb *et al.*, 2000), entre otros.

- Ruta en un paso:

En este caso la unión inicial se establece entre los nucleótidos expuestos en un lazo y una región de cadena sencilla en la molécula complementaria (Fig. I.5B). Este complejo favorece el desplazamiento hacia estructuras más estables que finalizan con la formación rápida de un dúplex entre las dos moléculas. Esta vía ha sido propuesta para el sistema hok/sok (Gerdes *et al.*, 1997) y el transposón Tn10 (Ma y Simons, 1990).

I.3.- Ribozimas naturales

Las ribozimas son moléculas de RNA que presentan actividad catalítica. Su descubrimiento en 1980 (Kruger *et al.*, 1982; Guerrier-Takada *et al.*, 1983) supuso un cambio en el concepto que se tenía del RNA. A este hallazgo siguieron otros en los que se identificaron nuevas funciones relacionadas con procesos de *splicing*, replicación genómica y, más recientemente, traducción. A excepción del rRNA, la catálisis mediada

por ribozimas consiste en el procesamiento del enlace fosfodiéster de una molécula de RNA (sustrato). La alta especificidad de la reacción viene condicionada por el establecimiento de interacciones tipo Watson-Crick, por tanto una misma molécula de ribozima es responsable del reconocimiento del sustrato y de su posterior degradación específica.

En su contexto natural, todas las ribozimas con la excepción de la RNasa P y el ribosoma catalizan reacciones intramoleculares. Sin embargo, los requerimientos secuenciales y estructurales mínimos para que la catálisis tenga lugar han sido identificados y aislados. Esto ha permitido el desarrollo de reacciones sobre sustratos aportados en *trans*, lo que implica un comportamiento similar al demostrado por las enzimas proteicas (es decir no se consumen ni se ven modificadas en el transcurso de la reacción; Zaug y Cech, 1986; Uhlenbeck, 1987; Hampel y Tritz, 1989; Branch y Robertson, 1991).

Aunque una misma molécula de ribozima lleva a cabo las etapas de reconocimiento y de catálisis, las secuencias implicadas en cada uno de estos pasos son, por lo general, diferentes, por lo que es posible modificar los nucleótidos responsables del reconocimiento del sustrato para conseguir ribozimas específicas de cualquier RNA que se pretenda inactivar. Esto otorga a las ribozimas un importante papel como herramientas terapéuticas. En la actualidad existen un gran número de estudios en los que se han empleado diversas ribozimas modificadas para bloquear múltiples funciones, tanto de genes virales como celulares.

I.3.1.- Intrones

El proceso de *splicing* es un fenómeno esencial para que la expresión génica ocurra correctamente. Consiste en la escisión de fragmentos de RNA que no contienen secuencias codificantes (intrones) y en la unión covalente de las unidades que los flanquean (exones). Existen dos grupos de intrones capaces de catalizar su propia escisión: intrones grupo I e intrones grupo II, que se diferencian en su estructura y en el mecanismo de *splicing*.

I.3.1.1.- Intrones grupo I

La primera ribozima descrita fue un intrón componente del rRNA grande de *Tetrahymena thermophila* (Cech *et al.*, 1981). Los intrones grupo I son abundantes en el material genético de mitocondrias de hongos y plantas, del cloroplasto, en genes que codifican para rRNA, en bacteriófagos, en virus que infectan células eucariotas y en eubacterias. Todos ellos se caracterizan por tener un mecanismo de reacción dependiente de guanosina y Mg^{2+} que consta de dos reacciones de trans-esterificación consecutivas (Fig. I.6A.). En un primer paso la molécula de guanosina queda unida al centro activo del intrón, que favorece una orientación en la que el grupo 3'OH se aproxima al nucleótido situado en 3' del exón 1. Este hecho permite el ataque nucleofílico del grupo 3'OH al enlace fosfodiéster que une los residuos 3' del exón 1 (un nucleótido de uracilo muy conservado) y 5' del intrón. Como resultado de este primer paso, la guanosina queda unida al extremo 5' del intrón, mientras que el exón 1 se mantiene unido al intrón mediante interacciones Watson-Crick. En un segundo paso se produce el ataque nucleofílico del grupo 3'OH del exón 1 al enlace fosfodiéster que une el intrón con el exón 2 (G-U). El producto final son los dos exones ligados y el intrón con la guanosina en su extremo 5'. Esta reacción es reversible, por lo que el intrón puede integrarse entre los dos exones (Woodson y Cech, 1989).

Los intrones grupo I presentan una secuencia poco conservada, pero todos ellos se caracterizan por tener cuatro motivos altamente conservados denominados P, Q, R y S, de manera que P siempre aparee con Q y R con S (Fig. I.6B). También conservan 10 elementos estructurales (P1-P10) que se mantienen a pesar de la existencia de secuencias adicionales, por lo que el centro catalítico permanece inalterado en todos los representantes del grupo. La secuencia del intrón que hibrida con el exón situado en 5' se denomina secuencia guía interna (IGS, *internal guide sequence*) (Davies *et al.*, 1982; Michel *et al.*, 1989; Williamson *et al.*, 1989; Been y Perrotta, 1991). Recientemente se ha conseguido determinar mediante cristalografía la estructura adquirida por algunos intrones grupo I, y su relación con el mecanismo catalítico (Adams *et al.*, 2004; Golden *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2004; Stahley y Strobel, 2005). También se ha comprobado, mediante el estudio de formas truncadas, que la ribozima adquiere una conformación globular con un interior relativamente inaccesible al solvente (Cate *et al.*, 1996; Juneau *et al.*, 2001).

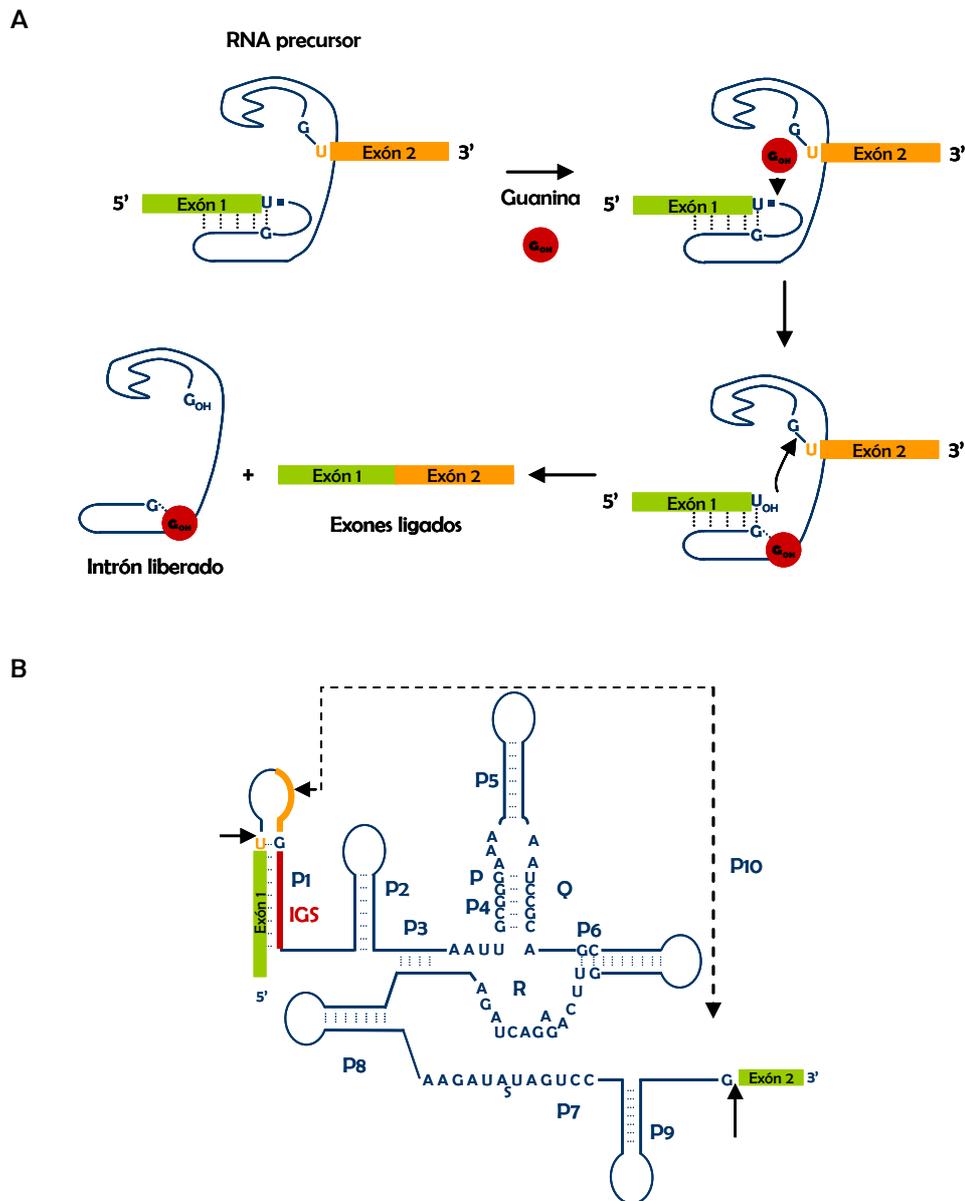


Fig. I.6.- Mecanismo de reacción y estructura secundaria de los intrones grupo I. A) Principales reacciones químicas durante el proceso de *splicing* mediado por intrones grupo I. Las líneas sólidas representan el intrón, mientras que los exones se muestran en cajas. Un nucleótido de guanina aportado exógenamente se posiciona específicamente para iniciar la reacción. Figura adaptada de (Cech, 1986). B) Representación esquemática de la estructura secundaria de los intrones grupo I. P1-P10 representan los elementos estructurales conservados. Las secuencias conservadas P, Q, R y S también se indican. Los exones se representan en cajas verdes y las flechas indican los sitios de *splicing*. La secuencia guía interna (IGS) se muestra como una línea roja. La línea discontinua indica la interacción que constituye el dominio P10. Figura adaptada de (Cech, 1990).

El intrón grupo I de *T. thermophila* ha sido modificado para cortar moléculas de RNA en *trans*. Para que la catálisis tenga lugar se necesita que el sustrato presente la secuencia complementaria del motivo IGS, y que se mantenga el par U-G en el sitio de corte.

I.3.1.2.- Intrones grupo II

Los intrones grupo II se encuentran principalmente en mRNAs sintetizados a partir de genes del cromosoma bacteriano y de mitocondrias y cloroplastos de plantas, hongos y levaduras (revisado en (Bonen y Vogel, 2001)).

El proceso de catálisis ocurre mediante dos trans-esterificaciones consecutivas (Fig. I.7A). En el primer paso se produce el ataque nucleofílico del grupo 2'OH de un nucleótido de adenina conservado sobre el sitio de *splicing* en 5'. La reacción genera un intermediario en forma de lazo en el que el extremo 5' del intrón queda unido covalentemente a la adenosina que ha participado en la catálisis. En una segunda etapa el extremo 3'OH libre del exón liberado ataca al sitio de corte en 3', quedando finalmente los dos exones ligados y liberándose el intrón en forma de lazo (Podar *et al.*, 1998).

La estructura secundaria de los intrones grupo II, determinada mediante estudios filogenéticos y mutacionales, consta de seis dominios helicoidales (I-VI) que se disponen alrededor de un dominio central, aunque se ha descrito que únicamente las hélices I y V son esenciales para la catálisis (Fig. I.7B; Jarrell *et al.*, 1988; Koch *et al.*, 1992). Existen dos regiones de reconocimiento en el dominio I, denominadas EBS 1 y EBS 2 (*exon binding sequence*), complementarias a secuencias en el RNA exónico a través de las cuales se establece la interacción (IBS 1, IBS 2, *intron binding sequence*).

Algunas ribozimas del grupo II catalizan la reacción reversa y quedan insertadas en regiones del DNA, por lo que se pueden comportar como elementos móviles (Yang *et al.*, 1996).

Al igual que en el caso del grupo I, los intrones grupo II pueden catalizar reacciones en *trans*, para lo cual necesitan de una secuencia de más de 13 nt implicada en el reconocimiento del RNA sustrato (Qin y Pyle, 1999).

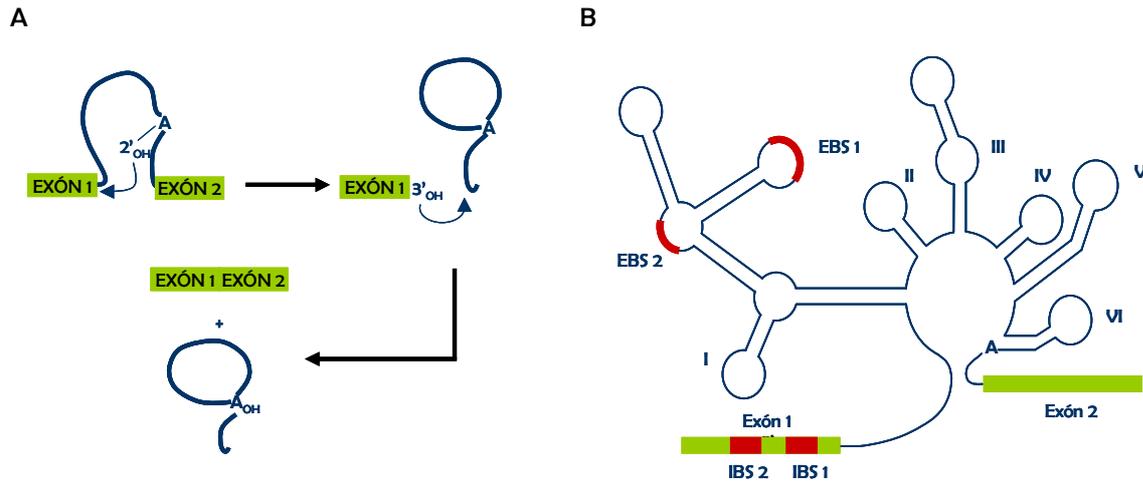


Fig. I.7.- Mecanismo de reacción y estructura secundaria de los intrones grupo II. A) Principales etapas en la reacción de *splicing* catalizada por los intrones grupo II. El ataque del grupo 2'OH de un residuo de adenina del dominio VI inicia la reacción. En un segundo paso los dos exones quedan ligados por un ataque del grupo 3'OH del exón en 5' sobre el sitio de *splicing* en 3'. El intrón es liberado en forma de lazo. Figura adaptada de (Pyle, 1996). B) Esquema representativo de la estructura secundaria adoptada por las ribozimas de grupo II. Se representan los distintos dominios estructurales, y se indica el residuo de adenina responsable del inicio de reacción. Los exones están representados mediante cajas verdes, y en rojo se destacan las secuencias de interacción entre el intrón y el exón en 5'. Figura adaptada de (Carola y Eckstein, 1999).

I.3.2.- RNasa P

La ribonucleasa P es una enzima esencial para la maduración de los tRNAs, por lo que se presenta de manera ubicua en todas las células (Altman *et al.*, 1993). Su función consiste en el procesamiento de las moléculas de pre-tRNA en su extremo 5', para generar tRNAs biológicamente activos. En todos los casos descritos la RNasa P se constituye como una ribonucleoproteína (RNP), siendo el componente de RNA esencial para la catálisis. De hecho, en algunas bacterias se ha demostrado que el RNA es catalíticamente activo *in vitro* (Guerrier-Takada *et al.*, 1983) y responsable de la unión al sustrato, mientras que el componente proteico colabora en disminuir la fuerza iónica e incrementa la velocidad de reacción, ya que facilita la liberación de los productos de corte (Reich *et al.*, 1988). Se ha descrito que durante la catálisis *in vitro* mediada por el RNA se requieren altas concentraciones de Mg^{2+} , y como consecuencia de la reacción de trans-esterificación se

genera un tRNA maduro con un extremo 5' fosfato y un segundo producto con un extremo 3'OH (Fig. I.8A).

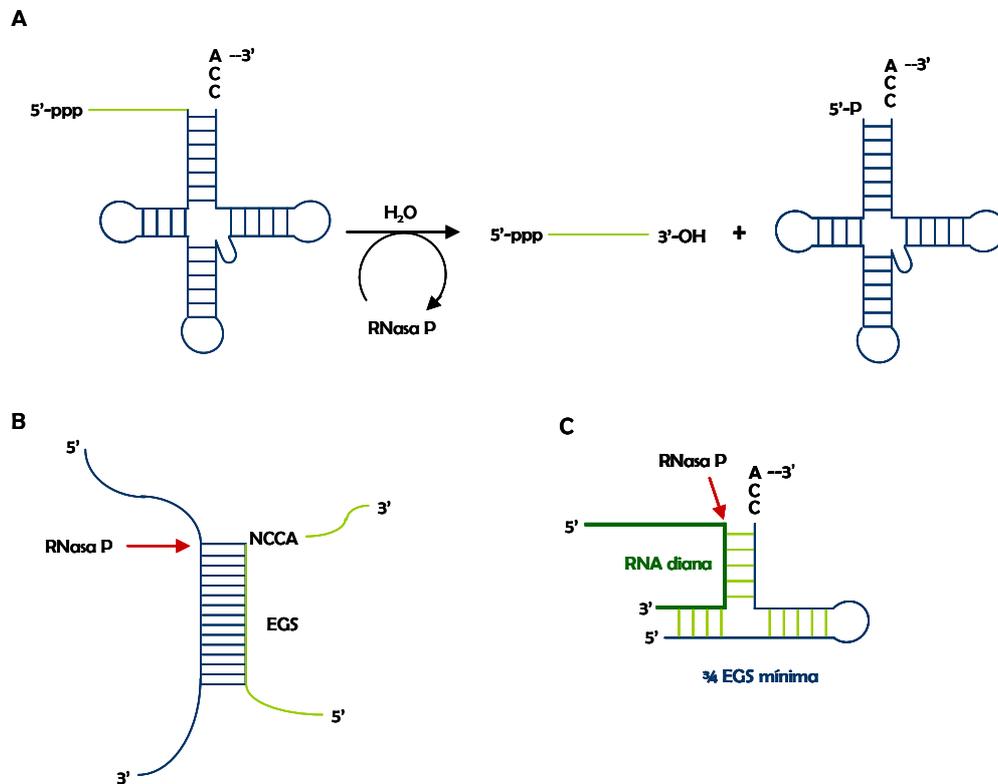


Fig. I.8.- Reacción de corte catalizada por la RNasa P. A) Esquema representativo del procesamiento del tRNA inmaduro catalizado por la RNasa P. El extremo 5' del pre-tRNA es eliminado para generar la molécula biológicamente activa. Se indica el triplete CCA necesario para la catálisis. B) Mínimos requerimientos estructurales para el corte mediado por la RNasa P de *E. coli*. C) Representación de los requerimientos estructurales mínimos del reconocimiento por la RNasa P eucariótica. Figura adaptada de (Puerta-Fernandez *et al.*, 2003b).

La subunidad de RNA en bacterias tiene una longitud de 350-410 nt. Su estructura secundaria ha sido propuesta a partir de numerosos estudios filogenéticos (Brown *et al.*, 1996; Haas y Brown, 1998; Brown, 1999;) y está compuesta por dos dominios en los que reside el sitio de reconocimiento del sustrato y el centro catalítico. Las moléculas de tRNA inmaduras son reconocidas por la presencia de un triplete CCA situado en 3' del brazo aceptor, por tanto sus requerimientos secuenciales son mínimos (McClain *et al.*, 1987; Forster y Altman, 1990). Esto ha permitido el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la ribozima de *E. coli*. Para ello se diseña una molécula de RNA (EGS, *external guide sequence*) complementaria a la región que se quiere procesar, y en cuyo extremo 3' se añade un triplete CCA. La estructura de doble cadena que se genera es reconocida por la

RNasa P bacteriana y procesada (revisado en (Altman, 1995)). En eucariotas, este modelo es funcional sólo si la estructura adoptada está compuesta por, al menos, $\frac{3}{4}$ de la estructura adoptada por el tRNA. La molécula necesaria para ello se denominó $\frac{3}{4}$ EGS (Fig. I.8B) (Yuan y Altman, 1994). Posteriormente se ha comprobado que el tamaño puede ser reducido sin alterar demasiado la capacidad de procesamiento, de manera que la EGS mínima requerida quedaría reducida a 30 nt (Fig. I.8C) (Werner *et al.*, 1997). La principal ventaja de este sistema como potencial estrategia terapéutica radica en que no es necesario aportar exógenamente la ribozima ya que ésta se encuentra en el interior celular, donde presenta su máxima actividad catalítica.

I.3.3.- RNAs catalíticos pequeños

A diferencia de las ribozimas descritas anteriormente, los RNAs catalíticos pequeños son un grupo de moléculas de tamaño no superior a 154 nt y que se caracterizan por presentar un mecanismo de reacción común. El proceso se inicia con el ataque nucleofílico del grupo 2'OH perteneciente al residuo -1 del sustrato sobre el enlace fosfodiéster adyacente (Fig. I.9). Esto genera un intermediario de reacción que presenta un fosfato pentavalente inestable, lo cual provoca la ruptura del enlace 5'O-P. Finalmente se protona el oxianión en 5', liberándose un producto con un extremo 5'OH y un segundo producto cuyo extremo presenta un grupo 2'-3' fosfato cíclico. Para que se inicie la reacción es necesaria la presencia de grupos capaces de aceptar el protón del 2'OH; inicialmente se atribuyó este papel a diferentes iones metálicos que podrían actuar como ácidos de Lewis o bien hidratados como aceptadores y donadores de protones (Long y Uhlenbeck, 1993; Pyle, 1993). Sin embargo, recientemente se ha descrito que existen residuos correctamente posicionados en algunas ribozimas capaces de actuar como ácidos y bases (Ferre-D'Amare *et al.*, 1998; Bevilacqua, 2003; Han y Burke, 2005).

Existen distintos tipos de ribozimas que se clasifican dentro de este grupo:

- Ribozima HDV
- Ribozima VS de *Neurospora*
- Ribozima Hairpin
- Ribozima Hammerhead

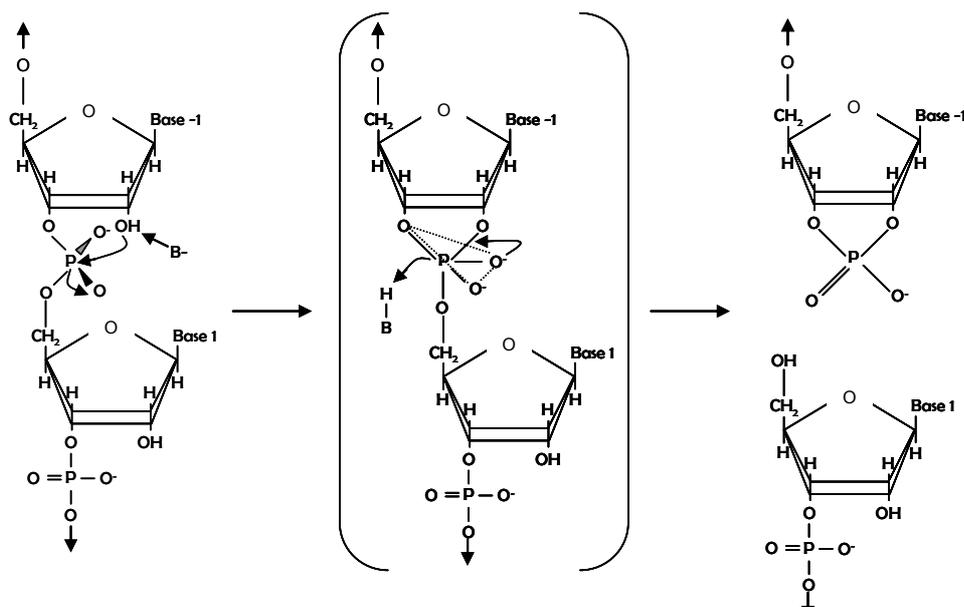


Fig. I.9.- Mecanismo de la reacción de corte catalizada por los RNAs catalíticos pequeños. La reacción se inicia con la desprotonación del grupo 2'OH del nucleótido en posición -1 del sustrato. Se genera un oxianión que ataca nucleofílicamente el fósforo adyacente, generándose un estado de transición en el que existe un fosfato pentavalente. Este intermediario evoluciona produciéndose la ruptura del enlace 5'O-P y la protonación del oxianión resultante. Los productos de la reacción presentan extremos 5'OH y 2'-3' fosfato cíclico. Para las ribozimas HDV, hairpin y hammerhead se ha propuesto que los grupos dadores y aceptores de protones pertenecen a residuos esenciales del dominio catalítico (Ferre-D'Amare *et al.*, 1998; Bevilacqua, 2003; Han y Burke, 2005). Figura adaptada de (Hammann y Lilley, 2002).

A continuación se procederá a describir los motivos catalíticos HDV, VS y hairpin. La ribozima hammerhead, dado que ha sido empleada como modelo en esta Tesis Doctoral, será tratada en un capítulo independiente.

I.3.3.1.- Ribozima HDV

La ribozima HDV es un motivo catalítico que ha sido detectado en las hebras genómica y anti-genómica del virus de la Hepatitis δ . Su función consiste en el procesamiento de los concatémeros que se generan como consecuencia de la replicación del genoma viral a través del mecanismo del círculo rodante (Kuo *et al.*, 1988; Sharmeen *et al.*, 1988).

Las ribozimas codificadas en ambas hebras presentan similitudes tanto estructurales como de secuencia. La obtención de la estructura cristalina ha supuesto un gran avance en la comprensión del mecanismo catalítico, ya que ha permitido caracterizar un residuo de citosina en posición 75 de la hebra genómica que actúa como catalizador ácido-base (Ferre-D'Amare *et al.*, 1998). El motivo catalítico mínimo capaz de autoprocresarse se compone de 85 nt, con un residuo en 5' respecto al sitio de corte. La estructura secundaria consta de cuatro motivos helicoidales (P1,...P4). La interacción entre P1 y P2 genera una estructura *pseudoknot* en la que queda incluido el sitio de procesamiento (Fig. I.10).

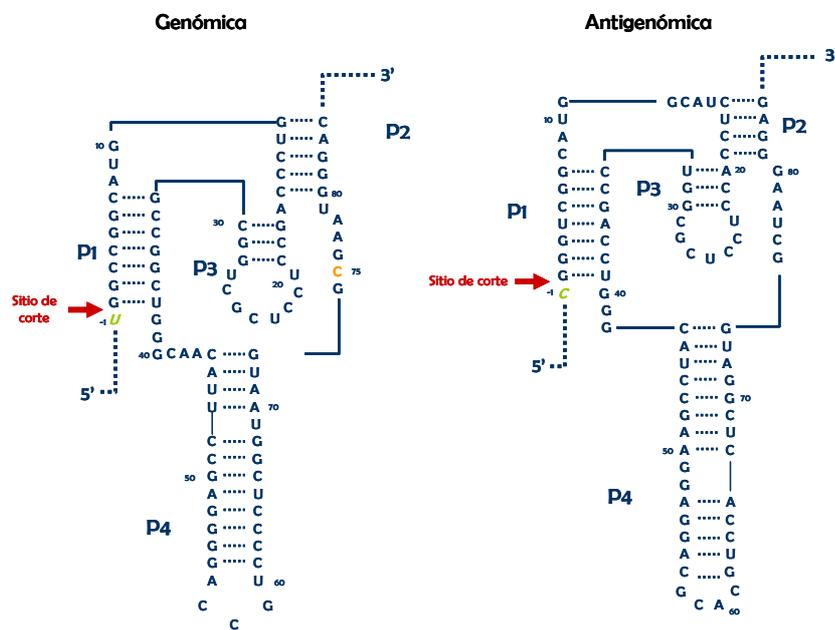


Fig. I.10.- Esquema representativo de la estructura secundaria de las ribozimas genómica y anti-genómica HDV. Las líneas punteadas en 3' y en 5' representan secuencias no esenciales para el autoprocresamiento. Las líneas continuas conectan diferentes motivos estructurales. P1-P4, regiones de doble cadena. Los sitios de corte en cada ribozima se muestran por una flecha. En verde se indican los residuos que son escindidos de la molécula tras la catálisis. En naranja se destaca un residuo de citosina esencial para la actividad de la ribozima. Figura adaptada de (Perrotta y Been, 1991).

La ribozima HDV puede ser dividida en dos moléculas para constituir un sistema de corte en *trans*. Se ha observado que la eliminación de la hebra 5' del dominio P1 no impide la actividad catalítica, y que cuando se aporta como una molécula independiente funciona como sustrato (Perrotta y Been, 1992). Este hecho, unido a su gran adaptación al ambiente intracelular, la convierten en un candidato ideal como potencial inactivador génico.

I.3.3.2.- Ribozima VS de *Neurospora*

En la mitocondria de la cepa Varkud-1c de *Neurospora* existe un plásmido que codifica para una enzima con actividad retro-transcriptasa y para un RNA (RNA VS). El DNA plasmídico se transcribe para generar un RNA que es procesado por un motivo autocatalítico codificado en su interior, la ribozima VS. Este mismo motivo es capaz de catalizar la ligación de los extremos del RNA, generándose moléculas de RNA monomérico y circular de 881 nt (Saville y Collins, 1991; Kennell *et al.*, 1995).

El motivo catalítico mínimo consta de 154 nt, con un nucleótido en 5' que es escindido tras el autoprosesamiento y 153 residuos en 3' (Fig. I.11). La estructura secundaria se compone de seis dominios y contiene un motivo *pseudoknot* que se establece entre los lazos I y V. Posteriormente se ha descrito que reducciones en algunas de las hélices pueden disminuir el tamaño de la ribozima hasta 121-126 nt sin que se afecte la actividad catalítica (Rastogi y Collins, 1998).

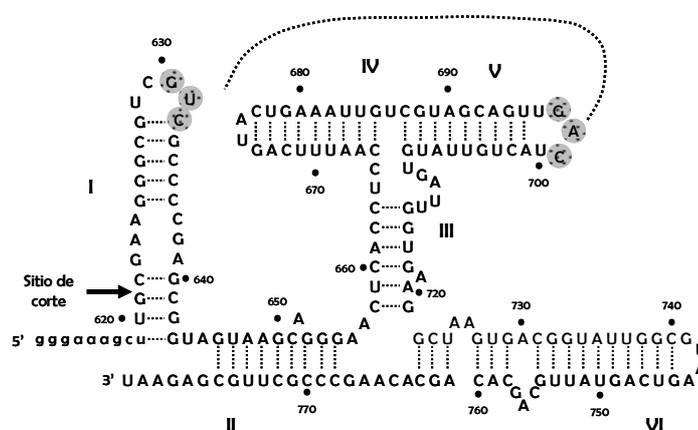


Fig. I.11.- Secuencia y estructura de la ribozima VS. Se representan los seis dominios estructurales (I-VI) y se destacan en gris los nucleótidos implicados en el establecimiento de una estructura *pseudoknot* (indicado por una línea discontinua). La numeración corresponde al RNA VS de longitud completa. Figura adaptada de (Beattie *et al.*, 1995).

De manera similar a la descrita en los casos anteriores, esta ribozima puede ser subdividida en dos moléculas independientes para generar sistemas catalíticos en *trans*. El dominio P1 se convierte en el sustrato, mientras que la ribozima es aportada como una molécula de 144 nt de longitud (Guo y Collins, 1995). El reconocimiento del sustrato no

parece implicar el establecimiento de interacciones estables, sino la presencia de dominios estructurales tipo tallo-lazo, por lo que se ha propuesto que esta ribozima podría ser un buen inactivador de RNAs altamente estructurados (Guo y Collins, 1995).

I.3.3.3.- Ribozima hairpin

El primer motivo tipo hairpin se describió en la hebra de polaridad negativa del RNA satélite del virus que causa las manchas en anillo en las plantas de tabaco ([-]sTRSV, *tobacco ringspot virus*; Feldstein *et al.*, 1989; Hampel y Tritz, 1989). La función de este dominio es la de procesar los productos multiméricos que son generados como consecuencia de la replicación del RNA satélite por el mecanismo del círculo rodante (Prody *et al.*, 1986). Los monómeros resultantes son circularizados ya que este motivo también presenta actividad ligasa (Buzayan *et al.*, 1986a; Buzayan *et al.*, 1986c).

Los requerimientos secuenciales mínimos para la catálisis han sido definidos mediante estudios filogenéticos y mutacionales. El motivo catalítico más utilizado es el descrito por Hampel y Tritz (Hampel *et al.*, 1990), en el que una ribozima que consta de 50 nt es capaz de procesar en *trans* una molécula de sustrato de 14 nt (Fig. I.12A).

La estructura secundaria del complejo ribozima-sustrato se estableció mediante estudios de selección *in vitro* y análisis mutacionales (Berzal-Herranz *et al.*, 1992; Berzal-Herranz *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1994) a partir de los cuales se definieron dos dominios en el motivo catalítico mínimo. El dominio A está constituido por dos hélices intermoleculares (I y II) que se establecen entre la molécula de ribozima y el sustrato, separadas por un lazo (lazo A). El dominio B se compone de dos hélices intramoleculares (3 y 4) que quedan separadas por el lazo B. Se ha observado que una vez ha ocurrido la interacción entre la ribozima y el sustrato, estos dos dominios deben de plegarse de manera que los lazos internos queden próximos. Este fenómeno, conocido como *docking*, es esencial para que la catálisis tenga lugar (Earnshaw *et al.*, 1997; Walter *et al.*, 1998).

La resolución, en 2001, de la estructura cristalina de un complejo formado por la ribozima hairpin y un inhibidor permitió concluir que el sitio activo se encontraba incluido en un bolsillo, y que la actividad catalítica no dependía de la presencia de iones metálicos, como ya se había propuesto previamente (Nesbitt *et al.*, 1997; Rupert y Ferre-D'Amare, 2001).

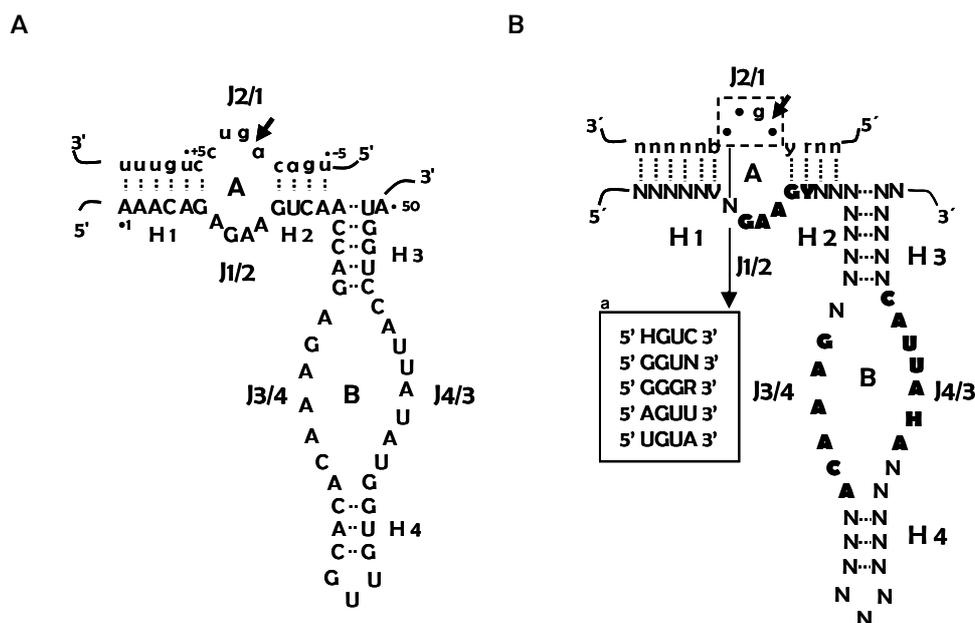


Fig. I.12.- Ribozima tipo hairpin. A) Estructura secundaria del complejo ribozima-sustrato derivado del [-]sTRSV. Los nucleótidos que componen la ribozima se muestran en mayúscula y numerados del 1 al 50, los que componen el sustrato se destacan en minúscula y numerados a partir del sitio de corte (G+1). B) Requerimientos de secuencia para el complejo ribozima-sustrato. N = cualquier nucleótido; Y = C ó U; R = A ó G; B = C, G ó U; V = A, C ó G; H = A, C ó U. Los nucleótidos importantes para la actividad catalítica están destacados en negrita. Las secuencias de la región J2/1 que son óptimamente procesadas por la ribozima hairpin se muestran en la caja "a". A y B representan los dos dominios definidos del complejo ribozima-sustrato, y J1/2-J4/3 regiones de cadena sencilla. H1-H4, regiones de doble cadena. La flecha indica el sitio de corte.

Los nucleótidos importantes para la catálisis se encuentran principalmente en las regiones de cadena sencilla que separan las hélices 1 y 2 (J1/2) y 3 y 4 (J3/4 y J4/3; Fig. I.12B). Por tanto, siempre y cuando se mantenga la estructura helicoidal, el resto de posiciones pueden ser modificadas para dirigir la ribozima frente a cualquier RNA que se pretenda inactivar. Esta circunstancia, unida a su pequeño tamaño, la convierten en un excelente candidato como agente terapéutico. La región de cadena sencilla que contiene el sitio de corte en el RNA sustrato (J2/1) presenta importantes requerimientos de secuencia. Se ha descrito que la presencia de un residuo de guanina en posición +1 es esencial para mantener la actividad catalítica (Chowrira *et al.*, 1991), aunque es posible cambiar esta posición si se compensa con una mutación en el nucleótido C₂₅ (Pinard *et al.*, 1999). Estos resultados sugieren la existencia de una interacción entre ambos residuos cuando se encuentran próximos tras el proceso de *docking*. Aunque no ha sido posible establecer un

consenso general para la región J2/1, existe un estudio completo de todas las posibles combinaciones de secuencia manteniendo el nucleótido de guanina en posición +1 (Perez-Ruiz *et al.*, 1999). En la figura I.12B se muestran las secuencias que son mejor procesadas por la ribozima hairpin.

La optimización del motivo catalítico para conseguir inhibidores más potentes se ha conseguido mediante modificaciones estructurales y de secuencia. Así, se ha descrito que el cambio en la posición 39 de un nucleótido de uracilo por otro de citosina mejora significativamente la actividad (Berzal-Herranz *et al.*, 1992; Joseph y Burke, 1993). También se observa este efecto cuando se estabiliza la hélice 4 (Sargueil *et al.*, 1995; Barroso-delJesus *et al.*, 1999).

I.4.- Ribozima hammerhead

I.4.1.- Origen y función

El motivo catalítico tipo hammerhead fue descrito inicialmente en 1986 cuando se estudiaba la capacidad de autoprosesamiento en ciertos RNAs patógenos de plantas (Buzayan *et al.*, 1986b; Hutchins *et al.*, 1986; Prody *et al.*, 1986). Estos RNAs de tipo viroidal aparecían como una única hebra circularizada, con un tamaño no superior a los 400 nt. Algunos de ellos presentaban un motivo estructural común que se denominó hammerhead y que fue definido mediante ensayos de delección (Buzayan *et al.*, 1986b; Forster y Symons, 1987a; Forster y Symons, 1987b). Posteriormente se han caracterizado nuevos motivos catalíticos con esta estructura en otros RNAs virales y viroidales, así como en animales (tabla I.2).

	RNA	Organismo	Polaridad	Referencia
Plantas	Viroides	ASBVd (viroide del manchado solar del aguacate)	+, -	(Hutchins <i>et al.</i> , 1986)
		PLMVVd (viroide del mosaico latente del melocotonero)	+, -	(Hernandez y Flores, 1992)
		CChMVd (viroide del moteado clorótico del crisantemo)	+, -	(Navarro y Flores, 1997)
	RNAs satélite de tipo viroidal	sLTSV (satélite del virus del rayado transitorio de la alfalfa)	+, -	(Forster y Symons, 1987a)
		sBYDV (satélite del virus del enanismo amarillento de los cereales)	+, -	(Miller y Silver, 1991)
		sTRSV (satélite del virus de las manchas anulares del tabaco)	+	(Buzayan <i>et al.</i> , 1986b; Forster y Symons, 1987a; Forster y Symons, 1987b)
		sChYMoV (satélite del virus del moteado amarillo de la achicoria)	+	(Symons, 1992; Symons, 1997)
		sSNMoV (satélite del virus del moteado de <i>Solanum nodiflorum</i>)	+	
		sSCMoV (satélite del virus del moteado del trébol subterráneo)	+	
		sVTMoV (satélite del virus del moteado del tabaco aterciopelado)	+	
	sRYMoV (satélite del virus del moteado amarillento del arroz)	+		
	RNA circular	Cerezo	+, -	(Di Serio <i>et al.</i> , 1997)
	Elemento retroviral	Clavel	+, -	(Hernandez <i>et al.</i> , 1992)
Animales	Transcritos de DNA satélite	<i>Dolichopoda</i> ssp.	+	(Rojas <i>et al.</i> , 2000)
		Familia II de tritón	+	(Epstein y Gall, 1987)
		Sma en <i>Schistosoma mansoni</i>	+	(Ferbeyre <i>et al.</i> , 1998)
		<i>Theileria parva</i>	+	(Ferbeyre <i>et al.</i> , 2000)
		Familia R de ratón	+	(Ferbeyre <i>et al.</i> , 2000)
		Familia Kpn-13 de humano	-	(Ferbeyre <i>et al.</i> , 2000)
	mRNAs	mRNA del gen que codifica para NADPH-citocromo P450 oxidoreductasa	+	(Ferbeyre <i>et al.</i> , 2000)
		mRNA del gen que codifica para DAP-1	+	
mRNA del gen que codifica para neuroleucina		+		

Tabla I.2.- Algunos RNAs naturales que contienen motivos tipo hammerhead. Polaridad hace referencia a la polaridad de la hebra de RNA que contiene el motivo.

En su forma natural, los motivos catalíticos tipo hammerhead participan en el proceso de replicación del RNA que los contiene. Los estudios realizados inicialmente llevaron a proponer que los viroides se replican mediante el mecanismo del círculo rodante (Fig. I.13)

(Hutchins *et al.*, 1986; Branch y Robertson, 1984; Daros *et al.*, 1994). En este modelo, la hebra infectiva (a la que se le asigna arbitrariamente la polaridad (+)) es reconocida como molde por una RNA polimerasa dependiente de RNA. Esto inicia la síntesis de sucesivas rondas de transcripción que generan una molécula compuesta por múltiples unidades monoméricas de polaridad (-). Posteriormente el multímero es procesado por el motivo autocatalítico, dando lugar a los monómeros lineales que son posteriormente ligados mediante una RNA ligasa. Estas especies son reconocidas a su vez por una RNA polimerasa, repitiéndose el ciclo de manera simétrica para generar las unidades de polaridad (+).

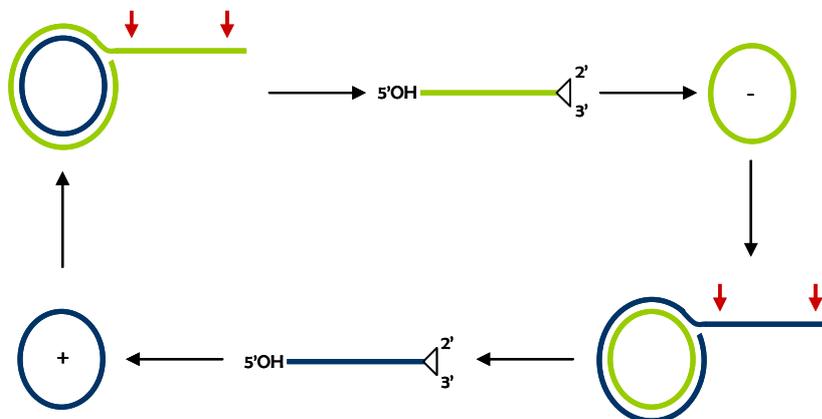


Fig. I.13.- Replicación del RNA circular por el mecanismo del círculo rodante en su modalidad simétrica cuando las dos hebras presentan motivos autocatalíticos. Las flechas indican los sitios de procesamiento por el motivo catalítico. Figura adaptada de (Flores *et al.*, 1999).

I.4.2.- Estructura secundaria y requerimientos de secuencia

El modelo de estructura secundaria propuesto para la ribozima hammerhead se obtuvo a partir de estudios filogenéticos, termodinámicos, de mutagénesis y de NMR (revisado en (Thomson *et al.*, 1997)).

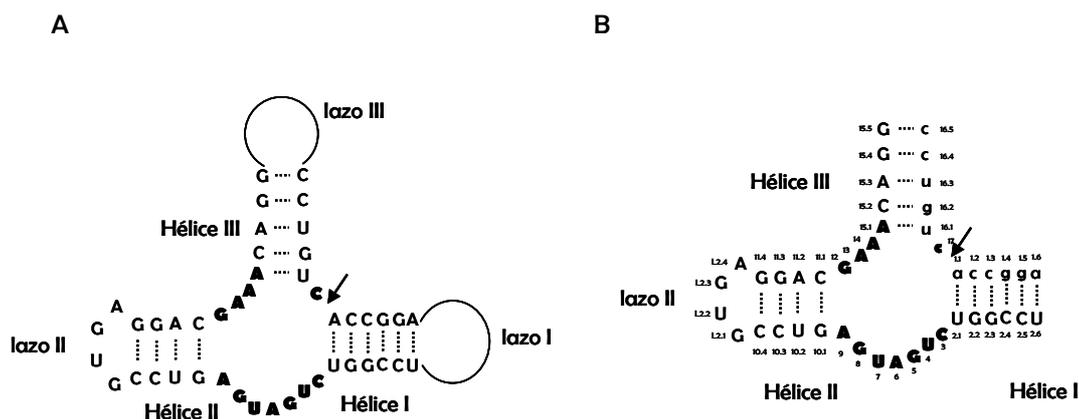


Fig. I.14.- Secuencia y estructura secundaria de la ribozima tipo hammerhead derivada del sTRSV. A) Representación de los dominios estructurales que conforman una ribozima que cataliza el procesamiento intramolecular. Los nucleótidos que constituyen el centro catalítico se muestran en negrita. El sitio de corte está indicado por una flecha. B) Representación de una ribozima hammerhead que cataliza el procesamiento *in trans* de una molécula de sustrato, generada por la apertura de los lazos I y III mostrados en A). Se muestra el dominio mínimo necesario para la actividad. Los nucleótidos que componen la molécula de sustrato se representan en minúscula, y en negrita aquellos que se localizan en el centro catalítico. El sitio de corte se indica por una flecha. El sistema de numeración es el acordado en (Hertel *et al.*, 1992).

Consta de tres elementos helicoidales (I, II y III) conectados por una región de cadena sencilla en la que se encuentran los residuos esenciales para la actividad, y que se ha denominado centro o bolsillo catalítico (Fig. I.14A). En la naturaleza, las tres hélices se encuentran cerradas por lazos. La eliminación de los residuos que cierran las hélices I y III permite dividir la molécula en dos unidades distintas: una que conserva la actividad catalítica y que contiene la mayor parte de los nucleótidos esenciales, y otra que actúa como sustrato (Uhlenbeck, 1987; Haseloff y Gerlach, 1988). Esta ribozima es la más utilizada, aunque también se ha descrito la posibilidad de apertura de los lazos II y III; este sistema resultaría menos ventajoso ya que gran parte de los nucleótidos esenciales para la catálisis quedarían situados en la molécula de sustrato (Jeffries y Symons, 1989). Para facilitar la comparación de los datos obtenidos por distintos grupos se ideó un sistema de numeración que permite abarcar todas las posibles modificaciones que puede sufrir el motivo catalítico (Hertel *et al.*, 1992), y que se muestra en la figura I.14B. La secuencia consenso de la ribozima hammerhead fue determinada mediante estudios filogenéticos de motivos catalíticos similares.

El centro catalítico es el lugar de la ribozima que menor número de mutaciones tolera (Fig. I.15). Únicamente la posición 7 es susceptible de ser modificada, e incluso en ese caso la actividad catalítica se ve afectada (U>G>A>C; Ruffner *et al.*, 1990).

La hélice I no parece presentar ningún requerimiento, aunque se ha observado que la secuencia que se encuentra adyacente al bolsillo catalítico podría influir en la estructura global adquirida por la ribozima (Amiri y Hagerman, 1996).

La hélice II contiene dos residuos conservados, 10.1 y 11.1. Estos nucleótidos aparean y se sitúan contiguos al centro catalítico; el par G_{10.1}-C_{11.1} es el más frecuente en la naturaleza, y también el más activo *in vitro*. También resulta importante la longitud de la hélice: las ribozimas con una hélice II inferior a dos pb son considerablemente menos activas que aquellas que presentan dominios de una mayor longitud (Tuschl y Eckstein, 1993). El lazo que cierra esta hélice no requiere de ningún nucleótido particular, aunque generalmente se emplean ribozimas con un lazo II constituido por cuatro nucleótidos (Birikh *et al.*, 1997). En un intento por minimizar el tamaño de la ribozima, se han descrito moléculas en las que el dominio II en su totalidad quedaba reemplazado por un espaciador con secuencia palindrómica. Esto permite la asociación de dos ribozimas a nivel de sus espaciadores, formándose un dominio II común para ambas (Kuwabara *et al.*, 1996).

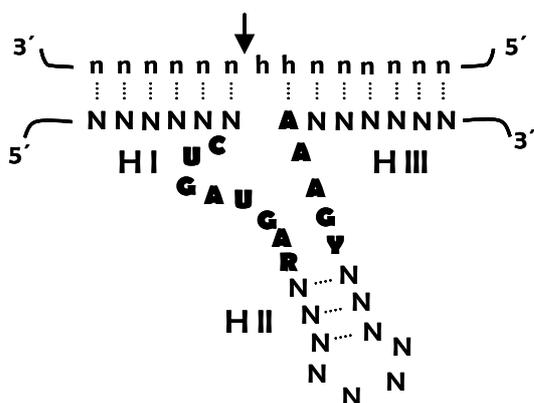


Fig. I.15.- Requerimientos de secuencia de la ribozima hammerhead. Se muestran los nucleótidos esenciales para la actividad catalítica de las ribozimas hammerhead que procesan sustratos en *trans*. Los nucleótidos que representan la ribozima se muestran en mayúscula, mientras que los del sustrato se indican en minúscula. N = cualquier nucleótido; Y = C o U; R = A o G; H = A, C ó U. HI-HIII = hélice I-hélice III.

En cuanto a la hélice III, sólo existen dos posiciones sensibles a ciertas modificaciones; se trata de los residuos que componen el sitio de corte. En la naturaleza, el sitio de procesamiento más frecuente es el triplete GUC, aunque también se ha detectado corte en 3' del triplete GUA y AUA (Miller y Silver, 1991; Birikh *et al.*, 1997). Para

comprobar si eran posibles otras sustituciones en el sitio de corte, se llevaron a cabo estudios de mutagénesis que permitieron concluir que el triplete NUH era el más activamente procesado por la ribozima hammerhead (N, cualquier nucleótido; H, A, C ó U) (Ruffner *et al.*, 1990; Zoumadakis y Tabler, 1995). Posteriormente este consenso fue modificado, ya que se comprobó que el nucleótido de uracilo podía ser sustituido por A o C siempre y cuando se mantuviera el par de bases 15.1-16.1. Es decir, tripletes del tipo NHH también podían ser eficientemente procesados por la ribozima hammerhead (Kore *et al.*, 1998). El hecho de que no se acepten nucleótidos de guanina en dos posiciones del triplete de corte puede ser debido a que la existencia de un par G-C bloquee a la ribozima y la mantenga en una conformación inactiva (Simorre *et al.*, 1998).

Estos datos han sido confirmados mediante la realización de métodos de selección *in vitro* en los que se intentaba optimizar el dominio catalítico y obtener nuevas dianas de corte (revisado en (Eckstein *et al.*, 2001)). La conclusión principal que se pudo obtener de estos estudios es que el centro catalítico de la ribozima hammerhead es el óptimo para el procesamiento del triplete NHH, posiblemente porque cambios en los nucleótidos esenciales alteran la estructura tridimensional del complejo ribozima-sustrato e impiden la adquisición de una conformación catalítica activa.

I.4.3.- Estructura terciaria

La ribozima hammerhead es el primer RNA catalítico del que se consiguió la estructura cristalina. Los resultados fueron aportados por dos laboratorios de manera independiente (Pley *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1995) y las conclusiones resultaron similares, a pesar de haber utilizado complejos moleculares distintos. Esto refuerza la validez de los datos y sugiere que la estructura cristalizada es muy próxima a la real.

En estos estudios se describe la formación de una estructura en forma de Y, con las hélices II y III alineadas y la hélice I situada en el mismo cuadrante que la hélice II (Fig. I.16). Esta estructura coincide con la determinada a partir de análisis por FRET (*fluorescence resonance energy transfer*; Tuschl *et al.*, 1994), movilidad comparativa en gel (Bassi *et al.*, 1995) o birrefringencia eléctrica (Amiri y Hagerman, 1994). Se pueden definir dos dominios estructurales. El dominio I lo componen los nucleótidos C₃U₄G₅A₆.

En esta región se forma una estructura similar al giro de la uridina, lo cual provoca un cambio en la orientación de las bases nucleotídicas que permite su alineamiento y favorece una mayor proximidad al residuo C₁₇ que se procesa (Fig. I.16). El dominio 2 está constituido por los nucleótidos G₁₂A₁₃A₁₄, que establecen una serie de interacciones no canónicas con el motivo U₇G₈A₉; esto provoca una extensión de la hélice II que favorece el alineamiento coaxial con la hélice III. Recientemente se ha comprobado mediante ensayos de *cross-linking* que los nucleótidos G₈ y G₁₂ pueden modificar su posición del estado inactivo para quedar apilados sobre el sitio de procesamiento (nucleótido C₁₇), favoreciendo una conformación activa. Esta proximidad contribuiría al procesamiento del sustrato a través de un mecanismo tipo ácido base general (Han y Burke, 2005; Heckman et al., 2005).

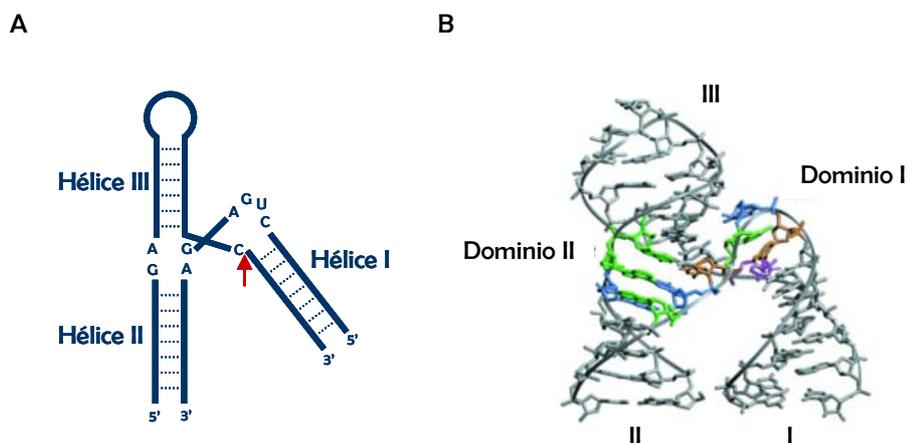


Fig. I.16.- Estructura tridimensional de la ribozima hammerhead. A) Representación de la estructura terciaria propuesta para la ribozima hammerhead en forma de Y, con las hélices II y III alineadas coaxialmente y la hélice I constituyendo el brazo de la Y. Se muestran los residuos que componen el centro catalítico y el sitio de corte se indica por una flecha. Figura tomada de (Doudna y Cech, 2002). B) Estructura cristalina de la ribozima hammerhead. Se señalan los dominios 1 y 2. El dominio 1 comprende el motivo denominado giro de la uridina, que incluye el nucleótido C₁₇ en el sitio de corte. El dominio 2 se forma por el alineamiento de las hélices II y III. En azul se destacan los nucleótidos de guanina, en verde los de adenina, en morado los de citosina y en naranja los de uracilo. Figura tomada de (Hammann y Lilley, 2002).

Se ha comprobado que la ribozima hammerhead requiere la presencia de Mg²⁺ y otros iones metálicos para adoptar una conformación activa (Fig. I.17). En su ausencia la molécula se encuentra extendida en un estado inactivo. La adición de Mg²⁺ desencadena una ordenación estructural en la ribozima que ocurre en dos etapas: en un primer paso se

produce la alineación de las hélices II y III, lo cual se corresponde con la formación del dominio 2 que se observa en la estructura cristalina; en un segundo paso la hélice I modifica su posición relativa y pasa a situarse en el mismo cuadrante de la hélice II, hecho que determina la formación de la estructura del giro de la uridina (Gast *et al.*, 1994; Bassi *et al.*, 1995; Bassi *et al.*, 1997; Murray *et al.*, 2002). Estos requerimientos por iones metálicos llevaron a estudiar extensamente sus sitios de unión en la ribozima hammerhead (Pley *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1995; Scott *et al.*, 1996). Se detectaron varios lugares de interacción en los segmentos helicoidales y tres situados en el centro catalítico. Dos de ellos se localizan en los nucleótidos A₉ y G_{10,1}, por lo que se relacionaron con la formación del dominio 2 durante el plegamiento. El tercero se sitúa en el residuo G₅, lo que sugería su implicación en la formación del dominio 1 y el giro de la uridina. También se encontraron iones metálicos próximos al enlace fosfodiéster que es procesado (Scott *et al.*, 1995; Scott *et al.*, 1996), aunque no parecen jugar un papel determinante en el mecanismo catalítico (Han y Burke, 2005).

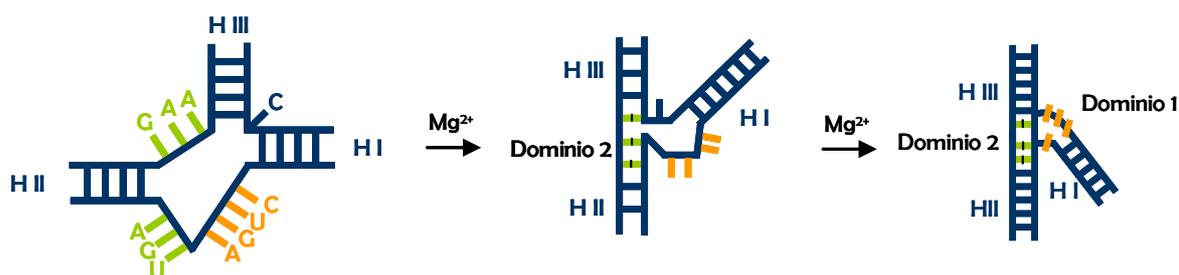


Fig. I.17.- Plegamiento de la ribozima hammerhead dependiente de Mg^{2+} . Representación esquemática del proceso de plegamiento en dos pasos. En una primera etapa se forma el dominio 2 mediante alineamiento de las hélices II y III. Este intermediario es inactivo. La conformación activa se alcanza con la formación del dominio 1 y el establecimiento de una estructura denominada giro de la uridina. Los nucleótidos que forman el dominio 2 se muestran en verde, los que forman el dominio 1 en naranja. Figura tomada de (Hammann y Lilley, 2002).

Recientemente se ha observado que las secuencias próximas al motivo catalítico mínimo presentes en las ribozimas naturales favorecen la estabilización de una conformación activa mediante el establecimiento de interacciones terciarias (De la Pena *et al.*, 2003; Penedo *et al.*, 2004; Saksmerprome *et al.*, 2004). Esto disminuye la concentración de iones divalentes necesaria para la adquisición de una conformación activa y permite la catálisis en un ambiente intracelular.

I.5.- Terapia con RNA

El descubrimiento de las ribozimas hace 25 años generó grandes expectativas debido a su posible utilización como inactivadores génicos. Sin embargo, aún hoy siguen existiendo una serie de factores a optimizar si se pretende explotar terapéuticamente las ribozimas y, en general, cualquier molécula de RNA (Rossi, 1995; Denman, 1999; Barroso-delJesus y Berzal-Herranz, 2001a). Entre ellos cabría destacar:

- Aporte del RNA inhibidor al interior celular: la penetración de moléculas de ácidos nucleicos en el interior celular es un proceso que requiere sistemas de transporte adecuados que permitan la internalización de las moléculas y su liberación de las vesículas endosómicas en las que quedan recluidas. Entre los sistemas más empleados destaca la utilización de vehículos lipídicos conocidos como liposomas.

- Colocalización de la molécula inhibidora con el RNA que se pretende inactivar: la efectividad de un RNA inhibidor depende de su posicionamiento en el mismo compartimiento celular que la diana a inactivar. La colocalización se puede promover mediante el uso de promotores específicos (Kato *et al.*, 2001).

- Cantidad de inhibidor activo en el interior celular: es preciso que exista una cantidad suficiente de moléculas activas que permitan la inactivación de todas las moléculas de sustrato.

- Estabilidad intracelular del RNA inhibidor: la abundancia de ribonucleasas en el interior celular hace que la vida intracelular de un RNA exógeno sea muy corta. Este aspecto puede ser mejorado mediante la síntesis química de los inhibidores a los que se les incorporan nucleótidos modificados en posiciones concretas, que incrementan la resistencia a la degradación (Pieken *et al.*, 1991; Heidenreich *et al.*, 1993; Heidenreich *et al.*, 1994; Jarvis *et al.*, 1996; Bramlage *et al.*, 2000; Tallet-Lopez *et al.*, 2003).

- Variabilidad genética del RNA diana: el empleo de ribozimas como agentes antivirales presenta una gran limitación, y es la elevada tasa de variabilidad que los virus (y principalmente los virus RNA) presentan. La solución consiste en el estudio e identificación de regiones conservadas en el genoma viral y su utilización como posibles dianas de ribozimas (Yamada *et al.*, 1996). Otra aproximación alternativa es el uso de *cassettes* que contienen ribozimas con diferentes especificidades (Ohkawa *et al.*, 1993).

- Actividad del inhibidor: los inhibidores deben de ser optimizados para conseguir las moléculas más eficientes. La mejora se puede producir a nivel de secuencia o de estructura.

- Acceso y unión a la región diana: la elección de los sitios diana en un RNA que se pretende inactivar es una cuestión fundamental ya que está relacionada directamente con la capacidad de procesamiento de dicho RNA. El alto grado de estructuración que presentan las moléculas de RNA dificulta en muchos casos el acceso del inhibidor al sitio diana, y es responsable del éxito o del fracaso de un experimento de terapia. Por ello se hace necesario el estudio de la estructura de los RNAs que se van a inactivar y el desarrollo de inhibidores capaces de acceder a sus sitios diana.

Durante los últimos años, la terapia con ribozimas y *antisense* ha pasado de generar una gran expectación a ser considerada como una forma poco efectiva para el tratamiento de enfermedades. El descubrimiento de los mecanismos de interferencia (RNAi) y su gran potencial en el campo de la medicina ha relegado el uso de estas moléculas a un sector olvidado de la terapia con RNA y DNA. No obstante, es importante destacar la gran contribución que el estudio de estas moléculas ha supuesto para el desarrollo de sistemas de introducción al interior celular y los grandes avances experimentados en la síntesis química de RNA. Estos trabajos han allanado el camino a la utilización de nuevas herramientas más potentes.

I.5.1.- Ribozimas

Los motivos catalíticos de RNA más empleados como agentes terapéuticos son las ribozimas hairpin y hammerhead, debido a su pequeño tamaño y a sus mínimos requerimientos de secuencia con respecto al sustrato (Marschall *et al.*, 1994). Existen un amplio número de trabajos en los que se han utilizado ribozimas hairpin y hammerhead para la inactivación selectiva de RNAs relacionados con procesos tumorales, enfermedades genéticas dominantes e infecciones virales. En la mayoría de los casos, las ribozimas son modificadas químicamente durante su síntesis para conferir una mayor estabilidad y resistencia a la degradación por RNAsas (Fig. I.18).

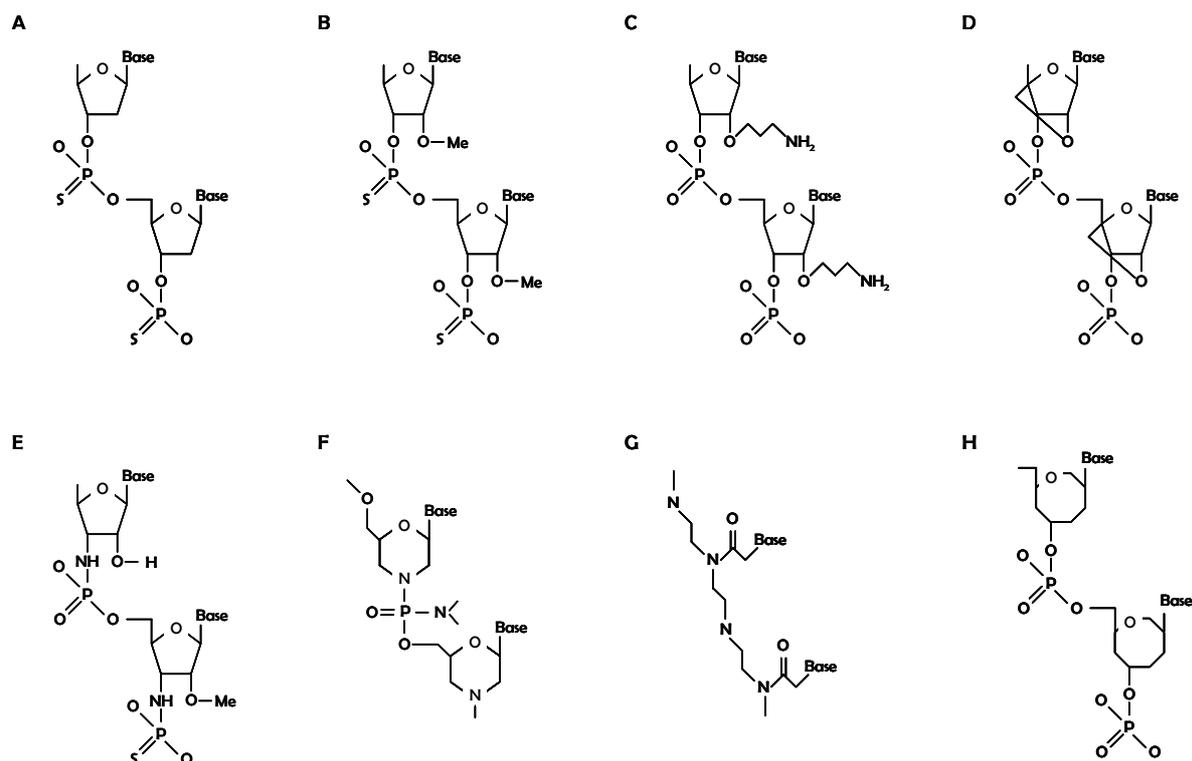


Fig. I.18.- Representación de la estructura de distintos oligonucleótidos sintéticos. A) Fósforotioato; B) 2'-O-metil fósforotioato; C) 2'-O-aminopropil fosfodiéster; D) LNA/BNA (*locked/bridged nucleic acids*); E) Fósforoamidita; F) Morfolino; G) PNA (*peptide nucleic acid*); H) HNA (*hexitol nucleic acid*). Figura tomada de (Zhang *et al.*, 2005b).

Algunos de los estudios llevados a cabo han demostrado la efectividad de la terapia con ribozimas y han permitido el desarrollo de diversos ensayos clínicos (tabla I.3).

A pesar del éxito obtenido en algunos casos, no cabe duda de que siguen siendo numerosos los ejemplos en los que la terapia con ribozimas no es efectiva, por lo que es preciso re-diseñar estos motivos para conseguir mejorar su actividad intracelular. Las nuevas moléculas presentan dominios adicionales que potencian diversas características del motivo catalítico. Por ejemplo, se han desarrollado ribozimas capaces regulables por la presencia de un ligando externo (ribozimas alostéricas, I.6.2.1.5). También se han diseñado nuevos inhibidores que portan dominios que favorecen su unión al RNA sustrato (RNAs *antisense* catalíticos; Puerta-Fernandez *et al.*, 2002; Puerta-Fernandez *et al.*, 2003a) o con capacidad para secuestrar proteínas (Sargueil *et al.*, 1995; Warashina *et al.*, 2001; Barroso-del Jesus *et al.*, 2005).

RNA diana	Nombre comercial	Compañía	Patología	Fase
mRNA VEGF-R	Angiozyme™	Ribozyme Pharmaceuticals	Tumores sólidos	II
RNA genómico de HCV	LY466700 (Heptazyme™)	Ribozyme Pharmaceuticals	Hepatitis C	II
mRNA EGF-R tipo 2	Herzyme™	Ribozyme Pharmaceuticals	Cáncer de mama y de ovario	I
mRNA del antígeno nuclear de células en proliferación	VitrenASE™	Immusol	Patologías de la retina	II
RNA genómico de HIV		Ribozyme Pharmaceuticals	Linfoma	II

Tabla I.3.- Ensayos clínicos desarrollados para terapia con ribozimas. Tabla tomada de (Zhang *et al.*, 2005b).

I.5.2.- *Antisense*

Los oligonucleótidos *antisense* constan, por lo general, de 18-25 residuos complementarios a una región de un mRNA diana. Pueden ser introducidos directamente en el paciente mediante inyección o a través de la formulación farmacéutica de distintos compuestos que transportan la droga al interior celular. Una vez allí, la unión del oligonucleótido a su sitio diana impide la síntesis de la proteína a través de diversos mecanismos (revisado en (Crooke, 1999)). Entre ellos destacan la inhibición de la transcripción por unión a secuencias promotoras, inhibición de la maduración del mRNA, inhibición de la unión del ribosoma por interacción con el codón de inicio de traducción o, en el caso de moléculas de DNA, degradación específica del RNA diana por activación de la RNasa H celular (Crooke, 1998).

En la actualidad, la terapia con *antisense* es fuente de numerosos estudios y existen múltiples ensayos clínicos con oligonucleótidos *antisense* de DNA y de RNA que están dando grandes resultados (tabla I.4). Algunos de estos ensayos han generado serias expectativas, y de hecho en la pasada década de aprobó el empleo de dos drogas *antisense*. Se conocen como Vitravene™ (Crooke, 2004) y Formivirsén (Roehr, 1998); ambas están

dirigidas frente al citomegalovirus (CMV) causante de retinitis, aunque la primera se emplea específicamente en pacientes infectados con HIV.

mRNA diana	Nombre	Compañía	Enfermedad	Fase
BCL-2	G3139	Genta/Aventis	Melanoma, MM, CLL, NSCLC	III
Ha-Ras	ISIS 2503	ISIS	Tumores sólidos	II
PKC- α	ISIS 3521 (Affinitak)	ISIS/Eli Lilly	NSCLC, tumores sólidos	III
c-RAF	ISIS 5132	ISIS	Tumores sólidos	Interrumpida
PKC	PKC412	Novartis	Tumores sólidos, infecciones del ojo	II
PKA-R1 α	GEM 231	Hybridon	Tumores sólidos	I-II
Ribonucleótido reductasa	GTI 2040, GTI 2501	Lorus	Tumores sólidos	I-II
c-RAF	LErafAON	Neopharm	Tumores sólidos	I-II
c-MYC	Oncomyc-NG	AVI	Cáncer	I-II
c-MYC	AVI 4126	BioPharma AVI	Cáncer, patologías del riñón	I-II
Clusterina	OGX-011	OncoGenex	Cáncer de próstata	I
TGF- β 2	Vacuna contra el cáncer	NovaRx	NSCLC	II
Citocromo P450	AVI4557	AVI BioPharma	Efectos adversos de algunas drogas	I-II
c-MYB	LR/INX-3001	Gewirth <i>et al.</i>	CML	I-II
DNA metiltransferasa	MG-98	MethylGene	Tumores sólidos	I-II
HIV-1	HGTV-43	Enzo Biochem	HIV	I
HIV gag	GEM-92	Hybridon	HIV	I
HIV env	VRX496	VIRxSYS	HIV	I
c-MYC	Resten-NG	AVI BioPharma	CAD, patologías de riñón, cáncer	I-II
HCV	ISIS 14803	ISIS	HCV	II
ICAM-1	ISIS 2302 (Alicaforsen)	ISIS	Enfermedad de Crohn, psoriasis	II-III
Adenosina A1R	EPI-2010	EpiGenesis	Asma	II
TNF- α	ISIS 104838	ISIS	Artritis, enfermedad de Crohn, psoriasis	II

Tabla I.4.- Ensayos clínicos llevados a cabo con oligonucleótidos *antisense*. MM, mieloma múltiple; CLL, leucemia linfática crónica; CML, leucemia mielógena crónica; CAD, enfermedad de las arterias coronarias. NSCLC, cáncer de pulmón invasivo. Tabla adaptada de (Zhang *et al.*, 2005b).

Un requisito esencial que deben de presentar los oligonucleótidos *antisense* para ser utilizados como agentes terapéuticos es el de ser estables. En la figura I.18 se muestra un esquema representativo de algunas de las modificaciones químicas que se han ensayado en oligonucleótidos *antisense* (y ribozimas). La primera generación incluía aquellas moléculas en las que se sustituían los átomos de oxígeno de los enlaces fosfato por azufre

(fosforotioatos), grupos metilo (metil fosfonatos) o aminas (fósforoamiditas). De todos ellos, el grupo de los fosforotioatos es el que ha sido más ampliamente utilizado debido a que confiere una gran resistencia al ataque por nucleasas y a su capacidad para inducir de manera específica la actividad RNasa H. Sus principales problemas son el de disminuir la afinidad y la especificidad por la secuencia diana (revisado en (Zhang *et al.*, 2005b)). Una segunda generación de *antisense* la constituyen oligonucleótidos que han sufrido sustituciones en la posición 2'; destacan la incorporación de grupos metilo, metoxietilo, amino y flúor (Manoharan, 1999). La tercera generación es más diversa que las anteriores y contiene oligonucleótidos *zwitteriónicos* (es decir, presentan grupos con cargas positivas y negativas), LNA (*locked nucleic acids*)/BNA (*bridged nucleic acids*) (Morita *et al.*, 2002), PNA (*peptide nucleic acids*) (Elayadi y Corey, 2001), morfolino (Summerton, 1999) y HNA (*hexitol nucleic acids*) (Declercq *et al.*, 2002).

I.5.3.- Aptámeros

Debido a su especificidad y a su gran capacidad de unión, así como a su versatilidad para capturar moléculas de muy distinta naturaleza, los aptámeros se han constituido como potenciales agentes terapéuticos (Gold *et al.*, 1995). Entre las principales ventajas cabe destacar su compleja estructura tridimensional, que les confiere alta especificidad y selectividad. Su pequeño tamaño, no superior a 15 kDa (25-40 nucleótidos), les aporta una mayor permeabilidad con respecto a otras moléculas utilizadas en aproximaciones terapéuticas, como son los anticuerpos, lo cual les permite introducirse en el interior celular más fácilmente.

A excepción del diseño, el empleo de aptámeros en terapia presenta las mismas limitaciones que la aproximación con oligonucleótidos *antisense*; es necesaria la obtención de moléculas estables, para lo cual se han introducido las mismas modificaciones químicas que en el diseño de *antisense*. Por otro lado, aunque su pequeño tamaño es ventajoso, también es responsable de su baja proporción en sangre, ya que son rápidamente filtrados por el riñón. Esto se puede solucionar mediante la conjugación del aptámero con moléculas de mayor tamaño, como PEG (Tucker *et al.*, 1999; Watson *et al.*, 2000) o liposomas (Willis *et al.*, 1998).

I.6.- Selección molecular *in vitro*

I.6.1.- Concepto

La generación de moléculas con nuevas funciones es un proceso tradicionalmente asociado a la naturaleza. Los ácidos nucleicos contienen una información o genotipo que puede amplificarse y diversificarse para crear múltiples variantes. La nueva molécula que se sintetiza a partir de esa información aporta una serie de características novedosas (fenotipo) que pueden ser ventajosas para el organismo y, en consecuencia, seleccionadas por la naturaleza. Durante muchos años, la simulación de este fenómeno en el laboratorio pareció algo inalcanzable. Los avances llevados a cabo en el campo de la biología molecular han permitido disponer de todas las herramientas necesarias para imitar en el laboratorio, de una manera rápida, los procesos de evolución que requieren miles de años en la naturaleza. En 1990, tres grupos describieron, por primera vez y de manera independiente, el diseño y desarrollo de un proceso de selección molecular *in vitro* (Green *et al.*, 1990; Robertson y Joyce, 1990; Tuerk y Gold, 1990). Previamente a estos trabajos, en 1967 el Dr. Spiegelman y col. observaron una serie de cambios en el RNA genómico del bacteriófago Q β que ocurrían durante el proceso de replicación (Mills *et al.*, 1967). Tras varias rondas de amplificación, la población mayoritaria de RNA genómico constaba de moléculas truncadas en las que se habían eliminado las secuencias innecesarias, y que se replicaban, por tanto, más rápidamente que el resto.

En los últimos 15 años ha quedado demostrado el gran potencial que estos sistemas tienen para la obtención de moléculas con actividades o fenotipos diversos: obtención de aptámeros capaces de unirse a diferentes moléculas o compuestos (revisado por (Sun *et al.*, 2000)), nuevas actividades catalíticas en los ácidos nucleicos, DNA y RNA (revisado en (Wilson y Szostak, 1999; Nieuwlandt, 2000)), ..., además de actuar como un medio que ha permitido profundizar en el conocimiento que se tenía sobre la catálisis mediada RNA (Green *et al.*, 1990; Chowrira *et al.*, 1991; Berzal-Herranz *et al.*, 1992; Berzal-Herranz *et al.*, 1993; Burke y Berzal-Herranz, 1993; Joseph *et al.*, 1993; Nakamaye y Eckstein, 1994; Thomson *et al.*, 1996; Tang y Breaker, 1997; Vaish *et al.*, 1997; Siwkowski *et al.*, 1998; Vaish *et al.*, 1998; Salehi-Ashtiani y Szostak, 2001). Asimismo, en un futuro, su utilización

de manera más generalizada podría venir acompañada de avances en los campos de la biotecnología y biomedicina.

De manera general, un proceso de selección molecular *in vitro* viene determinado por tres aspectos fundamentales que son fijados por el investigador: variabilidad en la población inicial, selección de variantes con características fenotípicas ventajosas y amplificación de dichas variantes. Una población de moléculas heterogénea es sometida a una presión selectiva que depende del fenotipo concreto que se desee obtener (Fig. I.19). Las moléculas inactivas se descartan, o bien son analizadas; las activas se recuperan y amplifican, generando una nueva población cuya heterogeneidad se encuentra disminuida con respecto a la situación inicial. Este proceso puede repetirse sucesivamente con el fin de enriquecer la población en moléculas positivas para el fenotipo buscado.

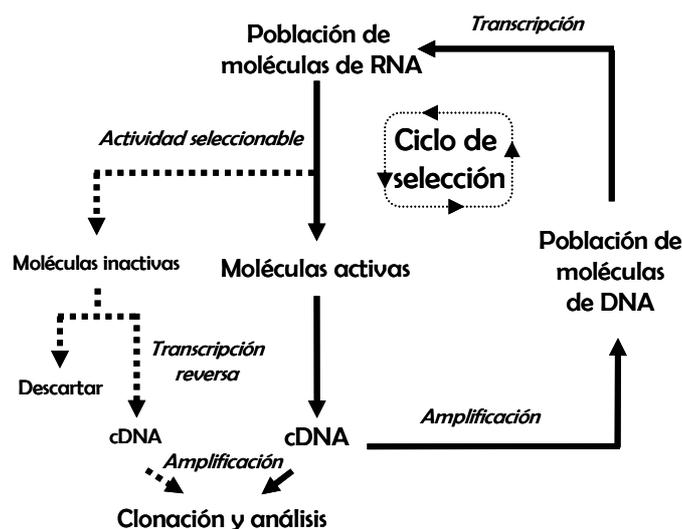


Fig. I.19.- Selección *in vitro* de moléculas de RNA a partir de una población de variantes. Las moléculas de RNA activas para el fenotipo buscado son separadas de las inactivas, para ser posteriormente amplificadas y transcritas. Figura adaptada de (Burke y Berzal-Herranz, 1993).

1º Población inicial:

La variabilidad se establece durante la síntesis del ácido nucleico. Las modificaciones introducidas pueden ser totalmente aleatorias, es decir, los cuatro monómeros se incorporan a la misma frecuencia; o bien fijadas, cada monómero se incluye a una frecuencia dictada por el investigador, por lo que la variación de secuencia es limitada. La elección de un sistema u otro depende de los objetivos concretos del experimento. Por otro

lado, aunque el número de posibles variantes con las que iniciar el proceso es teóricamente ilimitado (únicamente dependiente del tamaño de la población y de las frecuencias de variación en cada posición), existen limitaciones experimentales, por lo que en ciertas ocasiones, y dependiendo del fenotipo que se pretenda rescatar, se puede optar por utilizar moléculas con pocas modificaciones.

Finalmente, en el diseño de la población es necesaria la incorporación de secuencias invariables que se sitúan flanqueando la región aleatoria. Estas secuencias actúan como lugares de hibridación de cebadores durante los pasos de amplificación.

2º Selección *in vitro* de moléculas con un fenotipo específico:

El aspecto fundamental del que depende el éxito de un método de selección es la capacidad para recuperar aquellas moléculas que presentan las características deseadas. Existen fundamentalmente dos maneras de distinguir las moléculas activas de las inactivas:

- Selección por auto-modificación: la modificación puede suponer una diferencia en tamaño. Es la opción elegida cuando se seleccionan nuevos ácidos nucleicos con capacidad de autoprosesamiento (Green *et al.*, 1990; Chowrira *et al.*, 1991; Beaudry y Joyce, 1992; Berzal-Herranz *et al.*, 1992; Berzal-Herranz *et al.*, 1993; Joseph *et al.*, 1993; Joseph y Burke, 1993; Breaker y Joyce, 1994; Conaty *et al.*, 1999; Atsumi *et al.*, 2001; Barroso-delJesus y Berzal-Herranz, 2001b; Piganeau *et al.*, 2001), o con actividad ligasa (Bartel y Szostak, 1993; Harada y Orgel, 1993; Cuenoud y Szostak, 1995; Eklund y Bartel, 1995; Robertson y Ellington, 2000). Con este método se pueden discriminar las moléculas activas de las inactivas mediante separación por tamaño. Otra aproximación es el caso de obtención de moléculas con capacidad de autofosforilación (Lorsch y Szostak, 1994a) o acilación (Jadhav y Yarus, 2002). En estos sistemas la población inicial es inmovilizada a un soporte sólido mediante afinidad con un ligando concreto (otro ácido nucleico parcialmente complementario, uniones biotina-estreptavidina,...) que se encuentra unido a la matriz. La elución de las moléculas activas se consigue mediante la adición de una molécula específica y selectiva del grupo que ha sido incorporado durante la catálisis. Otra alternativa es la elución derivada únicamente de la acción catalítica, es decir, sólo las variantes activas son capaces de escapar de la columna.

- Selección por afinidad: este método incluye la unión a ligandos específicos. Es el caso de la selección de aptámeros. Las moléculas acomplejadas pueden ser rescatadas mediante cromatografía por afinidad con el ligando en cuestión. Esta aproximación ha

permitido la obtención de moléculas de DNA y RNA capaces de interactuar con múltiples y variados ligandos (Famulok y Szostak, 1992; Sassanfar y Szostak, 1993; Lorsch y Szostak, 1994b; Lato *et al.*, 1995; Duconge y Toulme, 1999; Nishikawa *et al.*, 2004).

3º Amplificación de las moléculas seleccionadas:

Las variantes activas que se han rescatado se encuentran en una baja proporción, por lo que es difícil proceder a su análisis. Para solucionar este problema se lleva a cabo un proceso de amplificación con el que se consigue enriquecer la población en moléculas activas para el fenotipo deseado. En el caso de utilizar DNA, se necesitan dos oligonucleótidos que actúen como cebadores mediante hibridación con las regiones invariables de la población. Cuando se trata de RNA, se requiere inicialmente un ODN complementario del extremo 3', que permite la síntesis de cDNA. Existen dos métodos alternativos para la amplificación *in vitro* de RNA (Fig. I.20):

- *Método basado en la reacción de PCR* (Fig. I.20A): se diseña un ODN que hibrida con una secuencia situada en 3' del RNA. Este ODN funciona como cebador y permite la síntesis de la molécula de cDNA. A continuación se añade un segundo ODN, complementario de una secuencia constante en el extremo 3' de la población de cDNA, y que porta en 5' la secuencia para el promotor de la RNA polimerasa del fago T7. Ambos cebadores inician la reacción de PCR, que tiene como resultado la generación de moléculas de DNA portadoras en su extremo 5' de una secuencia promotora. La amplificación se completa con la transcripción *in vitro* de la nueva población.

- *Método isotérmico* (Fig. I.20B): este sistema no requiere de la desnaturalización del molde, por lo que permite que todos los pasos transcurran a 37°C (Guatelli *et al.*, 1990). La reacción se inicia por la hibridación de un ODN cebador al extremo 3' de las moléculas de RNA, que genera moléculas de cDNA. A continuación se produce la degradación del RNA molde con RNasa H, y se sintetiza la segunda hebra de DNA por adición de un segundo ODN que contiene la secuencia promotora de la enzima RNA polimerasa del fago T7. El proceso finaliza con la síntesis de nuevas moléculas de RNA.

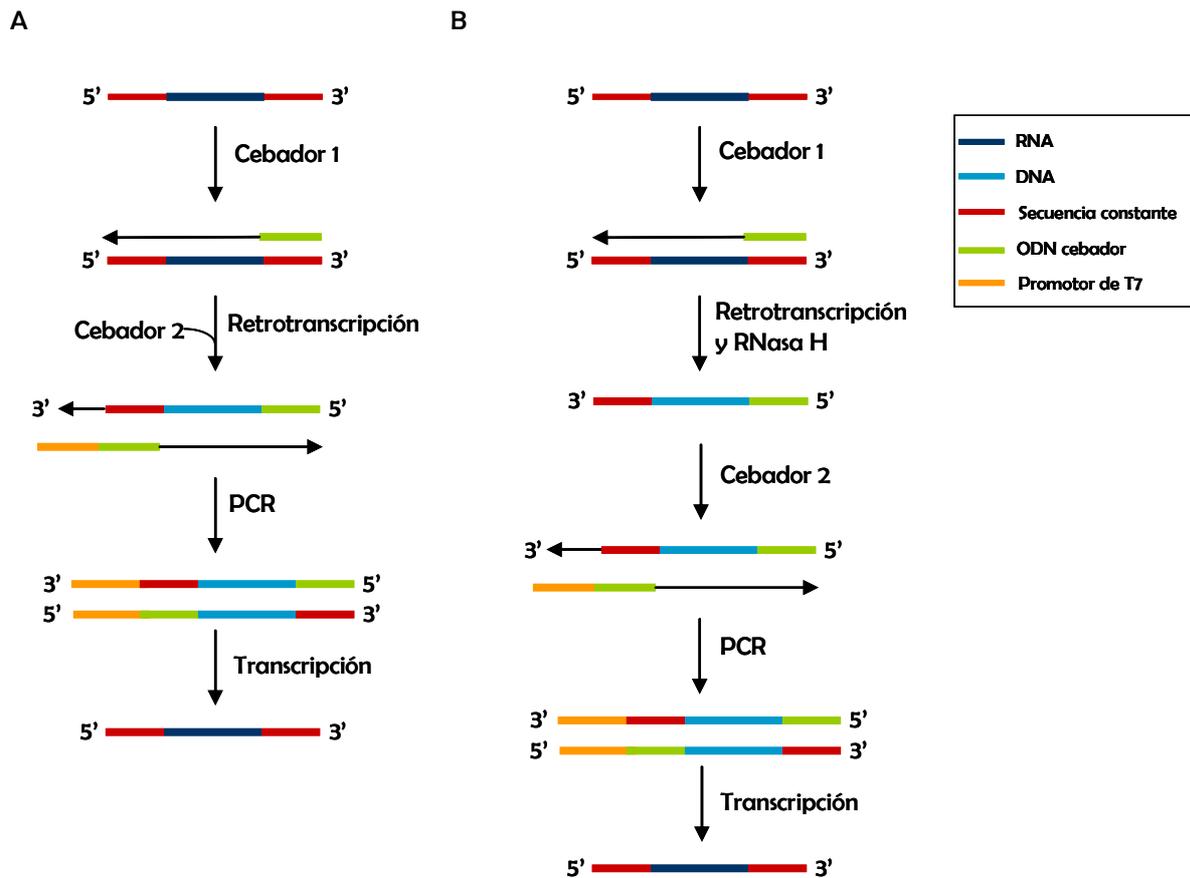


Fig. I.20.- Amplificación selectiva de RNA *in vitro*. A) Método basado en la reacción de PCR. Durante la reacción de amplificación se incorpora la secuencia del promotor de T7. B) Replicación isotérmica. Después de la síntesis de cDNA, el RNA es degradado. La amplificación del cDNA se realiza a 37°C.

I.6.2.- Aplicaciones

Las técnicas de selección molecular *in vitro* han sido ampliamente utilizadas para la identificación de nuevas propiedades y actividades catalíticas en los ácidos nucleicos. A continuación se procederá a resumir algunos de los trabajos desarrollados para seleccionar moléculas de RNA, y que han contribuido al avance de estos sistemas. Para mayor información, existe una base de datos que agrupa todos aquellos aptámeros y ribozimas que se han descrito y obtenido mediante técnicas de selección molecular *in vitro* (Lee *et al.*, 2004). Esta base está disponible a través de la dirección web <http://aptamer.icmb.utexas.edu/>.

I.6.2.1.- Selección in vitro de ribozimas

Las técnicas de selección *in vitro* han sido empleadas con éxito para comprender los mecanismos de reacción de las ribozimas naturales, así como para identificar nuevas ribozimas con diversas actividades catalíticas.

I.6.2.1.1.- Intrones grupo I

En 1990 se describió por primera vez el empleo de un sistema de selección molecular *in vitro* para analizar los elementos estructurales implicados en la catálisis mediada por el intrón grupo I presente en el rRNA 26S de *Tetrahymena thermophila* (Green *et al.*, 1990). Se introdujeron variaciones en nueve posiciones del centro catalítico cuyos requerimientos estructurales y secuenciales eran poco conocidos. Las secuencias utilizadas como exones eran constantes y se emplearon como lugares de hibridación para los ODN cebadores. Uno de los dos “exones” era aportado en *trans*, por lo que únicamente se amplificaban aquellas variantes capaces de catalizar la ligación entre ambas secuencias.

Ese mismo año, y de manera paralela, se describió un método de selección similar basado en la misma ribozima, con el que se identificaron ribozimas más activas frente a sustratos de DNA (Robertson y Joyce, 1990). Posteriormente se introdujeron una serie de variaciones sobre el método original, que incluían la generación de las variantes a seleccionar por dos sistemas: en primer lugar se construyó una población de RNA que contenía 140 posiciones parcialmente variables; durante los pasos de amplificación, esta variación era incrementada debido al empleo de condiciones que favorecían la introducción de mutaciones (Beaudry y Joyce, 1992).

También se ha descrito la selección de intrones grupo I dependientes de iones metálicos distintos de Mg^{2+} . En concreto, se han aislado ribozimas capaces de catalizar la unión de dos secuencias en presencia de Ca^{2+} utilizando un sistema de selección *in vitro* análogo al descrito anteriormente (Lehman y Joyce, 1993).

I.6.2.1.2.- Ribozima hairpin

El desarrollo de los sistemas de selección *in vitro* se vio fuertemente impulsado por su aplicación para el estudio de la ribozima hairpin.

En un primer trabajo, desarrollado por Burke y col. en 1992 (Berzal-Herranz *et al.*, 1992) se diseñó una novedosa estrategia que permitía la selección de ribozimas tipo hairpin activas para el corte y la ligación. El método (Fig. I.21) fue aplicado al estudio de dos regiones diferentes: los residuos componentes de la región J4/3 y las posiciones que rodean al sitio de procesamiento (J2/1) (Fig. I.12). La población de RNA constaba de un dominio catalítico tipo hairpin derivado de [-]sTRSV, en cuyo extremo 3' se adicionó la secuencia del sustrato de 14 nt; ambos dominios quedaban unidos por un espaciador compuesto por cinco residuos de citosina. La construcción quedaba flanqueada por dos secuencias constantes, P1 y P2, que actuaban como lugares de anclaje de ODN cebadores. En un primer paso de selección se producía el corte *in cis* en aquellas variantes que presentaban un motivo catalítico activo, lo que ocasionaba la liberación de la secuencia P2. Las moléculas procesadas eran identificadas en base a su tamaño mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. A continuación se introdujo un segundo paso de selección para recuperar variantes con capacidad ligasa; para ello se añadió en exceso una molécula mixta RNA-DNA que reconstruía el fragmento procesado y, a su vez, incorporaba una nueva secuencia, P3, que permitía la amplificación selectiva de aquellos representantes que habían catalizado tanto la reacción de autocorte como la de ligación. Esta estrategia resultaba innovadora en dos aspectos fundamentales: por un lado, se trataba del primer sistema de selección para el estudio de RNAs catalíticos de pequeño tamaño; por otro, el diseño en dos pasos permitía obtener moléculas que combinaran las dos actividades.

Esta aproximación supuso un gran avance en el desarrollo de sistemas de selección *in vitro*, y permitió su utilización para la determinación de diversas características funcionales y estructurales de la ribozima hairpin y, posteriormente, de otros RNAs catalíticos. Por ejemplo, permitió definir los requerimientos secuenciales y estructurales del complejo ribozima-sustrato en la región J2/1 (Chowrira *et al.*, 1991) y demostrar la esencialidad del residuo de guanosina en posición +1. También se determinó la importancia de los nucleótidos situados en las regiones J1/2, J3/4 y J4/3 (Berzal-Herranz *et al.*, 1992; Berzal-Herranz *et al.*, 1993; Sargueil *et al.*, 2000; Sargueil *et al.*, 2003).

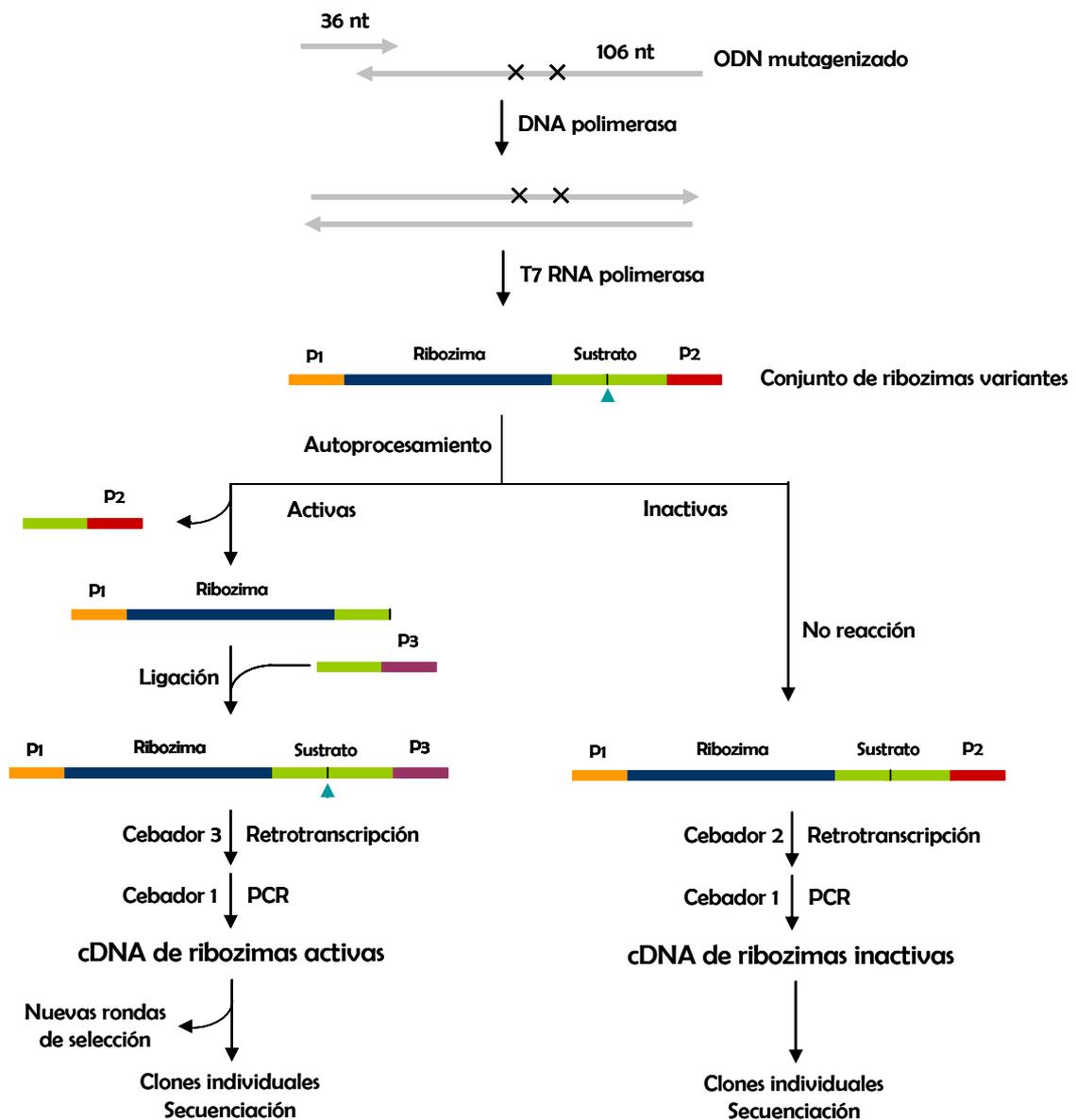


Fig. I.21.- Método de selección molecular *in vitro* para el estudio de la ribozima tipo hairpin. P1-P3, sitios de unión de cebadores. Con una cruz se marcan las posiciones mutagenizadas en la ribozima o en el sustrato. La flecha indica el sitio de corte y ligación. Figura adaptada de (Berzal-Herranz *et al.*, 1992).

Como ya se ha comentado anteriormente, la inactivación de un RNA por ribozimas en el interior celular depende de múltiples factores; el acceso del motivo catalítico a su sitio diana es uno de ellos. La elección de este sitio, así como el diseño de la ribozima, puede llevarse a cabo mediante ensayos de prueba y error, lo cual suele requerir mucho tiempo y no siempre aporta buenos resultados. Una alternativa es el empleo de métodos de selección molecular *in vitro* que permitan identificar, no sólo los sitios más eficientemente procesados, sino las ribozimas que lo llevan a cabo.

En 1998, Burke y col. (Yu *et al.*, 1998) diseñaron un sistema con el que identificar sitios de corte para ribozimas tipo hairpin en sustratos de RNA altamente estructurados. Como modelo del estudio se escogió el RNA subgenómico 26S del virus Sindbis. La secuencia del RNA fue retrotranscrita y amplificada en cuatro fragmentos independientes, que posteriormente fueron transcritos. El diseño de la población de ribozimas incluía diez posiciones mutagenizadas en las hélices I y II y en la región J1/2 (Fig. I.12). La reacción de corte se llevó a cabo mediante la incubación independiente de los cuatro RNAs sustrato en un exceso de 2500 veces con respecto a la población de ribozimas. La determinación de los lugares de corte se realizó mediante una reacción de extensión de cebador sobre los sustratos procesados y posterior secuenciación. Con este sistema se identificaron 15 sitios que eran activamente procesados por la ribozima hairpin.

La principal limitación de esta estrategia es que únicamente se identificaban los sitios procesados, mientras que la secuencia de las hélices de la ribozima responsable de dicho procesamiento debía de ser inferida por complementariedad. Este problema quedó solucionado en la estrategia propuesta posteriormente por Barroso-delJesus y Berzal-Herranz, quienes describieron una nueva aproximación que permitía la selección e identificación de las dianas más eficientemente procesadas en un RNA largo y de las ribozimas que llevaban a cabo dicho procesamiento (Barroso-delJesus y Berzal-Herranz, 2001b). Para ello, y a diferencia del anterior, en este método se empleó una estrategia de selección que implicaba la catálisis en *cis*. La población constaba de una secuencia para un RNA diana largo (mRNA del gen LacZ) a la que se le unió en el extremo 3' la mitad 5' de la ribozima hairpin con las hélices I y II totalmente mutagenizadas. Para evitar el autoprosesamiento durante la reacción de transcripción, se diseñó un motivo hairpin incompleto. El corte se iniciaba por la adición de la mitad 3' de la ribozima, que restauraba las hélices III y IV. Las moléculas autoprosesadas se recuperaron mediante purificación por electroforesis en geles de poliacrilamida. Este proceso podía repetirse sucesivas veces mediante amplificación del dominio ribozímico y posterior ligación a la secuencia codificante del RNA sustrato. La identificación de los sitios de corte se realizó mediante circularización del RNA y posterior amplificación y clonaje. Con esta estrategia se consiguieron identificar dos sitios diana en el sustrato empleado como modelo; las ribozimas seleccionadas mostraron capacidad inhibitoria en el medio intracelular.

I.6.2.1.3.- Ribozima hammerhead

Los trabajos llevados a cabo con la ribozima hairpin mediante técnicas de selección *in vitro* permitieron establecer las bases para la extensión de estos métodos al estudio con otros RNAs catalíticos pequeños. En el caso de la ribozima hammerhead se han enfocado en diversos aspectos de la catálisis, aunque también se han descrito estrategias en las que las hélices son mutagenizadas para identificar sitios de procesamiento en RNAs celulares (Lieber y Strauss, 1995). Las estrategias empleadas han sido básicamente dos (Fig. I.22; revisado en (Eckstein *et al.*, 2001)):

- Selección en cis:

Esta técnica se basa en la construcción de una molécula de dsDNA que contiene la secuencia para el promotor de la RNA polimerasa del fago T7 en su extremo 5', el sitio de corte para la ribozima y la secuencia que codifica para el motivo hammerhead con varias posiciones variables (en función de la región ribozímica en estudio; Fig. I.22A). La transcripción de esta molécula en presencia de nucleótidos marcados radiactivamente da lugar a productos de RNA que pueden ser auto-procesados y reconocidos por electroforesis en gel. Seguidamente se procede a la síntesis de cDNA y a la reconstrucción de la molécula completa mediante el empleo de ODN cebadores. El principal problema de esta aproximación es que durante la reacción de transcripción se producen condiciones óptimas para que la catálisis tenga lugar, por lo que es difícil distinguir los productos incompletos de transcripción de los resultantes del procesamiento. En estos casos se hace necesario el desarrollo de múltiples rondas de selección para eliminar falsos positivos, así como el empleo de cebadores específicos de las moléculas activas para el proceso de amplificación.

Uno de los primeros trabajos fue realizado por Nakamaye y Eckstein (Nakamaye y Eckstein, 1994), e implicaba la selección de ribozimas capaces de procesar el triplete AUA. Los resultados mostraron que las moléculas obtenidas presentaban los mismos residuos en el centro catalítico que las ribozimas naturales.

De manera similar, Long y Uhlenbeck (Long y Uhlenbeck, 1994) trataron de obtener motivos catalíticos con la hélice II delecionada. Las variantes que se seleccionaron presentaban una actividad catalítica 10 veces menor que la de la ribozima natural.

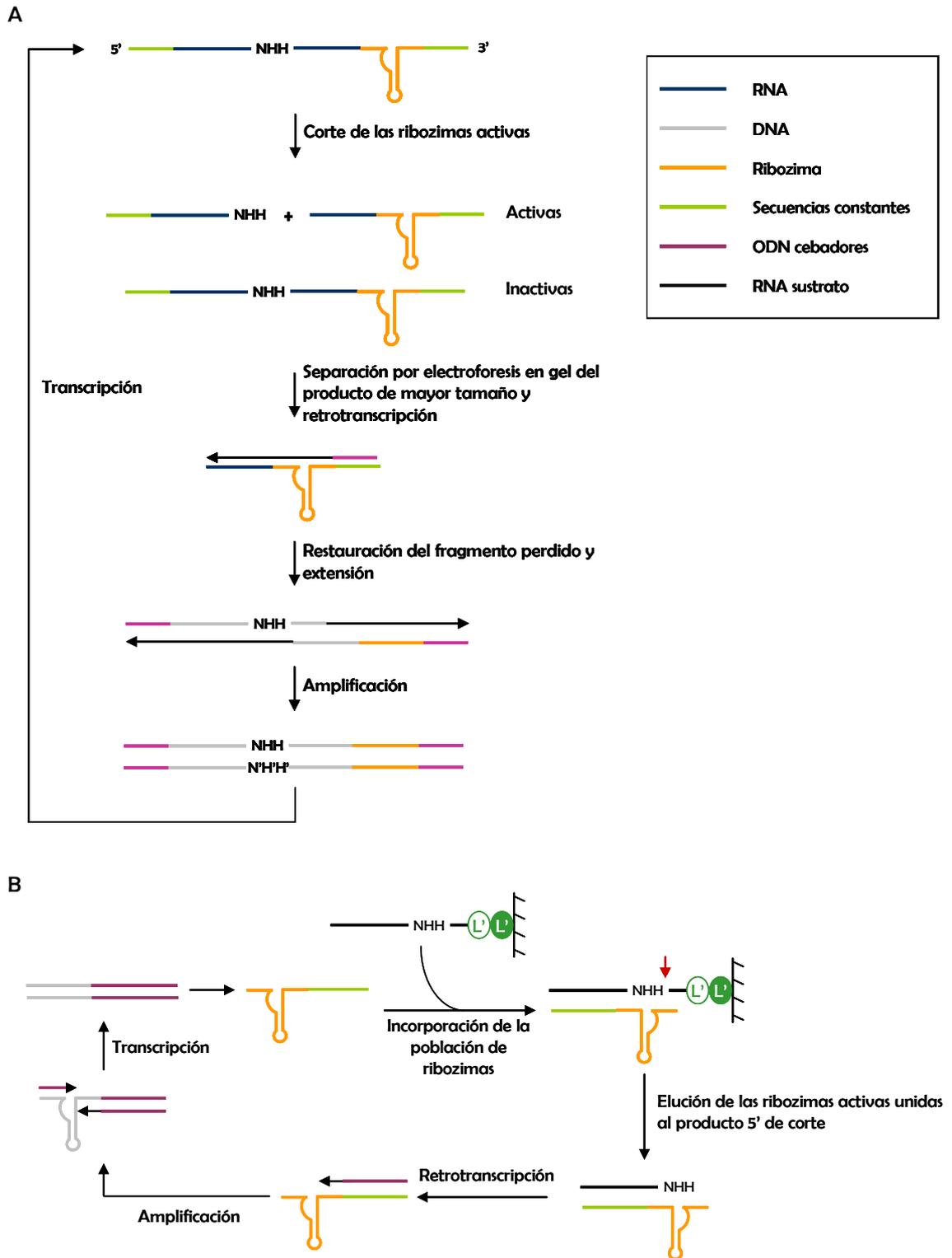


Fig. I.22.- Métodos de selección *in vitro* para la ribozima hammerhead. Esquema general de selección para mutantes de la ribozima hammerhead en el centro catalítico. A) estrategia de selección *in cis*. Figura adaptada de (Eckstein *et al.*, 2001). B) Estrategia de selección *in trans*. N, cualquier nucleótido; H, A, C ó U; N', H', nucleótidos complementarios a N y H, respectivamente.

- *Selección en trans*:

Este sistema ha sido empelado por varios autores para la obtención de ribozimas hammerhead más activas o con menores requerimientos de Mg^{2+} (Fig. I.22B; Ishizaka *et al.*, 1995; Conaty *et al.*, 1999). En este caso, la ribozima puede presentar algunas posiciones variables y una de las hélices extendida para permitir la hibridación con un oligonucleótido cebador. El sustrato es añadido en *trans* y procesado por aquellas variantes activas bajo las condiciones empleadas en el estudio. Las ribozimas capaces de catalizar el corte son recogidas unidas a uno de los productos de reacción. Este sistema aporta una ventaja con respecto al anterior, y es que ribozima y sustrato son transcritos de manera independiente, por lo que se evita su confusión con productos de transcripción incompletos.

Con el modelo de selección en *trans* propuesto por Ishizaka *et al.* (Ishizaka *et al.*, 1995), se pretendían seleccionar moléculas de RNA capaces de procesar un RNA sustrato que se encontraba inmovilizado a un soporte sólido. La población a seleccionar constaba de una región variable de 14 nt flanqueada por regiones de secuencia constante a través de las cuales se establecía la interacción con el RNA sustrato; también funcionaban como lugares de hibridación para los ODN cebadores. Las variantes que se obtuvieron, en su mayoría, presentaban el centro catalítico de la ribozima hammerhead.

En un estudio posterior se diseñó un sistema similar que permitía la obtención de nuevas ribozimas hammerhead capaces de catalizar el procesamiento de un RNA sustrato en condiciones de baja concentración de Mg^{2+} , similares a las existentes en un ambiente intracelular (Conaty *et al.*, 1999). Para ello se empleó una minizima, es decir, una ribozima hammerhead en la que la hélice II queda limitada a un único par de bases. El resto de posiciones fueron mutadas. Todas las variantes seleccionadas mantenían el centro catalítico de la ribozima hammerhead natural, mientras que las principales modificaciones se encontraban en el lazo que cierra la hélice II; las moléculas más activas presentaban los motivos UUUU, UUAA y UCCA. Estas ribozimas son de gran interés para el desarrollo de estudios en el interior celular.

También se ha abordado el desarrollo de estrategias de selección *in vitro* para identificar sitios óptimos de corte en RNAs diana (Pan *et al.*, 2003). Estos trabajos se han llevado a cabo basados en los estudios pioneros de selección *in vitro* descritos anteriormente para la ribozima hairpin. Una población de ribozimas hammerhead con las

hélices I y III mutagenizadas eran incubadas con el RNA sustrato (mRNA E6/E7 del papilomavirus). Las ribozimas activas, unidas a su producto 3' de corte, se amplificaron selectivamente y se sometieron a nuevas rondas de selección. Asimismo, el marcaje con ^{32}P en el extremo 5' de los productos de corte permitió la identificación de los lugares de procesamiento. Las ribozimas seleccionadas mostraron actividad inhibitoria en ensayos *ex vivo*.

1.6.2.1.4.- RNasa P

La RNasa P también ha sido objeto de estudio mediante estas técnicas. Su empleo como agente terapéutico depende de la presencia de dominios estructurales en el RNA sustrato capaces de ser reconocidos por la ribozima. Esto se facilita mediante el empleo de secuencias guía externas (EGS) que hibridan con el sitio diana y permiten la adquisición de una estructura que imita a la adoptada por el sustrato natural. El diseño de estas secuencias se puede abordar de manera racional, o bien mediante estrategias de selección *in vitro*. Yuan y Altman (Yuan y Altman, 1994) emplearon un RNA sustrato quimérico que contenía la estructura del tRNA para el aminoácido tirosina fusionado en 5' a la secuencia diana del RNA que se pretendía inactivar. Además se introdujeron nueve posibles variaciones en las zonas esenciales de reconocimiento. Las variantes procesadas fueron identificadas por su menor tamaño mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Una estrategia similar fue utilizada por Liu y Altman (Liu y Altman, 1994) para identificar nuevos sustratos de la ribozima. Los resultados obtenidos mostraron que las moléculas identificadas mediante selección *in vitro* diferían de los sustratos naturales conocidos para la RNasa P, lo cual sugería la existencia de otros sustratos distintos del tRNA.

1.6.2.1.5.- Nuevas actividades catalíticas identificadas mediante selección in vitro

Los métodos de selección *in vitro* han permitido la obtención de ribozimas capaces de catalizar múltiples reacciones químicas. A continuación se mencionarán algunos de los hallazgos más destacados. En la tabla I.5 se presenta un resumen de las diferentes actividades catalíticas mostradas por moléculas de RNA obtenidas a partir de estrategias de selección molecular *in vitro*.

Se ha descrito la identificación de nuevas moléculas de RNA, con estructuras distintas de las adquiridas por las ribozimas naturales, capaces de autoprocesarse en

presencia de distintos iones divalentes, como Pb^{2+} o Mg^{2+} (Pan y Uhlenbeck, 1992a; Pan y Uhlenbeck, 1992b; Williams *et al.*, 1995). Asimismo, se han aislado moléculas con diversas actividades RNA ligasa ($5' \rightarrow 3'$, $5' \rightarrow 2'$ y $5' \rightarrow 5'$; Bartel y Szostak, 1993; Ekland *et al.*, 1995; Ekland y Bartel, 1996) y polinucleótido kinasa (Lorsch y Szostak, 1994a).

Las estrategias de selección molecular *in vitro* también se han destinado a la obtención de ribozimas capaces de catalizar reacciones sobre enlaces distintos del esqueleto fosfodiéster. Un ejemplo son las reacciones de transferencia de grupos: se ha descrito la identificación de moléculas de RNA que transfieren aminoácidos o péptidos previamente activados a uno de los extremos de su molécula (Illangasekare *et al.*, 1995; Lohse y Szostak, 1996; Zhang y Cech, 1997; Baskerville y Bartel, 2002). En estos casos, la ribozima unida al aminoácido era recuperada mediante cromatografía por afinidad o HPLC. Otro claro ejemplo son las reacciones de alquilación (Wilson y Szostak, 1995; Wecker *et al.*, 1996) y de acilación (Suga *et al.*, 1998; Jadhav y Yarus, 2002), que implican la formación de enlaces C-N/C-S y C-C, respectivamente.

Actividad	Ribozima	Referencia	Nota
Sintasa	Purín nucleótido sintasa	(Lau <i>et al.</i> , 2004)	
	Acil-CoA sintasa	(Jadhav y Yarus, 2002)	
Transferasa	Peptidil transferasa	(Zhang y Cech, 1997; Baskerville y Bartel, 2002; Sun <i>et al.</i> , 2002)	Ligación de péptidos a RNA
	Aminoacil transferasa	(Lohse y Szostak, 1996)	
	Acil transferasa	(Suga <i>et al.</i> , 1998)	
	S-Alquil transferasa	(Wecker <i>et al.</i> , 1996)	Formación de enlaces C-S
	Acetil transferasa	(Lohse y Szostak, 1996; Jenne y Famulok, 1998)	
Metalasa	Porfirín-metalasa	(Kawazoe <i>et al.</i> , 2001)	
Kinasa	Polinucleótido kinasa	(Lorsch y Szostak, 1994a)	
Diels-Alderasa	Ribozima Diels-Alder	(Tarasow <i>et al.</i> , 1997; Seelig y Jaschke, 1999;)	Formación de enlaces covalentes C-C

Tabla I.5.- Ribozimas no naturales generadas mediante técnicas de selección molecular *in vitro*. Las reacciones de ligación y polimerización han sido tratadas con más detalle en la tabla I.1.

También se han identificado ribozimas capaces de llevar a cabo reacciones de polimerización de nucleótidos con un 97% de fidelidad, aunque baja procesividad (Ekland y Bartel, 1996; Johnston *et al.*, 2001).

La importancia de estos hallazgos radica en que permiten conocer la gran versatilidad catalítica del RNA y aportar nuevas pruebas a la hipótesis del mundo RNA.

Una de las más recientes estrategias de selección *in vitro* ha consistido en la generación de ribozimas alostéricas (Robertson y Ellington, 1999; Komatsu *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 2004). Se trata de moléculas de RNA regulables por la presencia o ausencia de un factor externo, llamado efector, capaz de unirse a un dominio en la ribozima (sitio de unión alostérico) a través del cual ejerce su modulación. Las técnicas de selección *in vitro* para identificar catalizadores alostéricos se llevan a cabo, de manera general, mediante la unión de un dominio de RNA mutagenizado a un dominio ribozímico, de tal manera que la presencia del primero impide la actividad catalítica. El método es dependiente de la existencia de un cambio conformacional del dominio alostérico en presencia del ligando; como consecuencia del cambio estructural, el dominio ribozímico se vuelve activo. Una de las ventajas de la selección alostérica es que permite el estudio de las interacciones del RNA con moléculas pequeñas. Entre algunos de los efectores descritos destacan oligonucleótidos (Porta y Lizardi, 1995; Komatsu *et al.*, 2002), proteínas (Robertson y Ellington, 2001) o ATP (Tang y Breaker, 1997).

I.6.2.2.- Selección in vitro de aptámeros de RNA

El término SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) hace referencia a una técnica de selección molecular *in vitro* que permite la obtención de oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a un ligando (tabla I.6) de naturaleza variada: iones (Ciesiolka y Yarus, 1996), moléculas pequeñas (Ellington y Szostak, 1990), péptidos (Nieuwlandt *et al.*, 1995), proteínas (Tuerk y Gold, 1990), orgánulos celulares (Ringquist *et al.*, 1995), virus (Pan *et al.*, 1995) e incluso células completas (Morris *et al.*, 1998). Este sistema se describió inicialmente en 1990 por dos grupos de manera independiente (Ellington y Szostak, 1990; Tuerk y Gold, 1990).

Ligando	Referencia
Nucleótidos y nucleobases	
ATP/adenosina	(Sassanfar y Szostak, 1993)
Guanosina	(Connell y Yarus, 1994)
Guanina/xantina	(Kiga <i>et al.</i> , 1998)
7-metil-GTP	(Haller y Sarnow, 1997)
Teofilina	(Jenison <i>et al.</i> , 1994)
Aminoácidos	
Arginina	(Geiger <i>et al.</i> , 1996)
Valina	(Majerfeld y Yarus, 1994)
Triptófano	(Famulok y Szostak, 1992)
Cofactores	
Cianocobalamina	(Lorsch y Szostak, 1994b)
NAD	(Lauhon y Szostak, 1995)
Antibióticos	
Neomicina (aminoglicósido)	(Wallis <i>et al.</i> , 1995)
Lividomicina (aminoglicósido)	(Lato <i>et al.</i> , 1995)
Kanamicina (aminoglicósido)	(Lato <i>et al.</i> , 1995)
Estreptomicina (aminociclitol)	(Wallace y Schroeder, 1998)
Viomicina (péptido básico)	(Wallis <i>et al.</i> , 1997)
Cloramfenicol	(Burke <i>et al.</i> , 1997)
Otros	
Dopamina	(Mannironi <i>et al.</i> , 1997)
Péptidos	(Nieuwlandt <i>et al.</i> , 1995)
Proteína priónica	(Rhie <i>et al.</i> , 2003)
Proteínas virales	(Nishikawa <i>et al.</i> , 2004)
RNA	(Duconge y Toulme, 1999)
Iones divalentes	(Hofmann <i>et al.</i> , 1997)

Tabla I.6.- Algunos de los ligandos frente a los que se han seleccionado aptámeros. Tabla adaptada de (Wilson y Szostak, 1999).

El proceso de selección molecular *in vitro* para obtener aptámeros es similar en todos los casos, independientemente de la especificidad de ligando (Fig. I.23). En primer lugar se sintetiza una población de moléculas de DNA o RNA con un número determinado de posiciones variables. La estructura básica de la población consta de una región central de secuencia aleatoria flanqueada por secuencias invariables que permiten la hibridación con ODN cebadores para el paso de amplificación. Cada una de las variantes adopta estructuras

diferentes que son responsables de la especificidad de unión. Una vez construida la población, ésta es incubada en presencia del ligando. En este punto existen dos posibilidades: o bien el ligando se encuentra inmovilizado a un soporte sólido, o bien presenta algún dominio o estructura que permite su captura de forma selectiva. Las moléculas capaces de unirse al ligando pueden ser rescatadas unidas al ligando, y posteriormente amplificadas para ser integradas en nuevas rondas de selección.

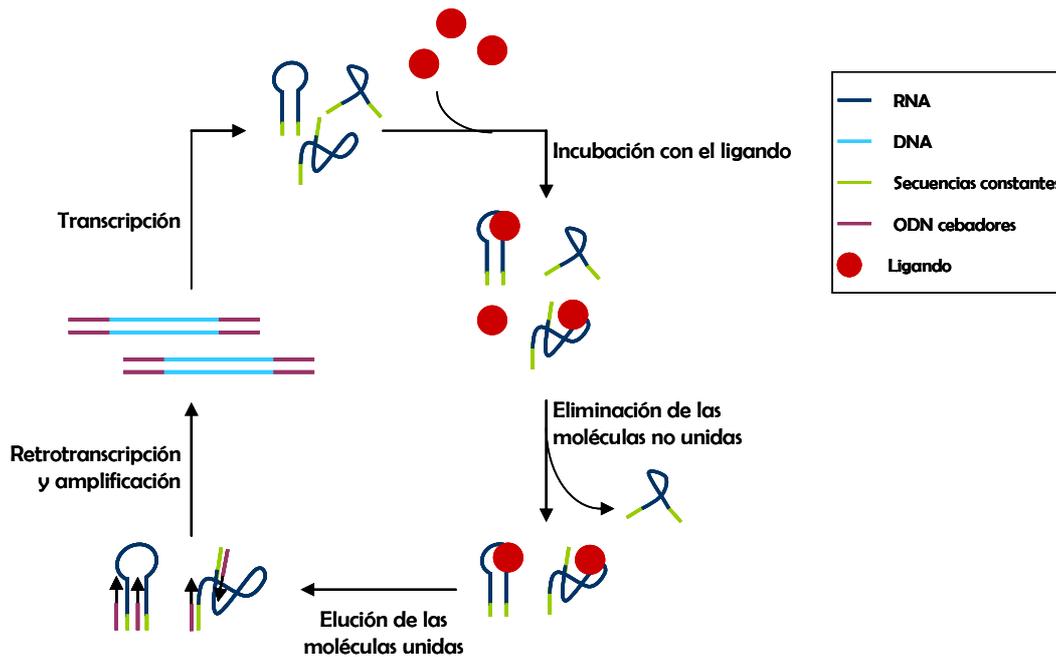


Fig. I.23.- Esquema general de un método de selección *in vitro* para la identificación de aptámeros de RNA frente a un ligando específico.

I.7.- Biología de HCV

La infección por el virus de la hepatitis C (HCV) es un problema sanitario mundial, ya que se estima que aproximadamente el 3% de la población está afectada (170 millones de personas, según datos de la OMS). Este gran número de infectados provoca una gran variabilidad en la epidemiología del virus, en función del área geográfica y a lo largo del tiempo. Aproximadamente, el 30% de los pacientes desarrolla cirrosis y carcinoma hepatocelular, así como otras patologías extrahepáticas (revisado en (Thomson y Finch, 2005)).

El HCV se clasifica en el género *Hepacivirus* de la familia *Flaviviridae*, en la que se incluyen flavivirus clásicos (virus de la fiebre amarilla), pestivirus (BVDV, virus de la diarrea bovina) y los virus GB. El género incluye a su vez tres categorías: genotipos, subtipos y aislados (Simmonds *et al.*, 1993). Incluso en un individuo infectado se puede detectar la existencia de una población viral heterogénea, lo que se conoce con el término de cuasiespecie (Martell *et al.*, 1992). Ello es debido a la alta tasa de replicación del genoma, y a que la polimerasa viral (RdRp, RNA polimerasa dependiente de RNA) carece de actividad correctora de errores.

En el suero de pacientes, los viriones se pueden detectar en forma libre o bien acomplexados a LDL o inmunoglobulinas (Thomssen *et al.*, 1993). Aunque aún no han podido ser visualizados por microscopía electrónica, por analogía con otros virus se piensa que su forma es icosaédrica, y el tamaño se estima en 55-65 nm de diámetro (Kaito *et al.*, 1994). La envoltura es de naturaleza lipídica, en la cual quedan incluidas glicoproteínas virales que favorecen la internalización. El material genético es una hebra de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva que queda encapsidada por un complejo proteico formado por múltiples copias de la proteína de la cápsida (C). Su visualización por microscopio electrónico ha permitido comprobar que presentan una morfología icosaédrica (Ishida *et al.*, 2001).

A pesar de haber sido identificado hace 16 años (Choo *et al.*, 1989), el conocimiento que se tiene del ciclo viral es parcial debido a la ausencia de sistemas efectivos para su cultivo en células y animales. Recientemente se han producido grandes avances en los sistemas replicón y en la producción de pseudopartículas (Bartosch *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2003), lo cual supone un elemento clave para estudiar las distintas funciones virales y desarrollar nuevos fármacos.

I.7.1.- Organización genética

El genoma de HCV es una molécula de RNA lineal de 9600 nt que codifica para una poliproteína de 3011 aminoácidos (Fig. I.24; Choo *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1990; Takamizawa *et al.*, 1991). Esta secuencia se encuentra flanqueada por dos regiones no traducibles (UTR, *untranslated region*) en los extremos 5' y 3', cuya función resulta esencial para la traducción de la poliproteína viral y la replicación del genoma

(Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993; Friebe *et al.*, 2001; Friebe y Bartenschlager, 2002).

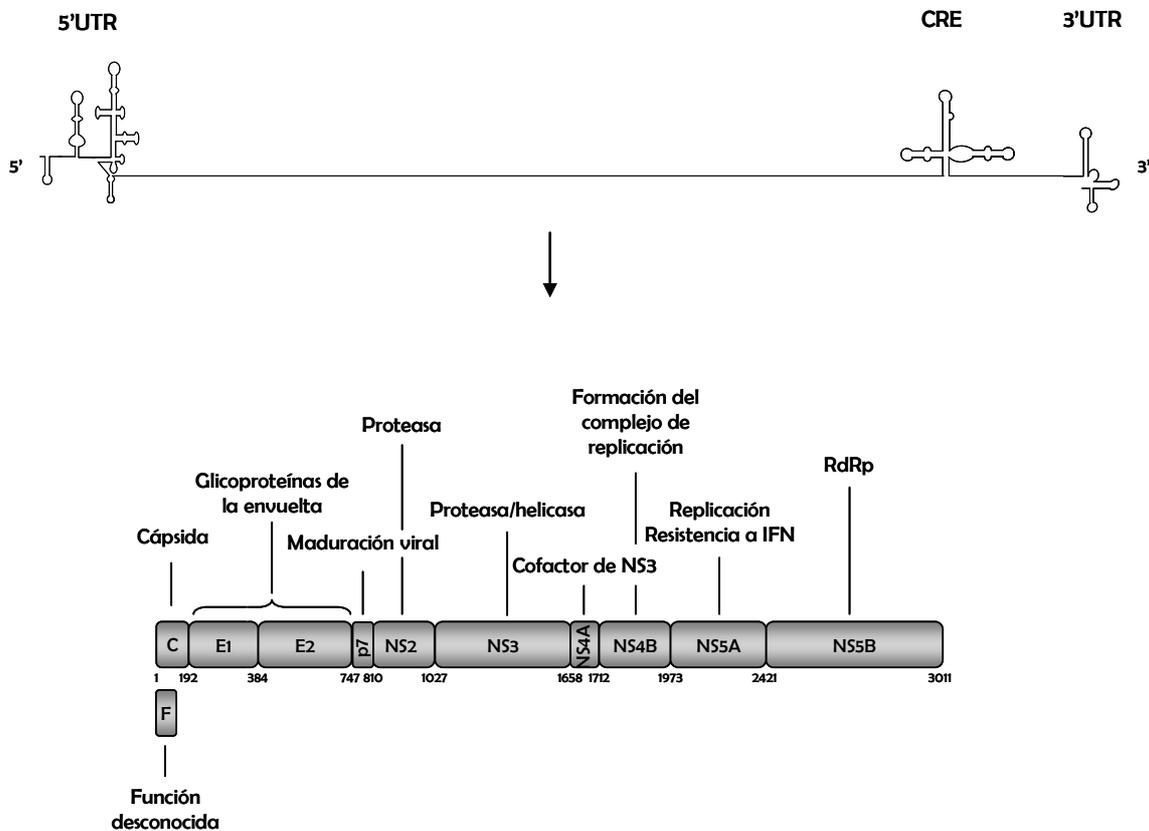


Fig. I.24.- Organización genética de HCV y poliproteína viral. En la parte superior de la figura se muestra un esquema del genoma de HCV, donde se indican las regiones 5' y 3' no traducibles (UTR, *untranslated region*) así como el elemento CRE (*cis-response element*). La traducción dependiente de IRES da lugar a una poliproteína de 3011 aminoácidos que es procesada para generar las proteínas estructurales y no estructurales. Se muestra la función desempeñada por cada proteína y sus correspondientes coordenadas aminoacídicas.

Recientemente se ha descrito la existencia de un elemento regulador independiente (CRE, *cis-response element*) situado en el extremo 3' de la secuencia codificante, cuya presencia es esencial para la replicación (You *et al.*, 2004; Friebe *et al.*, 2005). La poliproteína precursora es procesada co-traduccionalmente y post-traduccionalmente por proteasas virales y celulares, para generar las proteínas estructurales y no estructurales. Entre las primeras se incluyen la proteína de la cápsida, C, y las glicoproteínas de la envuelta, E1 y E2. Las proteínas no estructurales incluyen la auto-proteasa NS2-NS3 y la

serán proteasa NS3, NS3 helicasa/ATPasa, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (RdRp, RNA polimerasa dependiente de RNA).

Debido a que en la presente memoria se describen nuevos inhibidores dirigidos frente a la región 5'UTR, a continuación se procederá a describir sus propiedades y la función que desempeña en el ciclo viral como lugar de inicio de la síntesis de proteínas.

I.7.2.- Región 5'UTR de HCV

La región 5'UTR consta de 341 nt y es una de las más conservadas del genoma de HCV; se estima en un 85% la identidad de secuencia entre los diferentes aislados (Bukh *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1995). En esta región se encuentran secuencias esenciales para el inicio de replicación viral (Friebe *et al.*, 2001) y también contiene un dominio IRES (*internal ribosome entry site*) responsable del inicio de traducción de la poliproteína del virus de una manera independiente de cap (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993). Este dominio se extiende hasta el nt 370 aproximadamente, por lo que se incluye parcialmente en la secuencia codificante (Reynolds *et al.*, 1995; Honda *et al.*, 1996b; Lu y Wimmer, 1996;). Estas dos funciones esenciales para el ciclo del virus explican el alto grado de conservación de la región 5'UTR.

La estructura secundaria de esta región fue propuesta inicialmente por Brown *et al.* en 1992 (Brown *et al.*, 1992), y desde entonces ha sufrido diversas modificaciones en base a numerosos estudios estructurales y funcionales (Fig. I.25). En la actualidad se describe la existencia de cuatro dominios diferenciados, definidos por la formación de estructuras tipo tallo-lazo:

El dominio I es el que presenta menor grado de conservación. No es esencial para la función IRES aunque parece tener un efecto modulador (Simoès y Sarnow, 1991; Rijnbrand *et al.*, 1995; Reynolds *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000); en cambio sí se ha demostrado su implicación en la replicación (Friebe *et al.*, 2001).

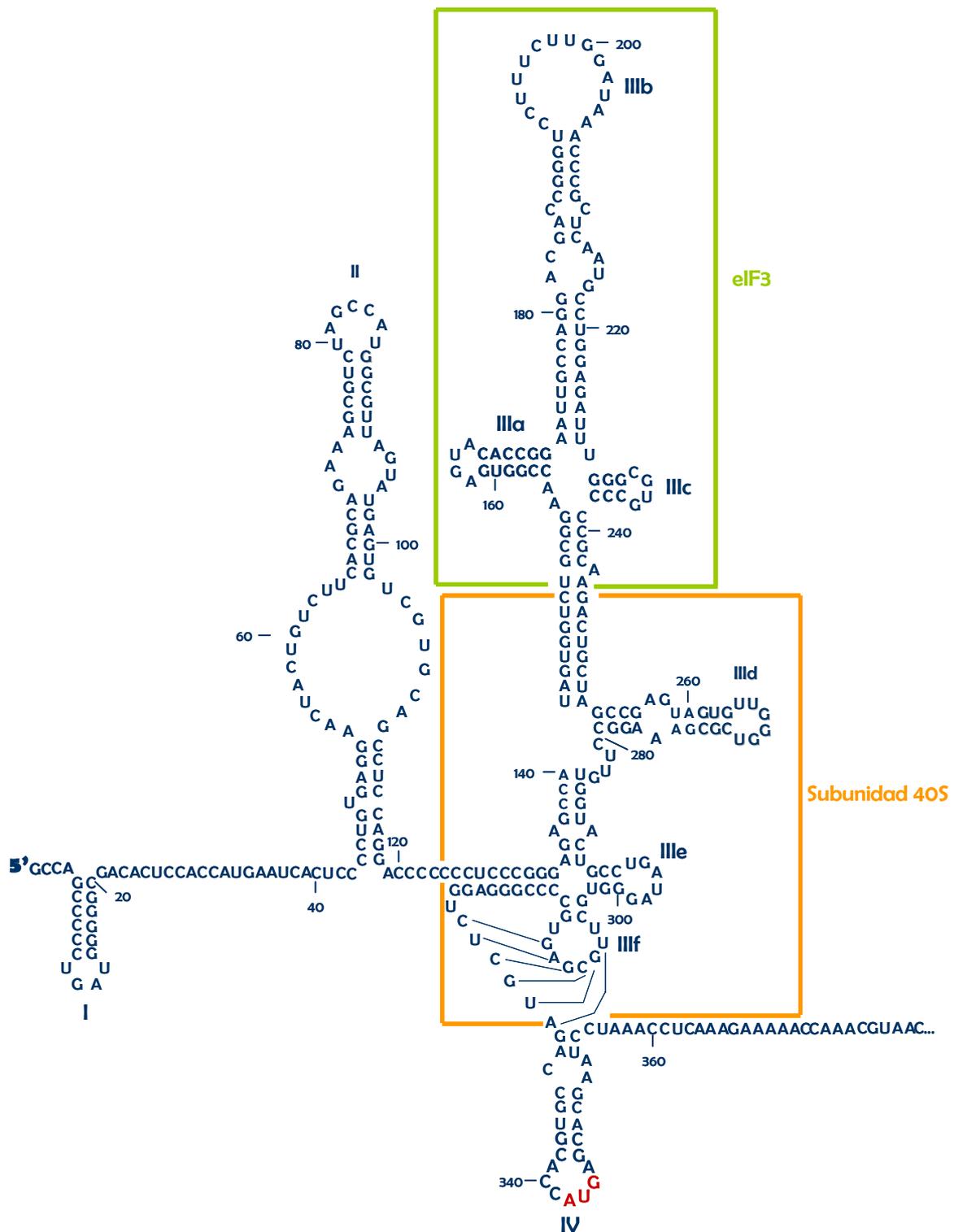


Fig.- I.25.- Estructura secundaria de la región 5'UTR de HCV. Los dominios implicados en la interacción con eIF3 y la subunidad ribosomal 40S se encuentran recuadrados en verde y naranja, respectivamente. El codón de inicio de la traducción se destaca en rojo.

Los dominios I y II se encuentran unidos por una región teóricamente de cadena sencilla que ha sido implicada en interacciones a larga distancia con nucleótidos situados en torno a la posición 430 del genoma viral (Honda *et al.*, 1999b; Kim *et al.*, 2003). Recientemente se han localizado con exactitud los residuos participantes en dicha interacción, que ha quedado localizada por la unión entre las posiciones C₂₇-U₃₃ y G₄₃₂-G₄₃₈ (Beguiristain *et al.*, 2005). El establecimiento de esta unión crea un dominio estructural en forma de bucle que afecta positivamente a la eficiencia de traducción por parte del IRES (Honda *et al.*, 1999b).

El dominio II consta de tres segmentos helicoidales interrumpidos varios por lazos internos y elementos estructurales terciarios (Honda *et al.*, 1999a; Lyons *et al.*, 2001). En el lazo apical y en un lazo interno existen secuencias muy conservadas que podrían participar en interacciones a larga distancia con otras regiones del RNA viral (Lafuente *et al.*, 2002) o en uniones con proteínas esenciales para la traducción. En estudios llevados a cabo por Spahn *et al.* se observó que el dominio II interacciona con el sitio E de la subunidad ribosomal 40S e induce una estabilización del complejo (Spahn *et al.*, 2001).

El dominio III es el lugar a través del cual el IRES se asocia a la subunidad 40S y a eIF3 (Kieft *et al.*, 2001; Lytle *et al.*, 2002; Otto *et al.*, 2002); también está implicado en la interacción eficiente con otros dominios estructurales de la región 5'UTR (Lafuente *et al.*, 2002). Comprende varios subdominios: el subdominio IIIabc consta de tres elementos estructurales tipo tallo-lazo que participan en la formación de un motivo *four-way junction*, esencial para la unión de la subunidad 40S y eIF3 (Kieft *et al.*, 2001).

El subdominio III d se estructura en un tallo, interrumpido por un lazo interno, y cerrado por un lazo de seis nucleótidos. Se pliega adoptando una conformación conocida como giro de la uridina, o *U-turn*, que implica la exposición de las bases nucleotídicas para favorecer la interacción con proteínas u otras secuencias de RNA (Jubin *et al.*, 2000; Klinck *et al.*, 2000; Lukavsky *et al.*, 2000; Lafuente *et al.*, 2002). De hecho, se ha comprobado que este dominio actúa como lugar principal de unión con la subunidad 40S a través del motivo conservado UUGGGU situado en el lazo (Kieft *et al.*, 1999; Kieft *et al.*, 2001; Kolupaeva *et al.*, 2000).

El subdominio IIIe presenta una estructura helicoidal cerrada por un lazo cuya secuencia, GAUA se encuentra altamente conservada y parece actuar como un lugar de contacto con la subunidad 40S (Lukavsky *et al.*, 2000). De hecho, cualquier mutación en estos residuos disminuye drásticamente la eficiencia de la traducción dependiente de IRES (Lukavsky *et al.*, 2000).

Una de las principales características del dominio III es la formación de una estructura *pseudoknot* que implica al subdominio IIIf y a los nucleótidos 325-330 (Wang *et al.*, 1995). Este motivo tiene un alto grado de conservación (Honda *et al.*, 1996b) y es uno de los lugares que interaccionan directamente con la subunidad 40S (Kieft *et al.*, 2001; Lytle *et al.*, 2002).

El dominio IV adopta una estructura helicoidal cerrada por un lazo que contiene el codón de inicio de la traducción, situado en la posición 342. Este motivo estructural no aparece conservado en otros IRES virales (Honda *et al.*, 1996b) aunque sí se mantiene entre los distintos aislados de HCV, por lo que se ha propuesto que su presencia no es esencial para el inicio de traducción. Honda *et al.* (Honda *et al.*, 1996a) describieron que un incremento en la estabilidad del motivo helicoidal conducía a una pérdida de la eficiencia traduccional. Estos resultados permitieron proponer una hipótesis en la que el posicionamiento del sitio P del ribosoma en el codón de inicio estaba dirigido por el dominio IV y el motivo *pseudoknot* situado en 5'.

Tal y como se ha mencionado, las interacciones a larga distancia son frecuentes entre distintos dominios del IRES. Esta situación parece estar favorecida por la adquisición de un plegamiento dependiente de la concentración de iones Mg^{2+} (Kieft *et al.*, 1999), de manera similar a la descrita para otros IRES virales (Ramos y Martinez-Salas, 1999).

La estructura tridimensional del dominio IRES fue visualizada mediante microscopía electrónica en el año 2001 por el grupo del Dr. Holzenburg (Beales *et al.*, 2001). En estos estudios se mostraba que, en un ambiente celular, la conformación adquirida distaba de ser globular, como en un principio se había supuesto. Los dominios II, III y IV aparecían anclados en la base a un núcleo estructural, compuesto por el motivo *pseudoknot*, mientras que el resto del dominio aparecía claramente extendido y expuesto al medio (Fig. I.26).

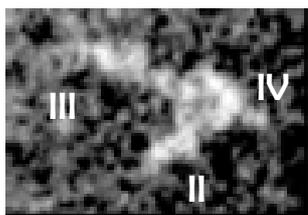


Fig. I.26.- Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de la región IRES. Imagen tomada de (Beales *et al.*, 2001).

El interés suscitado por el dominio IRES, debido a la importancia de la función que desempeña y a su potencial como diana terapéutica, ha propiciado numerosos estudios bioquímicos y estructurales que han permitido proponer un modelo para el inicio de traducción (Fig. I.27; Lytle *et al.*, 2002; Ji *et al.*, 2004).

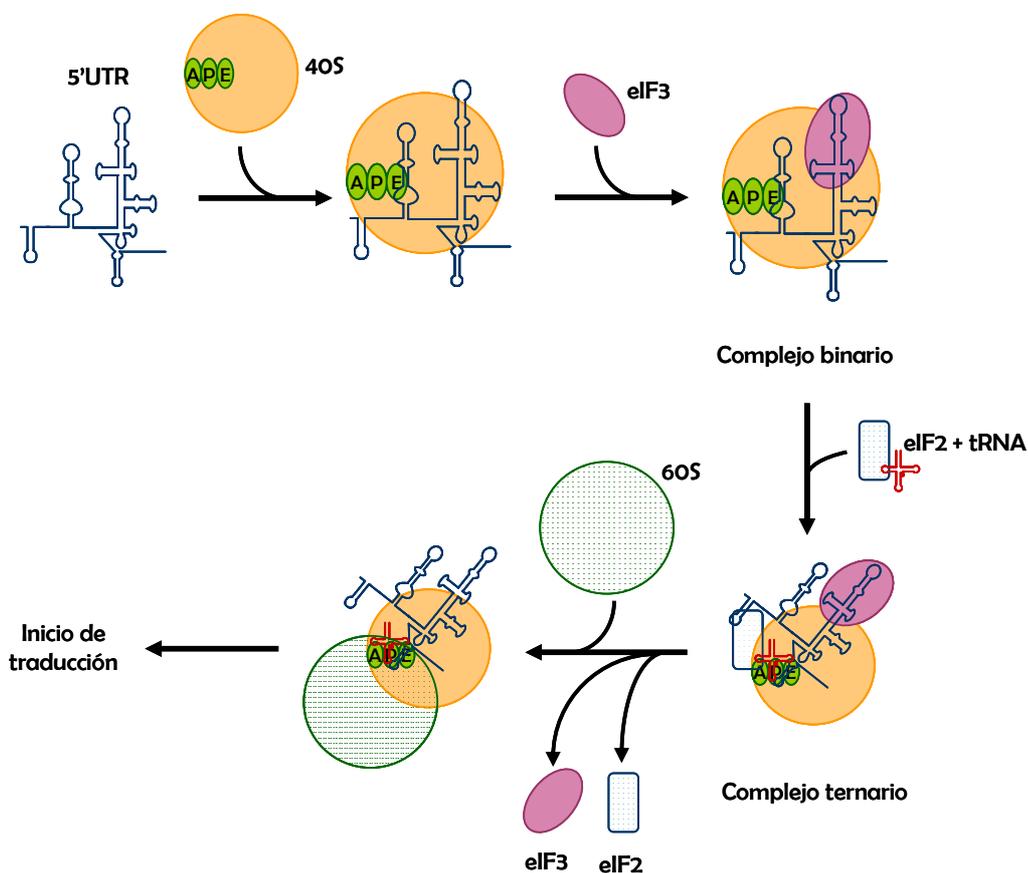


Fig. I.27.- Modelo para el inicio de la traducción dependiente de IRES.

El proceso se iniciaría con la formación del complejo binario, compuesto por la unión de eIF3 y la subunidad 40S a la región 5'UTR. A continuación se incorporaría eIF2 junto con la molécula de tRNA y GTP, para constituir el complejo 48S. En este momento se

produciría una reorganización en el RNA IRES, de manera que el dominio II, inicialmente protegido por la subunidad 40S, quedaría expuesto y el codón de inicio de traducción se situaría en el sitio P, próximo al tRNA. Finalmente se liberarían los factores de inicio eIF2 y eIF3, y la subunidad mayor del ribosoma 60S se incorporaría para formar el complejo 80S, con el que se iniciaría la síntesis de la poliproteína viral.

I.7.3.- Estrategias terapéuticas

El tratamiento actual para combatir la infección crónica por HCV se basa en la terapia combinada de PEG-IFN- α (polietilenglicol-interferón α) y ribavirina. Esta aproximación conlleva numerosos efectos secundarios y es poco efectiva en pacientes infectados por el genotipo 1 (principalmente en Europa, Norte América y Asia; (Simmonds *et al.*, 1993)). Por ello es necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas con las que tratar al 60% de infectados que no responden a los protocolos convencionales. En la tabla I.7 se muestran recogidas las terapias en desarrollo para el tratamiento de la Hepatitis C (tabla obtenida en la dirección web www.hivandhepatitis.com/hep_c/news/2005/ad/070105_a.html).

Tipo de fármaco	Nombre	Empresa productora	Ensayos clínicos
Interferón			
Interferón- α fusionado a albúmina	Albuferon	Human Genome Sciences	Fase II
Interferón- α purificado	Multiferon	Viragen	Fase II
PEG- α Con 1	Peg-alfacon	InterMune	Fase I
Interferón- Ω	Interferón- Ω	Biomedicines	Fase I
Interferón de medusa	Interferón de medusa	Flamel Technologies	Fase II
Interferón- β 1A	Rebif	Ares Serono	Fase III
Interferón- α oral	Interferón- α oral	Amarillo Biosciences	Fase I

Tabla I.7.- Tratamientos para la hepatitis C.

Tipo de fármaco	Nombre	Empresa productora	Ensayos clínicos
Alternativos a Ribavirina			
Amidina	Viramidina	Valeant Pharmaceuticals	Fase III
Inhibidores de IMPDH	Merimepodib (VX-497)	Vertex Pharmaceuticals	Fase II
Ácido micofenólico	Ácido micofenólico	Roche Pharmaceuticals	Fase I
Antiviral	Amantidina	Endo Labs	Fase III
Inmunomoduladores			
Activación de células T	Thymosin α -1 (Zadaxin)	Sci-Clone	Fase III
Activación de células T y células NK	Dihidrocloruro de histamina (Ceplene)	Maxim Pharmaceuticals	Fase II
Vacuna (proteína viral E1)	Vacuna E1	Innogenetics	Fase II
Vacuna	IC-41	Intercell	Fase II
Vacuna	HCV-MF59	Chiron	Fase I
ODN específico de TLR9	Actilon	Coley	Fase I/II
Inhibidores de enzimas virales			
Inhibidor de NS3	BILN-2061	Boehringer Ingelheim	Fase II
Inhibidor de NS3	Sch-6	Schering-Plough	Fase I
Inhibidor de NS3	VX-950	Vertex Pharmaceuticals	Fase II
Inhibidor de NS5B	Valopicitabine (NM-283)	Idenix Pharmaceuticals	Fase I/II
Inhibidor de NS5B	JDK-003	Akros Pharmaceuticals	Fase I
Inhibidor de NS5B	HCV-896	ViriPharma	Fase I
Otros			
Anticuerpo anti-CD-20	Rituximab	Genentech	Fase I/II
Anticuerpo	XLT-6865	XLT	Fase I/II
Pro-droga de Isatoribina	ANA-971	Anadys	Fase I
Pro-droga de Isatoribina	ANA-245	Anadys	Fase I/II
Anti-fosfolípido	Tarvacina	Peregrine	Fase I

Tabla I.7.- (continuación) **Tratamientos para la hepatitis C.** Se muestran algunas de las nuevas aproximaciones terapéuticas que están siendo ensayadas clínicamente. IMPDH.- inosín monofosfato deshidrogenada. Tabla tomada de www.hivandhepatitis.com/hep_c/news/2005/ad/070105_a.html.

Una alternativa a los inhibidores convencionales es el desarrollo de ácidos nucleicos capaces de bloquear procesos esenciales en el ciclo viral, como la traducción y la replicación.

I.7.3.1.- Ribozimas

Existen numerosos ejemplos en los que se describe el uso de ribozimas para la inactivación de HCV. Una de las dianas más utilizadas es la región 5'UTR, debido principalmente a su alto grado de conservación y a la relevancia de las funciones que desempeña. En 1996, Lieber *et al.* (Lieber *et al.*, 1996) diseñaron ribozimas tipo hammerhead frente a diferentes posiciones del dominio IRES; los inhibidores fueron introducidos en vectores adenovirales y ensayados en hepatocitos de pacientes infectados, y se observó una caída parcial en los niveles del RNA viral sintetizado. Ese mismo año se describieron ribozimas hammerhead capaces de bloquear la traducción dependiente de IRES hasta un 50% en cultivos celulares transfectados establemente con los inhibidores (Sakamoto *et al.*, 1996).

Posteriormente se ha optado preferentemente por el empleo de ribozimas modificadas durante su síntesis con diversos grupos químicos. El grupo del Dr. Blatt describió una ribozima hammerhead modificada con capacidad para procesar el genoma de HCV en la posición 195 (Macejak *et al.*, 2000). Esta molécula era capaz de inhibir la replicación de quimeras del tipo poliovirus-HCV en un 80%, y sus efectos se veían potenciados cuando el tratamiento se realizaba en combinación con IFN- α (Macejak *et al.*, 2001). Este inhibidor se denominó HeptazymeTM y fue ensayado clínicamente durante algún tiempo, pero finalmente su empleo fue desestimado. Otros ensayos llevados a cabo con ribozimas tipo hairpin (Welch *et al.*, 1996), dirigidas frente a la región 5'UTR o frente a la secuencia codificante de la proteína de la cápsida, han mostrado la capacidad de estos inhibidores para reducir el nivel de partículas retrovirales hasta un 94%. Finalmente, cabe destacar la importancia que determinados dominios estructurales pueden tener como posibles dianas de ribozimas. Recientemente se ha descrito la existencia de motivos similares al tRNA en el genoma de HCV, que son activamente procesados por la RNasa P (Nadal *et al.*, 2002), lo cual los convierte en excelentes candidatos como posible blanco de acción de nuevos inhibidores basados en la RNasa P.

I.7.3.2.- Antisense

En el caso de HCV, los oligonucleótidos *antisense* han supuesto una aproximación alternativa al uso de ribozimas. Principalmente se han dirigido frente al dominio IRES (Wakita y Wands, 1994; Alt *et al.*, 1995; Hanecak *et al.*, 1996; Wu y Wu, 1998; Alt *et al.*, 1999; Brown-Driver *et al.*, 1999; Wakita *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999; McCaffrey *et al.*, 2003; Tallet-Lopez *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2004), aunque también se han empelado como dianas la secuencia codificante para la proteína de la cápsida (Alt *et al.*, 1997; Wu y Wu, 1998; Brown-Driver *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2005) y para la proteasa NS3 (Heintges *et al.*, 2001; Amin *et al.*, 2005). En todos los casos, los oligonucleótidos utilizados, tanto de DNA como de RNA, han sido modificados químicamente para incrementar su estabilidad en el interior celular. Una de las moléculas que más expectativas ha despertado ha sido ISIS 14803, un ODN *antisense* modificado químicamente con grupos tioato y que es complementario a los nucleótidos 345-365 del genoma viral (Fig. I.18; McCaffrey *et al.*, 2003). Los estudios preliminares en cultivos celulares y en modelos de ratón mostraron una gran capacidad de inhibición de la traducción y replicación viral (McCaffrey *et al.*, 2003). Actualmente se desarrolla la fase II de los ensayos clínicos; aunque la disminución de los niveles de RNA viral en sangre parecen transitorios, hasta el momento no se ha detectado la aparición de variantes del virus resistentes al tratamiento (Soler *et al.*, 2004).

I.7.3.3.- Aptámeros

Una de las estrategias que ha tenido mayor aceptación en los últimos años ha consistido en el diseño y selección de aptámeros de RNA dirigidos principalmente frente a la proteína NS3, con el fin de inactivar tanto su función proteasa como helicasa (Kumar *et al.*, 1997; Urvil *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 2000; Nishikawa *et al.*, 2003; Fukuda *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2004a; Nishikawa *et al.*, 2004; Umehara *et al.*, 2005;), todas ellas desarrolladas en el grupo del Dr. Nishikawa. En todos los casos los aptámeros seleccionados eran capaces de unirse eficientemente a sus dominios diana en la proteína NS3 y bloquear su actividad *in vitro*. En 2003 se procedió a la caracterización de la actividad intracelular (Nishikawa *et al.*, 2003) de algunas de las moléculas obtenidas previamente por Fukuda *et al.* (Fukuda *et al.*, 2000). Para ello los inhibidores se clonaron

en un vector bajo un promotor citoplasmático fuerte; a la construcción se le incorporó el dominio catalítico de la ribozima HDV, lo cual permitía la creación de un sistema con múltiples copias de aptámero en tándem, que una vez transcritas eran procesadas por la ribozima para generar unidades monoméricas. La actividad inhibidora de la función proteasa de NS3 se determinó en células HeLa, donde se observaron valores de inhibición próximos al 100% en las condiciones empleadas.

También se ha descrito el desarrollo de aptámeros de DNA y RNA dirigidos frente a la proteína NS5B (Biroccio *et al.*, 2002; Bellecave *et al.*, 2003; Vo *et al.*, 2003). En todos los casos se detectó que la adquisición de motivos estructurales tipo tallo-lazo era responsable de la unión a la proteína y posterior inhibición de su actividad enzimática. Aunque no se ha evaluado su actividad en un modelo celular, en sistemas *in vitro* se comprobó que algunas de las moléculas seleccionadas eran capaces de bloquear la reacción de polimerización.

Una diana alternativa a NS3 y NS5B ha sido la región 5'UTR (Aldaz-Carroll *et al.*, 2002; Kikuchi *et al.*, 2003; Da Rocha Gomes *et al.*, 2004; Kikuchi *et al.*, 2005). Los métodos de selección molecular *in vitro* desarrollados han utilizado los dominios aislados del IRES (II, III y IV) como sustrato para identificar aptámeros. Los motivos consenso seleccionados, así como su lugar de interacción en el RNA viral, se muestran en la tabla I.8.

Secuencia consenso	Secuencia diana	Dominio sustrato	Referencia
5' ACCCA 3'	U ₂₆₅ GGGU ₂₆₉	IIIId	(Kikuchi <i>et al.</i> , 2005)
5' UAUGGCU 3'	A ₈₁ GCCAUG ₈₇	II	(Kikuchi <i>et al.</i> , 2003)
5' AUGGCU 3'	A ₈₁ GCCAU ₈₆	II	(Da Rocha Gomes <i>et al.</i> , 2004)
5' AUCAUGG 3'	C ₃₄₀ CAUGAG ₃₄₆	IV	(Aldaz-Carroll <i>et al.</i> , 2002)

Tabla I.8.- Secuencias consenso de RNAs aptámeros obtenidos mediante selección *in vitro* frente a distintos dominios de la región 5'UTR.

En algunos casos, la interacción entre ambas moléculas se producía a través de secuencias en el aptámero complementarias a lazos apicales del dominio sustrato, dando lugar a la formación del denominado *kissing complex* (apartado I.2). Este tipo de uniones se producen de manera rápida y efectiva, por lo que en muchas ocasiones son suficientes para la regulación de los procesos en los que se encuentran implicadas. En el caso de uno

de los aptámeros obtenidos frente al dominio III_d, se observó una caída en los niveles de traducción dependiente del IRES de HCV en un 50%.

En el grupo del Dr. Toulmé los aptámeros identificados establecían su interacción con el dominio diana a través de residuos que aparecen expuestos en lazos internos; este tipo de uniones se conocen como interacciones ALIL (*apical loop-internal loop interactions*; Aldaz-Carroll *et al.*, 2002; Da Rocha Gomes *et al.*, 2004). Al igual que ocurre en la formación del *kissing complex*, las interacciones ALIL se producen de manera eficaz y son utilizadas para la regulación de procesos biológicos en sistemas naturales (revisado en (Brunel *et al.*, 2002)).

De manera alternativa al uso de aptámeros, se pueden introducir en las células infectadas pequeñas moléculas de DNA o RNA que funcionan como *decoys* o señuelos, mimetizando los sustratos naturales de proteínas esenciales para el ciclo viral. Esta aproximación fue empleada inicialmente con los RNAs TAR y RRE de HIV-1, capaces de secuestrar las proteínas Tat y Rev (Sullenger *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1992;); las células que presentaban los RNAs *decoys* eran resistentes a la infección. En el caso de HCV, un estudio publicado recientemente por Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2005a) demuestra que la sobreproducción de los dominios estructurales del elemento CRE en un sistema replicón conduce a la inhibición de la replicación. También se ha comprobado que diversos dominios aislados (dominio III, subdominio III_{e-f}) de la región 5'UTR pueden capturar proteínas implicadas en el inicio de traducción, como la subunidad ribosomal 40S, y bloquear así la replicación viral (Ray y Das, 2004).

Actualmente se está ensayando en pacientes un nuevo fármaco, denominado ActilonTM (Coley); se trata de un oligonucleótido de DNA modificado químicamente y rico en dinucleótidos GC, capaz de potenciar la activación de células dendríticas y células T por unión al receptor TLR9. En cinco de los seis pacientes tratados se consiguió reducir la carga viral en un 90% (www.coleypharma.com/coley/actilon).

Alternativamente, se han realizado numerosos trabajos enfocados al diseño de siRNAs, dirigidos principalmente frente a las secuencias codificantes de las proteínas E2, NS3, NS5A y NS5B (Kapadia *et al.*, 2003; Sen *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2003; Yokota *et al.*, 2003; Takigawa *et al.*, 2004; Wu y Nandamuri, 2004; Korf *et al.*, 2005; Prabhu *et al.*, 2005; Wilson y Richardson, 2005;) y la región IRES (Randall *et al.*, 2003; Kronke *et al.*,

2004; Korf *et al.*, 2005). En estos estudios se eligen y diseñan múltiples siRNAs que posteriormente son ensayados en modelos de replicones subgenómicos. Debido a la posibilidad de generación de variantes virales resistentes al tratamiento, generalmente se utilizan mezclas de distintos inhibidores para conseguir un efecto potenciado.

Finalmente, es importante destacar que nuevas moléculas como PNAs y LNAs han demostrado un gran potencial inhibidor de la traducción dependiente de IRES (Nulf y Corey, 2004).

O.- OBJETIVOS:

Durante los últimos años se ha hecho evidente la escasez de terapias efectivas frente a un gran número de enfermedades virales debido a la gran capacidad mutagénica que presentan los virus y que les permite evolucionar como variantes resistentes a los tratamientos en uso. Por ello se hace necesario el desarrollo de terapias alternativas que permitan combatir de una manera eficiente a estos patógenos, y en su caso, que sean insensibles a la adquisición de resistencia por parte del agente viral. Las ribozimas se constituyen como buenos candidatos para ser empleadas como herramientas terapéuticas, debido a su alta especificidad en el procesamiento del RNA sustrato y a su baja toxicidad. El objetivo prioritario del trabajo realizado fue el desarrollo de nuevos inhibidores optimizados basados en ribozimas. Como RNA modelo frente al cual dirigir estas moléculas se escogió la región IRES del virus causante de la hepatitis tipo C (HCV). Para ello se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1.- Diseño de un método de selección molecular *in vitro* para identificar nuevos RNAs inhibidores optimizados que permitan resolver algunas de las carencias presentadas por las ribozimas convencionales.

2.- Aplicación del método para la selección de RNAs inhibidores dirigidos frente a la región IRES de HCV.

3.- Caracterización bioquímica de las moléculas seleccionadas y análisis del efecto inhibidor.

M.- MATERIALES Y MÉTODOS

M.1.- Materiales

M.1.1.- Productos químicos

En general se utilizaron reactivos de las casas Sigma (Saint Louis, USA), Fluka (Seelze, Alemania), Roche (Mannheim, Alemania), Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia), Panreac (Barcelona, España), Serva (Heidelberg, Alemania) y Amresco (Solon, USA).

M.1.2.- Enzimas de restricción y modificadoras de DNA y de RNA

Las enzimas utilizadas como herramientas moleculares se obtuvieron de las firmas New England Biolabs (NEB, Ipswich, USA), Amersham Biosciences (Uppsala, Suecia), Roche (Mannheim, Alemania) y MBI Fermentas (Vilnius, Lituania), salvo excepciones que se indican en su caso. Las enzimas para la manipulación de RNA se obtuvieron principalmente de Ambion (Austin, USA).

M.1.3.- Isótopos radiactivos

El marcaje radiactivo de RNA se ha llevado a cabo con el isótopo ^{32}P en forma de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ o $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, con actividades específicas entre 3000 y 5000 Ci/mmol. Para marcar radiactivamente las proteínas se ha empleado como isótopo ^{35}S , aportado en forma de $[\text{L}\text{-}^{35}\text{S}\text{-cisteína}]$ y $[\text{L}\text{-}^{35}\text{S}\text{-metionina}]$ (80:20) con una actividad específica de 1000 Ci/mmol.

En todos los casos, los isótopos fueron suministrados por Amersham Biosciences (Uppsala, Suecia).

M.1.4.- Películas autorradiográficas

Las películas autorradiográficas fueron de las casas Kodak (X-OMAT AR 5) y AGFA (Curix RP2).

M.1.5.- Medios de cultivo

- Medio LB líquido: Bactotripton 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l, pH=7.
- Medio LB-agar: Medio LB líquido y agar al 15%.
- Medio de congelación para células procariotas. Medio LB con glicerol a una concentración final del 25%.

M.1.6.- Tampones

Tampón de electroforesis Tris-Acetato (TAE) 1X

Tris-acetato.....0.04 M

EDTA.....0.001 M

Tampón de electroforesis Tris-Borato (TBE) 1X

Tris-borato.....0.045 M

EDTA.....0.001 M

Tampón de electroforesis para geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (1X)

Tris-acetato.....50 mM

Acetato de magnesio.....10 mM

Tampón de electroforesis para geles de poliacrilamida en presencia de SDS (L) 1X

Tris Base.....0.35 M

SDS.....0.1%

pH = 8.8

Tampón de electroforesis para geles de poliacrilamida en presencia de SDS (M) 1X

Tris Base.....0.15 M

SDS.....0.1%

pH = 6.8

Tampón de electroforesis para geles de poliacrilamida en presencia de SDS (*Running buffer*) 1X

Tris Base.....0.025 M

Glicina.....0.192 M

SDS.....0.1% (p/v)

pH ~ 8.5

Tampón no desnaturizante para carga en geles de agarosa

Glicerol.....50 % (v/v) en agua

Xilencianol.....0.4 % (p/v) en agua

Azul de bromofenol.....0.4 % (p/v) en agua

Tampón no desnaturizante para carga en geles de poliacrilamida

Glicerol.....30 % (v/v) en agua

TMN 5X.....20 % (v/v) en agua

tRNA.....4 % (p/v) en agua

Xilencianol.....0.4 % (p/v) en agua

Azul de bromofenol.....0.4 % (p/v) en agua

Tampón desnaturalizante para carga en geles de poliacrilamida

Formamida desionizada.....94% (v/v)
Xilencianol.....0.025 % (p/v)
Azul de bromofenol.....0.025% (p/v)
EDTA.....17 mM

**Tampón desnaturalizante para carga en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
(1X)**

Tris-HCl, pH 6.8.....10 mM
SDS.....2% (p/v)
EDTA.....2 mM
Glicerol.....5% (p/v)
 β -mercaptoetanol.....1% (v/v)
Azul de bromofenol.....0.1 mg/ml

Tampón de elución de ácidos nucleicos a partir de geles de poliacrilamida

NH₄Ac.....0.5 M
SDS.....0.1 % (p/v)
EDTA (pH = 8.0).....1 mM

Tampón de unión biotina-estreptavidina

Na₃PO₄.....20 mM
NaCl.....150 mM
pH = 7.5

Tampón TMN 1X

Tris-acetato.....0.02 M
Acetato de magnesio.....0.01 M
Cloruro sódico.....0.1 M

Tampón para la degradación con RNasa T1 en condiciones desnaturalizantes (2X)

Citrato sódico, pH = 4.5.....	20 mM
EDTA.....	1 mM
Urea.....	7 M
Azul de bromofenol.....	1% (p/v)
Xilencianol.....	1% (p/v)

Solución para la hidrólisis alcalina de RNA (10X)

Carbonato sódico.....	0.1 M
Bicarbonato sódico.....	0.1 M
pH =	9.5

Tampón de corte de la ribozima hammerhead

Tris-HCl (pH 7.5).....	50 mM
MgCl ₂	10 mM

M.1.7.- Construcciones de DNA**M.1.7.1.- pBSHH363**

Procede de pBSSK (Stratagen. La Jolla. USA), al cual se le ha integrado la secuencia que codifica para la ribozima hammerhead HH363. Esta ribozima fue descrita por Lieber *et al.* en 1996 (Lieber *et al.*, 1996), la cual a su vez deriva del motivo presente en el [+]sTRSV. La secuencia que codifica para HH363 se obtuvo mediante hibridación y extensión de dos ODN complementarios: 5'HH363 (5' – TAT *GGT ACC TTC TTT CTG ATG AGT CCG TGA G* – 3') y 3'HH363 (5' – ATA *GGA TCC AAA CCT TTC GTC CTC ACG GAC TC* – 3'), según se describe en M.2.5.2. El producto de extensión fue digerido con los enzimas *KpnI* y *BamHI* (M.2.13.1.1), y posteriormente ligado en el plásmido pBSSK, previamente digerido de la misma manera para obtener la construcción pBSHH363 (M.2.14).

Una vez digerida con la enzima de restricción *BamHI*, esta construcción actuaba como molde para la síntesis de la ribozima HH363.

M.1.7.2.- pU5'HCV-691

Deriva de pUC19 y contiene la secuencia del genoma de HCV-1b desde la posición +1 hasta la 691. En 5' se ha incorporado la secuencia promotora para la RNA polimerasa del fago T7. Esta secuencia fue sintetizada como dos fragmentos independientes, que posteriormente fueron ligados y clonados en pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985).

Para la construcción del fragmento 5' (posiciones +1 a 255) se utilizó el plásmido pGHCV-280, derivado de pGEM®-3Zf(-) (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) y que contiene la secuencia genómica de HCV hasta el nucleótido 280, obtenida a partir del RNA viral de pacientes infectados con el genotipo 1b. Se diseñaron dos ODN cebadores: el primero de ellos, 5'T7pHCV (5' – TAT *GAA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG CCA GCC CCC TGA* – 3') hibrida en el extremo 5' del genoma y permite la incorporación de la secuencia para el promotor de la enzima RNA polimerasa del fago T7 (subrayada) y de un sitio de restricción para *EcoR1* (en cursiva); el segundo se denominó HCVas255 (5' – TAT *GCT AGC AGT CTT GCG GGG GCA* – 3') y aparea en la posición 255 del genoma viral, donde existe un sitio de corte para el enzima *NdeI* (en cursiva). La reacción de amplificación se llevó a cabo según se describe en el apartado M.2.5.3, utilizando como molde el plásmido pGHCV-280. El producto de PCR fue seguidamente purificado por gel de agarosa y digerido con *NdeI* (M.2.13.1.1).

El segundo fragmento (posiciones 256 a 691) se obtuvo igualmente por amplificación utilizando como DNA molde el plásmido pN(1-4728), cedido por el Dr. J. Gómez. Para la reacción de PCR se diseñaron dos ODN cebadores: uno denominado 5'HCV-249, que hibrida en la posición 249, donde se encuentra el sitio de restricción para *NdeI* (en cursiva; 5' – TAT *GCT AGC CGA GTA GTG TTG GGT* – 3'); el segundo, 5'HCV-691B, hibrida en la posición 691 del genoma de HCV e incorpora un sitio de restricción para *BamHI* (5' – TTG *GAT CCA CCC AAA TTG CGC GAC CTA C* -3'). Este ODN fue descrito originalmente por Inchauspe *et al.* (Inchauspe *et al.*, 1991); en esta memoria se ha utilizado la misma secuencia a la que se le ha incorporado un sitio de restricción *BamHI* necesario para el proceso clonación. Tras la reacción de amplificación (M.2.5.3) se digirió el DNA con *NdeI* (M.2.13.1.1).

Ambos fragmentos fueron ligados a través de sus extremos *NdeI* (M.2.14) y posteriormente reamplificados con los cebadores 5'T7pHCV y 5'HCV-691 (M.2.5.3). El

producto resultante se digirió con los enzimas de restricción *EcoR1* y *BamH1* (M.2.13.1.1) y se clonó en el vector pUC19, previamente digerido de igual forma.

Esta construcción fue digerida con la enzima de restricción *BamH1* y seguidamente utilizada para la síntesis del RNA sustrato 5'HCV-691, que se ha empleado durante el segundo paso del proceso de selección molecular *in vitro* y para la caracterización cinética de la actividad catalítica de diversas ribozimas.

M.1.7.3.- pU5'HCV-691gg

Proviene del plásmido pUC19 y contiene la secuencia que funciona como promotor para la enzima RNA polimerasa del fago T7, así como el genoma de HCV hasta la posición 691 con dos mutaciones puntuales en las posiciones U₃₆₂→G₃₆₂ y C₃₆₃→G₃₆₃. Se construyó a partir de dos fragmentos independientes:

El fragmento 5' (HCV-335, contiene las posiciones +1 a 335 del genoma viral más la secuencia para el promotor de la RNA polimerasa del fago T7 en 5') se obtuvo mediante digestión del plásmido pU5'HCV-691 con los enzimas de restricción *EcoR1* (en 5') y *ApaL1* (en 3').

El fragmento 3', el cual debe contener las posiciones 362 y 363 mutadas, presenta los residuos 336 a 691 del genoma de HCV (HCV336-691). Se obtuvo mediante PCR tal y como se detalla en el apartado M.2.5.3, utilizando como DNA molde la construcción pU5'HCV-691 y dos ODN cebadores. El cebador en 5' se denomina 5'363gg (5' – GAC CGT GCA CCA TGA GCA CGA ATC CTA AAC CGG AAA GAA – 3'); permite la incorporación de las mutaciones y del sitio de restricción para *ApaL1* (en cursiva) que se encuentra en el nucleótido 335 de HCV. El cebador en 3' fue 5'HCV-691B, descrito anteriormente. El producto de amplificación fue purificado (M.2.8.2.2) y digerido a continuación con la enzima *ApaLI* (M.2.13.1.1).

Ambos fragmentos (HCV-335 y HCV336-691) se ligaron y posteriormente se reamplificaron con los ODN cebadores 5'T7pHCV y 5'HCV-691B (ambos descritos en el apartado M.1.7.2). El DNA resultante se digirió con *EcoR1* y *BamH1* y se clonó en el vector pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), previamente digerido de manera similar (M.2.13.1.1).

Este plásmido se utilizó como molde (previa digestión con *Bam*H1) para la síntesis del RNA sustrato 5'HCV-691gg, empleado para caracterizar cinéticamente la capacidad de asociación de distintos dominios catalíticos.

M.1.7.4.- pU5'HCV-356

Deriva del plásmido pUC19, al cual se le ha incorporado la secuencia reconocida por la enzima T7 RNA polimerasa del fago T7 y los primeros 356 nt del genoma de HCV.

La construcción pU5'HCV-691 fue utilizada como molde para la amplificación del fragmento HCV 1-356 (M.2.5.3). Se utilizaron dos oligonucleótidos cebadores: 5'T7pHCV (M.1.7.2) y priHCV356 (5' – ATA *AAG CTT* AGG ATT CGT GCT CAT – 3'), el cual incorpora un sitio para la enzima de restricción *Hind*III (en cursiva). El producto de PCR fue digerido con las enzimas *Eco*R1 y *Hind*III (M.2.13.1.1), y clonado en el plásmido pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) igualmente digerido.

Esta construcción se utilizó como molde, tras su digestión con el enzima de restricción *Hind*III, para la síntesis del RNA 5'HCV-356, utilizado en el primer paso del proceso de selección molecular *in vitro* y en ensayos de protección a la degradación por RNasas.

M.1.7.5.- pGT-P_n

Una fracción de las moléculas rescatadas durante los diferentes ciclos de selección (P₁...P₆) fue clonada en el vector pGEM®-T Easy (Promega, Madison, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, para generar las construcciones pGT-P_n (pGT-P₁,...pGT-P₆). Brevemente, el producto de PCR generado fue subdividido en varias fracciones. Una de ellas se destinó al clonaje en el vector pGEM®-T Easy vector. Las condiciones de ligación se indican en el apartado M.2.14.

M.1.8.- Cepas bacterianas

La cepa bacteriana empleada pertenece a la especie *E. coli*.

DH5 α F' (Raleigh *et al.*, 1989; Woodcock *et al.*, 1989) F'/*endA1 hsdR17*(r_k-m_k⁺) *supE44 thi-1 recA1 gyrA* (Nal^r) *relA1* Δ (*LacIZYA-argF*)*U169 deoR* (ϕ 80*dlacA(lacZ)*M15)

M.1.9.- Marcadores de masa molecular

M.1.9.1.- Para DNA

- DNA del plásmido pUC19 digerido con *MspI*. Fragmentos (longitud en pb): 509, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 111, 67, 46.

- DNA del fago Lambda gt11 (c1857, ind1, Sam7) digerido con *StyI*. Fragmentos (longitud en pb): 7743, 6223, 3472, 269, 1882, 1489, 925, 421, 74.

- DNA del plásmido pUC18 digerido con *Sau3AI*. Fragmentos (longitud en pb): 943, 585, 341, 258, 153, 105, 78, 46, 36, 18, 12, 8.

M.1.9.2.- Para RNA

Como marcadores de masa molecular se utilizaron las mismas moléculas de RNA de longitud y secuencia conocidas, obtenidas por transcripción *in vitro* a partir de plásmidos digeridos con distintas enzimas de restricción. Estos RNAs fueron marcados radiactivamente en su extremo 5' y posteriormente digeridos con RNasa T1 en condiciones desnaturalizantes (M.2.13.2.2). También se empleó la hidrólisis alcalina de dichas moléculas, tal y como se describe en el apartado M.2.13.2.5.

M.1.10.- Programas informáticos

A continuación se relacionan los programas informáticos más comúnmente utilizados durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral:

- Microsoftword: Versiones 98, 2000 y 2003. Microsoft Inc.
- Powerpoint: Versiones 98, 2000 y 2003. Microsoft Inc.
- Sigmaplot: versión 8.0 : SPSS Inc.
- Internet Explorer: Microsof Inc.
- Adobe Photoshop: versión 8.0. Adobe Systems Inc.
- SeqEd: Perkin Elmer Corp.
- DNASIS Max: MiraiBio
- Oligo 4.03 Computer Software: National Biosciences Inc., USA
- Imagequant: Molecular Dynamics. IQ Solutions
- M-Fold. RNA Folding.
- Endnoteplus. Niles Software Inc.

M.2.- Métodos

M.2.1.- Cultivo de células procariotas

Las cepas de *E. coli* utilizadas a lo largo del estudio se cultivaron en medio líquido (LB) a partir, en cada caso, de un clon aislado crecido en medio sólido (LB-agar), asegurando de esta manera poblaciones homogéneas. Los medios fueron suplementados con ampicilina, X-gal y/o IPTG, en caso necesario. Los cultivos se incubaron a 37°C.

El crecimiento en medio líquido se llevó a cabo en agitación hasta saturación, para la extracción de DNA plasmídico, o bien hasta una fase de crecimiento exponencial para la preparación de células competentes o la congelación del cultivo.

M.2.2.- Crioconservación de células procariotas

Las bacterias se crecieron en medio LB líquido durante toda la noche. Los cultivos saturados fueron diluidos 1:1000 en medio fresco e incubados de nuevo hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial (D.O.₆₀₀ aprox 0.4-0.6). Las células se diluyeron con glicerol a una concentración final del 25%, se repartieron en tubos de 1.5 ml y se congelaron directamente a – 80°C. Las bacterias se conservaron a esta temperatura.

M.2.3.- Transformación de *E.coli* con DNA plasmídico

M.2.3.1.- Preparación de células competentes

Las células fueron preparadas para su transformación química con CaCl₂ (Lederberg y Cohen, 1974) (Hanahan y Meselson, 1983). El CaCl₂ permeabiliza las paredes celulares, de manera que las moléculas de DNA circulantes pueden penetrar al interior de las células.

Células pertenecientes a la cepa DH5α de *E. coli* fueron crecidas hasta una D.O.₆₀₀ de 0.4-0.6. Se recogieron por centrifugación en frío durante 7 min a 6000 xg. Se

resuspendieron en 0.5 volúmenes de CaCl₂ 50 mM frío y se incubaron en hielo 30 min. Tras este período se recogieron de nuevo por centrifugación como se ha descrito y se resuspendieron finalmente con CaCl₂ 50 mM frío en 1/20 del volumen original. Las células así preparadas fueron conservadas en hielo y utilizadas en un período máximo de 36 h.

M.2.3.2.- Transformación

Para la transformación de las bacterias competentes preparadas con CaCl₂ se utilizó el método de choque térmico (Lederberg y Cohen, 1974; Hanahan y Meselson, 1983).

Se mezclaron 200 µl de células competentes con 10-100 ng de DNA y se mantuvieron 30 min en hielo. La entrada del DNA adherido a la superficie celular se facilita mediante un incremento en la temperatura hasta alcanzar los 42°C durante 90 s. Las células se recuperaron 5 min en hielo. Seguidamente, se añadió 1 ml de medio LB precalentado y las células se incubaron en agitación suave durante una hora a 37°C. Transcurrido este período, se sembraron en placas de medio sólido (aproximadamente 200 µl/placa) en presencia del antibiótico adecuado y se crecieron toda la noche a 37°C. La eficiencia de transformación obtenida mediante este protocolo suele ser de 10⁶ células /µg de DNA plasmídico utilizado.

*M.2.4.- Selección de colonias recombinantes de *E. coli**

Las células transformadas se seleccionaron por la resistencia al antibiótico conferida por el plásmido. Las colonias recombinantes se identificaron por expresión del gen de la β-galactosidasa. La cepa bacteriana DH5α es defectiva para la síntesis de esta enzima debido a la deleción del gen que codifica para uno de sus péptidos (el péptido α). Los plásmidos que portan este gen restauran la expresión en las células transformadas mediante un fenómeno de complementación genética. Así, en presencia de un sustrato cromogénico denominado X-gal y del inductor IPTG, las células transformadas adquieren coloración azul. El sitio de clonación en este tipo de plásmidos se sitúa dentro del marco abierto de

lectura del gen del péptido α , por lo que en los plásmidos recombinantes que contienen un inserto se altera la pauta de lectura del gen y las colonias aparecen blancas.

Para este tipo de selección las células transformadas se sembraron en medio LB sólido conteniendo ampicilina 50 $\mu\text{g/ml}$, X-gal 40 $\mu\text{g/ml}$ e IPTG 150 $\mu\text{g/ml}$.

M.2.5.- Síntesis de ácidos nucleicos

M.2.5.1.- Síntesis química de oligonucleótidos

En general, los oligodesoxirribonucleótidos (ODNs) sintéticos utilizados en el desarrollo de esta memoria fueron obtenidos del servicio de síntesis del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”. La síntesis se llevó a cabo en un sintetizador de DNA 3400 DNA Synthesizer (Applied Biosystems, Wellesley, USA).

El ODN mutagenizado empleado para la síntesis de la población inicial durante el proceso de selección molecular *in vitro* (3'HH363is) fue suministrado por Sigma-Genosys (Woodlands, USA).

El ODN biotilado en su extremo 5', utilizado para la inmovilización del RNA sustrato durante el segundo paso de selección (5'b-as691) se obtuvo en Isogen (IJsselstein, Holanda).

M.2.5.2.- Síntesis por hibridación de oligonucleótidos y extensión

La síntesis enzimática de DNA de doble cadena a partir de oligonucleótidos se llevó a cabo hibridando los dos ODNs precursores parcialmente complementarios y extendiendo a partir de sus extremos 3' mediante la acción de la enzima *Taq* DNA polimerasa. Los ODNs (200 pmol de cada uno) se hibridaron mediante desnaturalización y renaturalización conjunta en agua estéril durante 5 min a 72°C y posterior enfriamiento lento hasta la temperatura de hibridación de los cebadores, calculada con el programa Oligo 4.0. Para la extensión se utilizaron 0.025 U/ μl de *Taq* DNA polimerasa (Biotools, Madrid, España) a 72°C. La reacción se incubó durante 20 min en presencia del tampón correspondiente suministrado por el fabricante y 0.05 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP).

Para la construcción de la población inicial de moléculas durante el proceso de selección molecular *in vitro* se hibridaron 6 nmol de cada ODN (5'HH363is y 3'HH363is) según se ha descrito y se llevó a cabo la reacción de extensión escalada en un volumen final de 150 μ l. Los productos resultantes fueron purificados mediante cromatografía de exclusión por tamaños (M.2.8.4), extracción fenólica y precipitación con etanol absoluto (M.2.8.1). Las muestras se secaron mediante centrifugación a vacío y se resuspendieron en un volumen apropiado del tampón correspondiente.

M.2.5.3.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación exponencial y específica de una molécula de DNA mediante una única reacción enzimática. Se requiere una DNA polimerasa termoestable y está basada en sucesivos ciclos de desnaturalización de la doble hebra, hibridación de los cebadores específicos y extensión por síntesis de DNA.

Las reacciones de amplificación de DNA mediante PCR se realizaron en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 (Wellesley, USA). En la mezcla de reacción se incluyó: dNTPs 200 μ M cada uno, $MgCl_2$ 2 mM, DNA molde 1 ng/ μ l, *Taq* DNA polimerasa (Biotools, Madrid, España) 0.015 U/ μ l, tampón de reacción suministrado por la casa comercial 1X y cada uno de los cebadores a una concentración final de 0.5 μ M. La temperatura de hibridación de los cebadores se calculó mediante el programa informático "Oligo" versión 4. Los protocolos de amplificación utilizados fueron variados. Por lo general se utilizaron entre 25 y 40 ciclos de amplificación compuestos por 30 s de desnaturalización a 95°C; 30 s de hibridación a la temperatura calculada para los cebadores y 30 s de extensión a 72°C. Fueron precedidos por un paso de desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, y seguidos de una elongación final de 7 min a 72°C. El volumen de reacción más usado fue de 100 μ l.

El DNA codificante para la población inicial obtenido mediante extensión fue sometido a un proceso de amplificación en siete ciclos con el fin de incrementar la proporción de representantes para cada variante. La reacción de PCR se realizó según se ha

descrito escalada a un volumen final de 1 ml. El DNA resultante fue purificado tal y como se detalla en el apartado M.2.8.1.

M.2.5.4.- Transcripción in vitro

Las moléculas de RNA fueron sintetizadas mediante transcripción *in vitro* con el enzima T7 RNA polimerasa.

Como DNAs molde se utilizaron plásmidos previamente linearizados con enzimas de restricción adecuadas o fragmentos de DNA de doble cadena producto de reacciones de amplificación por PCR. En ambos casos los DNAs fueron purificados bien por gel de agarosa o bien por extracción fenólica y precipitación con etanol (M.2.8.1).

Las reacciones catalizadas por la T7 RNA polimerasa se llevaron a cabo en un volumen total de 50 μ l en presencia de 2 μ g de DNA molde, Tris-ClH 40 mM pH 7.9, MgCl₂ 6 mM, espermidina 2 mM, NaCl 10 mM, DTT 20 mM, 0.01% de Triton X100, NTPs 1 mM cada uno, 0.5 U/ μ l de inhibidor de RNasa y 0.5 U/ μ l de T7 RNA polimerasa. La reacción fue incubada durante 2 horas a 37°C tras las cuales el DNA molde fue eliminado mediante digestión con RQ1 DNasa (M.2.13.1.2).

Para la síntesis de RNA marcado internamente las concentraciones de nucleótidos fueron modificadas tal y como se describe en el apartado M.2.16.1.2.

Tras la síntesis todos los RNAs se purificaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, a una concentración de poliacrilamida variable en función del tamaño de las moléculas a purificar, tal y como se describe en el apartado M.2.8.3.

En el caso de la síntesis del RNA de la población inicial se realizó la reacción de transcripción según se detalla, en un volumen de 500 μ l. Las moléculas de RNA fueron purificadas según se ha descrito para DNA en el apartado M.2.5.2.

M.2.5.5.- RT-PCR

La RT-PCR combina las reacciones de retrotranscripción y PCR para lograr la amplificación de una secuencia de RNA específica a partir de un RNA molde. Las dos reacciones se llevaron a cabo con la enzima *Tth* DNA polimerasa (Promega, Madison, USA). Se trata de una enzima termoestable capaz de replicar moléculas de DNA a una temperatura de 72°C. Su principal característica es que cataliza la polimerización de dNTPs en dirección 5'→3' usando como molde DNA en presencia de Mg²⁺, mientras que en presencia de Mn²⁺ exhibe preferencia por utilizar RNA como molde. Esto permite el uso de una única enzima en los dos pasos de reacción. Durante las dos etapas se siguieron las instrucciones del fabricante.

Brevemente, para la síntesis de la primera cadena de DNA complementaria se empleó un cebador específico de la secuencia situada en el extremo 3' de la molécula de RNA. La hibridación se llevó a cabo por desnaturalización conjunta a 72°C durante 2 min y posterior enfriamiento hasta alcanzar la temperatura de hibridación del cebador, la cual se mantuvo durante 90 s. A continuación se procedió a la extensión de la hebra de cDNA a 72°C durante 20 min. El tampón empleado en esta primera reacción se compone de Tris-HCl 1 mM, pH = 8.3, KCl 9 mM y MnCl₂ 1 mM (1X). Se utilizaron 0.25 U/μl de *Tth* y 0.2 mM de cada dNTP. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las reacciones se mantuvieron en hielo hasta su utilización en el segundo paso.

Para la síntesis de la segunda hebra y amplificación simultánea del DNA por PCR se añadió un segundo cebador, específico de la región 3' del cDNA, junto con el cebador usado en la etapa de retrotranscripción. Para retirar específicamente los iones Mn²⁺ del medio se añadió un tampón quelante 1X (Tris-HCl 1 mM, pH = 8.3, 10 mM KCl, EGTA 75 μM, Tween®20 0.005% y glicerol 0.5%) y se suplementó con MgCl₂ 2 mM. Se siguió el mismo protocolo que se detalla en el apartado M.2.5.3. Las moléculas de DNA fueron purificadas (M.2.8.1) y resuspendidas en el tampón correspondiente.

M.2.6.- Aislamiento de DNA plasmídico de *E.coli*

M.2.6.1.- Pequeña escala

Para el aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala se utilizaron diferentes protocolos. El método de extracción rápida se empleó básicamente para el análisis de clones recombinantes. El DNA destinado a reacciones de secuenciación automática fue extraído mediante el *kit* comercial “*High Pure Plasmid Isolation*” de Roche (Mannheim, Alemania), el cual proporciona un mayor grado de pureza.

M.2.6.1.1. - Método de extracción rápida (Song *et al.*, 1999)

Este protocolo permite el aislamiento de DNA plasmídico a partir de un cultivo bacteriano en un tiempo aproximado de 10-15 min. El DNA obtenido, aunque contaminado con genómico de la bacteria, es perfectamente apto para su digestión con enzimas de restricción, por lo que este método resulta extremadamente útil para el rastreo de clones recombinantes.

Las células contenidas en 1.5 ml de cultivo son recogidas por centrifugación a 13000 rpm durante 2 min. El sedimento es directamente resuspendido en 200 µl de una mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y agitado enérgicamente al menos durante 10 s. Las fases orgánica y acuosa se separan por centrifugación a 13000 rpm durante unos minutos. La fase acuosa se recoge y se precipita con 400 µl de etanol. Para ello, ambos componentes se mezclan bien por agitación durante 10 s y las muestras son directamente centrifugadas a 13000 rpm durante 5 min. El precipitado se resuspende en 20 µl de agua estéril con 0.2 µg/µl de RNasa A.

M.2.6.1.2.- Método kit “High Pure Plasmid Isolation” (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania)

Para la obtención de DNA plasmídico con un alto grado de pureza se utilizó un *kit* comercial de la casa Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania) y se siguieron las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las células son lisadas con una solución de SDS al 1% y NaOH 0.2 mM. Posteriormente, el DNA plasmídico es retenido en una

resina, lavado y eluído en agua. El rendimiento varía según la cepa bacteriana, siendo para DH5 α aproximadamente de 10 μ g de DNA por 1.5 ml de cultivo.

M.2.6.2.- Gran escala

Para el aislamiento de DNA plasmídico a escala preparativa se empleó el *kit* comercial “Wizard® Plus Maxipreps System” (Promega, Madison, USA). Al igual que en el caso anterior, la extracción se basa en la lisis alcalina de las células y la retención del DNA plasmídico en una resina, de la que será finalmente eluído en una solución de baja fuerza iónica. El protocolo seguido es básicamente el mismo descrito en el apartado anterior, aunque existen pasos adicionales de purificación del DNA mediante precipitaciones con isopropanol y etanol absoluto. Se parte de 400 ml de cultivo bacteriano crecido hasta saturación durante toda la noche en agitación a 37°C. El rendimiento medio en cantidad de DNA para plásmidos de alto número de copias es de 2-4 μ g por ml de cultivo. El DNA obtenido mediante este protocolo fue principalmente utilizado en la preparación de marcadores de masa molecular para DNA, como vectores plasmídicos en procesos de clonación y como DNAs molde en reacciones de transcripción *in vitro*.

M.2.7.- Electroforesis

M.2.7.1.- De ácidos nucleicos

M.2.7.1.1.- En geles de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon al 0.8-2% (p/v) en tampón TAE 1X con 100 μ g/ml de bromuro de etidio (BrEt). Como tampón de carga se utilizó la solución no desnaturizante de alta densidad descrita previamente en Materiales (M.1.6). La electroforesis se desarrolló en tampón TAE a 10 ó 20 V/cm. Las moléculas de DNA fueron visualizadas por trans-iluminación con luz ultravioleta a 312 nm.

M.2.7.1.2.- En geles desnaturalizantes de poliacrilamida

Se utilizó una solución de poliacrilamida al 40% compuesta por acrilamida:bisacrilamida en una proporción 19:1. Los geles se prepararon al 4-20% de acrilamida (p/v), y 7 M de urea en TBE 1X. Como catalizadores de la reacción de polimerización se utilizaron APS (0.0625 % p/v) y TEMED (0.0625 % v/v). Los geles se sometieron a una pre-electroforesis de aproximadamente 30 min con una intensidad de corriente continua de 36 mA. Las muestras se prepararon en tampón de carga desnaturalizante de formamida 1X (M.1.6), se desnaturalizaron por incubación a 95°C durante 2 min y se conservaron en hielo hasta el momento de ser cargadas en el gel. La electroforesis se realizó a la misma intensidad de corriente que el paso previo y durante un tiempo variable dependiendo del tamaño de las moléculas bajo estudio y de la capacidad resolutive del gel. Para la purificación de oligonucleótidos y moléculas de RNA, se utilizaron geles preparativos de 1.5 mm de grosor, por el contrario los geles de naturaleza analítica se prepararon con un grosor de 0.8 mm o de 0.4 mm. Los geles analíticos con una concentración máxima de acrilamida del 6% fueron secados por vacío a una temperatura de 80°C. Para ello previamente fueron tratados con una solución al 10% en metanol y 10% en ácido acético para eliminar la mayor parte de la urea y fijar los ácidos nucleicos al gel, y por último transferidos a papel Whatman para proceder a su secado. Una vez secos, pueden conservarse indefinidamente.

M.2.7.1.3.- En geles nativos de poliacrilamida

Los geles nativos de poliacrilamida se utilizaron para la electroforesis en condiciones no desnaturalizantes. Se empleó la misma solución de acrilamida:bisacrilamida que para las condiciones desnaturalizantes, y como tampón de electroforesis Tris-Acético a una concentración de 50 mM y acetato de magnesio a 10 mM (M.1.6). No se añadió urea. El porcentaje de acrialmida utilizado fue del 4-6% (p/v). Como catalizadores de la reacción de polimerización se utilizaron APS y TEMED, tal y como ya ha sido descrito. La electroforesis se desarrolló a 4°C. Previamente se realizó una pre-electroforesis de aproximadamente 20 minutos con una intensidad de corriente continua de 10 mA. Las muestras se prepararon por adición de un volumen de tampón de carga no desnaturalizante (M.1.6), y se conservaron en hielo hasta su carga en el gel. La electroforesis se realizó a

una intensidad de corriente continua de 10 mA durante 8-10 horas. Todos los geles se prepararon con un grosor de 0.8 mm, y se secaron a vacío antes de su exposición.

M.2.7.2.- De proteínas

La electroforesis de proteínas se realizó en condiciones desnaturizantes, en geles de poliacrilamida con SDS. Las dimensiones del gel fueron de 10cm x 10 cm x 0.75 mm. Los geles se prepararon en todos los casos al 12.5% a partir de una solución de acrilamida:bisacrilamida al 30% (29.2:0.8) con tampón L (M.1.6). Como catalizadores de la reacción de polimerización se usaron APS (0.025%, p/v) y TEMED (0.004% v/v). Para una mejor resolución de las proteínas se utilizó un sistema discontinuo en el que la fracción superior del gel se encontraba menos concentrada (al 5%) y a diferente pH (tampón de electroforesis M, M.1.6). Las muestras se prepararon en tampón de carga para proteínas (M.1.6) y se desnaturizaron durante 2 min a 95°C. La electroforesis se desarrolló en una cubeta Hoefer™ SE 260 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) con tampón “*Running*” (M.1.6) a una intensidad constante de 40 mA.

M.2.8.- Purificación de ácidos nucleicos

M.2.8.1.- Extracción fenólica y precipitación

Esta técnica ha sido extensivamente utilizada para la eliminación de proteínas presentes en las mezclas de reacción y para cambio de tampón. La muestra se lleva a un volumen final de 100 µl con agua bidestilada estéril. Se añade un volumen igual de fenol equilibrado a pH 8.0. Las dos fases se mezclan por agitación y son nuevamente separadas por centrifugación a 13000 rpm durante 2 min. La fase acuosa se rescata y se pasa a otro tubo. Se añade seguidamente un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se repite el proceso descrito. La fase acuosa resultante es precipitada mediante la adición de 3 volúmenes de etanol absoluto, acetato sódico 0.3 M y opcionalmente una molécula que ayuda en la precipitación, como glicógeno (10-20 µg por precipitación). La mezcla se incubó 30 min a -80°C y se centrifuga en frío otros 30 min a 13000 rpm. Los ácidos

nucleicos precipitados se lavan con 250 μ l de etanol al 70%. Tras centrifugar nuevamente de forma breve, se decanta el sobrenadante y el precipitado se seca por centrifugación a vacío durante 4 min. El sedimento es resuspendido en un volumen apropiado de agua estéril.

M.2.8.2.- Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Las moléculas de interés son separadas del resto en base a su tamaño por electroforesis en gel de agarosa en presencia de BrEt. Una vez localizadas por transiluminación con luz ultravioleta, el fragmento de gel que contiene dichas moléculas es escindido con ayuda de una cuchilla. El DNA puede ser eluído de la agarosa mediante diferentes procedimientos.

M.2.8.2.1.- Método de congelación con fenol

La pieza de agarosa se tritura y se mezcla con un volumen igual de fenol. La muestra se congela a -80°C durante 10 min e inmediatamente, y sin dejar que se descongele, se centrifuga a temperatura ambiente y 13000 rpm durante 15 min. La fase acuosa resultante se recupera y se extrae una vez con fenol saturado en Tris Base, otra con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una última vez solamente con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El volumen recuperado se precipita con etanol absoluto y el DNA es finalmente resuspendido en agua.

M.2.8.2.2.- Método Wizard SV Gel Clean Up® (Promega, Madison, USA)

Con este método el DNA se recupera mediante la unión a una resina, posterior lavado de la misma y elución en agua. El fragmento de agarosa se sumerge en un volumen adecuado de una solución de unión a la resina, y se incuba a 65°C hasta que la agarosa se disuelve completamente. La solución se pasa por la resina, a la cual se unen los ácidos nucleicos. Posteriormente la resina se lava para eliminar las impurezas unidas junto al DNA. Finalmente, el DNA se eluye con agua estéril libre de RNasas y DNasas.

El porcentaje de recuperación del DNA con este método depende en gran medida de la longitud del mismo, asegurándose una recuperación óptima con fragmentos de DNA por encima de 100 pb. Se siguieron las instrucciones del fabricante.

M.2.8.3.- Purificación de ácidos nucleicos a partir de geles de poliacrilamida

Tras la electroforesis, las moléculas de interés son localizadas por “*UV shadowing*”. El gel se coloca sobre una placa de silica-gel 60 F254. Al ser irradiado con epiluminiscencia UV a 254 nm, el fluorocromo de la placa se excita emitiendo energía en forma de fluorescencia. La región del gel en la que se encuentran las moléculas de ácido nucleico absorbe parcialmente la luz ultravioleta, por lo que la fluorescencia emitida por la placa en esa zona es menor y aparece sombreada.

En el caso de purificación de ácidos nucleicos marcados radioactivamente, éstos se localizan en el gel mediante exposición en película autorradiográfica durante unos minutos, y posterior revelado de la misma. El fragmento de gel conteniendo los ácidos nucleicos de tamaño adecuado se escinde y trocea con una cuchilla estéril. A continuación se añaden entre 200 y 350 μ l de tampón de elución (M.1.6) y se incuba durante toda la noche a 37°C, si se trata de DNA, o a 4°C si es RNA. El ácido nucleico es finalmente recuperado a partir del tampón de elución mediante extracción fenólica y precipitación con etanol (M.2.8.1).

La mayoría de los oligonucleótidos sintéticos, así como las moléculas de RNA, fueron purificados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes de forma previa a su utilización.

M.2.8.4.- Cromatografía por exclusión de tamaños

Esta técnica fue utilizada generalmente para la eliminación de nucleótidos libres. Se prepararon columnas de Sephadex-G25, con un lecho aproximado de 0.9 ml empaquetado por centrifugación a 2000 rpm durante 4 min. La columna fue equilibrada con 0.1 ml del disolvente de la muestra, la cual fue llevada a un volumen final de 0.1 ml y finalmente filtrada por centrifugación en idénticas condiciones.

M.2.9.- Inmovilización de ácidos nucleicos a un soporte sólido

Para inmovilizar las moléculas de RNA sustrato durante el método de selección *in vitro* se utilizaron dos aproximaciones diferentes: unión directa del RNA internamente biotinilado o inmovilización por hibridación con un ODN biotinilado en uno de sus extremos. En ambos casos se utilizaron como soportes sólidos columnas de sefarosa-estreptavidina (HiTrapTM Streptavidin HP, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). La estreptavidina, purificada del hongo *Streptomyces avidinii*, es incorporada a una resina de sefarosa, actuando como ligando de alta afinidad para biotina y/o moléculas biotiniladas. Esta unión es muy fuerte y estable, y únicamente puede interrumpirse mediante la aplicación de condiciones extremas de acidez (pH = 1.5).

M.2.9.1.- Inmovilización de RNA marcado internamente con biotina a una columna de sefarosa-estreptavidina

Primeramente la columna fue equilibrada con un tampón que permite el establecimiento de uniones estreptavidina-biotina. Para ello se procedió según las instrucciones del fabricante. Se aplicaron 10 volúmenes de dicho tampón a un flujo de 1 ml/min. El RNA biotinilado internamente fue desnaturalizado durante 7 min a 65°C y posteriormente renaturalizado a 37°C durante 10 min. A continuación se incorporaron a la columna 300 pmol de dicho RNA a un flujo de 0.1-0.5 ml/min. Las moléculas no unidas se eliminaron mediante la adición de 10 volúmenes de tampón TMN (M.1.6) a un flujo de 1 ml/min. Estos pasos de lavado permitían el equilibrado de la columna con el tampón necesario.

M.2.9.2.- Inmovilización de RNA a una columna de sefarosa-estreptavidina mediante hibridación con un ODN biotinilado

La columna fue equilibrada con tampón de unión estreptavidina-biotina, según se ha descrito. Un ODN biotinilado en su extremo 5' y complementario a la región 3' del RNA a

inmovilizar fue desnaturalizado y renaturalizado durante 2 min a 95°C y seguidamente 15 min en hielo. Se incorporó una cantidad de 5 pmol de ODN, a un flujo de 0.1-0.5 ml/min; las moléculas no unidas se eluyeron mediante la adición de 10 volúmenes de tampón de unión estreptavidina-biotina, a un flujo de 1 ml/min. A continuación, 300 pmol de RNA se desnaturalizaron durante 7 min a 65°C y se renaturalizaron por incubación a 37°C 10 min. Finalmente el RNA fue incorporado a la columna a un flujo de 0.1-0.5 ml/min. Las moléculas que no habían apareado con el ODN complementario fueron eluidas mediante la adición de 10 volúmenes de tampón de corte (M.1.6) a un flujo de 1 ml/min, lo cual permitía además el equilibrado de la columna para el paso siguiente.

M.2.10.- Concentración de ácidos nucleicos

Para disminuir el volumen en soluciones de ácidos nucleicos se utilizó el sistema Microcon® (Millipore, Bedford, USA). La concentración se produce por el paso de la solución mediante centrifugación a través de una membrana de celulosa de tamaño de poro variable, en función de las dimensiones de la molécula a concentrar. En nuestro caso se optó por la variedad YM-10. Se siguieron las instrucciones dadas por el fabricante para conseguir reducir el volumen inicial de 4 ml a 100 µl.

M.2.11.- Cuantificación de ácidos nucleicos

M.2.11.1.- Mediante espectrofotometría

La concentración de los ácidos nucleicos en solución puede ser determinada espectrofotométricamente debido a la capacidad cromófora que presentan los anillos aromáticos de las bases púricas y pirimidínicas a 260 nm. Como coeficientes de extinción se tomaron $50 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ para DNA, $40 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ para RNA y $37 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ para oligonucleótidos de cadena sencilla. La concentración se calculó por determinación de la D.O. a 260 nm de la muestra problema.

La medida a 280 nm permite determinar la contaminación de la muestra con proteínas. La relación $D.O_{.260}/D.O_{.280}$ debe estar comprendida entre 1.8-2.0 para considerar la muestra pura.

M.2.11.2.- Cuantificación de RNA marcado radiactivamente en solución

El cálculo de la concentración de RNA en solución marcado internamente con [α - ^{32}P] UTP se hizo a partir de la medida de las dpm (desintegraciones por minuto) de la muestra una vez purificada por gel. En primer lugar es necesario determinar la actividad específica de la molécula en función de: i) la cantidad de isótopo utilizado durante su síntesis, ii) la cantidad del correspondiente nucleótido frío, iii) y el número de posibles incorporaciones del nucleótido marcado en la molécula (número de uridinas en la secuencia). La actividad específica ($\mu\text{Ci/molécula}$), en combinación con el valor de dpm final de la muestra, permite el cálculo del número de moléculas según la relación $1\mu\text{Ci} = 2.2 \times 10^6$ dpm. Las medidas de radiación β se realizaron generalmente sobre 10 μl de la muestra en el contador de radioisótopos “Quick Count” (Bioscan, Washington, USA).

M.2.11.3.- Cuantificación de RNA radiactivo inmovilizado en geles de poliacrilamida

Para la cuantificación del RNA radioactivo inmovilizado en soporte sólido se utilizó el escáner Storm 820, de Molecular Dynamics (Uppsala, Suecia). Este instrumento es un escáner de fluorescencia. El soporte sólido con la muestra radioactiva se expone en una pantalla que contiene un elemento susceptible de ser excitado, Europio. El láser del escáner pasa el Europio a un estado energético inferior, permitiéndose la liberación de energía en forma de fluorescencia que puede ser cuantificada con el programa ImageQuant©.

M.2.12.- Secuenciación automática de DNA

Las reacciones fueron realizadas por el servicio de secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”. Las muestras fueron preparadas y entregadas a dicho servicio con 1 µg del DNA problema y 6.4 pmol del cebador adecuado en un volumen de 12 µl. El DNA se secuenció mediante un sistema basado en el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), por mediación de una reacción de PCR utilizando el “*Big dye kit*” de Applied Biosystems (Wellesley, USA). Este *kit* emplea terminadores de cadena marcados con fluorescencia y la AmplyTaq FS DNA polimerasa. Las reacciones fueron sometidas a electroforesis capilar y analizadas (3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Wellesley, USA).

M.2.13.- Digestión de ácidos nucleicos

M.2.13.1.- DNA

M.2.13.1.1.- Enzimas de restricción

La digestión de DNA con enzimas de restricción se llevó a cabo según las condiciones de reacción especificadas por el fabricante (tampón de reacción y temperatura). Por lo general se utilizaron entre 2-5 unidades de enzima por cada µg de DNA y el tiempo de incubación fue muy variable (de 1 h a toda la noche). Las digestiones dobles se realizaron simultáneamente cuando las condiciones de reacción de ambas enzimas lo permitieron. En todo caso se realizaron digestiones control independientes para comprobar la eficiencia de la reacción de cada enzima por separado. En el caso de tampones compatibles pero diferentes se realizó primero la digestión con la enzima correspondiente al tampón con menor contenido en sal. Tras comprobar una digestión total se añadió NaCl a la reacción hasta alcanzar la concentración requerida por la otra enzima y se realizó la segunda digestión. Las digestiones dobles con tampones de reacción incompatibles se realizaron de forma secuencial. Tras la primera digestión el DNA fue purificado mediante extracción fenólica y precipitación con etanol (M.2.8.1).

La digestión de DNA mediante enzimas de restricción fue visualizada mediante electroforesis de una alícuota de reacción en geles de agarosa teñidos con EtBr.

M.2.13.1.2.- RQ1 DNasa

La RQ1 DNasa (Promega, Madison, USA) es una DNA endonucleasa libre de ribonucleasas, por lo que fue utilizada para la degradación del DNA molde empleado en las reacciones de transcripción *in vitro*. Una vez finalizada la síntesis de RNA, se añadieron a la mezcla 0.5 U de enzima por cada μg de DNA presente y la reacción se incubó durante 15 min a 37°C.

M.2.13.2.- RNA

M.2.13.2.1.- RNasa A

La digestión con RNasa A se destinó a:

- *Eliminación de RNA de las preparaciones de DNA plasmídico:*

Las muestras se trataron con 0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de enzima durante 10 min a temperatura ambiente o bien fueron directamente resuspendidas en agua estéril con 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de RNasa A.

- *Degradación parcial para la determinación de la estructura secundaria de moléculas de RNA:*

El RNA problema se sintetizó mediante transcripción *in vitro* (M.2.5.4); a continuación fue purificado por electroforesis en geles de poliacrilamida, eluido, fenolizado y precipitado con etanol. Se desfosforiló siguiendo el protocolo indicado en el apartado M.2.15.2 y se marcó en su extremo 5' con ^{32}P (M.2.16.1.1). Se purificó nuevamente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y se eluyó. Finalmente fue fenolizado, precipitado con etanol absoluto y resuspendido en agua estéril (M.2.8.1). La digestión se llevó a cabo en unas condiciones que permitían un corte por molécula de RNA. Para ello se emplearon 0.05 pmol de RNA marcado radiactivamente (con una actividad específica aproximada de 500 CPMs), que fueron incubados en tampón TMN con 0.05 ng de enzima durante 2 min a 37°C y 2 μg de tRNA, para evitar la degradación masiva. La reacción se detuvo por adición de tampón de carga desnaturizante con

formamida (M.1.6) suplementado con EDTA 100 mM. Los productos de degradación se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes de alta resolución al 6%, con unas dimensiones de 0.4 x 450 x 350 mm. La potencia se mantuvo constante a 30 W durante un tiempo que osciló entre 90 min y 5 h. Los geles se secaron a vacío y se visualizaron en un escáner de fluorescencia (Storm 820, Molecular Dynamics, Uppsala, Suecia).

M.2.13.2.2.- RNasa T1

La digestión con RNasa T1 se realizó para la determinación de la accesibilidad de distintas regiones en moléculas de RNA así como para la generación de marcadores de peso molecular de RNA.

Para la digestión se utilizó la misma cantidad de RNA descrita en M.2.13.2.1. en tampón TMN. Las muestras se trataron con 0.1 U de T1 durante 5 min a 37°C. Para evitar una reacción descontrolada se incorporaron 2 µg de tRNA. Las reacciones se pararon por adición de tampón de carga desnaturizante con formamida (M.1.6) suplementado con EDTA 100 mM. Los productos resultantes de la degradación se separaron mediante electroforesis de igual manera a la descrita en el apartado anterior.

Como marcador de peso molecular se llevaron a cabo reacciones de degradación parcial con RNasa T1 en condiciones desnaturizantes sobre moléculas de RNA de longitud y secuencia conocida, marcadas radiactivamente en su extremo 5' con ³²P (M.2.16.1.1). Esto permite el procesamiento en todos los nucleótidos de guanina, independientemente de su conformación. Para ello se incubaron 0.05 pmol del RNA a degradar en presencia del tampón de corte desnaturizante (M.1.6) y 0.1 U de T1 RNasa durante 5 min a 55°C. Los productos de degradación se resolvieron en geles de poliacrilamida de alta resolución, según se detalla en el apartado M.2.7.1.2.

M.2.13.2.3.- Degradación con RNasa H

La RNasa H degrada específicamente los heterodúplex DNA/RNA.

Los ensayos de accesibilidad se realizaron con ODN de ocho residuos complementarios a las regiones en estudio y posterior degradación con RNasa H. El RNA sustrato 5'HCV-356 se sintetizó mediante transcripción *in vitro*, fue purificado por

electroforesis en gel de poliacrilamida al 4% (p/v), eluido del gel, fenolizado, precipitado con etanol absoluto y resuspendido en agua estéril. Seguidamente se desfosforiló según se describe en el apartado M.2.15.2 y se marcó en su extremo 5' con ^{32}P (M.2.16.1.1). Finalmente fue purificado de nuevo por electroforesis, eluido, fenolizado y precipitado. Se resuspendió en agua estéril. Para la reacción de degradación se emplearon 0.05 pmol de RNA (con una actividad específica aproximada de 500 CPM), que fue desnaturalizado y renaturalizado durante 7 min a 65°C y 10 min a 37°C. A continuación se añadieron 5 pmol de ODN y se suplementó con tampón de corte para RNasa H 1X (Tris-HCl 40 mM pH 8.0, MgCl₂ 4 mM, DTT 1 mM y BSA 0.03µg/µl). La reacción de degradación se inició por adición de 0.5 U/µl de RNasa H y se incubó durante 20 min a 30°C. El procesamiento se detuvo mediante la adición de tampón de carga con formamida (M.1.6) y conservación en hielo. Los productos de reacción se resolvieron y visualizaron según se describe en el apartado M.2.7.1.2.

M.2.13.2.4.- Degradación con plomo del RNA

La degradación con plomo ofrece un patrón de accesibilidad de la molécula de RNA, permitiendo discernir su estructura secundaria.

Las reacciones se realizaron sobre muestras de RNA marcadas radiactivamente en el extremo 5'. Se utilizaron 0.05 pmol de RNA, con una actividad específica aproximada de 500 CPMs, en presencia de 2 µg de tRNA, y tampón TMN. Se trató con una solución de acetato de Pb²⁺, 1 mM, durante 5 min a 37°C. Las reacciones se pararon por adición del tampón de carga desnaturizante con formamida y suplementado con 100 mM de EDTA. Los productos de degradación se resolvieron en las condiciones de electroforesis de alta resolución ya descritas.

M.2.13.2.5.- Hidrólisis alcalina del RNA

La hidrólisis alcalina del RNA se realizó con una solución de carbonato-bicarbonato sódico 0.1 M pH 9.5. Se trataron 0.05 pmol de RNA marcado radiactivamente en su extremo 5' con 0.5 µl de esta solución y 1 µg de tRNA. La mezcla de reacción se incubó durante 90 s a 95°C, y la reacción se paró por adición del tampón de carga desnaturizante

suplementado con 100 mM de EDTA. Nuevamente, los productos de la degradación se resolvieron en las condiciones de electroforesis de alta resolución indicadas.

M.2.14.- Ligación de DNA

La DNA ligasa derivada del fago T4 cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre los extremos 5' fosfato y 3' OH de moléculas de DNA de doble cadena. Las dos moléculas objeto de ligación fueron digeridas con las mismas enzimas de restricción y purificadas por electroforesis en gel de agarosa de forma previa a su utilización en la reacción de ligación. Ésta se llevó a cabo en presencia de PEG 2.5 %, 0.1 U/ μ l de T4 DNA ligasa y tampón de reacción 1X (40 mM Tris-ClH pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT y 5 mM ATP). Se ha descrito que la reacción de ligación es más eficiente en presencia de ATP, por lo cual se suplementó con 1 mM de ATP, evitándose de este modo posibles alteraciones en la composición del tampón de reacción por congelación-descongelación del mismo. La reacción se incubó durante toda la noche a 15°C. Para la construcción de plásmidos recombinantes por inclusión de un fragmento de DNA, el vector y el inserto se utilizaron como norma general a una relación de concentraciones 1:3 (vector:inserto).

Para la ligación en el vector pGEM®-T Easy, el DNA procedente de una reacción de PCR fue purificado en gel de agarosa (M.2.8.2). La reacción de ligación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 0.3 U/ μ l de T4 DNA ligasa y 50 ng de DNA vector. Se utilizó un exceso de DNA inserto de 3 veces. El tampón de reacción estaba compuesto por Tris-HCl 30 mM, pH = 7.8, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM y PEG al 5%. La reacción se incubó durante toda la noche a 4°C.

M.2.15.- Desfosforilación de ácidos nucleicos

M.2.15.1.- Desfosforilación de DNA

La eliminación del grupo fosfato del extremo 5' del DNA se ha llevado a cabo sobre plásmidos digeridos que iban a ser utilizados como vectores de clonación para evitar su religación y favorecer la integración del inserto. Para ello se incubó el DNA (5-10 µg) en presencia de 1 U de la fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Promega, Madison, USA) y del tampón 1X distribuido por la casa comercial durante 1 hora a 37°C. La enzima fue posteriormente inactivada por incubación a 70°C durante 10 min y eliminada mediante extracción fenólica y precipitación de la muestra.

M.2.15.2.- Desfosforilación de RNA

La defosforilación se ha realizado sobre RNAs obtenidos por transcripción *in vitro* que iban a ser marcados radioactivamente en su extremo 5', por lo que resultaba imprescindible la eliminación de los grupos fosfato existentes. Se añadían 3 unidades de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Promega, Madison, USA) para 100 pmoles de RNA, y se incubaba, en el tampón comercial, durante 1 hora a 37°C. La reacción se realizó sobre el RNA purificado mediante electroforesis en gel de acrilamida tras la síntesis *in vitro*.

M.2.16.- Técnicas de marcaje de ácidos nucleicos

M.2.16.1.- Marcaje radiactivo de RNA

M.2.16.1.1.- Marcaje radiactivo en el extremo 5'

El marcaje radiactivo de moléculas de RNA en su extremo 5' se llevó a cabo mediante fosforilación con la T4 polinucleótido quinasa. Esta enzima cataliza la transferencia del grupo fosfato situado en posición γ del ATP a extremos 5'OH de DNA y RNA de cadena sencilla o doble. En este caso se empleó como donador de grupos fosfato

el nucleótido marcado radiactivamente [γ - ^{32}P] ATP, con una actividad específica de 5000 Ci/mmol. Se utilizaron 7 μl de isótopo (70 μCi totales) por reacción para un volumen final de 10 μl , y aproximadamente 15 pmoles de RNA previamente defosforilado para el marcaje. La eliminación del nucleótido no incorporado tras la reacción se realizó mediante electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida y purificación del RNA marcado de tamaño adecuado. Seguidamente se eluyó, fenolizó y precipitó con etanol absoluto. Fue resuspendido en agua estéril.

M.2.16.1.2.- Marcaje radiactivo interno

Durante la reacción de transcripción *in vitro* (M.2.9.4) se disminuyó la concentración de UTP de 1 a 0.4 mM. En su lugar las reacciones fueron suplementadas con 20 μCi de [α - ^{32}P] UTP.

M.2.16.2.- Marcaje interno con biotina de RNA

La reacción de transcripción *in vitro*, realizada según se describe en el apartado M.2.5.4, se suplementó con una cantidad variable de 16-bio-UTP, en función del número de posiciones disponibles en la molécula y del número de sitios biotinilados que se deseen. En el protocolo descrito por Theissen *et al.* (Theissen *et al.*, 1989) es posible conseguir una molécula de RNA biotinilada en una sola posición siguiendo los siguientes cálculos:

$$\text{Bio}_{\text{av}} = n \cdot [(d/r) - d + 1]^{-1}$$

donde n es el número de posiciones disponibles para el nucleótido biotinilado (en este caso, número de posiciones con nucleótidos de uridina), d es el grado de discriminación de la enzima T7 RNA polimerasa (estimado entre 3 y 4) y r

$$r = \text{BioUTP}/(\text{BioUTP} + \text{UTP})$$

donde BioUTP y UTP hacen referencia a la concentración de UTP biotinilado y UTP en la reacción, respectivamente.

De esta manera se puede calcular la concentración de 16-bio-UTP que es necesario aportar a una reacción de transcripción *in vitro* para conseguir moléculas de RNA biotiniladas en una sola posición.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el RNA se purificó por extracción fenólica y cromatografía de exclusión por tamaño. Finalmente se concentró mediante precipitación con etanol. Se resuspendió en agua estéril.

M.2.17.- Reacciones de asociación

Se llevó a cabo una reacción de asociación durante el primer paso del proceso de selección molecular *in vitro*. Para ello el RNA 5'HCV-356 fue inmovilizado a una columna de sefarosa-estreptavidina (M.2.9.1), que posteriormente se equilibró con 10 volúmenes de tampón TMN. Se adicionaron 4 nmol de la población inicial de variantes resuspendida en el mismo tampón, y se incubó en presencia del RNA sustrato durante 30 min a temperatura ambiente en las tres primeras rondas. Para incrementar la presión selectiva, durante los ciclos 4-6 se aumentó la temperatura a 37°C. Las moléculas no unidas se descartaron mediante sucesivos pasos de lavado a temperatura ambiente con tampón TMN. Las variantes unidas al sustrato fueron rescatadas por la adición de 10 volúmenes de TMN a 90°C. Finalmente se concentraron con Centricon YM-10 (Millipore, Bedford, USA; M.2.10), se precipitaron con etanol absoluto y se secaron por centrifugación a vacío.

Para la caracterización cinética de la capacidad de asociación de las distintas ribozimas y aptámeros se utilizó el sustrato 5'HCV-691gg, el cual no puede ser procesado por las ribozimas. Se utilizaron ribozimas o aptámeros marcados radiactivamente en su extremo 5' con ^{32}P (M.2.16.1.1) a una concentración de 2 nM, y un exceso de RNA sustrato variable que permitía la determinación del valor de K_d . Las moléculas sufrieron un proceso previo de desnaturalización-renaturalización en tampón TMN, mediante incubación a 65°C durante 7 min y 10 min a 37°C. La reacción se inició mezclando ambas moléculas a 37°C e incubando durante 30 min. El proceso se detuvo por adición de un

volumen adecuado de tampón de carga no desnaturizante para geles de poliacrilamida. La formación del complejo se apreció como un cambio en la movilidad electroforética de las moléculas en geles de poliacrilamida nativos (M.2.7.1.3). Los geles se secaron, antes de su visualización en un escáner de fluorescencia (Storm 820, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia,) y los datos obtenidos se ajustaron a curvas exponenciales que permitían determinar las constantes de las distintas reacciones de asociación (K_d), con el programa SigmaPlot 4.0. En el cálculo de los parámetros cinéticos el error experimental se redujo por repetición de los distintos ensayos, de un modo independiente, cuatro veces.

M.2.18.- Reacciones de corte con ribozimas

Las reacciones de corte se llevaron a cabo en dos ocasiones: durante el segundo paso de selección *in vitro* y para la caracterización cinética de la actividad catalítica de distintas ribozimas.

En el segundo paso de selección, el RNA sustrato 5'HCV-691 fue hibridado a través de su extremo 3' a un ODN que se encontraba biotinilado en su extremo 5' e inmovilizado a una columna de sefarosa-estreptavidina, tal y como se ha descrito en M.2.9.2. La columna fue equilibrada con 10 volúmenes de tampón de corte (M.1.6). Las moléculas resultantes del primer paso de selección fueron resuspendidas en el mismo tampón, incorporadas a un flujo de 0.5 ml/min e incubadas en la columna en presencia del RNA sustrato, durante 1 h a 37°C en los tres primeros ciclos. La presión selectiva se incrementó durante las rondas 4-6 disminuyendo el tiempo de reacción a 30 min. Las variantes catalíticamente activas se recogieron unidas a su producto 5' de corte, mediante la adición de 10 volúmenes de tampón de corte a temperatura ambiente. A continuación fueron concentradas con Centricon YM-10 (Millipore, Bedford, USA; M.2.10), precipitadas con etanol absoluto y secadas por centrifugación a vacío. Finalmente se resuspendieron en agua estéril.

Para la caracterización cinética de la actividad catalítica se utilizó un exceso de la molécula de ribozima sobre la molécula de RNA sustrato, marcada internamente con ^{32}P (M.2.16.1.2). La magnitud de este exceso fue de 200 veces. Las ribozimas y sustrato, en el tampón de reacción adecuado (M.1.6), se desnaturizaron y renaturalizaron por separado,

tal y como se ha descrito en el apartado anterior. Las reacciones se iniciaron mezclando ambas moléculas a 37°C y el curso de la reacción se siguió tomando alícuotas a distintos tiempos. La reacción se detuvo por adición de un volumen adecuado de tampón de carga desnaturizante, y los productos de reacción se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante, tal y como ha sido descrito en el apartado M.2.7.1.2. La visualización de los productos de reacción se realizó utilizando un escáner de fluorescencia (Storm 820, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) y para su cuantificación se utilizó el programa ImageQuant© (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Los datos obtenidos se ajustaron mediante una regresión no lineal a una curva exponencial, con ayuda del programa SigmaPlot 4.0. Los parámetros cinéticos representativos de la reacción se dedujeron a partir de la ecuación de la curva. Para ello cada experimento se realizó de un modo independiente cuatro veces.

M.2.19.- Síntesis de proteínas

Los ensayos de inhibición de la traducción *in vitro* se realizaron en un sistema acoplado de transcripción-traducción derivado de lisados de reticulocito de conejo (TNT® T7 Quick Coupled Transcription-Translation System, Promega, Madison, USA). De manera previa a su utilización, los RNAs inhibidores se desnaturizaron y renaturalizaron 7' a 65°C y 15 minutos a 30°C. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 5 µl, con 4 µl de lisado, 50 ng del plásmida pCMVCatIREcLuc (cedido por la Dra. P. Fortes), 0.5 µCi de una mezcla que contiene ³⁵S-[L]-metionina y ³⁵S-[L]-cisteína y RNA inhibidor a distintas concentraciones (10 nM - 5 µM). Se incubaron durante 60 min a 30°C. Se detuvieron por enfriamiento en hielo y se conservaron a 4°C hasta su utilización. Los productos de traducción se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS al 12.5% (M.2.7.2). Los geles fueron secados a 80°C en condiciones de vacío. Los productos proteicos se visualizaron con un escáner de fluorescencia (Storm 820, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) y se cuantificaron utilizando el programa ImageQuant© (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

R.- RESULTADOS

R.1.- Ribozimas hammerhead dirigidas frente a la región IRES de HCV

El HCV es el agente etiológico de la hepatitis C, enfermedad que afecta a 170 millones de personas en todo el mundo. Aunque en algunos casos la infección transcurre de manera asintomática, con relativa frecuencia los pacientes desarrollan hepatitis crónica y carcinoma hepatocelular. Los tratamientos actuales basados en terapias combinadas de interferón con ribavirina únicamente son eficaces en un 40 % de los casos, por lo que se hace necesario el desarrollo de nuevos agentes antivirales. En este sentido las ribozimas pueden actuar como unos excelentes agentes terapéuticos. El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se ha centrado en el diseño, desarrollo y caracterización de nuevos RNAs catalíticos basados en la ribozima hammerhead capaces de inactivar la región IRES de HCV. El objetivo principal era el de potenciar su capacidad de unión al RNA diana y su especificidad en un ambiente celular. Como ya se ha comentado en apartados anteriores, estos dos aspectos son de una extraordinaria relevancia en la eficiencia intracelular de las ribozimas. Por otro lado, el alto grado de estructuración que presenta el IRES así como el gran número de factores proteicos que recluta hacen suponer que la ribozima presentará una asociación limitada al RNA sustrato.

Inicialmente se realizó una búsqueda de posibles sitios teóricos de procesamiento para la ribozima hammerhead. Debido a que los requerimientos de secuencia en el RNA sustrato son poco estrictos para la ribozima hammerhead, se encontraron múltiples dianas potenciales. Se escogió el sitio de procesamiento situado en la posición 363, que pertenece a la secuencia codificante de la proteína de la cápsida y participa en la función del IRES (Reynolds *et al.*, 1995; Reynolds *et al.*, 1996; Fletcher *et al.*, 2002). Este sitio había sido descrito previamente como diana para la ribozima hammerhead por Lieber *et al.* (Lieber *et al.*, 1996) y se había demostrado que, en el interior celular, las ribozimas incluidas en vectores adenovirales conseguían reducir parcialmente los niveles de RNA viral.

La ribozima hammerhead empleada en este estudio deriva del motivo presente en el [+]*s*TRSV y fue descrita para su utilización en un sistema de procesamiento en *trans* por Haseloff y Gerlach en 1988 (Haseloff y Gerlach, 1988). Las hélices I y III a través de las cuales se produce la interacción el sustrato fueron modificadas para dirigirlas frente a la secuencia de 13 nucleótidos en el RNA IRES que incluye el sitio de procesamiento en la posición 363. Esta ribozima se denomina HH363 y se muestra en la figura R.1.



Fig. R.1.- Ribozima hammerhead HH363. Secuencia y estructura secundaria de la ribozima hammerhead usada en este estudio. En naranja se muestran los nucleótidos del sustrato, en azul los de la ribozima y en verde las secuencias extras en la ribozima derivadas de la síntesis a partir del plásmido pBSHH363. En minúscula se señala el sitio de clonaje para *Kpn*I.

R.1.1.- Asociación de la ribozima hammerhead HH363 a la región IRES de HCV

Con el fin de determinar la capacidad de unión del motivo catalítico HH363 al IRES de HCV y comprobar su afinidad se procedió a caracterizar cinéticamente la asociación entre ambas moléculas. Para ello se optó por utilizar un RNA sustrato largo que incluye los primeros 691 nt del genoma de HCV. No obstante, y debido a que las condiciones utilizadas para este estudio mantienen una concentración de Mg^{2+} de 10 mM, a la cual el motivo catalítico tipo hammerhead se mantiene activo, se hizo necesario la introducción de dos mutaciones puntuales en el sitio de corte. Las mutaciones consistieron en las sustituciones $U_{362} \rightarrow G$ y $C_{363} \rightarrow G$. En la nueva molécula de RNA sustrato generada (5'*HCV*-691gg) la introducción de estas modificaciones impide la catálisis por parte de la

ribozima hammerhead (Kore *et al.*, 1998) y por tanto nos permitió detectar los complejos formados.

El RNA sustrato 5'HCV-691gg se obtuvo mediante transcripción *in vitro* con T7 RNA polimerasa, utilizando como DNA molde el plásmido pU5'HCV-691gg previamente digerido con el enzima de restricción *Bam*H1. El RNA resultante fue purificado mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 4% en condiciones desnaturizantes, y seguidamente sometido a un proceso de extracción fenólica y precipitación con etanol. La ribozima HH363 fue sintetizada con el enzima T7 RNA polimerasa a partir del plásmido pBSSH363 digerido con *Bam*H1. El producto de transcripción fue desfosforilado con fosfatasa alcalina y marcado posteriormente en su extremo 5' con ³²P, según se describe en Materiales y Métodos. Una vez purificado de manera análoga a la descrita para el RNA sustrato, se desnaturizó 7 min a 65°C y se renaturalizó a 37°C durante 10 min. Para llevar a cabo las reacciones de asociación se utilizó una concentración de 2 nM del RNA marcado radiactivamente y se incubó con concentraciones crecientes del sustrato 5'HCV-691gg durante 30 min a 37°C en tampón TMN. Los complejos formados se resolvieron en geles de poliacrilamida al 6% en condiciones no desnaturizantes y se procedió a su detección en un escáner de fluorescencia (Storm 820, Molecular Dynamics). Un ejemplo representativo de estos ensayos se muestra en la figura R.2A. La fracción de RNA acomplejado en función de la concentración de RNA sustrato fue representada gráficamente según la ecuación:

$$Y = (Y_o \cdot X)/(X+K_d)$$

donde Y representa el porcentaje de complejo formado, Y_o el porcentaje inicial de complejo, X la concentración del RNA que se utiliza en exceso, en este caso el sustrato, y K_d la concentración de sustrato a la cual la formación de complejo es semi-máxima. Este valor permite obtener una medida de la afinidad que presenta el RNA utilizado en defecto, en este caso HH363, por el RNA que se añade en exceso (5'HCV-691gg; Aldaz-Carroll *et al.*, 2002).

Se realizaron cuatro experimentos independientes y se calculó el valor medio de complejo formado para cada concentración de RNA sustrato (Fig. R.2B). Se observó que la

ribozima mostraba una gran afinidad en la unión por 5'HCV-691gg, con un valor de K_d de 12.912 nM.

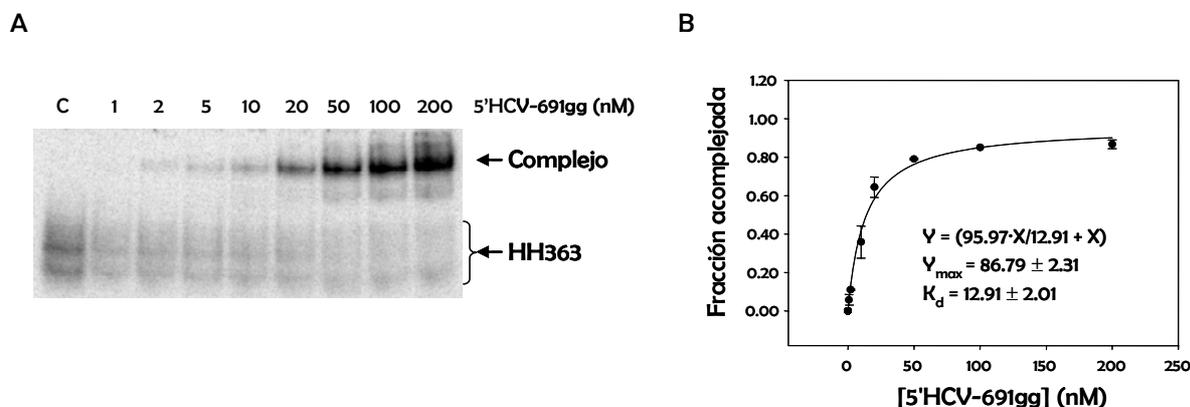


Fig. R.2.- Asociación de HH363 al sustrato 5'HCV-691gg. A) Autorradiografía de un gel de poliácridamida que muestra un ensayo típico de asociación entre HH363 marcada radiactivamente con ^{32}P y el sustrato 5'HCV-691gg. Se indica la concentración de RNA sustrato empleada en cada carril. Las flechas señalan la ribozima y el complejo formado. B) Representación gráfica de la cinética de unión para HH363 frente al sustrato 5'HCV-691gg. Cada punto es el resultado de cuatro experimentos independientes. Se muestra también la ecuación de la curva a la que se ha ajustado el ensayo cinético.

R.1.2.- Procesamiento *in vitro* del RNA sustrato por HH363

A continuación se procedió a analizar la capacidad catalítica de HH363. Para ello se llevó a cabo la caracterización cinética de la reacción de corte de HH363 sobre un sustrato que contuviera el sitio de procesamiento. Se diseñó una molécula que presenta los primeros 691 nt del genoma viral, y se denominó 5'HCV-691. Esta molécula fue clonada en el vector pUC19, tal y como se detalla en Materiales y Métodos, para generar la construcción pU5'HCV-691.

La determinación de las constantes cinéticas para los distintos RNAs inhibidores se realizó en condiciones de “no-recambio” o *single turnover*. Esta situación se establece cuando todas las moléculas de sustrato se encuentran unidas a una molécula de inhibidor, de manera que no hay posibilidad de que una molécula de ribozima procese más de una de sustrato. Esto simplifica los estudios ya que únicamente el paso catalítico resulta limitante. La constante obtenida como resultado de este tipo de ensayos, k_{obs} , refleja la reacción en su

conjunto y permite comparar las distintas moléculas en estudio. El exceso de RNA catalítico empleado se determina mediante experimentos de saturación.

Las reacciones de corte *in vitro* se realizaron a una temperatura de 37°C, y las condiciones de fuerza iónica quedaron establecidas por tampón de corte (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM). Tanto los RNAs quiméricos como el sustrato se desnaturalizaron y renaturalizaron por separado, mediante incubaciones de 7 min a 65°C y seguidamente 10 min a 37°C. Las reacciones se iniciaron mezclando ambas moléculas y se tomaron alícuotas a distintos tiempos. Para detener la catálisis se añadió un volumen de tampón de carga desnaturizante (98% v/v de formamida) y los productos de corte fueron resueltos en geles de poliacrilamida desnaturizantes al 4%. En la figura R.3A se muestra un ejemplo representativo del ensayo. El análisis se realizó en un escáner de fluorescencia (Storm 820, Molecular Dynamics) y los productos de corte se cuantificaron con el programa ImageQuant©. Los datos experimentales fueron ajustados por regresión no lineal mediante el programa SigmaPlot© a ecuaciones del tipo

$$Y = Y_0 + a \cdot (1 - e^{-bt})$$

donde Y representa la fracción de RNA sustrato procesada, a es la extensión de la reacción a tiempo infinito, t es el tiempo y b representa la constante de la reacción k_{obs} . Este parámetro queda expresado en unidades de tiempo⁻¹.

Los valores que se obtuvieron son el resultado de cuatro experimentos independientes.

La ribozima hammerhead HH363 demostró ser un excelente catalizador de la reacción de corte bajo las condiciones en las que se realizó el experimento (Fig. R.3B). Se observó que casi el 90% del sustrato era procesado a 60 min. El valor de k_{obs} para la reacción fue de 0.072 min⁻¹, es decir, antes de alcanzarse los 10 min se había procesado el 45% de las moléculas de sustrato ($t_{1/2} = \text{Ln}2/k_{obs}$).

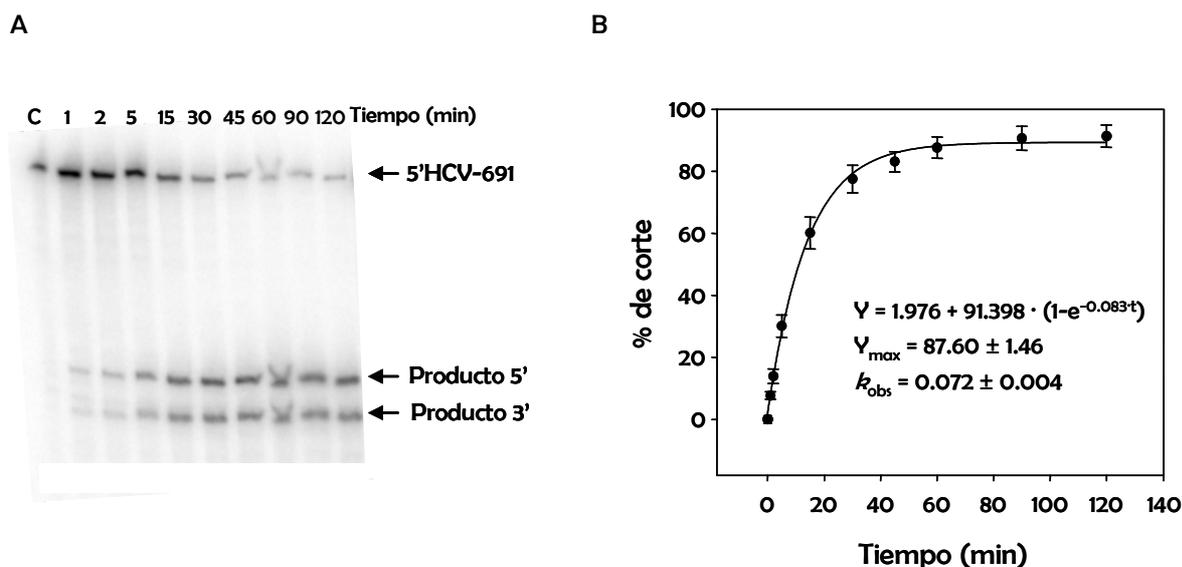


Fig. R.3.- Procesamiento del sustrato 5'HCV-691 por HH363. A) Autorradiografía de un gel de poliacrilamida que muestra un ensayo de corte del sustrato 5'HCV-691 por HH363. El RNA sustrato fue marcado internamente con ^{32}P . Se indican los tiempos a los que se tomaron las distintas alícuotas. Las flechas señalan el RNA no procesado y los productos de corte. B) Representación gráfica de la cinética de corte para HH363. Cada punto es el resultado de cuatro experimentos independientes. Se muestra la ecuación a la que se ajustaron los valores de procesamiento en función del tiempo.

R.1.3.- Inhibición de la actividad del IRES por HH363

Como primera aproximación se realizaron ensayos de inhibición en un sistema de traducción *in vitro* derivado de lisados de reticulocito de conejo. Este sistema es un modelo sencillo en el que llevar a cabo la traducción de moléculas de mRNA de una manera eficiente y rápida. Se obtiene a partir de un lisado de reticulocito de conejo tratado con nucleasa, la cual posteriormente es inactivada (Pelham y Jackson, 1976). De esta forma, el sistema carece de cualquier tipo de material genético. Esta técnica ha permitido caracterizar productos proteicos codificados en una molécula de mRNA, y también ha sido ampliamente utilizada en ensayos de determinación de la actividad traduccional de secuencias de RNA (Paulous *et al.*, 2003; Ronfort *et al.*, 2004; Van Eden *et al.*, 2004), entre otros. En el caso del HCV ha sido empleada para identificar los requerimientos mínimos que permiten la función de la región IRES (revisado en (Hellen y Pestova, 1999; Rijnbrand y Lemon, 2000)) así como en ensayos preliminares de la actividad anti-IRES de

diversos inhibidores (Alt *et al.*, 1995; Das *et al.*, 1998; Kikuchi *et al.*, 2003; Tallet-Lopez *et al.*, 2003; Kikuchi *et al.*, 2005). Uno de los principales problemas que presenta el uso de este tipo de sistemas es su alta sensibilidad a la concentración iónica (Jackson, 1991) que influencia en muchos casos el resultado obtenido. No obstante, sigue siendo la aproximación elegida en estudios preliminares de inhibidores de la actividad del IRES.

En nuestro caso se optó por el empleo de sistemas acoplados de transcripción-traducción, en los que la síntesis del RNA molde que va a dar lugar a los productos proteicos ocurre de manera acoplada en el tiempo y el espacio a la reacción de traducción. Se utilizó un DNA molde (pCMVCatIREcLuc) cedido por la Dra. P. Fortes, que codifica para una construcción dicistrónica (Fig. R.4A): la primera unidad del transcrito es traducida para generar la proteína cloranfenicol acetil transferasa (CAT), mientras que el segundo cistrón, el cual codifica para la proteína FLuc, se traduce de una manera dependiente de IRES (Fig. R.4B). El empleo de dos marcadores sintetizados a partir de una misma molécula de mRNA permite comparar los efectos ejercidos por los inhibidores sobre el IRES con respecto al cistrón que presenta una traducción independiente.

La ribozima HH363 fue sintetizada enzimáticamente mediante transcripción *in vitro* a partir del plásmido pBSSH363 digerido con *Bam*H1. Para determinar su efectividad como inhibidor, las reacciones se incubaron con distintas concentraciones de HH363 (10 nM, 100 nM, 1 μ M y 5 μ M). Las proteínas sintetizadas fueron marcadas internamente durante la reacción de traducción y resueltas mediante electroforesis en geles de acrilamida al 12.5% con SDS. Los productos de la reacción de traducción fueron visualizados utilizando un escáner de fluorescencia (Storm 820, Molecular Dynamics, Uppsala, Suecia). La cuantificación de los datos obtenidos se realizó con el programa Image Quant[®].

En la figura R.4 se muestran los resultados que se obtuvieron, y que representan el valor medio de cuatro experimentos independientes. Los excelentes resultados de asociación y corte obtenidos no se correspondían con los valores de inhibición alcanzados por la ribozima HH363. A la concentración de inhibidor máxima utilizada de 5 μ M se observaba una caída en la síntesis de la proteína luciferasa próxima al 40%, un valor insuficiente si se pretende utilizar este motivo catalítico como agente anti-HCV.

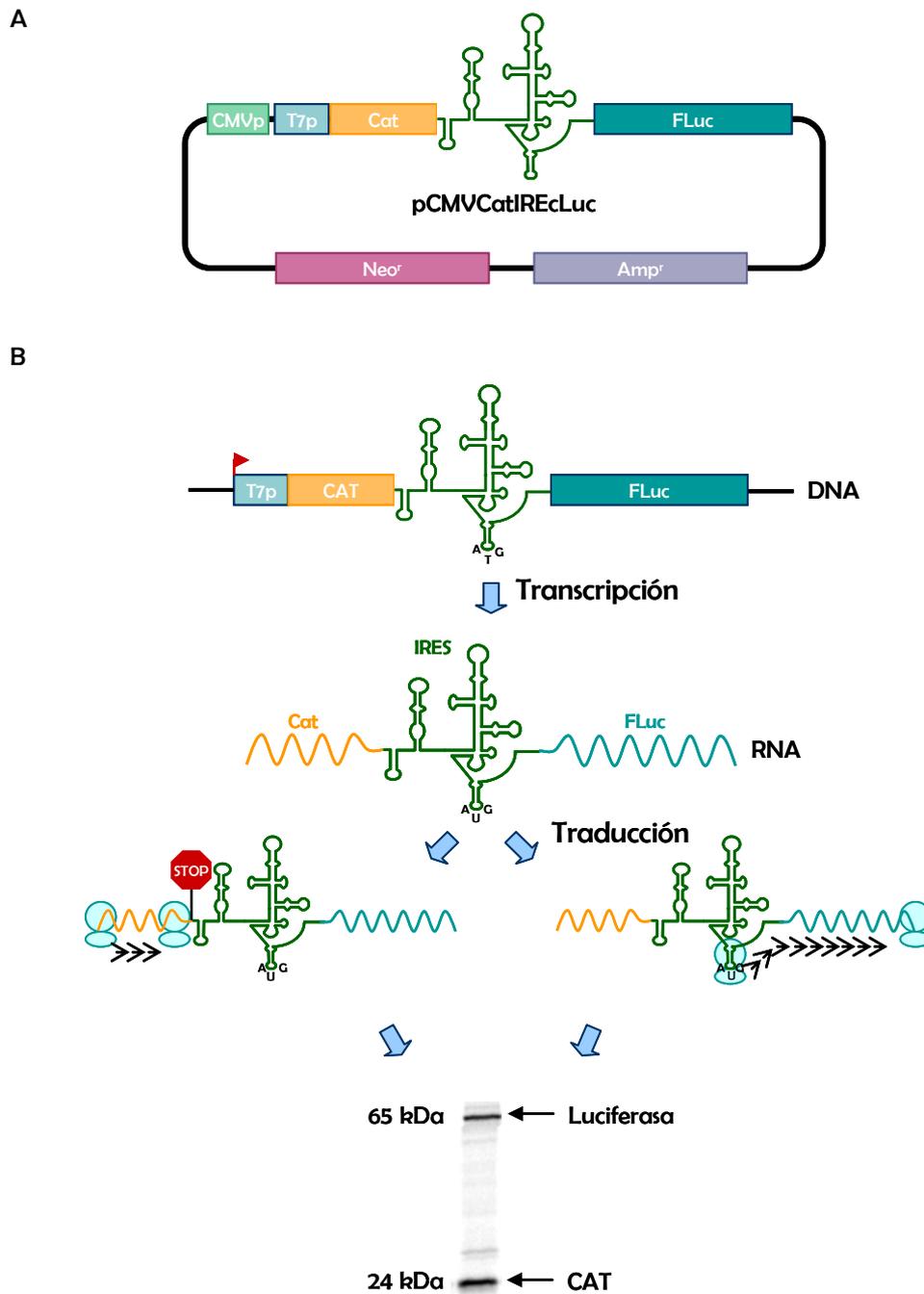


Fig. R.4.- Traducción *in vitro* a partir de construcciones bicistrónicas. A) Esquema del plásmido pCMVCatIREcLuc cedido por la doctora P. Fortes. CMVp = Secuencia promotora del citomegalovirus; T7p = Secuencia promotora del fago T7; CAT = Cloranfenicol acetil-transferasa; FLuc = Luciferasa de *Firefly* spp.; Amp^r = Gen de resistencia a ampicilina; Neo^r = Gen de resistencia a neomicina. B) Esquema general que ilustra el mecanismo del sistema acoplado de transcripción-traducción *in vitro*.

Estos resultados confirmaron que el comportamiento manifestado por un inhibidor difiere según las condiciones del ensayo y según se realice en un sistema *in vitro* o en el interior celular. También se puede concluir que, efectivamente, en el interior celular existen múltiples factores con los que una ribozima debe competir para asegurarse una unión rápida y efectiva a su sitio diana, por lo que es esencial optimizar la capacidad de asociación si se pretende obtener inhibidores eficaces y específicos.

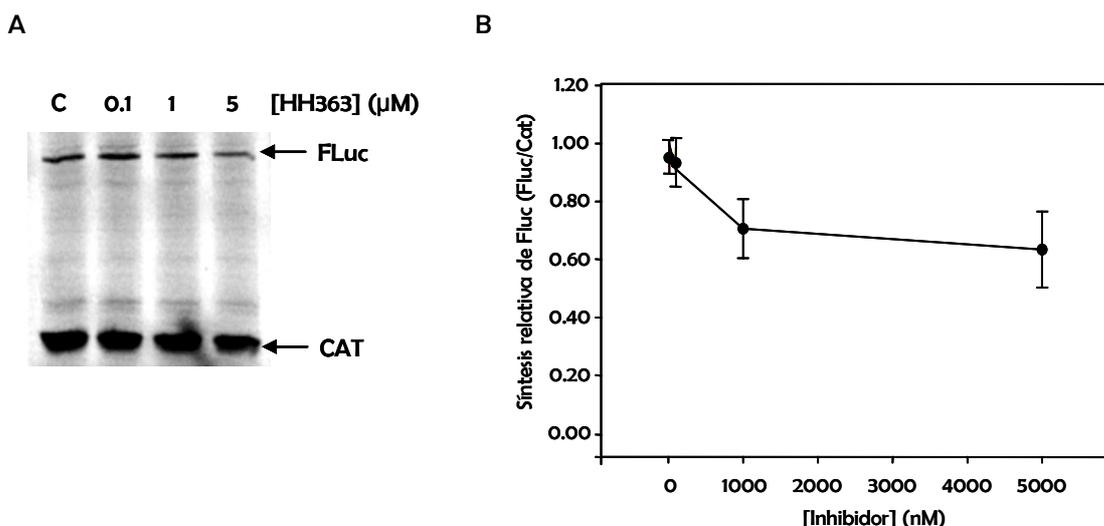


Fig. R.5.- Inhibición de la traducción dependiente de IRES *in vitro* por HH363. A) Autorradiografía de un gel de poliacrilamida con un ejemplo representativo de los ensayos de inhibición. Las proteínas fueron marcadas internamente durante su síntesis con [L]-³⁵S-metionina y [L]-³⁵S-cisteína. Se indican las concentraciones de HH363 utilizadas y se señalan los productos derivados de la traducción. B) Representación gráfica de la inhibición ejercida por HH363 sobre la función del IRES. Cada punto se calculó a partir de cuatro experimentos independientes.

Con el fin de mejorar la unión entre una ribozima y su sustrato, así como de incrementar la especificidad y la rapidez del proceso, en el laboratorio del Dr. Berzal se construyeron unos nuevos inhibidores basados en el mecanismo de actuación de los RNAs *antisense* naturales. El papel biológico de estos RNAs es la inhibición funcional de otra molécula de RNA mediante la interacción rápida, efectiva y específica de secuencias total o parcialmente complementarias. Se diseñaron motivos catalíticos derivados de la ribozima hairpin o hammerhead dirigidos frente a la región LTR de HIV. En 3' de dichos motivos se adicionó un dominio de RNA de secuencia complementaria al elemento TAR de HIV.

Estos dominios se pliegan adoptando una estructura tallo-lazo, por lo que su interacción imitaría a la ocurrida en los sistemas naturales. Los resultados mostraron que las nuevas moléculas (denominadas RNAs *antisense* catalíticos) exhibían una mejora sustancial no sólo en la capacidad de unión, sino también en la asociación al RNA sustrato (Puerta-Fernandez *et al.*, 2002; Puerta-Fernandez *et al.*, 2003a; Puerta-Fernandez *et al.*, 2005). No obstante, cuando se sustituyó este dominio *antisense* por el correspondiente a otros motivos tallo-lazo presentes en la región LTR (dominio poliA, dominio DIS), aunque el comportamiento seguía siendo similar, la mejora era menos evidente (datos no publicados). Esto hizo suponer que la elección y diseño del motivo *antisense* no es trivial, y que la conducta del RNA *antisense* catalítico depende del contexto molecular en el que se haya inmerso.

Por tanto, el siguiente paso consiste en el desarrollo de herramientas que permitan la identificación del mejor motivo *antisense* (o el mejor motivo capaz de favorecer la asociación a un sustrato determinado) para una ribozima y un RNA sustrato concreto.

El principal objetivo del trabajo desarrollado consistió en la optimización del motivo catalítico tipo hammerhead capaz de degradar específicamente el RNA genómico del HCV en la región IRES. Para ello se pensó en la adición de un motivo de RNA, en 3' de la ribozima HH363, que facilitase su acceso a la secuencia diana en un ambiente celular, en el cual dicha región IRES se encuentra altamente compactada y unida a factores implicados en el inicio de la traducción (Kieft *et al.*, 2001). Este motivo, por tanto, actuaría como aptámero del IRES, favoreciendo la asociación del inhibidor a su diana. En el diseño de este nuevo dominio se optó por una aproximación experimental mediante la aplicación de un proceso de selección molecular *in vitro*.

R.2.- Método de selección molecular *in vitro*

De manera general, en el diseño de un método de selección molecular *in vitro* se precisa de una población molecular heterogénea que sirve como punto de partida. A ésta se le aplica una presión selectiva que consigue el aislamiento de moléculas activas para el fenotipo buscado. Finalmente, las variantes activas rescatadas son amplificadas con la consiguiente disminución en la heterogeneidad con respecto a la población inicial de la cual se parte.

Para el desarrollo del método de selección se diseñó una población basada en una ribozima hammerhead con especificidad por la región IRES de HCV (HH363). Por analogía con el diseño de los RNAs *antisense* catalíticos, se adicionó en 3' una secuencia aleatoria de 25 nt a través de la cual se esperaba la unión a dominios específicos del RNA sustrato. En el diseño del proceso se incluyeron dos pasos diferenciados. En una primera etapa se seleccionan variantes capaces de unirse al IRES a través de la región variable, mientras que el segundo paso permite rescatar moléculas que conservan la actividad catalítica y que portan en 3' un dominio de RNA que se une al sustrato. Este criterio no implicaba que se produjese una mejora en la catálisis ya que se podían rescatar todas aquellas moléculas que presentasen capacidad de degradar el sustrato específicamente, aun cuando esta capacidad fuese mínima.

Como resultado de este diseño, se obtienen moléculas capaces de asociarse a la región IRES de HCV y de procesarla de manera específica. En principio, los nuevos RNAs presentan una capacidad de asociación mejorada con respecto a la ribozima convencional. Una ventaja añadida es el empleo de una estrategia experimental, que permite la obtención de variantes que de otro modo serían imposibles de conseguir.

R.2.1.- Diseño y construcción de la población inicial de moléculas de RNA

En el diseño de la población de moléculas de RNA se utilizó como esqueleto la secuencia de la ribozima hammerhead que procesa el RNA IRES de HCV en el nucleótido 363 (HH363; Lieber *et al.*, 1996). En 3' de dicha secuencia se introdujo una secuencia aleatoria de 25 nucleótidos, lo cual genera un número teórico de variantes de 1.12×10^{15} (Fig R.6). Durante la selección, las variantes capaces de unirse al RNA sustrato a través de este dominio son recuperadas y amplificadas.

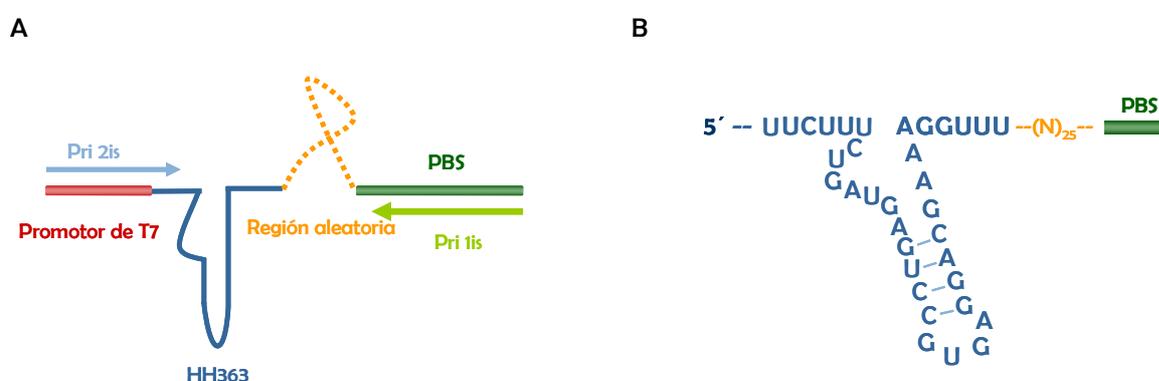


Fig. R.6.- Diseño de la población de moléculas utilizadas en el método de selección *in vitro*. A) Esquema general de la población de moléculas de DNA. PBS = secuencia constante que funciona como lugar de unión de cebador (*Primer Binding Site*). Pri1is, Pri2is, oligonucleótidos que actúan como cebadores para la amplificación de la población mediante PCR. Las flechas indican el sentido en el que se produce la extensión a partir del cebador. B) Moléculas de RNA sometidas al proceso de selección. Se muestra la secuencia nucleotídica del dominio catalítico HH363. N₂₅ representa la región aleatoria de 25 nt.

La construcción de la población se llevó a cabo mediante hibridación y extensión de dos oligonucleótidos de DNA complementarios (tabla R.1):

- 5'HH363is, en el que además se incorpora la secuencia del promotor para el enzima T7 RNA Polimerasa.

- 3'HH363is, el cual introduce dos sitios de restricción para los enzimas *HindIII* y *BamHI*. Durante su síntesis química, este ODN fue mutagenizado en las posiciones correspondientes a los 25 nucleótidos situados inmediatamente en 3' de la secuencia de

HH363, constituyendo así el motivo que será seleccionado por su unión al RNA sustrato. Por tanto, es el responsable de la introducción de la variabilidad en la población.

Nombre	Secuencia del oligonucleótido
5'HH363is	5'- <i>TAT GAA TTC</i> <u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG</u> GGT TCT TTC TGA TGA GTC CGT gag gac gaa agg ttt-3'
3'HH363is	5'-GCT GAA AGC TTG GAT CCG CTC AN ₂₅ a aac ett teg tcc tc-3'
Pri1is	5'- GCT GAA AGC TTG GAT CCG CTC A -3'
Pri2is	5'- TAT GAA TTC <u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG</u> GGT TCT TTC TGA TGA GTC CGT -3'

Tabla R.1.- Secuencias de los ODN utilizados durante el método de selección molecular *in vitro*. La secuencia para el promotor T7 se encuentra subrayada; las secuencias complementarias a través de las cuales hibridan los ODN 5'HH363is y 3'HH363is aparecen en minúscula; las secuencias implicadas en la hibridación de Pri1is y Pri2is se muestran en cursiva; los sitios de restricción para los enzimas *Eco*R1 (5'-GAA TTC -3'), *Bam*H1 (5'- GGA TCC -3') y *Hind*III (5'- AAG CTT-3') se muestran en negrita.

Para reducir la proporción de productos incompletos, una vez concluidos los pasos de hibridación y extensión de los ODN la población inicial de moléculas de DNA fue sometida a un proceso de amplificación en 7 ciclos. Los productos resultantes fueron utilizados posteriormente como DNA molde para generar la población inicial de moléculas de RNA, mediante transcripción *in vitro*.

Con el fin de comprobar el grado de variabilidad en las distintas posiciones, la población inicial de moléculas de DNA fue clonada y secuenciada de manera previa a su utilización en el método de selección.

R.2.2.- Diseño y construcción de los sustratos utilizados en el método de selección

La incorporación de dos pasos diferenciados en el método de selección hace necesario el empleo de sustratos de RNA con características distintas (5'HCV-356 y 5'HCV-691). Su utilización diferencial permite el rescate de moléculas con fenotipo positivo para la asociación, en un primer paso, y para el corte, en un segundo paso.

R.2.2.1.- Selección para la asociación. Diseño y construcción del sustrato 5'HCV-356

El primer paso del método de selección está destinado a la obtención de moléculas positivas para la asociación al IRES de HCV. Para ello se construyó un RNA sustrato que contiene la secuencia del genoma de HCV-1b desde el nucleótido +1 hasta el 356 (Fig. R.7A), y que se denominó 5'HCV-356. Esta molécula contiene, por tanto, la totalidad de la región 5' UTR de HCV así como los cuatro primeros codones que codifican para la proteína de la cápsida, pero carece del sitio de procesamiento de HH363 (Bukh *et al.*, 1992). Este diseño conlleva lo siguiente: por un lado, aquellas moléculas de la población que presenten en su región variable dominios capaces de unirse al RNA sustrato podrán ser rescatadas; por otro, se elimina la posibilidad de seleccionar moléculas de RNA cuya secuencia de unión al sustrato constituya una extensión de la hélice III de la ribozima, ya que se ha descrito que el empleo de ribozimas con largas secuencias de reconocimiento del sustrato tiene efectos deletéreos sobre la especificidad (Herschlag, 1991). Por otro lado, la presencia de una secuencia extendida de la hélice III no implica una mejora en la asociación.

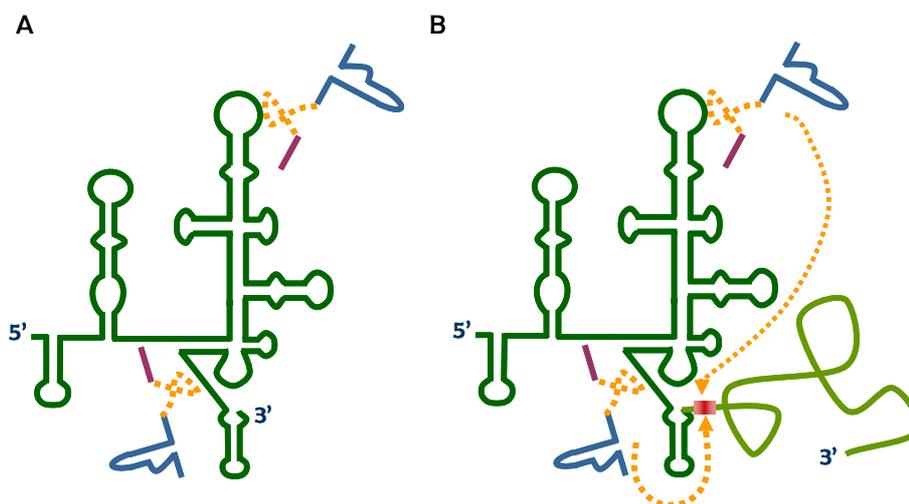


Fig. R.7.- Esquema representativo de las moléculas de RNA sustrato utilizadas durante el método de selección *in vitro*. A) RNA 5'HCV-356. Esta molécula contiene los primeros 356 nt del genoma viral y no es procesable por el dominio catalítico HH363. B) RNA 5'HCV-691. Incorpora hasta la posición 691 del genoma viral, es procesable por la ribozima hammerhead 363.

Para la síntesis del RNA 5'HCV-356 se utilizó como DNA molde el plásmido pU5'HCV-356 digerido con el enzima de restricción *HindIII*, y se procedió a su transcripción *in vitro* según se detalla en la sección de Materiales y métodos.

R.2.2.2.- Selección para el corte. Diseño y construcción del sustrato 5'HCV-691

El segundo paso selectivo que se incorpora en el método ha de permitir el rescate de moléculas que mantienen su capacidad de unión al IRES de HCV y que además conservan actividad catalítica. Para lograr este objetivo se diseñó una molécula de RNA que contenía la secuencia genómica de HCV desde el nucleótido +1 hasta el 691 (sustrato 5'HCV-691). Por tanto, incluye la totalidad de la región 5'UTR y la diana de procesamiento de la ribozima HH363 (Fig. R7B).

Para la transcripción *in vitro* del RNA 5'HCV-691 se utilizó como DNA molde el vector pU5'HCV-691 previamente digerido con el enzima de restricción *BamHI*, tal y como se describe en el apartado de Materiales y métodos.

R.2.3.- Selección molecular *in vitro*

La población de RNA inicial (P_0) se sintetizó mediante transcripción *in vitro* a partir del DNA molde y se purificó mediante extracción fenólica, cromatografía de exclusión por tamaño y precipitación. La concentración final de RNA fue determinada mediante espectrofotometría. La población P_0 fue sometida seguidamente al proceso de selección molecular *in vitro* esquematizado en la figura R.8.

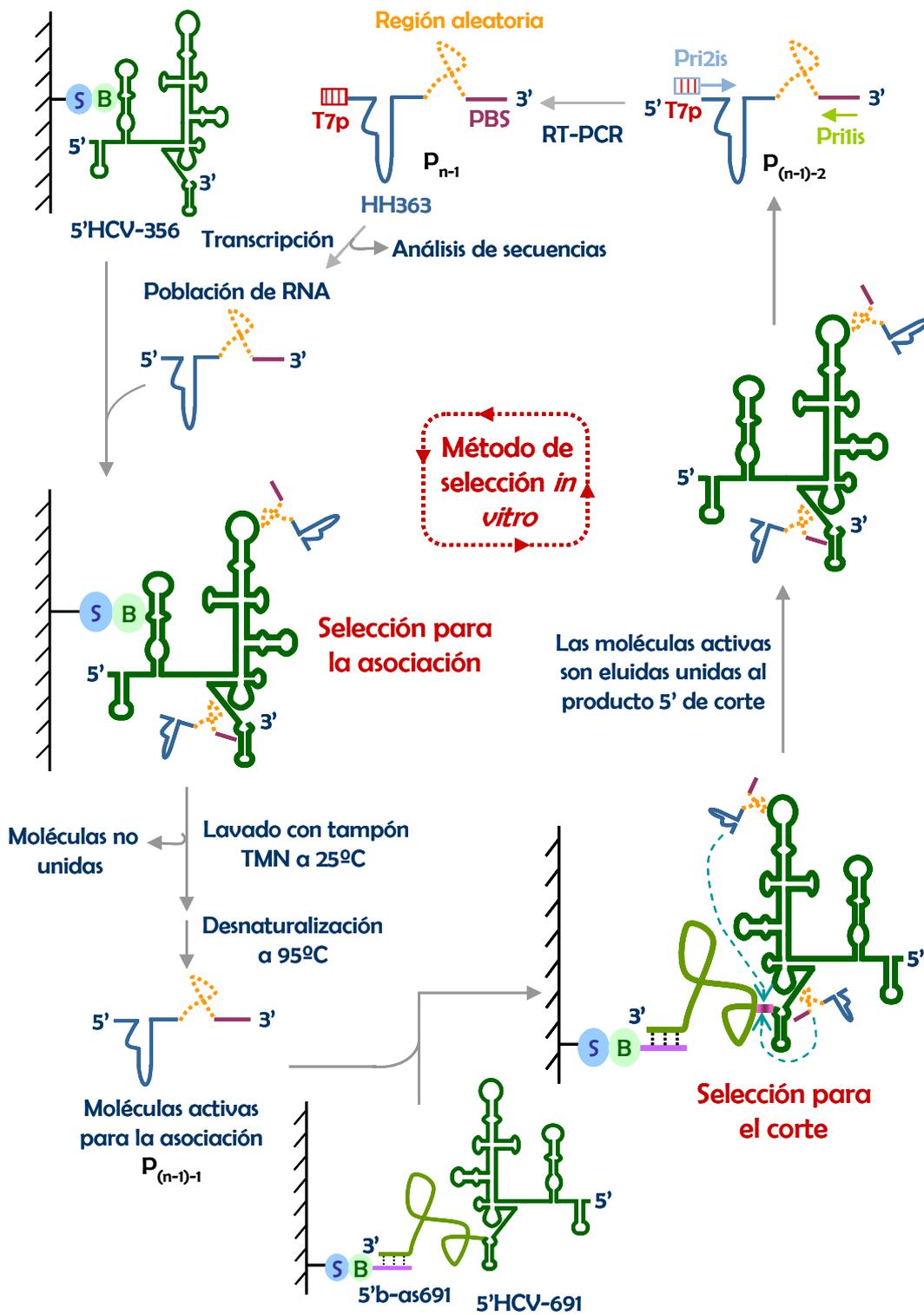


Fig. R.8.- Método de selección molecular *in vitro*. S = estreptavidina; B = biotina; T7p, PBS, descritos en la figura R.6. 5'b-as 691: 5' - biotina- ACC CAA ATT GCG CGA CCT ACG - 3'

R.2.3.1.- Primer paso de selección. Selección para la asociación a la región 5'UTR de HCV

El RNA sustrato 5'HCV-356 fue sintetizado mediante transcripción *in vitro* en presencia de biotin-16-UTP, bajo unas condiciones en las cuales sólo se incorpora, teóricamente, una molécula de nucleótido biotinilado por molécula de RNA (M.2.16.2; (Theissen *et al.*, 1989)). Seguidamente, 300 pmol del RNA fueron inmovilizados a una columna de sefarosa-estreptavidina, inicialmente equilibrada con un tampón que permite la unión biotina-estreptavidina. Una vez fijado el RNA a la columna, ésta fue equilibrada con tampón TMN. A continuación se adicionó la población de RNAs quiméricos (P₀, 4 nmoles) que a su vez se encontraba disuelta en el mismo tampón. Se dejó transcurrir la reacción durante 30 min a 25°C y se procedió a lavar con el mismo tampón de reacción, igualmente a 25°C.

Los primeros lavados no desnaturalizantes permitieron la elución moléculas que no habían quedado unidas al RNA sustrato, o bien aquellas cuya unión resultaba débil. Seguidamente, se continuó con el proceso de elución de variantes activas para la asociación. Esto se consiguió mediante la aplicación de condiciones desnaturalizantes: se procedió al calentamiento de la columna a 95°C durante 2' y posteriormente se lavó con buffer TMN, también a 95°C. Se realizaron 10 lavados, cada uno de ellos con 1 ml de tampón. Las cuatro primeras fracciones de cada ciclo (P₀₋₁) fueron recogidas y concentradas con Centricon YM-10 (Millipore), y destinadas al siguiente paso de selección

R.2.3.2.- Segundo paso de selección. Selección para el procesamiento del sustrato 5'HCV-691

En este segundo paso de selección, el DNA pU5'HCV-691 digerido con el enzima de restricción *Bam*H1 fue utilizado como molde en una reacción de transcripción *in vitro* para generar el RNA sustrato 5'HCV-691. Para su inmovilización a una columna de sepharosa-estreptavidina se utilizaron 5 nmol de un ODN biotinilado en su extremo 5' y que presentaba una secuencia complementaria al extremo 3' del RNA sustrato (posiciones 671-

691), siguiendo así una estrategia similar a la abordada por Kikuchi *et al.* (Kikuchi *et al.*, 2003; Kikuchi *et al.*, 2005). En total, 300 pmol de 5'HCV-691 fueron inmovilizados en la columna. El motivo de utilizar un protocolo de inmovilización alternativo al empleado durante el primer paso viene impuesto por el proceso de selección en sí: únicamente las moléculas híbridas catalíticamente activas podrán eluir unidas al producto 5' de corte. Este tipo de estrategia de selección no resulta factible en el caso de desarrollar un protocolo de inmovilización como el descrito para el primer paso.

Para la inmovilización del ODN biotinilado se siguió un protocolo análogo al descrito en la inmovilización del sustrato 5'HCV-356. Seguidamente se equilibró la columna con tampón de corte y se adicionó el RNA sustrato 5'HCV-691, el cual quedó retenido por hibridación de su extremo 3' con el ODN biotinilado. La población P₀₋₁, disuelta a su vez en tampón de corte, fue incorporada a la columna e incubada en presencia del sustrato durante 60 minutos a 37°C. La elución de moléculas activas para el procesamiento (P₀₋₂) se consiguió realizando 10 lavados a temperatura ambiente con solución de corte (M.2.17).

Según la hipótesis inicial, todas aquellas moléculas incapaces de cortar el RNA sustrato permanecían en la columna unidas al RNA sin procesar. Las cuatro primeras fracciones fueron reunidas y concentradas con Centricon YM-10 (Millipore). El RNA resultante fue retro-transcrito con el cebador Pri1is para generar el cDNA, y posteriormente amplificado con los ODN cebadores Pri1is y Pri2is.

Llegados a este punto, existen dos posibilidades:

- *Aplicación de un nuevo ciclo de selección:*

En este momento, la heterogeneidad de la población se encuentra reducida con respecto a la situación inicial. Las moléculas híbridas pueden ser ahora introducidas en un nuevo ciclo selectivo que permite depurar y acotar los representantes activos para ambos fenotipos. Para ello se realizó la transcripción *in vitro* de la población de moléculas híbridas de DNA, generando una nueva población (P₁) que se integra en la siguiente ronda.

- *Clonaje y análisis de las secuencias obtenidas:*

Esta opción permite hacer un seguimiento del funcionamiento del método, así como obtener información de las moléculas que se seleccionan. Los productos de amplificación

fueron clonados y secuenciados posteriormente. Las secuencias obtenidas fueron estudiadas y analizadas.

Después de seis rondas de selección las moléculas rescatadas (P_6) fueron analizadas. En el cuarto ciclo se incrementó la presión selectiva para ambos pasos: en el primer paso se aumentó la temperatura de reacción a 37°C y disminuyó el tiempo hasta 15 min; en el segundo paso, se redujo el tiempo de incubación de 60 min a 30 min.

R.2.3.3.- Validación del método de selección

Una de las formas de acreditar el correcto funcionamiento del proceso selectivo, además de mediante clonaje y análisis de las secuencias obtenidas, es la comprobación de la adquisición del fenotipo que se pretende rescatar. En este caso, capacidad de asociación a la región 5'UTR y mantenimiento de la actividad catalítica.

R.2.3.3.1.- Asociación de las poblaciones P_0 , P_3 y P_6 a la región 5'UTR de HCV

La verificación de este fenotipo en tres poblaciones (la inicial y las resultantes de los ciclos tercero y sexto) se realizó mediante visualización del complejo formado entre las poblaciones de RNA y el RNA sustrato 5'HCV-356. Para ello se marcó internamente 5'HCV-356 con [α^{32} P]UTP durante la reacción de transcripción *in vitro*, tal y como se describe en Materiales y métodos. El RNA correspondiente a las poblaciones P_0 , P_3 y P_6 fue obtenido mediante transcripción *in vitro* a partir de sus respectivos DNAs molde.

Los ensayos se realizaron en defecto del RNA sustrato, el cual se utilizó a una concentración de 2 nM. Todas las moléculas de RNA utilizadas fueron desnaturalizadas a 65°C durante 7 min y posteriormente renaturalizadas a 37°C, de manera previa a su utilización. La adición de 5'HCV-356 a los RNAs quiméricos de las distintas poblaciones permitía el comienzo de la reacción de asociación. Se permitió que la formación de los complejos transcurriera durante 30 min en tampón TMN, a 37°C. El proceso se detuvo por enfriamiento rápido en hielo, y fue visualizado mediante electroforesis en condiciones no desnaturalizantes en geles de poliacrilamida al 4%, según se ha descrito en el apartado de

Materiales y métodos. La electroforesis se desarrolló a una temperatura de 4°C y una intensidad constante de 10 mA. La formación del complejo ocasionó un retardo en la movilidad electroforética del RNA sustrato que pudo ser visualizado y analizado en un escáner de fluorescencia (Storm 820, Molecular Dynamics, Uppsala, Suecia). Para su cuantificación se utilizó el programa ImageQuant®.

Cuando el RNA sustrato fue incubado en presencia del RNA correspondiente a la población inicial no se observaron cambios en la movilidad electroforética (Fig. R.9A). Sin embargo, con el transcurso de los ciclos y el incremento de la presión selectiva se pudo detectar que el RNA sustrato migraba más lentamente cuando era incubado en presencia de P₃ ó P₆, lo cual indicaba la existencia de una interacción entre ambas moléculas. Cuando la incubación se realizó en presencia de P₆, más del 90% de las moléculas de sustrato manifestó cambios en su movilidad electroforética (Fig. R.9B). Estos resultados permitieron constatar el correcto funcionamiento y diseño del primer paso del método de selección *in vitro*.

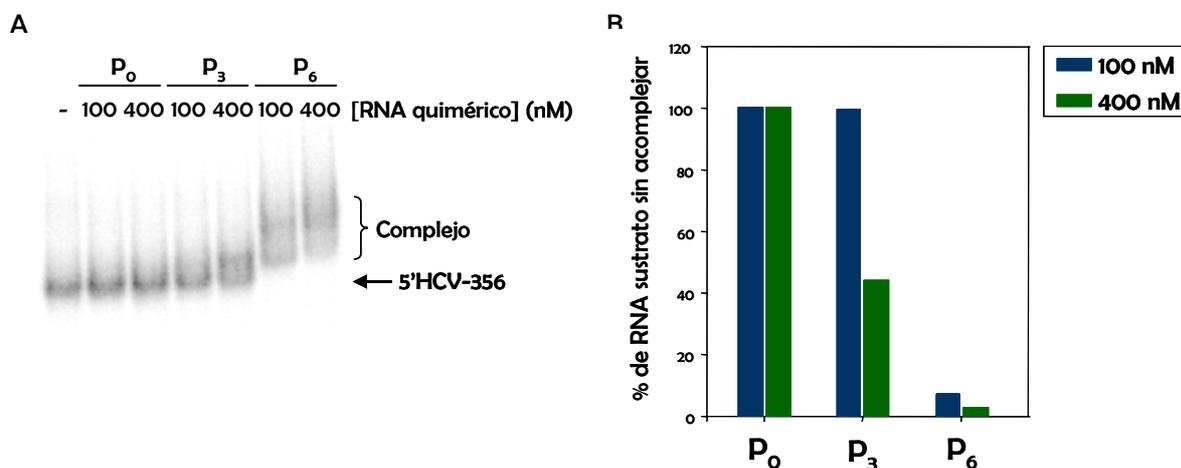


Fig. R.9.- Capacidad de unión de las poblaciones de RNAs quiméricos durante el proceso de selección.

A) Autorradiografía de un ensayo de asociación. El RNA 5'HCV-356 marcado internamente con ³²P se incubó con distintas concentraciones de la población de RNAs quiméricos. Los complejos formados se pudieron detectar como un cambio en la movilidad electroforética del RNA sustrato. B) Diagrama de barras en el que se muestra la cuantificación del ensayo de asociación mostrado en A.

R.2.3.3.2.- Actividad catalítica de las poblaciones P_0 , P_3 y P_6 frente al sustrato 5'HCV-691

La eficacia del segundo paso del método de selección se comprobó para las poblaciones P_0 , P_3 y P_6 . Para ello se ensayó la actividad de corte de dichos RNAs frente al sustrato 5'HCV-691. Éste fue marcado internamente con $[\alpha^{32}\text{P}]\text{UTP}$ mediante transcripción *in vitro*. Tanto los RNAs seleccionados como la molécula sustrato fueron desnaturalizados y renaturalizados en las mismas condiciones que para la reacción de asociación descrita en el apartado anterior, previamente a su utilización.

El ensayo de corte se llevó a cabo en condiciones de exceso de RNA catalítico con respecto al sustrato, de manera que al inicio de la reacción todas las moléculas de RNA sustrato queden unidas a las moléculas catalíticas a través del sitio diana. Por tanto, no existe posibilidad de recambio (*turnover*) y así cada molécula de ribozima únicamente puede procesar una sola molécula de RNA sustrato. El exceso de RNA catalítico utilizado fue de 5 veces, y las condiciones de fuerza iónica en la reacción quedaron establecidas por un tampón compuesto por Tris-HCl 50 mM a un pH de 7.5 y MgCl_2 10 mM. La reacción de corte se inició al mezclar ribozimas y sustrato, y se incubaron durante 60 min a 37°C. La catálisis se detuvo mediante la adición de un volumen igual de tampón de carga (98% v/v de formamida), y los productos resultantes del procesamiento por la ribozima se resolvieron mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 4%. La visualización de los productos de corte y su posterior análisis se realizó en un escáner de fluorescencia (Storm 820, Molecular Dynamics, Uppsala, Suecia).

Tras los sucesivos ciclos se detectaron leves cambios en la capacidad catalítica de las moléculas seleccionadas (Fig. R.10A), lo cual sugería que durante el segundo paso la población quedaba ligeramente enriquecida en moléculas catalíticamente más activas (Fig. R.10B). Según las premisas que se habían establecido inicialmente, este segundo paso parecía actuar a través de un proceso de selección que permite retirar únicamente aquellos representantes que hayan perdido su capacidad de corte por la incorporación del dominio de unión a la región 5'UTR.

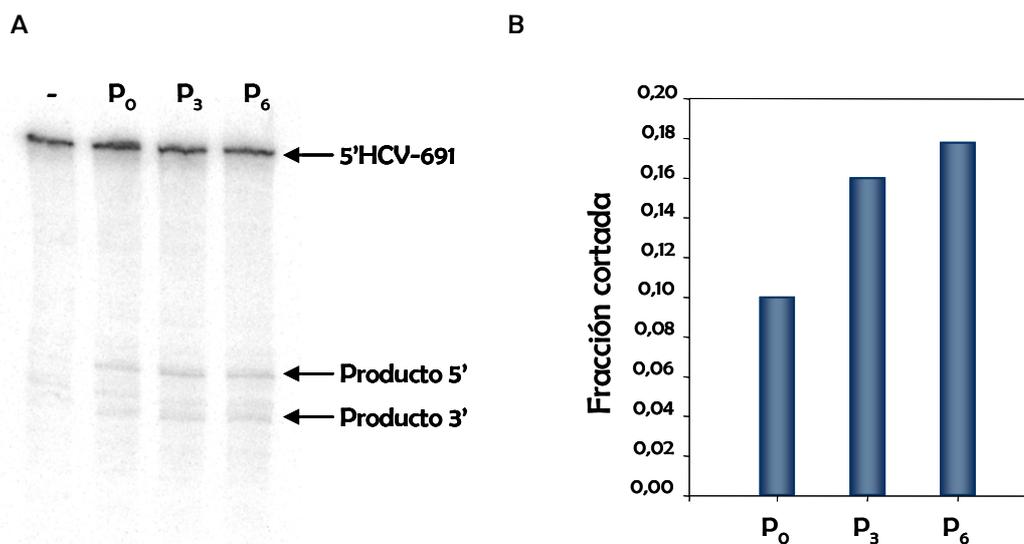


Fig. R.10.- Procesamiento del sustrato 5'HCV-691 por los RNAs quiméricos a lo largo del proceso de selección *in vitro*. A) Autorradiografía de la reacción de corte llevada a cabo por las poblaciones de RNA P₀, P₃ y P₆ sobre el sustrato. La molécula 5'HCV-691 fue marcada internamente con ³²P. Se indican los productos generados como consecuencia de la reacción de corte así como el RNA sustrato B) Diagrama de barras que representa la fracción de RNA sustrato procesado por las poblaciones de RNA. Aunque las diferencias en procesamiento con respecto a P₀ son pequeñas, en cualquier caso se produce un leve incremento en la fracción de producto generado en las poblaciones P₃ y P₆.

R.2.4.- Análisis de las moléculas seleccionadas

Los resultados obtenidos con los ensayos de validación del método de selección permitieron concluir que el proceso había funcionado correctamente, por lo que se procedió al análisis de los representantes de las poblaciones resultantes de los ciclos tercero y sexto. Para ello, los productos de RT-PCR correspondientes a las poblaciones P₃ y P₆ se introdujeron en el vector pGEM®-T (Promega). El producto de ligación fue posteriormente introducido en la cepa DH5α de *Escherichia coli* mediante transformación con CaCl₂. Los DNAs plasmídicos de todas las colonias crecidas de manera independiente fueron extraídos y secuenciados automáticamente.

El análisis de las secuencias recogidas tras el tercer ciclo (P₃) no reveló ningún motivo de secuencia que apareciese claramente seleccionado entre la población.

El clonaje de las moléculas resultantes del sexto ciclo de selección (P_6) permitió el rescate de 30 variantes diferentes en un total de 60 colonias independientes (Fig. R.11). El análisis de estas secuencias reveló que todas ellas podían ser encuadradas dentro de siete grupos distintos, los cuales quedaron definidos por motivos consenso presentes en el dominio aptámero. En algunos representantes se pudieron detectar dos e incluso tres motivos consenso dentro de dicho dominio. Los diferentes grupos quedaron definidos de la siguiente manera:

- *Grupo 1*: es el más numeroso, alcanzando un 56.7% del total de moléculas rescatadas. En trabajos previos desarrollados por los grupos del doctor S. Nishikawa (Kikuchi *et al.*, 2005) y J-J. Toulmé (Tallet-Lopez *et al.*, 2003) se describen aptámeros obtenidos mediante selección molecular *in vitro* que presentan motivos consenso que incluyen al aquí descrito.

- *Grupo 2*: la secuencia consenso YAUGGCU representa un 26.7% en el total de las variantes seleccionadas. Esta secuencia ya ha sido descrita previamente en RNAs aptámeros obtenidos por selección *in vitro* (Kikuchi *et al.*, 2003; Da Rocha Gomes *et al.*, 2004).

- *Grupo 3*: el motivo CCACV se encuentra presente en el 23.3% de las moléculas analizadas. Este motivo consenso aún no ha sido descrito por otros autores.

- *Grupo 4*: constituido por cuatro representantes (un 13.3% del total). Con excepción de la variante HH363-10, las otras tres comparten el motivo consenso definido para el grupo 1.

- *Grupo 5*: el 10% de las secuencias analizadas pertenecen a este grupo. De los tres representantes que lo componen, uno de ellos presenta también secuencias conservadas para las familias 2 y 7 (la variante HH363-18). Esta secuencia consenso fue previamente caracterizada por Aldaz-Carroll *et al.* (Aldaz-Carroll *et al.*, 2002).

- *Grupo 6*: los tres representantes del grupo 6 (un 10% del total de secuencias distintas analizadas) presentan todos ellos dominios que los encuadran en otros grupos. Este motivo consenso es la primera vez que se describe y por tanto resulta de especial interés el determinar de manera experimental su lugar de anclaje.

- *Grupo 7*: el motivo consenso AUURG se encuentra presente en el 10% de las moléculas analizadas. Los tres representantes que lo componen contienen secuencias

consenso que los incluyen en otros grupos. Hasta la fecha no ha sido descrito por otros autores.

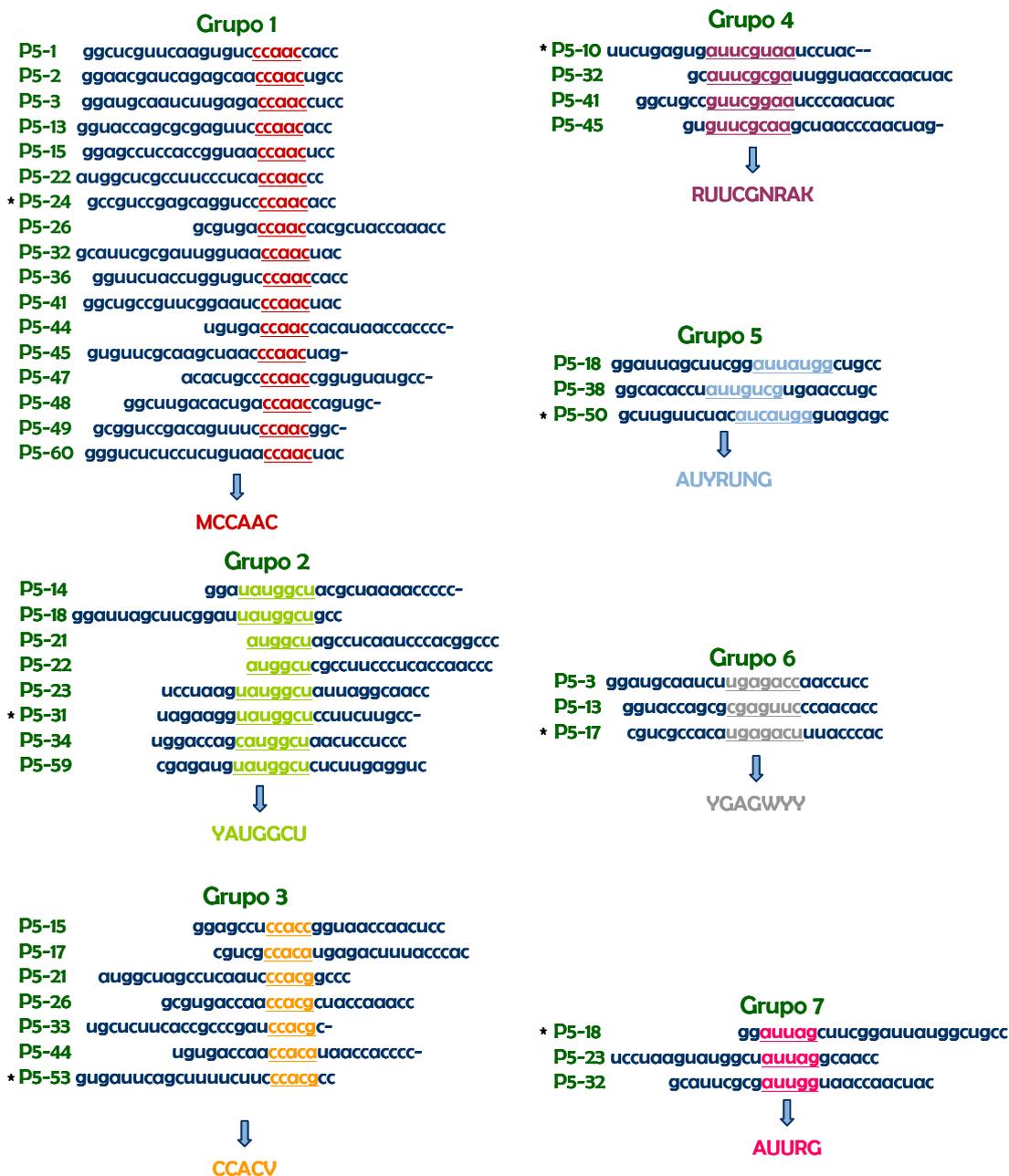


Fig. R.11.- Secuencias seleccionadas de los RNAs aptámeros. Se muestra la secuencia de RNA de 25 nt después de seis rondas de selección. Las 30 variantes están clasificadas en grupos en función de motivos consenso comunes (subrayados). La secuencia consenso se muestra debajo de cada grupo. "--" = nucleótido deleciónado; Y = C o U; R = G o A; M = A o C; K = G o U; W = A o U; V = A, C o G; N = cualquier nucleótido. Las variantes representativas de cada grupo que se utilizaron en los estudios posteriores se indican por un asterisco.

R.2.5.- Estudio teórico de los lugares de unión en el RNA sustrato

Una vez identificadas las secuencias comunes entre las distintas variantes, se realizó una búsqueda de secuencias complementarias a los motivos consenso en la molécula 5'HCV-356. El examen mostró que cada uno de los motivos seleccionados encontraba en la región 5'UTR de HCV secuencias complementarias y únicas (tabla R.2). El apareamiento en estos lugares teóricos quedaría establecido por interacciones del tipo Watson-Crick, así como por uniones tipo *wobble*.

Grupo	Secuencia consenso	Secuencia complementaria en el RNA sustrato
1	5' MCCAAC 3'	G ₂₆₃ UUGGG ₂₆₈
2	5' YAUGGCU 3'	A ₈₁ GCCAUG ₈₇
3	5' CCACV 3'	U ₂₈₃ GUGG ₂₈₇
4	5' RUUCGNRAK 3'	U ₃₀₅ UGCGAGU ₃₁₂
5	5' AUYRUNG 3'	C ₃₄₀ CAUGAG ₃₄₆
6	5' YGAGWYY 3'	G ₃₂₂ GUCUCG ₃₂₈
7	5' AUURG 3'	C ₂₉₃ UGAU ₂₉₇

Tabla R.2.- Secuencias complementarias a los motivos consenso obtenidos mediante selección *in vitro*.

La nomenclatura para designar posiciones en las que es posible más de un nucleótido corresponde a la adoptada por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica (NC-IUB, 1985), donde Y = C o U; R = A o G; V = A, C o G; M = A o C; K = G o U; W = A o U; N = cualquier nucleótido.

En la figura R.12 se muestran las secuencias complementarias a los dominios consenso incluidas dentro de la estructura secundaria de la región 5'UTR de HCV.

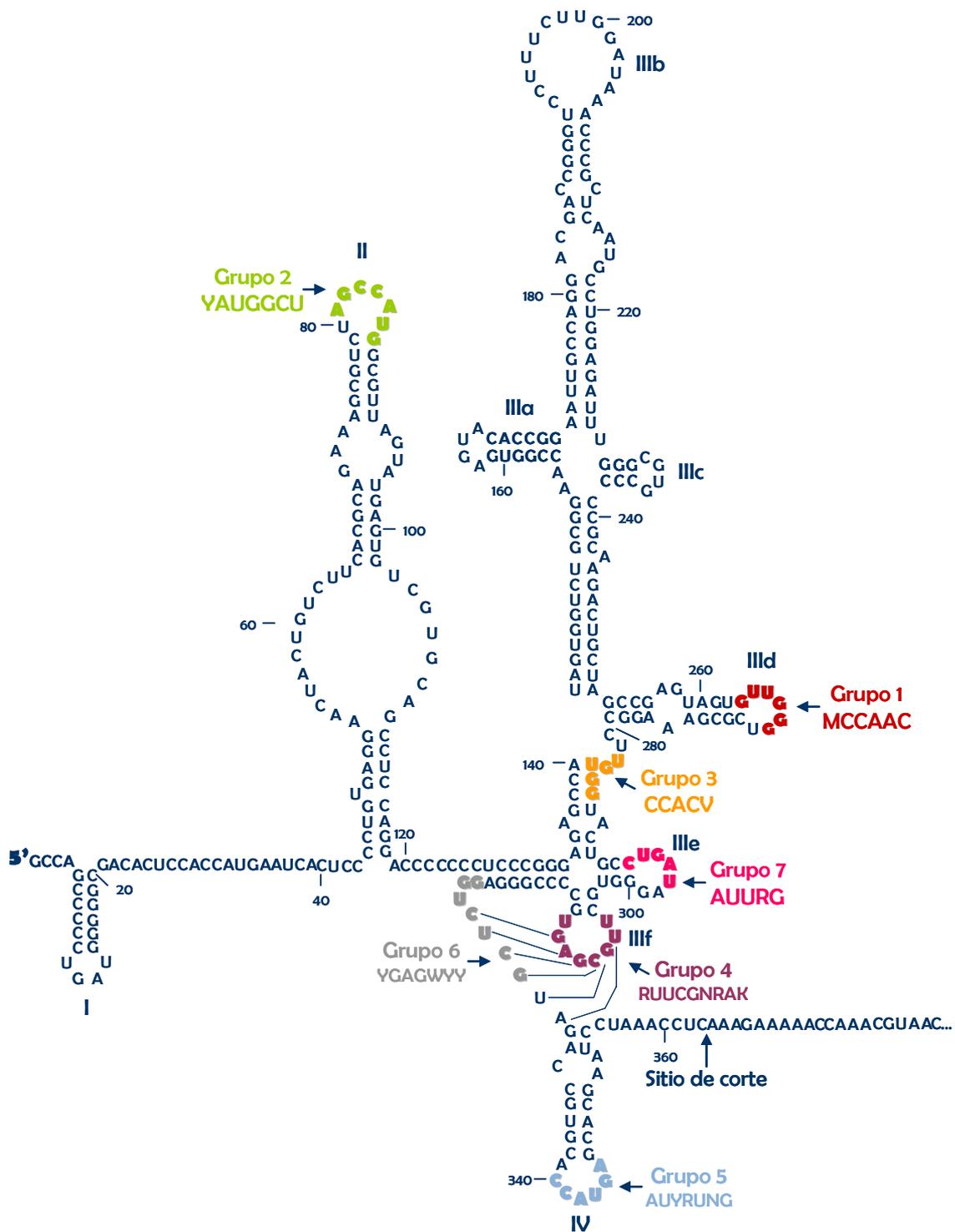


Fig. R.12.- Estructura secundaria de la región 5'UTR de HCV que contiene el IRES. Se muestran las secuencias complementarias a los motivos consenso. Figura adaptada de (Lyons *et al.*, 2001).

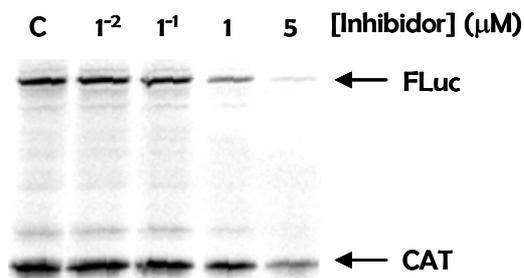
R.3.- Ensayos de inhibición de la actividad de la región IRES *in vitro*

Con el fin de comprobar la capacidad de los RNAs quiméricos para bloquear la función de la región IRES se realizaron ensayos de inhibición de la traducción en un sistema acoplado de transcripción-traducción, de manera análoga a la descrita para HH363. Se seleccionó una variante representativa de cada grupo (Fig. R.11) y se determinó su capacidad de inhibición a diferentes concentraciones (10 nM, 100 nM, 1 μ M y 5 μ M). En todos los casos la cantidad del plásmido pCMVCatIREcLuc empleada fue constante (50 ng). También se realizaron dos reacciones control: una de ellas en ausencia de inhibidor (C) y otra en la que se utilizó un RNA quimérico procedente de la población inicial y cuya secuencia no presenta ninguno de los consensos seleccionados (C-).

En la figura R.13 se muestran los resultados logrados para los distintos RNAs quiméricos comparados con los datos obtenidos para HH363. Los valores que se representan son el resultado de cuatro experimentos independientes para cada inhibidor.

Se observó que todos los RNAs quiméricos ensayados eran capaces de bloquear la actividad IRES a una concentración de 5 μ M. Mientras que la ribozima convencional sólo era capaz de inhibir la función del IRES en un 40%, cuatro de las ocho variantes probadas (HH363-24, HH363-17, HH363-50 y HH363-18) disminuían la síntesis de la proteína FLuc en más de un 80%, alcanzándose incluso valores de inhibición cercanos al 97% en el caso de las moléculas HH363-17 y HH363-18. La variante HH363-24 se mostraba como un inhibidor con gran potencial ya que a una concentración de 100 nM era la molécula más potente. Los valores de inhibición obtenidos para el caso del RNA quimérico C- fueron similares a los alcanzados por HH363.

A



B

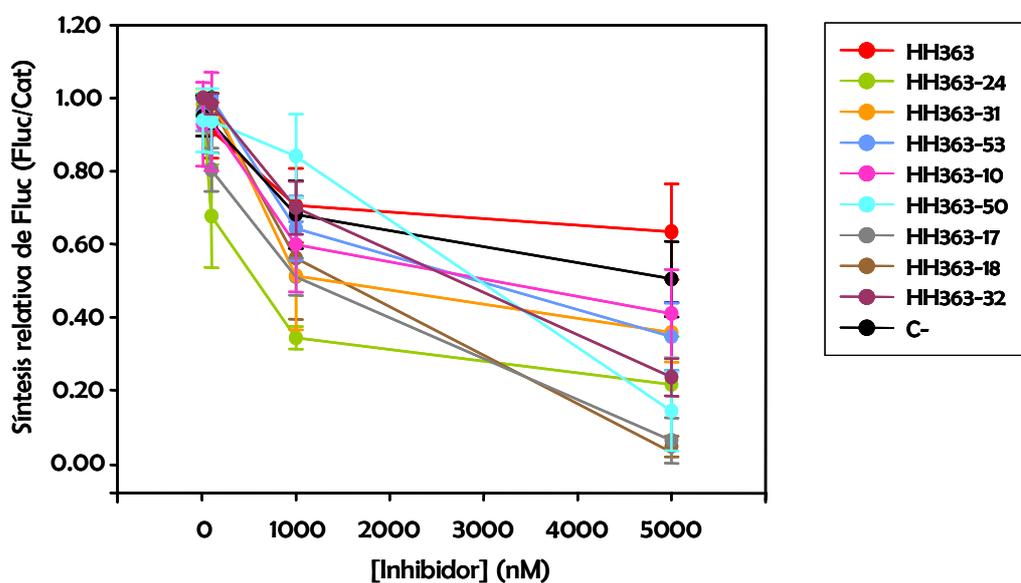


Fig. R.13.- Inhibición de la traducción *in vitro* por los RNAs quiméricos. A) Autorradiografía de un gel de poliácridamida que muestra un ejemplo representativo de un ensayo de inhibición de la traducción mediada por el IRES. Las proteínas fueron marcadas internamente durante su síntesis con [L]-³⁵S-metionina y [L]-³⁵S-cisteína. Se indican las concentraciones de inhibidor utilizadas y se señalan los productos derivados de la síntesis. C, reacción en ausencia de inhibidor. B) Representaciones gráficas de la inhibición obtenida por cada RNA quimérico a las distintas concentraciones empleadas. Cada punto se calculó como resultado de cuatro experimentos independientes. La secuencia del dominio de 25 nt para la molécula C- es la siguiente: 5' – GGC ACA CCG TAT GTA AGG CCT CC – 3'.

Para completar el estudio y determinar el efecto que los dominios aptámero ejercían sobre la traducción se sintetizaron los RNAs enzimáticamente y se purificaron de manera análoga a como se hizo con los RNAs quiméricos y con HH363. El ensayo se realizó igualmente de manera similar y se probaron las mismas concentraciones para cada aptámero. Los resultados obtenidos en el caso de las variantes 24, 31, 10 y 32 mostraron que no existían diferencias significativas en la inhibición ejercida entre el aptámero y el RNA quimérico (Fig R.14). Sin embargo, en el 50% restante de las variantes ensayadas (variantes 53, 50, 17 y 18) se comprobó que el inhibidor quimérico era significativamente más activo que el aptámero, e incluso tres de ellos resultaron ser los inhibidores más potentes, alcanzando tasas de inhibición superiores al 85% (Fig. R.15).

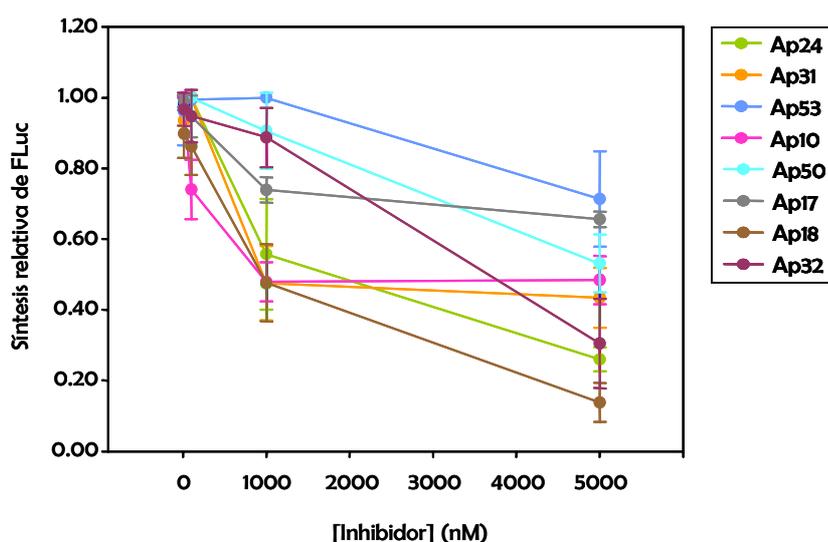


Fig. R.14.- Inhibición de la traducción *in vitro* por los RNAs aptámeros. Representaciones gráficas de la inhibición obtenida por cada RNA aptámero a las distintas concentraciones empleadas. Cada punto se calculó como resultado de cuatro experimentos independientes.

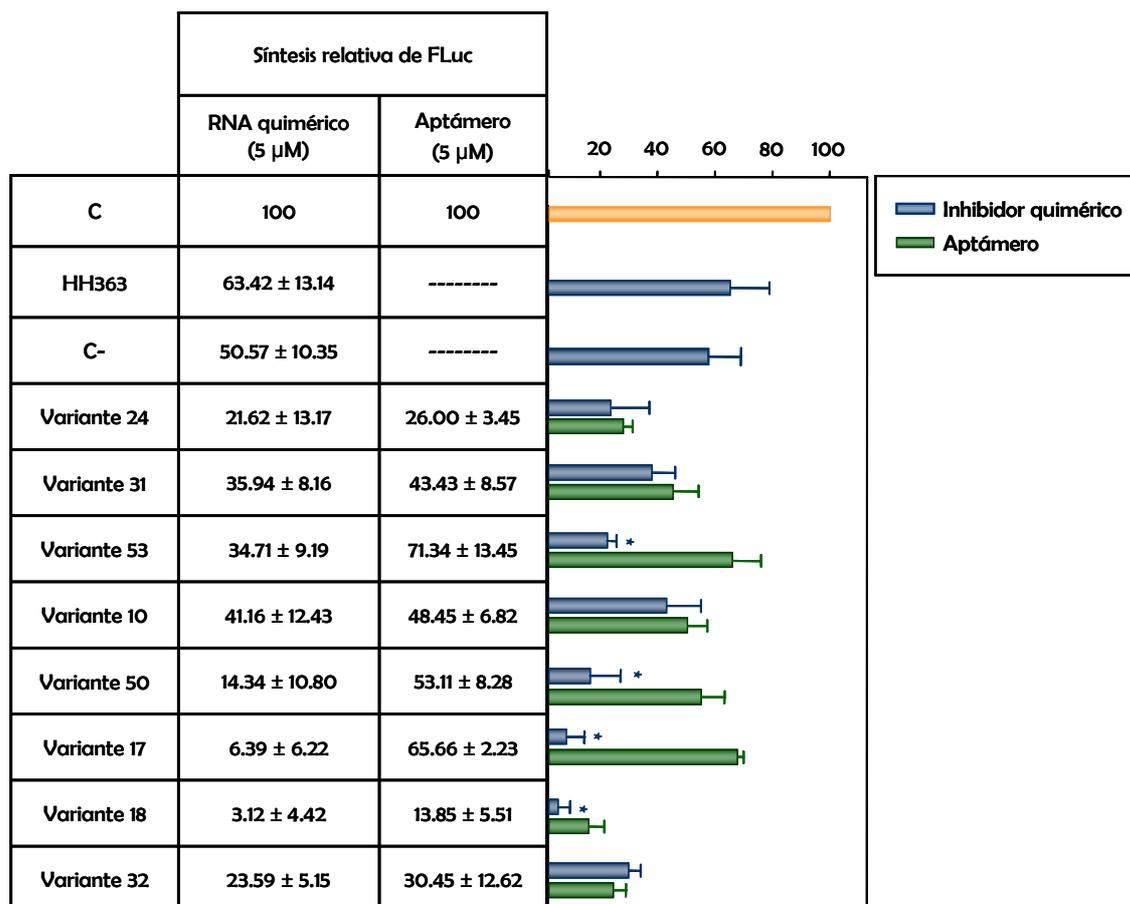


Fig. R.15.- Inhibición de la traducción *in vitro* dependiente de IRES. Representación gráfica de la síntesis relativa de FLuc para los distintos inhibidores ensayados. Los datos para cada RNA están normalizados con respecto al control en ausencia de inhibidor. Los valores son la media de cuatro experimentos independientes. El asterisco indica diferencias significativas en la inhibición observadas entre el RNA quimérico y su aptámero correspondiente ($p < 0.07$). C, reacción en ausencia de inhibidor. C-, reacción en presencia de un RNA perteneciente a la población inicial.

R.4.- Ensayos de asociación de los RNAs inhibidores al sustrato largo

Las moléculas para las cuales los datos de inhibición eran más positivos coincidían con aquellas que presentaban secuencias consenso en sus dominios aptámero complementarias a motivos presentes en lazos apicales del IRES (Fig. R.12). Las uniones

que involucran a nucleótidos situados en lazos apicales han sido calificadas como muy rápidas y efectivas, y son responsables últimos en la regulación de multitud de procesos biológicos. En algunos casos, las interacciones inter- o intramoleculares a través de los lazos apicales (bien por apareamientos tipo Watson-Crick o por interacciones “no canónicas”) pueden llegar a ser suficiente para el establecimiento de una estructura terciaria y en consecuencia de una función (revisado en (Brunel *et al.*, 2002)). También se ha demostrado recientemente la importancia de las interacciones entre residuos presentes en un lazo interno y aquellos componentes de un lazo apical en moléculas de RNA obtenidas mediante selección *in vitro* (Aldaz-Carroll *et al.*, 2002; Da Rocha Gomes *et al.*, 2004).

Para determinar la afinidad de los RNAs quiméricos por su sustrato se procedió a caracterizar cinéticamente los distintos representantes de cada grupo, para lo cual se empleó el sustrato 5'HCV-691gg. Tanto los RNAs quiméricos como el sustrato se sintetizaron con el enzima T7 RNA polimerasa. Los RNAs quiméricos se desfosforilaron y se marcaron posteriormente en su extremo 5' con ^{32}P . Los ensayos de asociación se realizaron de la misma manera que en el caso de HH363. Los datos obtenidos fueron ajustados a una ecuación del tipo

$$Y = (Y_o \cdot X) / (X + K_d)$$

donde Y es el porcentaje de complejo formado, Y_o el porcentaje inicial de complejo, X la concentración del RNA que se utiliza en exceso, en este caso el sustrato, y K_d la concentración de sustrato a la cual la formación de complejo es la mitad de la máxima.

En la figura R.16 se muestra uno de estos ensayos llevados a cabo con el inhibidor HH363-50.

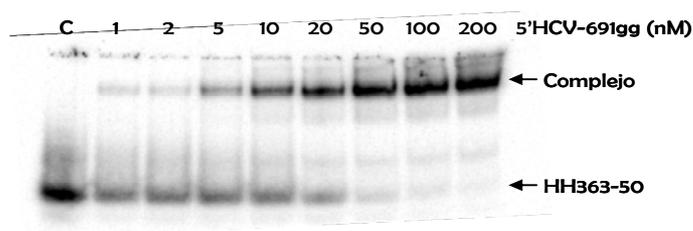


Fig. R.16.- Asociación de HH363-50 al RNA sustrato 5'HCV-691gg. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el que se ha resuelto el complejo formado entre el RNA inhibidor y su sustrato. Se señala el RNA quimérico así como el complejo formado. C, reacción llevada a cabo en ausencia de sustrato.

Para cada RNA quimérico, el ensayo se repitió cuatro veces de manera independiente (Fig. R.17). Tal y como se había observado previamente, el motivo catalítico presentaba una gran afinidad por el RNA sustrato (tabla R.3). Los RNAs quiméricos HH363-50 y HH363-32 mejoraron significativamente ($p < 0.05$) este valor en algo más de dos veces. Asimismo, la extensión final de la reacción también se vio significativamente incrementada ($p < 0.05$) para cinco de las ocho variantes probadas (HH363-24, HH363-31, HH363-50, HH363-18 y HH363-32). Por otro lado, se determinó el valor de K_d para el RNA C-; a pesar de contener el dominio catalítico, su afinidad por el RNA sustrato es casi 17 veces inferior a la exhibida por HH363, y apenas un 16% de las moléculas logran asociarse a 5'HCV-691gg.

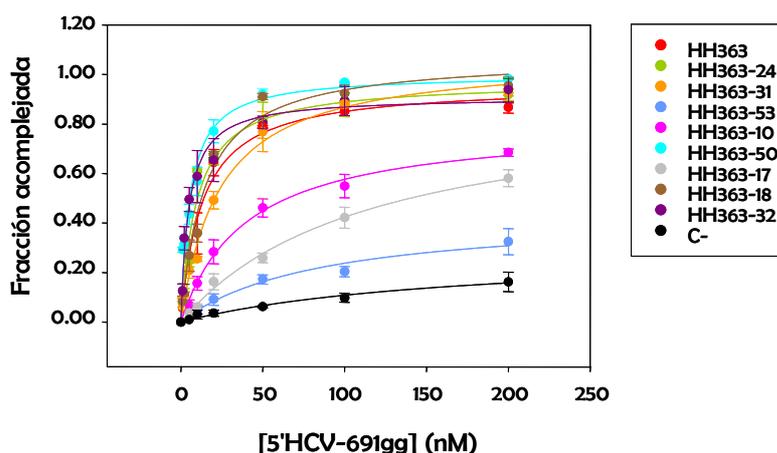


Fig. R.17.- Caracterización cinética de la asociación de los RNAs quiméricos al sustrato 5'HCV-691gg. Representación gráfica de las distintas cinéticas de asociación para los RNAs quiméricos. Cada punto es el valor medio de cuatro experimentos independientes. Los datos se ajustaron a la curva con un valor de $R^2 > 0.99$.

RNA	$K_d \pm \text{d.s. (nM)}$	K_{rel}	E	$Y_{\text{max}} \pm \text{d.s.}$
HH363	12.91 ± 2.01	1	6.45	86.79 ± 2.31
C-	228.26 ± 68.42	0.06	114.14	16.28 ± 4.00
HH363-24	12.28 ± 1.31	1.05	6.14	91.88 ± 2.34
HH363-31	23.71 ± 2.73	0.54	11.85	92.92 ± 1.43
HH363-53	77.04 ± 8.39	0.17	38.52	32.52 ± 5.23
HH363-10	39.91 ± 3.54	0.32	19.95	68.51 ± 1.51
HH363-50	5.47 ± 1.07	2.36	2.73	98.24 ± 0.21
HH363-17	114.44 ± 16.29	0.11	57.22	58.14 ± 3.39
HH363-18	14.35 ± 1.93	0.90	7.24	95.48 ± 2.76
HH363-32	4.78 ± 0.78	2.70	2.39	93.83 ± 5.15

Tabla R.3.- Parámetros cinéticos para la asociación de los RNAs quiméricos a 5'HCV-691gg. Los valores que se muestran se obtuvieron tras realizar cuatro experimentos independientes. El dato de K_{rel} indica el valor de la constante K_d normalizado con respecto valor de la constante obtenida para la asociación de HH363 al sustrato. E indica el exceso de RNA sustrato necesario (nM) para alcanzar el valor de K_d . Y_{max} supone la extensión de la reacción a concentración infinita de RNA sustrato.

Con el fin de comprobar el papel que el dominio aptámero ejercía sobre esta unión se diseñó una batería de moléculas con las secuencias seleccionadas de los distintos representantes y se realizaron estudios predictivos de estructura secundaria para determinar la mínima secuencia requerida para el mantenimiento de la estructura del dominio. En todos los casos se incluyó la secuencia seleccionada de 25 nt, y en algunos fue necesario la introducción de las secuencias flanqueantes para conservar la estructura secundaria. El DNA molde para la síntesis por transcripción *in vitro* de los distintos aptámeros se obtuvo mediante hibridación y extensión de los oligonucleótidos T7ap24, T7ap31, T7ap53, T7ap10, T7ap50, T7ap17, T7ap18 y T7ap32 con un oligonucleótido complementario, T7gg. La secuencia de todos ellos aparece recogida en la tabla R.4.

Nombre	Secuencia del oligonucleótido
T7gg	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG G -3'
T7ap24	5'- GGA TCC GGT GTT GGG GAC CTG CTC GGA CGG CCC <u>TAT AGT GAG TCG TAT TA</u> - 3'
T7ap31	5'- GGC AAG AAG GAG CCA TAC CTT CTA CCC <u>TAT AGT GAG TCG TAT TA</u> - 3'
T7ap53	5'- GGA TCC GCT CAG GCG TGG GAA GAA AAG CTG AAT CAC <u>TAT AGT GAG TCG TAT TA</u> - 3'
T7ap10	5'- GTA GGA TTA CGA ATC ACT CAG AAC <u>CTA TAG TGA GTC GTA TTA</u> -3'
T7ap50	5'- GCT CTA CCC ATG ATG TAG AAC AAG <u>CCT ATA GTG AGT CGT ATT A</u> -3'
T7ap17	5'- GGA TCC GTG GGT AAA GTC TCA TGT GGC GAC GCC <u>CTA TAG TGA GTC GTA TTA</u> - 3'
T7ap18	5'- GGA TCC GGC AGC CAT AAT CCG AAG CTA ATC CCC <u>TAT AGT GAG TCG TAT TA</u> - 3'
T7ap32	5'- TGG ATC CGC TCA GTA GTT GGT TAC CAA TCG CGA ATG CCC <u>TAT AGT GAG TCG TAT TA</u> - 3'

Tabla R.4.- Secuencias de los ODN empleados para la síntesis de los correspondientes RNAs aptámeros.

Los ensayos se realizaron de manera similar a la descrita para los RNAs quiméricos. Los resultados obtenidos (Fig. R.18.) reflejan que los aptámeros por sí mismos no son capaces de asociarse de manera estable al sustrato, con excepción de Ap10 y Ap18, para los cuales los valores de Y_{max} y de K_d se encuentran próximos a los descritos en el caso de los RNAs quiméricos (tabla R.5).

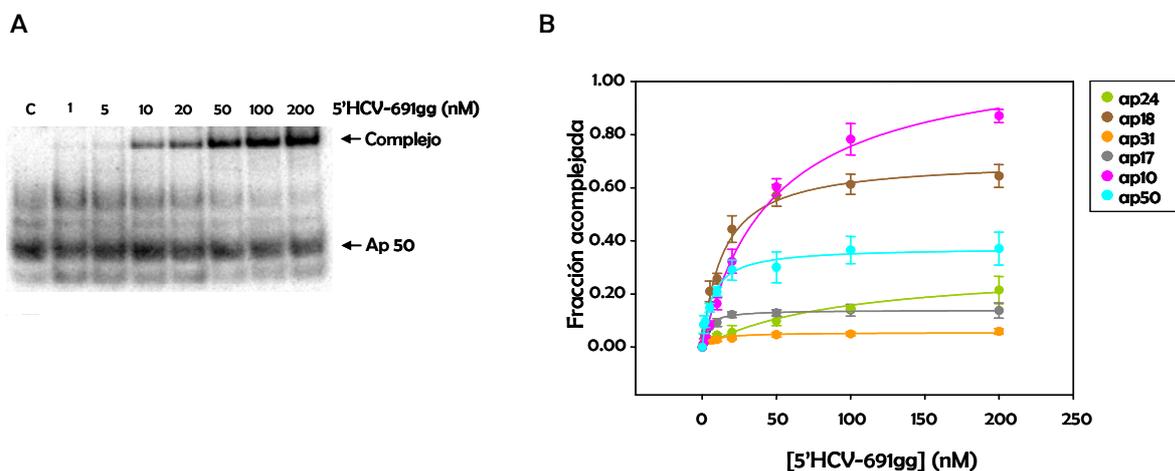


Fig. R.18.- Asociación de los RNAs aptámeros al sustrato 5'HCV-691gg. A) Autorradiografía de un gel de poliacrilamida en la que se muestra un ensayo representativo de asociación entre un RNA aptámero y el sustrato. B) Representación gráfica de las cinéticas de unión para los distintos aptámeros ensayados. Cada punto es el resultado de cuatro experimentos independientes.

RNA	$K_d \pm \text{d.s. (nM)}$	E	$Y_{\text{max}} \pm \text{d.s.}$
Ap24	91.89 ± 28.58	45.94	21.47 ± 5.1
Ap31	7.25 ± 2.05	3.62	5.91 ± 1.09
Ap53	n.d.	n.d.	n.d.
Ap10	46.87 ± 4.99	23.43	87.08 ± 2.48
Ap50	7.00 ± 1.02	3.5	37.08 ± 6.22
Ap17	3.42 ± 0.49	1.71	13.79 ± 2.85
Ap18	13.96 ± 1.74	6.98	64.43 ± 4.31
Ap32	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla R.5.- Parámetros cinéticos para los RNAs aptámeros. E indica el exceso de RNA sustrato necesario (nM) para alcanzar el valor de K_d . Y_{max} supone la extensión de la reacción a concentración infinita de RNA sustrato. d.s., desviación estándar. Los valores mostrados se obtuvieron tras realizar cuatro experimentos independientes.

R.5.- Ensayos de procesamiento *in vitro* del RNA sustrato por los RNAs quiméricos

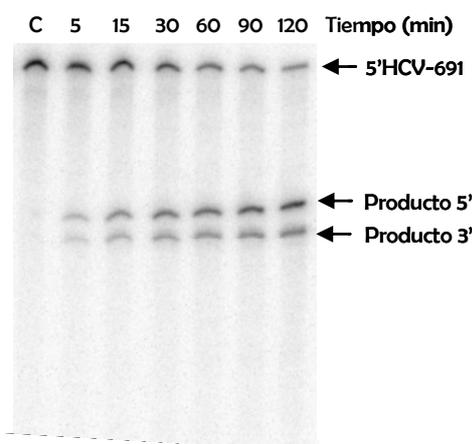
Una vez comprobada la capacidad de asociación de los RNAs quiméricos al sustrato, se procedió a analizar el posible efecto que el dominio aptámero ejercía sobre la actividad del dominio catalítico, para lo cual se realizó la caracterización cinética de la reacción de corte catalizada por los distintos inhibidores. Para ello se eligió el sustrato utilizado durante el segundo paso de selección, 5'HCV-691, y los resultados obtenidos fueron comparados con los correspondientes a la molécula HH363.

La determinación de las constantes cinéticas para los distintos RNAs inhibidores se realizó en situación de “no-recambio” o *single turnover*, y las condiciones establecidas fueron análogas a las empleadas para la caracterización de HH363.

Los resultados obtenidos para los RNAs quiméricos así como para la ribozima HH363 y el RNA C- (descrito en el apartado anterior) quedan recogidos en la figura R.19 y en la tabla R.6. Se observó un empeoramiento en la catálisis de los inhibidores quiméricos

con respecto al motivo catalítico HH363. En todos los casos la extensión final de la reacción resultaba inferior, e incluso en algunos casos resultó difícil detectar procesamiento. Por otro lado, el tiempo requerido por el RNA quimérico para conseguir que ocurriera el 50% del procesamiento ($t_{1/2}$) resultaba superior al empleado por la ribozima. Estos resultados indican que la adición de un dominio aptámero en 3' de HH363 dificulta su actividad catalítica

A



B

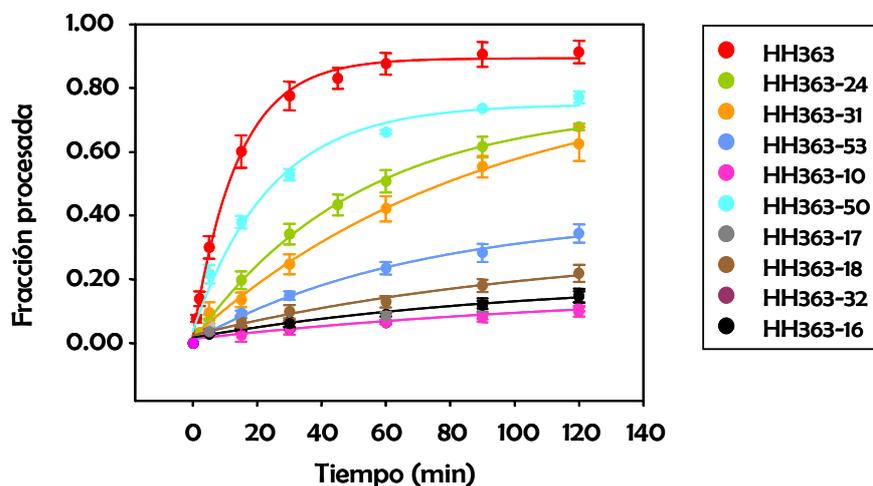


Fig. R.19.- Caracterización cinética del procesamiento de 5'HCV-691 por los RNAs quiméricos. A) Autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el que se muestra un ensayo representativo de procesamiento del sustrato 5'HCV-691 por un RNA quimérico. El RNA sustrato fue marcado internamente con ^{32}P . Se indican los productos de corte así como la molécula 5'HCV-691. B) Representación gráfica de las distintas cinéticas de corte del RNA sustrato realizadas con los RNAs quiméricos.

RNA	k_{obs} (min^{-1}) \pm d.s	k_{rel}	$t_{1/2}$ (min)	$a \pm$ d.s
HH363	0.072 ± 0.004	1	9.63	87.60 ± 1.46
C-	0.024 ± 0.010	0.33	34.66	18.54 ± 2.97
HH363-24	0.019 ± 0.001	0.26	36.48	73.98 ± 0.94
HH363-31	0.011 ± 0.002	0.15	63.01	83.11 ± 9.55
HH363-53	0.014 ± 0.003	0.19	49.51	39.87 ± 3.35
HH363-10	0.010 ± 0.007	0.14	69.31	18.55 ± 7.86
HH363-50	0.042 ± 0.006	0.58	16.50	71.43 ± 3.81
HH363-17	0.007 ± 0.007	0.01	99.02	15.90 ± 10.36
HH363-18	0.009 ± 0.007	0.12	77.02	29.09 ± 13.76
HH363-32	0.235 ± 0.060	3.26	2.95	23.07 ± 4.49

Tabla R.6.- Procesamiento de 5'HCV-691 por los RNAs quiméricos. k_{rel} indica el valor de la constante k_{obs} normalizado con el obtenido para HH363; a es la extensión final de la reacción a tiempo infinito; d.s, desviación estándar. Los datos mostrados son el resultado de cuatro experimentos independientes.

R.6.- Determinación de las secuencias implicadas en la unión a la región 5'UTR

La actividad biológica de una molécula de RNA viene determinada por su estructura tridimensional, la cual queda definida por los enlaces de hidrógeno establecidos entre bases complementarias así como por las interacciones terciarias inter- e intramoleculares que definen el plegamiento global de la molécula. Actualmente, existen múltiples programas informáticos que permiten predecir, a través de distintos algoritmos, la estructura secundaria de un ácido nucleico. Para el estudio llevado a cabo en esta memoria se ha optado por el programa informático MFold, al cual se accede a través de la dirección web <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold> (Zuker, 1989; Jaeger *et al.*, 1990; Zuker, 2003). El principal problema de esta aproximación es su poca fiabilidad cuando se desconoce por completo la conformación adoptada por la molécula en estudio.

Como alternativa al análisis predictivo, se han llevado a cabo estudios de protección a la degradación selectiva y parcial con RNAsas y agentes químicos. La base de esta aproximación la constituye el hecho de que la estructura del RNA determina el grado de

modificación de las unidades que la componen, es decir, los nucleótidos. Por tanto, si se conoce la especificidad del agente modificador, se pueden inferir las características estructurales de la molécula de RNA sometida a la modificación. Existen varios tipos de agentes que inducen cambios en los nucleótidos: nucleófilos, electrófilos y agentes alquilantes, oxidantes, agentes hidrolíticos y nucleasas. De todos ellos, las nucleasas han sido, junto con Pb^{2+} , los más empleados dada la facilidad de su uso y a la rapidez con la que se consiguen los resultados. El principal problema presentado por las nucleasas es su gran tamaño, de manera que presentan el acceso restringido a determinadas regiones. Por otro lado, su interacción con la molécula de RNA puede inducir cambios conformacionales, por lo que los resultados obtenidos deben de ser validados mediante la realización de tratamientos alternativos con agentes químicos, como Pb^{2+} . En el análisis realizado en esta Tesis Doctoral se eligieron dos RNAsas, T1 y A, y un agente químico, Pb^{2+} , para llevar a cabo el mapeo de estructura secundaria tanto de los RNAs quiméricos como del RNA sustrato.

La RNasa T1, obtenida a partir del hongo *Aspergillus orizae*, procesa de una manera específica en 3' los nucleótidos de guanina que se encuentran expuestos en regiones de cadena sencilla, generándose productos con un extremo 3'-fosfato (revisado en (Ehresmann *et al.*, 1987)).

La RNasa A, es capaz de procesar en una molécula de RNA, bajo determinadas condiciones y de manera específica, nucleótidos de citosina o de uracilo en 3' que se encuentran expuestos en regiones de cadena sencilla.

Como agente químico se empleó el ion plomo (Pb^{2+}). Debido al carácter polianiónico del RNA, su estructura puede quedar alterada bajo determinadas condiciones iónicas. En concreto, los iones plomo han sido ampliamente utilizados tanto *in vitro* ((Brunel *et al.*, 1991; Kazakov y Altman, 1992), entre otros), como *in vivo* (Lindell *et al.*, 2002) en la degradación controlada y específica del RNA. Así, una molécula de RNA puede sufrir el ataque nucleofílico de los iones plomo en el extremo 3' de nucleótidos altamente expuestos, y que puede culminar, finalmente y si no se impide la reacción química, en la degradación total del RNA.

R.6.1.- Estudio de los RNAs quiméricos

El estudio de los nucleótidos de los RNAs quiméricos implicados en la interacción con el sustrato se hizo mediante ensayos de protección a la degradación por RNAsas específicas, así como por Pb^{2+} .

Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo sobre los RNAs quiméricos marcados radiactivamente con ^{32}P en su extremo 5'. De manera previa a las reacciones de degradación, se realizaron ensayos de asociación de los RNAs seleccionados con el sustrato 5'HCV-356, tal y como se ha descrito en apartados anteriores. Se desnaturalizaron 50 fmol de RNA marcado radiactivamente durante 7 min a 65°C y seguidamente se renaturalizaron 10 min a 37°C. La reacción de asociación se inició por la adición de 10 pmol de RNA sustrato (5'HCV-356) no marcado, igualmente desnaturalizado, y las condiciones de fuerza iónica quedaron establecidas durante todo el proceso por la adición de tampón TMN. Se establecieron reacciones control en las que se incubaba el RNA marcado radiactivamente con un RNA no relacionado de tamaño similar al RNA sustrato (334 nt) y que se denominó RNA-334. Esta molécula se obtuvo por transcripción *in vitro*, utilizando como DNA molde el fragmento que se genera tras la digestión del plásmido pBSSK con el enzima *PvuII*. Después de 30 min de incubación a 37°C, se detuvo la formación de complejo en hielo. Para el tratamiento con RNasa T1 se incubó el complejo en presencia de 1.5 µg de tRNA y 0.1 U de RNasa T1, durante 3 min a 37°C. El tratamiento con RNasa A se realizó bajo condiciones similares y con 0.1 ng de nucleasa. En ambos casos las reacciones se detuvieron por enfriamiento a 4°C y la adición de tampón de carga desnaturizante suplementado con EDTA (50 mM). En cuanto a la degradación con Pb^{2+} , las moléculas de RNA fueron incubadas en una solución de acetato de plomo (1mM) y con igual cantidad de tRNA que en los casos anteriores, durante 7 min a 37°C. La reacción se detuvo de manera análoga a como se hizo para las RNAsas. Por otro lado, se realizó una hidrólisis alcalina con un tampón compuesto de carbonato y bicarbonato sódico al 50%, durante 2 min a 95°C, con la que se pudo determinar el tamaño de los productos de degradación. Todos ellos se resolvieron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, al 6% y de alta resolución. Tras el proceso de secado, los geles fueron analizados en un escáner de fluorescencia (Storm 820, Molecular Dynamics).

Los resultados de susceptibilidad a la degradación obtenidos para cada inhibidor quimérico se utilizaron para predecir su estructura secundaria mediante el empleo del programa MFold.

R.6.1.1.- Grupo 1. Variante HH363-24

El análisis experimental de la protección frente a RNasas y Pb^{2+} realizado con la variante HH363-24 se muestra en la figura R.20A. En el dominio aptámero se detectó sensibilidad a la hidrólisis de los nucleótidos constituyentes del motivo consenso (posiciones 54-59) y en los residuos 70-73. Las secuencias que flanquean el consenso aparecían resistentes al procesamiento por Pb^{2+} . Asimismo, las posiciones 64 y 76 eran débilmente procesadas por RNasa T1. Con estos datos se realizó un nuevo plegamiento que aparece mostrado en la figura R.20B.

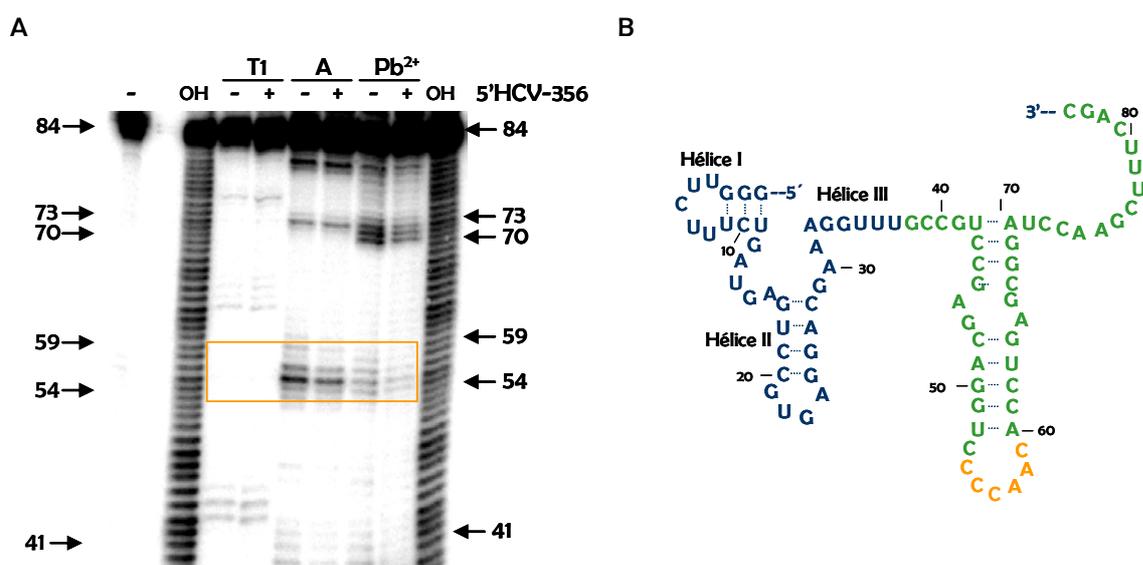


Fig. R.20.- Determinación experimental de los nucleótidos implicados en la interacción entre el dominio aptámero de HH363-24 y el RNA sustrato. A) Autorradiografía en la que se aprecia el patrón de degradación obtenido para la molécula HH363-24 con RNasa T1, RNasa A y Pb^{2+} , en ausencia (-) o en presencia del RNA sustrato 5'HCV-356. El RNA quimérico fue marcado en su extremo 5' con ³²P. Los nucleótidos que constituyen el motivo consenso se encuentran recuadrados. B) Secuencia y modelo teórico de la molécula HH363-24 obtenido mediante análisis predictivo con el programa MFold a partir del patrón de degradación mostrado en A. En azul se marcan los nucleótidos que componen el dominio HH363, en verde el dominio aptámero y en naranja el motivo consenso.

Cuando se llevó a cabo el ensayo en presencia de 5'HCV-356 se observó un cambio en la conformación del RNA quimérico con respecto a la molécula no acomplejada (Fig. R.20B). Esta modificación afectaba a las posiciones 54-59, las cuales corresponden a la secuencia consenso, lo cual sugería una implicación directa de estos residuos en la interacción con la molécula de sustrato.

R.6.1.2.- Grupo 2. Variante HH363-31

Los ensayos de protección con RNasas y Pb^{2+} mostraron que el motivo consenso se localizaba en una región sensible a la degradación (Fig. R.21A), mientras que las secuencias flanqueantes no eran procesadas. También se determinó la presencia de una región expuesta en las posiciones 61-66 (Fig. R.21A). Estos resultados se utilizaron para realizar una predicción teórica de la estructura adoptada por HH363-31 con el programa MFold (Fig. R.21B).

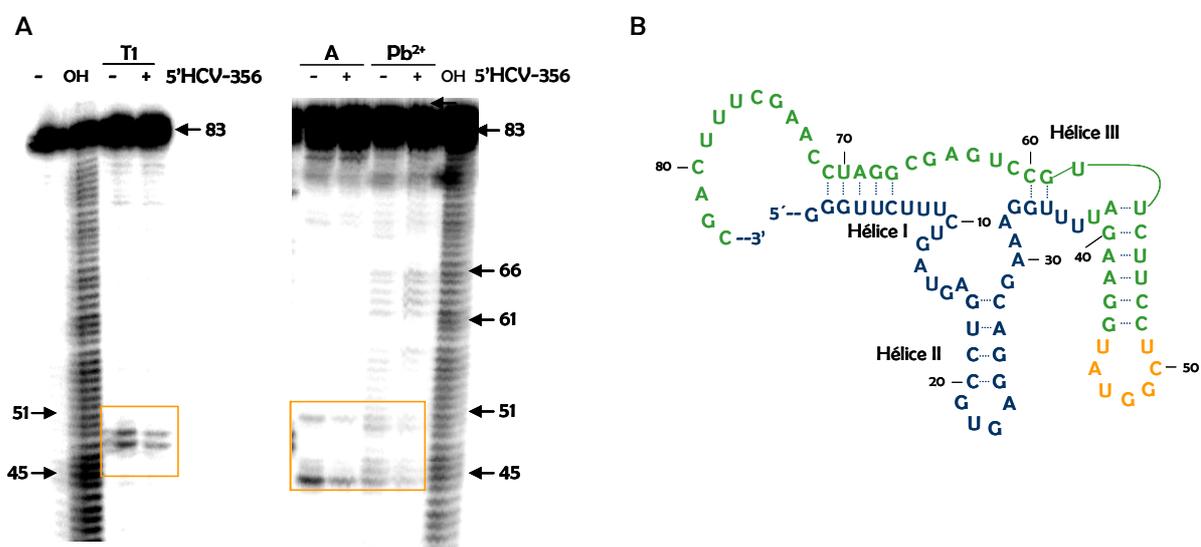


Fig. R.21.- Ensayos de protección a la degradación con RNasas y Pb^{2+} del RNA quimérico HH363-31.

A) Autorradiografía en la que se muestra el patrón de degradación obtenido para la molécula HH363-31 con RNasa T1, RNasa A o Pb^{2+} , en ausencia (-) o en presencia del RNA sustrato 5'HCV-356. El RNA inhibidor fue marcado en su extremo 5' con ³²P, mientras que el RNA sustrato se utilizó sin marcar. Los nucleótidos que constituyen el motivo consenso se encuentran recuadrados. También se identifican otros residuos a los que se hace referencia en el texto. B) Análisis predictivo para la molécula HH363-31 obtenida a partir del patrón de degradación mostrado en A. El código de colores es el empleado en la figura R.20.

Al realizar la determinación estructural en presencia del RNA sustrato se identificaron dos modificaciones (Fig. R.21A):

- Una de ellas afectaba a los residuos constituyentes del motivo consenso. La unión al sustrato determinaba una mayor resistencia al procesamiento mediado por RNAsas y por Pb^{2+} .

- La segunda suponía una mayor sensibilización a la hidrólisis por parte de los nucleótidos 62-66 una vez ocurrida la interacción con el sustrato.

Estos resultados indican que el motivo consenso para el grupo 2 se encuentra implicado en la interacción con la molécula 5'HCV-356.

R.6.1.3.- Grupo 3. Variante HH363-53

Los ensayos de degradación parcial con RNAsas y Pb^{2+} mostraron que el motivo consenso, bajo las condiciones empeladas, era débilmente procesado por los tres agentes utilizados (Fig. R.22A). La región situada en 3' (posiciones C₆₁- C₈₄) de la molécula también aparecía poco compacta, según se comprobó en el patrón de degradación con Pb^{2+} , al igual que los residuos posicionados en 5' del dominio aptámero (U₃₇GUGAUUC₄₄). Estos datos permitieron realizar un estudio predictivo de la estructura secundaria de HH363-53 con el programa MFold. El resultado se muestra en la figura R.22B.

La incubación de HH363-53 con 5'HCV-356 provocó cambios en el patrón de degradación del RNA quimérico (Fig. R.22A). La secuencia U₃₇GUGAUUC₄₄ exhibía resistencia al procesamiento tanto por RNAsas como por Pb^{2+} , lo cual sugería su importancia en la interacción con el sustrato. Por otro lado, los nucleótidos constituyentes del motivo consenso no se protegían tras la adición de 5'HCV-356, sino que se tornaban más susceptibles a la hidrólisis por Pb^{2+} . Por tanto, para esta variante no se pudo demostrar la implicación del motivo consenso en la unión al RNA sustrato.

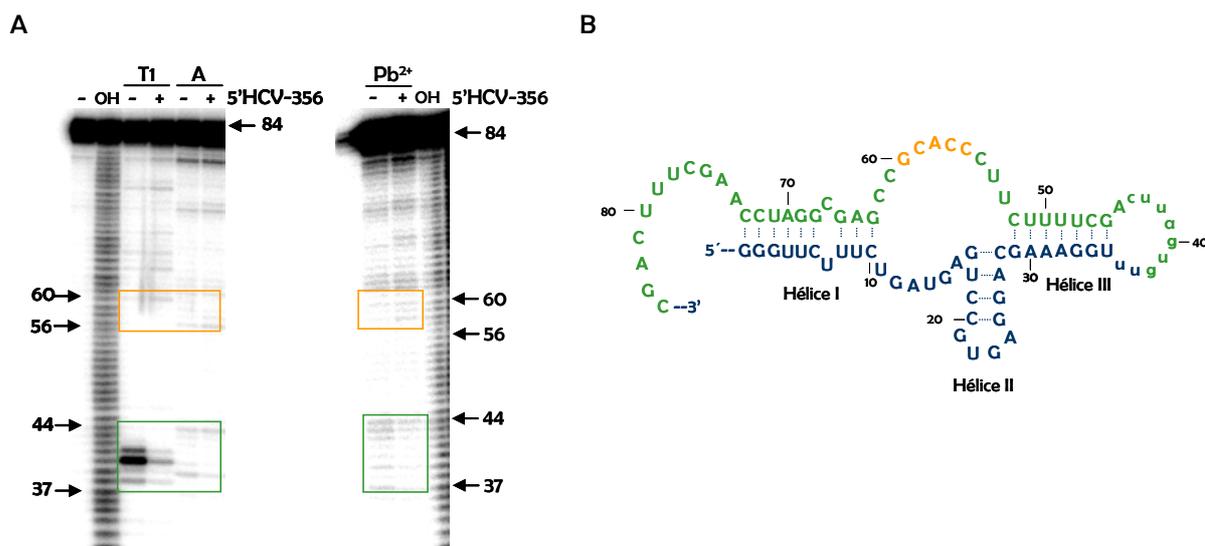


Fig. R.22.- Determinación experimental de los nucleótidos implicados de HH363-53 implicados en la interacción con el RNA sustrato. A) Autorradiografía en la que se muestra el patrón de degradación obtenido para la molécula HH363-53 (marcada en su extremo 5' con ^{32}P) con RNasa T1, RNasa A o Pb^{2+} , en ausencia (-) o en presencia (+) del RNA sustrato 5'HCV-356 (no marcado). Los nucleótidos que constituyen el motivo consenso se encuentran recuadrados en naranja. En verde se marcan los residuos del dominio aptámero que resultan protegidos tras la degradación en presencia del sustrato. También se identifican otros residuos a los que se hace referencia en el texto. B) Modelo teórico propuesto para la estructura secundaria de la molécula HH363-53 obtenido a partir del patrón de degradación mostrado en A. El código de color es análogo al descrito en la figura R.20. Los nucleótidos en minúscula se corresponden con los delimitados en A por un recuadro verde.

R.6.1.4.- Grupo 4. Variante HH363-10

En el patrón de degradación obtenido para HH363-10 se observó que los nucleótidos componentes del motivo consenso (situados en las posiciones 47-55) se encontraban expuestos, según indicaba el procesamiento por RNasas y Pb^{2+} (Fig. R.23). También se detectó sensibilidad a la hidrólisis en las secuencias flanqueantes y en la región 3' de la molécula (nucleótidos 68-82), aunque los resultados diferían en función del agente utilizado. Todo esto sugería un bajo nivel de compactación en la molécula bajo las condiciones utilizadas. Debido a las discrepancias que se obtuvieron en el análisis con los diferentes agentes hidrolíticos, no fue posible realizar una predicción teórica de la estructura adoptada por la molécula.

Cuando HH363-10 fue sometido a la hidrólisis parcial en presencia del sustrato 5'HCV-356 se observó que algunos nucleótidos del RNA quimérico sufrían cambios en la accesibilidad con respecto a la molécula sin acomplejar (Fig. R.23). Algunos de los residuos pertenecientes al motivo consenso eran más débilmente procesados cuando el sustrato estaba presente, aunque esto no era extensivo para toda la secuencia. Esta menor sensibilidad a la hidrólisis se continuaba en los residuos situados inmediatamente en 5' (G₄₂AGUG₄₆), que podrían participar en el apareamiento con el sustrato debido a la proximidad espacial de una secuencia parcialmente complementaria y a la cual se anclarían las moléculas del grupo 6. También se detectó una mayor susceptibilidad a la degradación con RNasa T1 en las posiciones 62 y 66.

Los resultados obtenidos para esta variante no permiten obtener ninguna conclusión acerca del papel del motivo consenso en la interacción con el sustrato.

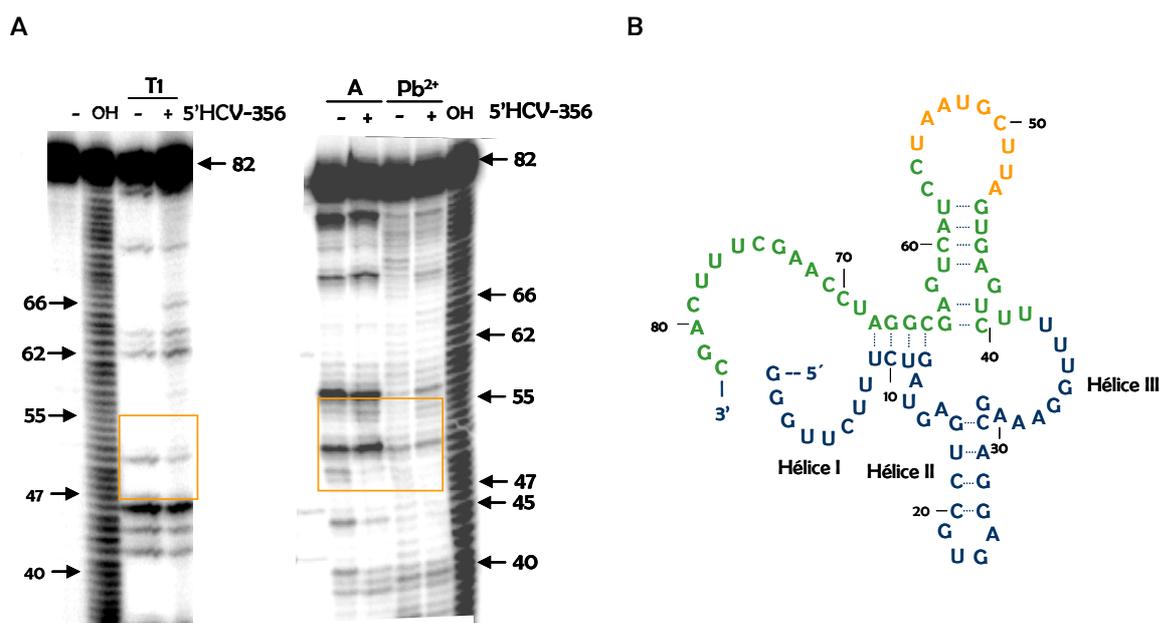


Fig. R.23.- Determinación experimental de los nucleótidos de HH363-10 implicados en la interacción con el sustrato. A) Autorradiografía en la que se aprecia el patrón de degradación obtenido para la molécula HH363-10 con RNasa T1, RNasa A o Pb²⁺, en ausencia (-) o en presencia (+) del RNA sustrato 5'HCV-356. La molécula HH363-10 fue marcada en su extremo 5' con ³²P. El RNA sustrato se utilizó sin marcar. Los nucleótidos que constituyen el motivo consenso se encuentran recuadrados en naranja. B) Plegamiento teórico propuesto para la molécula HH363-10 según los datos obtenidos en A. El código de color es el indicado en la figura R.20.

R.6.1.5.- Grupo 5. Variante HH363-50

El patrón de degradación mostró que la molécula se hallaba altamente compactada, según se deducía por su resistencia al procesamiento (Fig. R.24A). El motivo consenso (posiciones 49-55) se encontraba expuesto, mientras que las secuencias situadas en 5' y 3' del mismo resultaron resistentes al ataque hidrolítico. Sorprendentemente, no se detectó procesamiento del nucleótido G₅₅, aunque sí del G₅₄, posiblemente debido al establecimiento de una interacción entre el par A₄₉-G₅₅ que cierra el lazo. Este tipo de interacciones se han asociado con una estabilización del complejo formado entre dos lazos apicales (Duconge y Toulme, 1999; Duconge *et al.*, 2000). También se detectó la existencia de un nucleótido débilmente accesible, correspondiente a la posición 63, que podría indicar su exclusión parcial de una estructura tipo tallo. Las conclusiones de este estudio experimental se utilizaron para realizar un análisis predictivo de la estructura secundaria de HH363-50 (Fig. R.24B).

Cuando la degradación parcial de la molécula HH363-50 se llevó a cabo en presencia del sustrato 5'HCV-356 se observó un único cambio estructural que implicaba una mayor resistencia de los nucleótidos constituyentes del motivo consenso (49-55) a la hidrólisis (Fig. R.24A). Este efecto también se constató para los residuos situados inmediatamente en 5' de dicho motivo (posiciones 45-48).

Los resultados obtenidos permitieron concluir que el motivo consenso para el grupo 5 en la variante HH363-50 estaba implicado en el establecimiento de una interacción con el RNA sustrato.

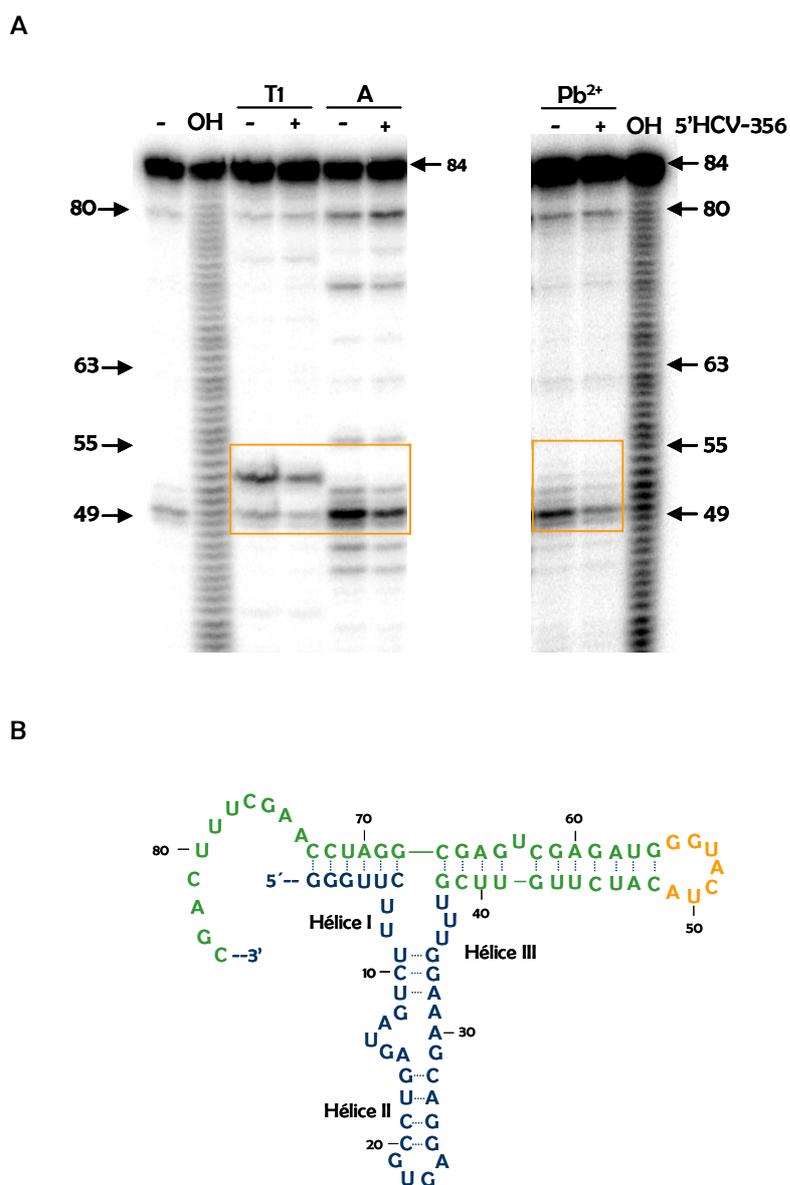


Fig. R.24.- Ensayos de protección a la degradación parcial con RNasas y con Pb^{2+} para HH363-50. A) Autorradiografía de un gel de poliacrilamida en la que se muestra el patrón de degradación obtenido para la molécula HH363-50 con RNasa T1, RNasa A y Pb^{2+} , en ausencia (-) o en presencia (+) del RNA sustrato 5'HCV-356. El RNA quimérico fue marcado en su extremo 5' con ^{32}P . Los nucleótidos que constituyen el motivo consenso se encuentran recuadrados en naranja. También se señalan otros residuos que son referidos en el texto. B) Modelo teórico de la estructura secundaria propuesta para HH363-50 utilizando el programa MFold y los datos obtenidos a partir del patrón de degradación mostrado en A. Se ha empleado el mismo código de color indicado en la figura R.20.

R.2.1.6.- Grupo 6. Variante HH363-17

Todos los representantes que componen este grupo contienen más de un motivo consenso, por lo que el estudio no se pudo realizar para moléculas puras. Se escogió la variante HH363-17, que presenta los motivos consenso para los grupos 3 y 6.

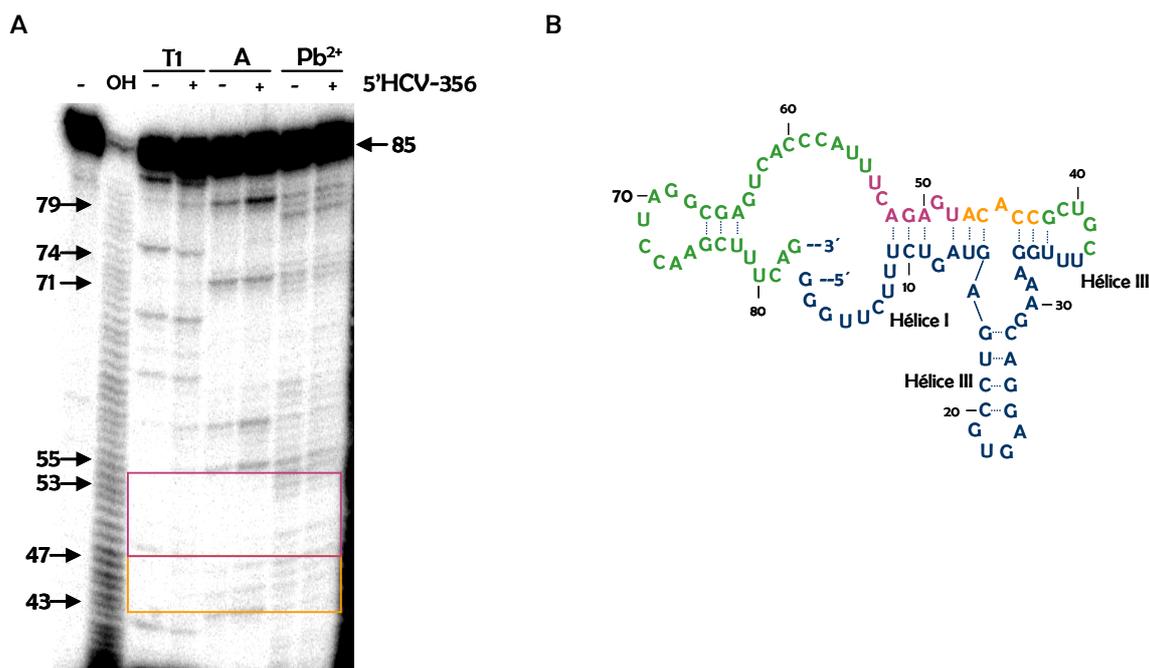


Fig. R.25.- Determinación experimental de los nucleótidos de HH363-17 implicados en la interacción con el RNA sustrato. A) Autorradiografía de un gel de poliacrilamida que muestra el patrón de degradación para HH363-17 (marcado en su extremo 5' con ³²P) obtenido en ausencia (-) o en presencia (+) de 5'HCV-356 con distintos agentes hidrolíticos. En naranja y morado se recuadran los nucleótidos correspondientes a los motivos consenso para los grupos 3 y 6, respectivamente. B) Modelo de estructura secundaria propuesto para HH363-17 obtenido a partir del patrón de degradación mostrado en A, obtenido mediante el programa MFold. El código de colores empleado para los motivos consenso corresponde con el mostrado en A. En azul se destacan los residuos componentes del dominio HH363 y en verde los del dominio aptámero.

Los datos que se obtuvieron a partir del patrón de degradación mostraron que los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 53-64 (que incluyen dos residuos constituyentes del motivo consenso para el grupo 6, C₅₃ y U₅₄) eran sensibles a la reacción de degradación llevada a cabo por los distintos agentes empleados, mientras que las secuencias adyacentes quedaban protegidas. Esto indicaba que los dos motivos consenso

presentes en HH363-17 participaban en la formación de estructuras secundarias con otros residuos de la molécula. También se apreciaron productos de hidrólisis correspondientes a los nucleótidos situados en el extremo 3' del RNA (posiciones 71-74 y 79-83). Con los datos experimentales de los que se disponía, se realizó un modelo de la estructura secundaria adoptada por la molécula con el programa MFold (Fig. R.25B).

Los ensayos de protección en presencia del RNA sustrato mostraron una mayor sensibilidad a la degradación por RNasa A en los nucleótidos U₅₆ACCC₆₀ y en la posición 81 (Fig. R.25A). No se detectó ningún otro cambio, por lo que con los resultados de los que se dispone no se puede afirmar que las secuencias consenso para los grupos 3 y 6 estén implicadas en la asociación de HH363-17 al RNA sustrato.

R.6.1.7.- Grupo 7. Variante HH363-18

Esta molécula presenta tres motivos consenso correspondientes a los grupos 2, 5 y 7. Fue escogida en representación de este último ya que ninguna de las moléculas que lo forman contiene esta secuencia como motivo único en el dominio aptámero.

Los resultados que se obtuvieron tras realizar los ensayos de protección con RNasas y con Pb²⁺ se muestran en la figura R.26. La degradación con Pb²⁺ reflejó la susceptibilidad de los residuos 52-59 al procesamiento (Fig. R.26A); en estas posiciones se encuentran superpuestos los motivos consenso 2 y 5. Se observó también la implicación del motivo consenso 7 en el establecimiento de interacciones con otras secuencias de la molécula, ya que no mostró sensibilidad a la degradación por los agentes utilizados. Finalmente, se detectó la exposición de los nucleótidos C₈₁AGC₈₄ que aparecían susceptibles a la hidrólisis. Por tanto, en este caso la estructura secundaria determinada experimentalmente coincidía con la predicha de manera teórica. Con estos datos se realizó un estudio predictivo de la estructura secundaria de HH363-18 utilizando el programa MFold (Fig. R.26B).

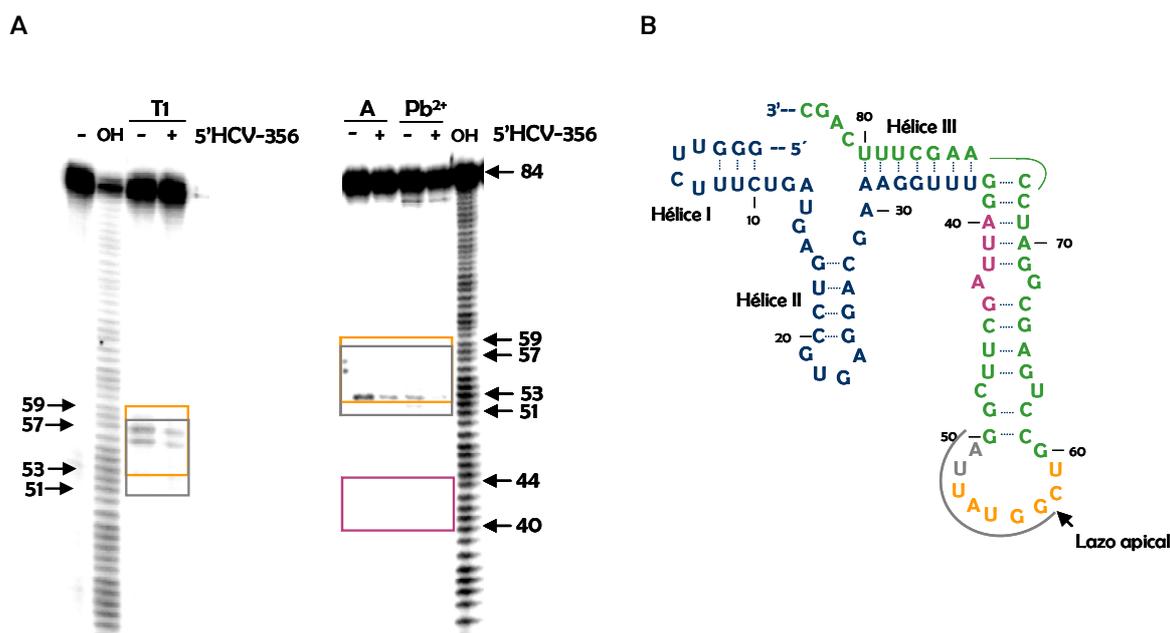


Fig. R.26.- Determinación experimental de los nucleótidos de HH363-18 implicados en la unión con el sustrato 5'HCV-356. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida en la que se aprecia el patrón de degradación para HH363-18 (marcada en su extremo 5' con ^{32}P) obtenido en ausencia (-) o en presencia (+) de 5'HCV-356 con distintos agentes hidrolíticos. En naranja, gris y morado se recuadran los nucleótidos correspondientes a los motivos consenso para los grupos 2, 5 y 7, respectivamente. B) Estudio predictivo de la estructura secundaria adoptada por HH363-18. La predicción se ha llevado a cabo utilizando el programa MFold y los datos experimentales obtenidos a partir del patrón de degradación mostrado en A. En azul y en verde se destacan los residuos de los dominios HH363 y aptámero, respectivamente. El código de colores para los motivos consenso coincide con el mostrado en A.

Cuando se incubó HH363-18 con su sustrato 5'HCV-356 previamente a la hidrólisis se descubrió la existencia de un único cambio en el patrón de degradación que afectaba a los residuos $\text{U}_{52}\text{UAUGGCU}_{59}$ (Fig. R.26A). En estas posiciones el RNA se volvía más resistente al procesamiento, lo cual sugería un papel de estos nucleótidos en la interacción con el RNA sustrato.

Con el fin de comprobar si el consenso para este grupo estaba implicado en la interacción con el sustrato se procedió a analizar la variante HH363-32.

R.6.1.7.1.- Variante HH363-32

En esta molécula la secuencia consenso para el grupo 7 se encuentra flanqueada por motivos para los grupos 4 y 1, en 5' y 3' respectivamente.

La degradación con RNasas (Fig. R.27A) mostró que los nucleótidos U₃₅UUGCAU₄₁ eran procesados específicamente por los tres agentes empleados en el ensayo. En el dominio aptámero, la secuencia nucleotídica para el motivo consenso 1 (A₅₄CCAAC₅₉) se mostraba completamente expuesta, mientras que el motivo consenso para el grupo 4 no resultaba accesible por ninguno de los agentes hidrolíticos utilizados (A₄₀UUCGCGAU₄₈). La secuencia consenso para el grupo 7 (incluido entre las posiciones 47-51) se encontraba parcialmente expuesta, ya que los residuos G₅₀ y G₅₁ eran susceptibles al tratamiento por RNasa T1 y Pb²⁺. Estos datos permitieron modelar la estructura de HH363-32 con el programa MFold. El resultado se muestra en la figura R.27B.

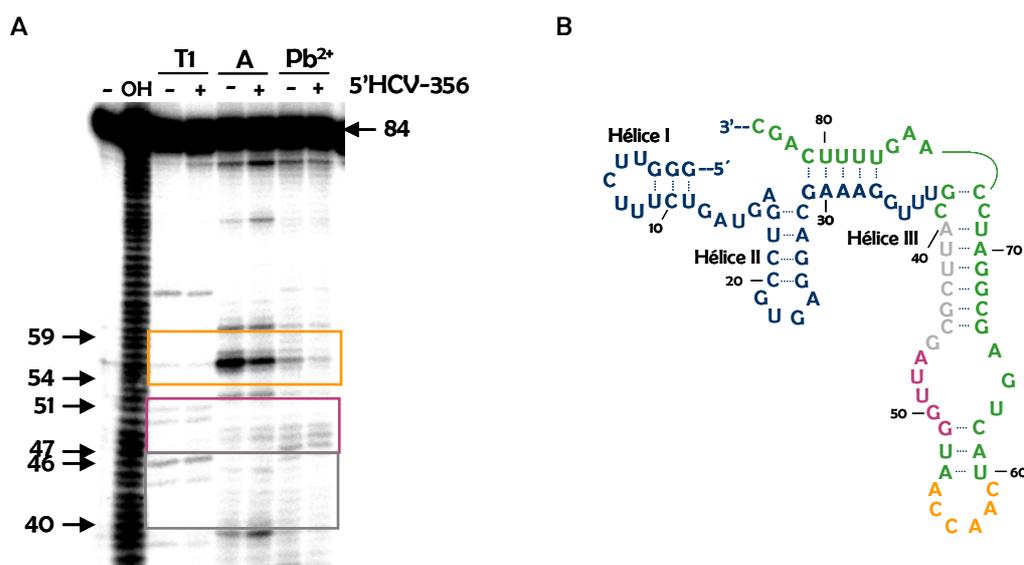


Fig. R.27.- Ensayos de protección a la degradación con RNasas y Pb²⁺ del RNA quimérico HH363-32. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida que muestra el patrón de degradación para HH363-32 obtenido en ausencia (-) o en presencia (+) de 5'HCV-356 con distintos agentes hidrolíticos. La molécula HH363-32 fue marcada en su extremo 5' con ³²P. En naranja, gris y morado se recuadran los nucleótidos correspondientes a los motivos consenso para los grupos 1, 4 y 7, respectivamente. En azul se destacan los residuos del dominio HH363 que aparecen protegidos tras la asociación con el sustrato 5'HCV-356. B) Modelo teórico de la estructura secundaria de HH363-32 obtenido mediante el programa MFold a partir de los resultados de protección mostrados en A. En azul se muestran los nucleótidos que componen el dominio catalítico y en verde el dominio aptámero. El código de colores coincide con el mostrado en A.

La asociación al RNA sustrato provocó que la secuencia A₅₄CCAAC₅₉ (consenso para el grupo 1) quedase protegidas, tal y como indicaba su resistencia al procesamiento (Fig. R.27A). No se detectó ningún cambio en la sensibilidad a la degradación para los nucleótidos constituyentes de los consensos 4 y 7, por lo que no fue posible concluir su papel en la asociación a 5'HCV-356.

R.6.2.- Determinación de los lugares de unión en el RNA sustrato 5'HCV-356

Una vez identificadas las secuencias de los RNAs inhibidores implicadas en la interacción con el RNA sustrato, se procedió a la determinación de los lugares de anclaje en la molécula 5'HCV-356.

Para ello el RNA 5'HCV-356 fue sometido a un estudio de protección con RNasas (T1 y A) o con Pb²⁺, de manera similar al realizado en el caso de los RNAs quiméricos, y el patrón de degradación se comparó con el obtenido en presencia de los distintos representantes de cada grupo.

El RNA sustrato fue marcado en su extremo 5' con ³²P, y posteriormente incubado con las variantes escogidas de cada familia. Todas las moléculas de RNA utilizadas durante estos ensayos fueron desnaturalizadas durante 7 min a 65°C y renaturalizadas posteriormente 10 min a 37°C, de manera previa a su utilización. La reacción de asociación se llevó a cabo con un exceso de RNA quimérico de 200 veces en tampón TMN, según se describe en Materiales y métodos. Se detuvo la formación del complejo mediante enfriamiento rápido a 4°C y seguidamente fue sometido a degradación parcial con RNasa T1, con RNasa A y con una solución de acetato de plomo. Durante todo el proceso la concentración de Mg²⁺ se mantuvo en 10 mM, por un lado para favorecer la formación del complejo y por otro para permitir la adquisición de una estructura terciaria funcional del IRES (Kieft *et al.*, 1999). Las condiciones empleadas (tanto de reacción como de electroforesis) fueron idénticas a las descritas en el apartado anterior para los RNAs quiméricos.

R.6.2.1.- Grupo 1. Variante HH363-24

El lazo apical del dominio IIIId ($G_{263}UUGGG_{268}$) es el lugar definido de manera teórica para la unión del motivo consenso del grupo 1. Se trata de una zona altamente accesible en el IRES, tal y como se demuestra con los ensayos de degradación con RNasas y con Pb^{2+} (Fig. R.28). La unión de HH363-24 al RNA sustrato provocó un cambio en la accesibilidad de los residuos incluidos en el lazo apical del dominio IIIId, que se volvieron más resistentes a la hidrólisis (Fig. R.28). También se observó que el nucleótido en posición 82 y algunos de los residuos flanqueantes eran menos susceptibles a la degradación en presencia del RNA quimérico. Otro cambio detectable ocurría en la secuencia $G_{118}ACCCC_{124}$. Estos nucleótidos aparecían fuertemente protegidos del ataque hidrolítico cuando el sustrato quedaba acomplejado con HH363-24. Este último patrón fue observado también para el resto de variantes, lo cual sugiere un papel del dominio común HH363 en la interacción con el RNA sustrato. Este resultado será abordado en mayor detalle en el apartado R.6.3.

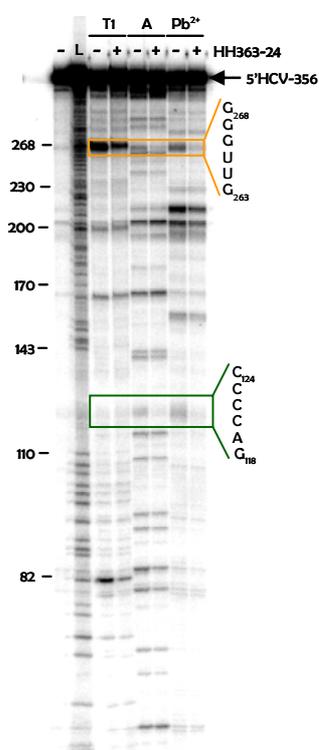


Fig. R. 28.- Mapeo experimental de los nucleótidos de 5'HCV-356 implicados en la interacción con HH363-24. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el que se muestra el patrón de degradación para la molécula 5'HCV-356 en ausencia (-) o en presencia (+) de HH363-24. El RNA sustrato fue marcado en su extremo 5' con ^{32}P , el RNA inhibidor se utilizó sin marcar. En naranja aparecen recuadrados los nucleótidos correspondientes al lugar de anclaje para el motivo consenso. En verde se recuadran los residuos 118-124, que aparecen protegidos tras la adición del RNA quimérico. L = Marcador de pesos moleculares realizado con RNasa T1 sobre la molécula de RNA 5'HCV-356 en condiciones desnaturalizantes.

R.6.2.2.- Grupo 2. Variante HH363-31

El lugar teórico de anclaje para este grupo es el lazo apical del dominio II; esta región se encuentra expuesta en la estructura del IRES, y es procesada en el RNA sustrato 5'HCV-356 (Fig R.29). Al degradar esta molécula en presencia de HH363-31, se inducía una protección en los nucleótidos constituyentes del lazo II (A₈₁GCCAUG₈₇). Este hecho permitía suponer un papel de dichos residuos en la interacción del sustrato con el inhibidor. No se detectó ningún otro cambio en la sensibilidad al procesamiento por parte del RNA sustrato, además del mencionado para las posiciones 118-124.

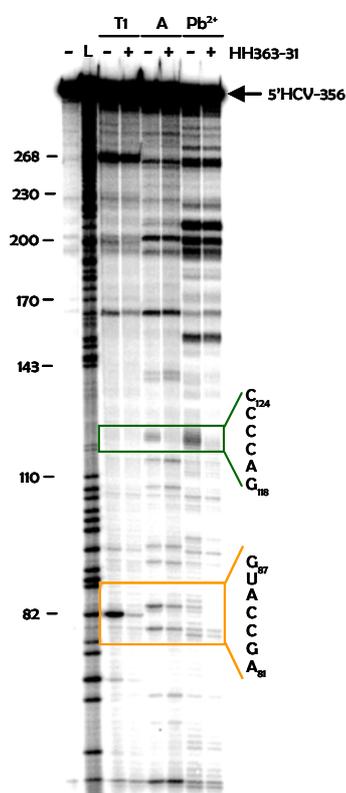


Fig. R.29.- Determinación experimental de los nucleótidos de 5'HCV-356 implicados en la interacción con HH363-31.

Autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el que se muestra el patrón de degradación para la molécula 5'HCV-356 (marcado en su extremo 5' con ³²P) en ausencia (-) o en presencia (+) de HH363-31. El código de color coincide con el indicado en la figura R.28. L = Marcador de pesos moleculares realizado con RNasa T1 sobre la molécula de RNA 5'HCV-356 en condiciones desnaturalizantes.

R.6.2.3.- Grupo 3. Variante HH363-53

El análisis del patrón de degradación del RNA sustrato en presencia de esta variante permitió la detección de un cambio en la accesibilidad que afectaba a una amplia región de 5'HCV-356, comprendida entre los nucleótidos 290-304 (Fig R.30). En ausencia del RNA quimérico esta región era parcialmente procesada por Pb²⁺, sin embargo la adición del

inhibidor inducía una menor susceptibilidad a la degradación en esos residuos, principalmente en la posición 295. No se consiguió observar, por otro lado, ninguna modificación en la accesibilidad a nivel de la secuencia teórica de anclaje (posiciones 282-286).

Estos resultados no permitieron determinar el sitio de anclaje para HH363-53.

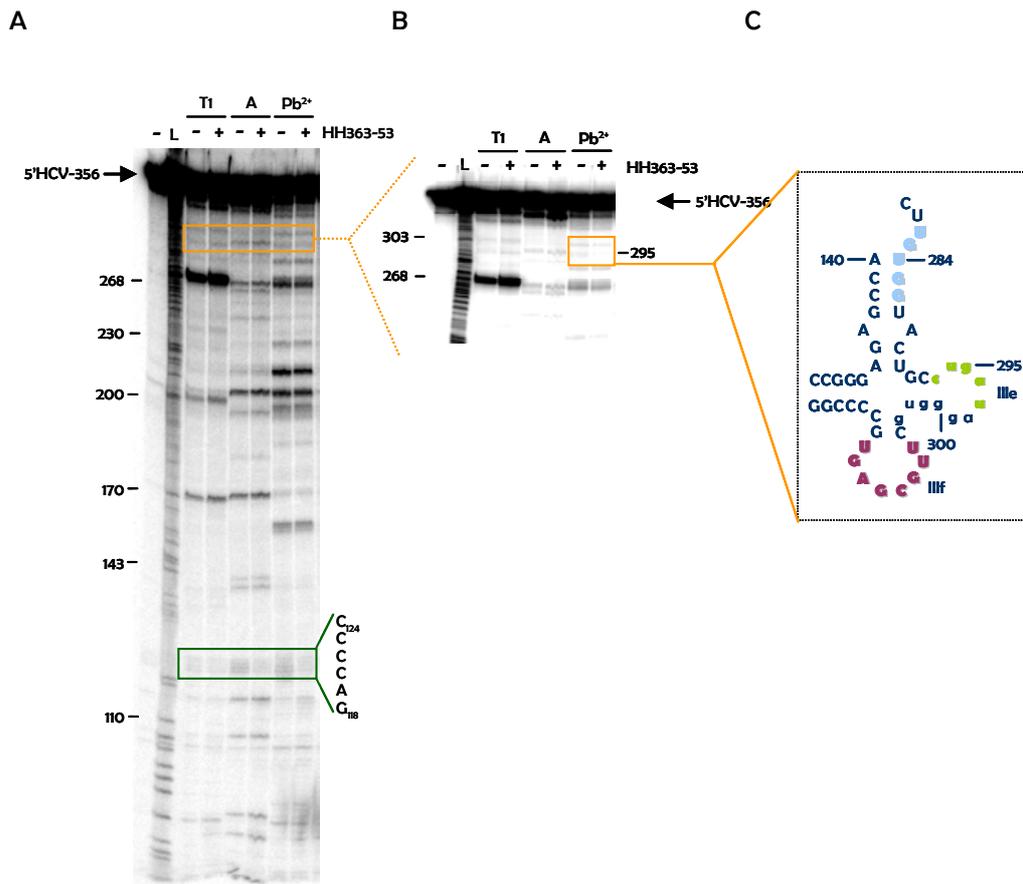


Figura R.30.- Ensayos de protección mediante degradación parcial con RNasas y Pb^{2+} del RNA 5'HCV-356 en presencia de HH363-53. A) Autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el que se muestra el patrón de degradación para la molécula 5'HCV-356 en ausencia (-) o en presencia (+) de HH363-53. El RNA sustrato fue marcado en su extremo 5' con ^{32}P . El código de color coincide con el descrito en la figura R.28. B) Imagen ampliada en la que se aprecia la protección ocurrida tras la adición del RNA inhibidor entre los nucleótidos 290-305. C) Estructura secundaria de la región de 5'HCV-356 que resulta protegida tras la adición de HH363-53. En minúscula se muestran los nucleótidos que se protegen como consecuencia de la formación del complejo entre las dos moléculas. En azul, morado y verde se destacan los residuos que participan teóricamente en el anclaje de los motivos consenso 3, 4 y 7, respectivamente. L = Marcador de pesos moleculares realizado con RNasa T1 sobre la molécula de RNA 5'HCV-356 en condiciones desnaturizantes.

R.6.2.4.-Grupo 4. Variante HH363-10

Se realizaron ensayos de protección en el RNA 5'HCV-356 con RNasas T1 y A, así como con Pb^{2+} , para identificar el lugar de anclaje de HH363-10. Con esta aproximación no se pudieron detectar cambios en la accesibilidad de residuos del RNA sustrato en presencia del RNA inhibidor (Fig. R.31A). Esto posiblemente sea debido a que la secuencia teórica de anclaje para HH363-10 se encuentra incluida en el dominio *pseudoknot*, una región altamente estructurada y resistente a la degradación por los agentes hidrolíticos empleados en el estudio. Únicamente se confirmó la protección en las posiciones 118-124, ya detectada para otras variantes.

Nombre	Secuencia del ODN	Secuencia diana
asIRES-196	5'- TAT CCA AGA -3'	5'- U ₁₉₆ CU UGG AUA ₂₀₄ -3'
asIRES-280	5'- ACC ACA AG -3'	5'- C ₂₈₁ UU GUG GU ₂₈₈ -3'
asIRES-304	5'- ACT CGC AA -3'	5'- U ₃₀₅ UG CGA GU ₃₁₂ -3'
asIRES-321	5'- ACG AGA CCU -3'	5'- A ₃₂₁ GG UCU CGU ₃₂₉ -3'

Tabla R.7.- Secuencias de los ODN utilizados en los ensayos de degradación con RNasa H, así como su secuencia complementaria en el RNA sustrato.

Como aproximación alternativa se realizaron ensayos de degradación con RNasa H. Este enzima es capaz de procesar específicamente los heterodúplex DNA-RNA y ha sido ampliamente utilizado en estudios de accesibilidad en moléculas de RNA de gran tamaño (revisado en (Frank y Goodchild, 1997)). La estrategia consiste en la utilización de oligonucleótidos de DNA de 6-8 residuos complementarios a una secuencia de un RNA. Si este motivo se encuentra expuesto en la molécula, entonces podrá interaccionar con su ODN complementario y formar un heterodúplex que será reconocido y procesado por la RNasa H. En el caso que nos ocupa se diseñó un ODN complementario de la región teórica de anclaje para HH363-10 (asIRES-304; tabla R.7). Si el RNA inhibidor utiliza como lugar de interacción con el sustrato la secuencia implicada en la hibridación del ODN, entonces se establece una competición entre ambas moléculas que queda reflejada por una disminución en la proporción de productos derivados del tratamiento con RNasa H.

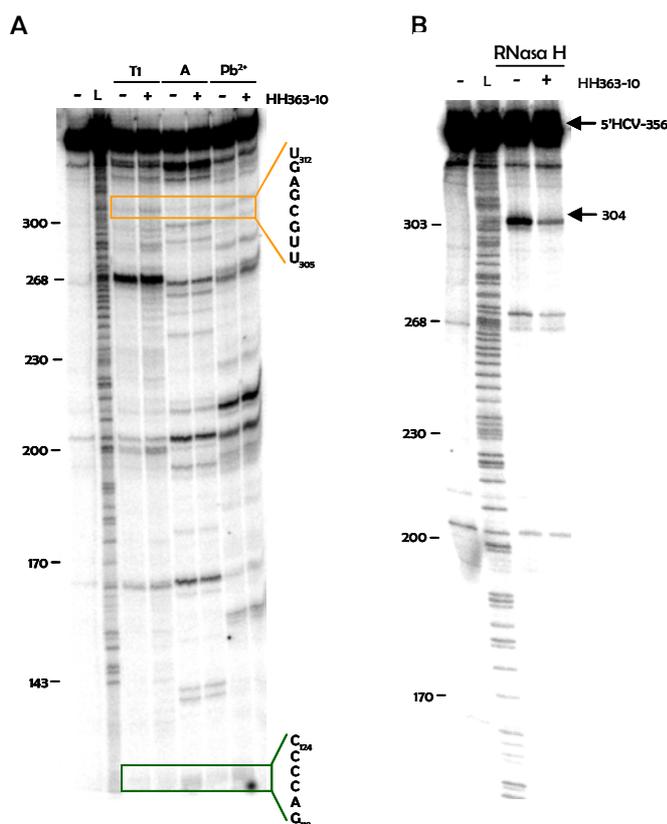


Fig. R.31.- Determinación de las secuencias del sustrato 5'HCV-356 implicadas en la interacción con HH363-10. A) Autorradiografía de un gel de poliacrilamida que muestra el patrón de degradación de 5'HCV-356 (marcado en su extremo 5' con ^{32}P) en ausencia (-) o en presencia (+) de HH363-10, obtenido con RNasa T1, RNasa A o Pb^{2+} . El código de color es el mismo que el empleado en la figura R.28. B) Degradación de 5'HCV-356 con RNasa H en presencia del ODN asIRES-304. Se muestran las reacciones ensayadas sin (-) o con (+) RNA quimérico. Se indica con una flecha el producto de procesamiento específico. L = Marcador de pesos moleculares realizado con RNasa T1 sobre la molécula de RNA 5'HCV-356 en condiciones desnaturalizantes

Se llevó a cabo el ensayo realizando, en primer lugar, una reacción de asociación entre el RNA sustrato 5'HCV-356, marcado radiactivamente en su extremo 5', y HH363-10, tal y como se describe en Materiales y métodos. A continuación se incubó el complejo formado con 5 pmol de ODN asIRES-304, complementario a la región 5'UTR desde el nucleótido 305 al 312, y finalmente se trató con 0.5 U de RNasa H durante 20 min a 30°C. Los resultados obtenidos se muestran en la figura R.31B. El sitio diana en el RNA sustrato resultó parcialmente accesible al ODN que se había diseñado, generándose un producto de corte del tamaño esperado (304 nt). La fracción de RNA procesado disminuía en un 33%

cuando se formaba el complejo ribozima:sustrato previamente a la reacción de corte. La utilización de un ODN complementario al lazo apical del dominio IIIb (asIRES-196) daba lugar a un producto de corte específico de 201 nt (datos no mostrados), cuya proporción no se veía modificada cuando el ensayo se realizaba en presencia de HH363-10. Este resultado sugería que la interacción entre el RNA inhibidor y el sustrato era específica y que implicaba a las posiciones 305-312, constituyentes del motivo *pseudoknot*.

R.6.2.5.- Grupo 5. Variante HH363-50

El lazo apical del dominio IV en el IRES de HCV (posiciones 340-345) es el lugar de unión teórico para esta variante. Cuando el RNA 5'HCV-356 fue degradado con RNasas y Pb^{2+} se observó que esta región se encontraba accesible (Fig. R.32). Sin embargo, en presencia del inhibidor estos residuos se volvían resistentes a la hidrólisis.

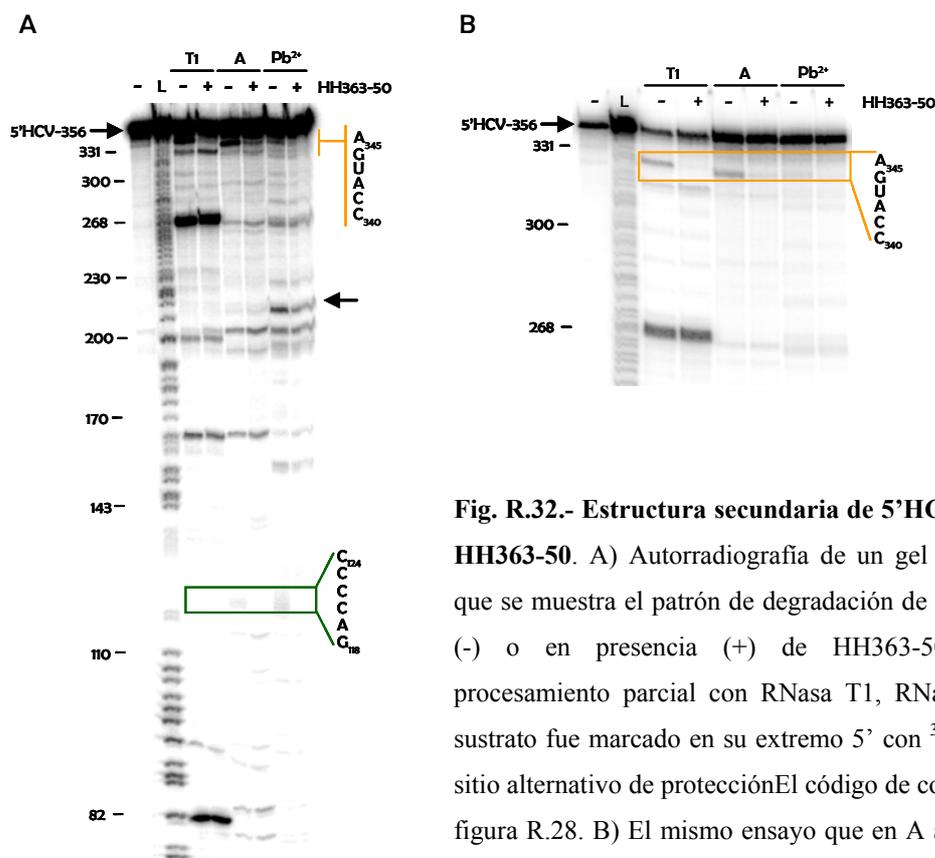


Fig. R.32.- Estructura secundaria de 5'HCV-356 en presencia de HH363-50. A) Autorradiografía de un gel de poliácridamida en el que se muestra el patrón de degradación de 5'HCV-356 en ausencia (-) o en presencia (+) de HH363-50, obtenido mediante procesamiento parcial con RNasa T1, RNasa A o Pb^{2+} . El RNA sustrato fue marcado en su extremo 5' con ^{32}P . La flecha indica un sitio alternativo de protección. El código de color es el empleado en la figura R.28. B) El mismo ensayo que en A a mayor resolución. L = Marcador de pesos moleculares realizado con RNasa T1 sobre la molécula de RNA 5'HCV-356 en condiciones desnaturalizantes.

Este resultado permitía suponer una implicación de la secuencia del lazo apical del dominio IV en la interacción con HH363-50. También se detectó una menor sensibilidad a la degradación en un nucleótido próximo a la posición 220. Al igual que para el resto de representantes, se apreció asimismo una mayor resistencia al procesamiento en las posiciones 118-124.

R.6.2.6.- Grupo 6. Variante HH363-17

Se llevó a cabo un estudio del patrón de degradación generado por 5'HCV-356 en ausencia y en presencia de HH363-17 (Fig R.33A). Los resultados no permitieron obtener datos concluyentes acerca la importancia de los lugares de anclaje para los grupos 3 y 6 en la interacción con el RNA con el RNA quimérico HH363-17. Sin embargo, se observó que en torno a las posiciones 160 y 190 la sensibilidad a la hidrólisis por Pb^{2+} disminuía cuando el sustrato estaba acomplejado con el RNA quimérico.

Con el fin de definir de manera más precisa el lugar de anclaje para HH363-17 se optó por llevar a cabo un ensayo de accesibilidad y protección con RNasa H. Para ello se realizó el estudio con dos ODN complementarios a las regiones de unión teóricas para los grupos 3 (asIRES-280) y 6 (asIRES-321). Las condiciones empleadas fueron similares a las utilizadas en el caso de HH363-10, y los resultados derivados del ensayo se muestran en la figura R.33B. Para el ODN asIRES-280 se observaron dos productos de corte: uno con un tamaño de aproximadamente 285 nt, el cual coincidiría con la longitud esperada tras el corte en la posición de hibridación del ODN; un segundo producto de 270 nt, lugar donde termina el lazo del dominio IIIId. Los productos de corte inespecíficos por parte de la RNasa H no son infrecuentes ya que es capaz de procesar un heterodúplex mínimo constituido por cuatro apareamientos (Donis-Keller, 1979). No se pudieron apreciar cambios en la proporción del producto específico cuando HH363-17 estaba presente, sin embargo sí que se constató una protección evidente en el caso del producto de menor tamaño. Este hecho podría indicar la existencia de interacciones transitorias a este nivel que favorecen el anclaje posterior a regiones más estructuradas del RNA sustrato. Por tanto, estos resultados no permitieron obtener conclusiones acerca del papel que tiene el

lugar de anclaje para el motivo consenso 3 de la variante HH363-17 en la interacción con el sustrato.

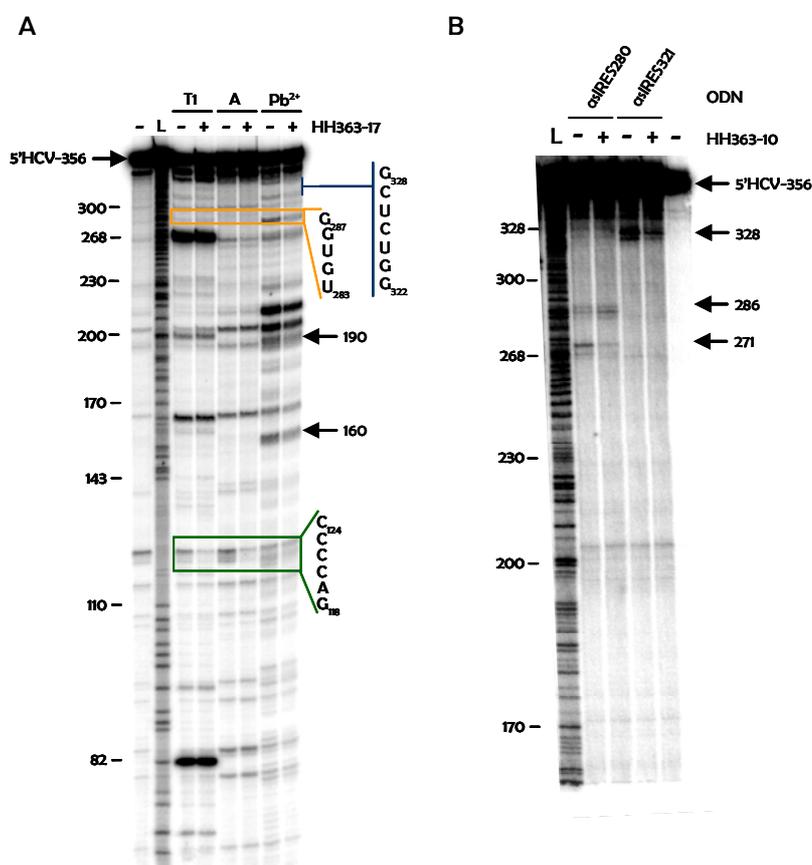


Fig. R.33.- Determinación experimental de los residuos del RNA sustrato 5'HCV-356 implicados en la interacción con HH363-17. A) Autorradiografía de un gel de poliacrilamida que muestra el patrón de degradación de 5'HCV-356 (marcado en su extremo 5' con ^{32}P) en ausencia (-) o en presencia (+) de HH363-17, obtenido con RNasa T1, RNasa A o Pb^{2+} . Los residuos delimitados en naranja constituyen el lugar de anclaje para el motivo consenso del grupo 3, mientras que en azul se señala el lugar de anclaje para el motivo consenso del grupo 6. En verde se recuadran los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 118-124, que aparecen protegidos tras la adición de HH363-10. Las flechas indican posiciones que ven modificada su sensibilidad a la degradación con Pb^{2+} en presencia del RNA quimérico. B) Degradación de 5'HCV-356 con RNasa H en presencia del ODN asIRES-321. Se muestran las reacciones ensayadas sin (-) o con (+) RNA quimérico. Se indica con una flecha el producto de procesamiento específico. L = Marcador de pesos moleculares realizado con RNasa T1 sobre la molécula de RNA 5'HCV-356 en condiciones desnaturizantes.

Por otro lado, en el caso del procesamiento en presencia del ODN asIRES-321, únicamente se apreció un producto de corte del tamaño esperado que aparecía protegido en presencia de HH363-17, lo cual permitió definir el lugar de anclaje para los representantes del grupo 6 (Fig. R.33B).

De nuevo, y de igual manera que para la variante HH363-10, la proporción del producto de corte específico generado tras la adición del ODN no relacionado asIRES-196 no se vio modificada tras la adición de HH363-17 (datos no mostrados).

R.6.2.7.- Grupo 7. Variante HH363-18

La variante HH363-18 presenta tres motivos consenso (2, 5 y 7) a través de los cuales puede interaccionar con el RNA sustrato. Los lugares de unión teóricos se localizan en el lazo apical II, en el alzo apical IV y en el dominio IIIe, respectivamente. Todos ellos fueron sensibles a la hidrólisis cuando se degradó 5'HCV-356 (Fig. R.34). La asociación entre el RNA quimérico y el sustrato provocó la protección de los residuos A₈₁GCCAUG₈₇, componentes del lazo apical del dominio II, aunque no se apreciaron cambios en el patrón de degradación para los dominios IV y IIIe (Fig. R.34). Esta variante también generaba protección en las posiciones 118-124.

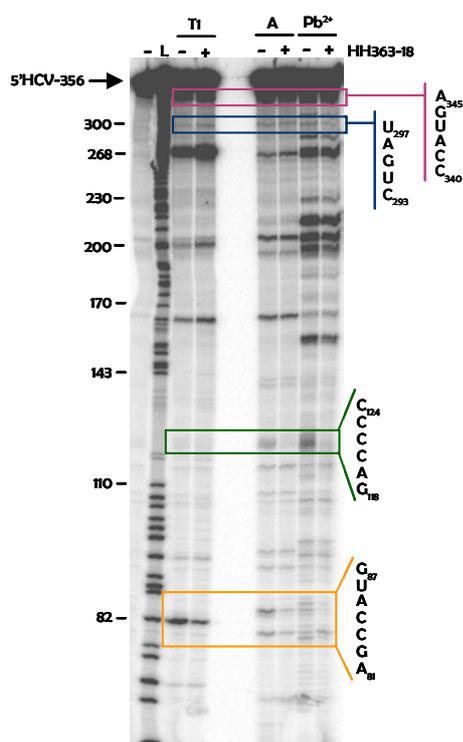


Fig. R.34.- Ensayos de protección mediante degradación parcial con RNasas y Pb²⁺ del sustrato 5'HCV-356 en presencia de HH363-18. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el que se muestra el patrón de degradación para la molécula 5'HCV-356 (marcado en 5' con ³²P) en ausencia (-) o en presencia (+) de HH363-18. En naranja aparecen recuadrados los nucleótidos que constituyen el lugar de anclaje del motivo consenso para el grupo 2, en morado para el grupo 5 y en azul para el grupo 7. En verde se recuadran los residuos 118-124, que quedan protegidos tras la adición del RNA quimérico. L = Marcador de pesos moleculares realizado con RNasa T1 sobre la molécula de RNA 5'HCV-356 en condiciones desnaturizantes.

R.6.2.7.1.- Variante HH363-32

Los tres posibles lugares de anclaje para HH363-32 se encuentran en los dominios III d (grupo 1), III e (grupo 7) y III f (grupo 4). Los dos primeros son susceptibles al ataque por agentes hidrolíticos específicos de cadena sencilla, sin embargo el último participa en la formación de la estructura *pseudoknot* y no es sensible al procesamiento (Fig. R.35). Cuando el RNA sustrato fue degradado con RNasa T1, RNasa A o Pb^{2+} en presencia de HH363-32 se observó una mayor resistencia al procesamiento por parte de los nucleótidos pertenecientes al dominio III d. También se constató este efecto aunque de manera menos evidente para el dominio III e cuando era degradado con Pb^{2+} . Estos resultados permitieron asociar estos residuos con la interacción entre el RNA sustrato y el RNA quimérico, aunque no permitieron concluir la importancia que presentaba el dominio III f en la asociación entre ambas moléculas.

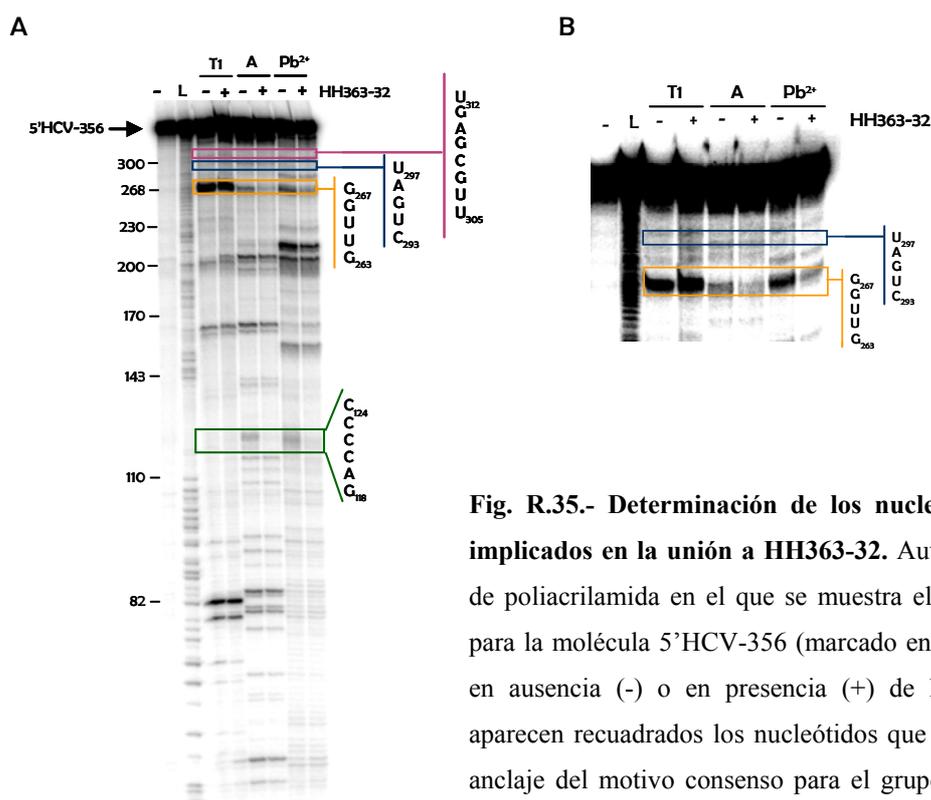


Fig. R.35.- Determinación de los nucleótidos de 5'HCV-356 implicados en la unión a HH363-32. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el que se muestra el patrón de degradación para la molécula 5'HCV-356 (marcado en su extremo 5' con ^{32}P) en ausencia (-) o en presencia (+) de HH363-32. En naranja aparecen recuadrados los nucleótidos que constituyen el lugar de anclaje del motivo consenso para el grupo 1, en morado para el grupo 4 y en azul para el grupo 7. En verde se recuadran los residuos 118-124, que quedan protegidos tras la adición del RNA quimérico. L = Marcador de pesos moleculares realizado con RNasa T1 sobre la molécula de RNA 5'HCV-356 en condiciones desnaturizantes.

En conclusión, se puede afirmar que, a excepción del grupo 3, todos los motivos consenso obtenidos por selección *in vitro* se encuentran implicados en el establecimiento de interacciones con el RNA sustrato 5'HCV-356, y que las secuencias a las que son complementarias en la región 5'UTR actúan como lugares de anclaje para dichos motivos.

R.6.3.- Determinación del papel ejercido por HH363 en la interacción de los RNAs quiméricos a su sustrato

En todos los ensayos de protección llevados a cabo sobre el RNA sustrato en presencia de los distintos inhibidores se detectó que los nucleótidos situados entre las posiciones 118-124 quedaban protegidos de la degradación. Dado que el dominio catalítico HH363 es la única secuencia común entre todas las variantes, se procedió a determinar experimentalmente la implicación de HH363 en la unión al sustrato. La ribozima fue obtenida mediante transcripción *in vitro*, utilizando como DNA molde el plásmido pBSHH363 digerido con el enzima *Bam*H1. Se realizaron degradaciones parciales del RNA sustrato 5'HCV-691gg marcado en 5' con ³²P en ausencia y en presencia de HH363, con RNasa T1, RNasa A o con Pb²⁺, de igual forma que para los RNAs quiméricos. La utilización de esta molécula en lugar de 5'HCV-356 permitiría determinar la relevancia de la unión a nivel de los residuos 118-124 en presencia del sitio diana 363. Los resultados obtenidos se muestran en la figura R.36.

En presencia de HH363 se generaba una especie molecular que implicaba al RNA sustrato y que migraba más lentamente que 5'HCV-691gg. En estas condiciones, la interacción a través de los residuos 118-124 resulta evidente, lo cual sitúa a esta región como un lugar de interacción con el motivo catalítico.

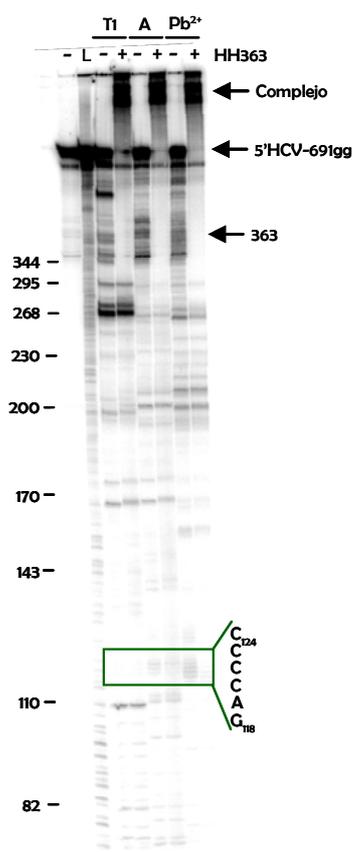


Fig. R.36.- Análisis de los nucleótidos del RNA sustrato implicados en la asociación con HH363. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida en el que se muestra el patrón de degradación para la molécula 5'HCV-691gg en ausencia (-) o en presencia (+) de HH363. El RNA sustrato fue marcado en su extremo 5' con ^{32}P , el RNA inhibidor se utilizó sin marcar. En verde se recuadran los residuos 118-124, que aparecen protegidos tras la adición de la ribozima. L = Marcador de pesos moleculares realizado con RNasa T1 sobre la molécula de RNA 5'HCV-691gg en condiciones desnaturalizantes.

Por tanto, existe un lugar alternativo de anclaje para el dominio catalítico que podría favorecer y estabilizar la unión a través de las secuencias consenso presentes en el dominio aptámero.

R.6.4.- Determinación de los nucleótidos implicados en la interacción. Conclusiones

A continuación se procederá a resumir los principales resultados obtenidos a partir de los ensayos de protección realizados tanto con los RNAs inhibidores como con el sustrato (tabla R.8).

Variante	Grupo	Consenso	Secuencia en el inhibidor	Secuencia de anclaje
HH363-24	1	5' MCCAAC 3'	5' CCCAAC 3'	5' G ₂₆₃ GUUG ₂₆₇ 3'
HH363-31	2	5' YAUGGCU 3'	5' UAUGGCU 3'	5' A ₈₁ GCCAUG ₈₇ 3'
HH363-53	3	5' CCACV 3'	5' CCACG 3'	n.d.
HH363-10	4	5' RUUCGNRAK 3'	5' AUUCGUAU 3'	5' C ₃₀₄ UUGCGAGU ₃₁₂ 3'
HH363-50	5	5' AUVRUNG 3'	5' AUCAUGG 3'	5' C ₃₄₀ CAUGAG ₃₄₆ 3'
HH363-17	3	5' CCACV 3'	5' CCACA 3'	n.d.
	6	5' YGAGWYY 3'	5' UGAGACU 3'	5' G ₃₂₂ GUCUCG ₃₂₈ 3'
HH363-18	2	5' YAUGGCU 3'	5' UAUGGCU 3'	5' A ₈₁ GCCAUG ₈₇ 3'
	5	5' AUVRUNG 3'	5' AUUGUCG 3'	n.d.
	7	5' AUURG 3'	5' AUUAG 3'	n.d.
HH363-32	1	5' MCCAAC 3'	5' ACCAAC 3'	5' G ₂₆₃ GUUG ₂₆₇ 3'
	4	5' RUUCGNRAK 3'	5' AUUCGCGAU 3'	n.d.
	7	5' AUURG 3'	5' AUUGG 3'	5' C ₂₉₃ UGAU ₂₉₇ 3'

Tabla R.8- Secuencias identificadas mediante el proceso de selección molecular *in vitro*. Se muestran los inhibidores representantes de cada grupo, las secuencias que los clasifican en las distintas familias y su lugar de anclaje determinado experimentalmente. Y = C o U; R = G o A; M = A o C; K = G o U; W = A o U; V = A, C o G; N = cualquier nucleótido; n.d. = no determinado.

R.6.4.1.- Variante HH363-24

Los ensayos de protección realizados sobre el inhibidor HH363-24 mostraron que el motivo consenso para el grupo 1 aparecía expuesto, y que la unión al RNA sustrato cambiaba el patrón de degradación provocando una disminución en el procesamiento por ribonucleasas y Pb²⁺ a nivel de los residuos C₅₄CCAAC₅₉. Estos nucleótidos quedaban expuestos en un lazo apical, según los estudios predictivos llevados a cabo con el programa MFold. Por otro lado, cuando se realizaron los ensayos de protección para la molécula 5'HCV-356, se observó que la interacción con el RNA quimérico inducía un cambio en la accesibilidad de los residuos constituyentes del lazo apical del dominio III_d; inicialmente estas posiciones eran altamente sensibles a la hidrólisis, pero la unión con HH363-24 conducía a una protección en esos nucleótidos.

Estos resultados permitieron concluir que en la interacción entre el sustrato y el RNA inhibidor se encontraban implicados los nucleótidos del motivo consenso y el lazo apical del dominio III.

R.6.4.2.- Variante HH363-31

El patrón de degradación para HH363-31 reveló la presencia del motivo consenso en una región expuesta de la molécula, que se volvía resistente a la hidrólisis tras la asociación con el RNA sustrato. Con los datos experimentales, los estudios predictivos de estructura secundaria mostraron que el motivo consenso se encontraba situado en el lazo apical de una estructura en horquilla. Por otro lado, la degradación de 5'HCV-356 en presencia del RNA quimérico inducía una protección en los nucleótidos del lazo apical del dominio II.

R.6.4.3.- Variante HH363-53

El patrón de degradación mostrado por esta molécula revelaba una región claramente accesible: por un lado, la secuencia C₅₆CACGCCGA₆₄, que contiene el motivo consenso para el grupo 3; por otro, la secuencia U₃₆UGUGAUUC₄₄. En el primer caso la asociación con el RNA sustrato no provocaba ninguna alteración en el patrón de degradación. Sin embargo, en el segundo caso se observaba que los nucleótidos se volvían resistentes al procesamiento. Los estudios predictivos realizados con estos datos experimentales revelaron la formación de una estructura tipo tallo-lazo en la que quedaban expuestos los residuos comprendidos entre las posiciones 36-44.

El análisis de estructura secundaria del RNA sustrato 5'HCV-356 mostraba que existía cierta predisposición a la degradación en los residuos comprendidos entre las posiciones 295-303. En presencia de HH363-53 se producía un cambio en la sensibilidad de estos residuos a la hidrólisis. No se pudieron apreciar modificaciones del patrón de degradación en el lugar teórico de anclaje para el motivo consenso 3.

R.6.4.4.- Variante HH363-10

En los ensayos de protección llevados a cabo con el RNA quimérico HH363-10 se observó que el motivo consenso era procesado, así como la secuencia adyacente en 5', lo cual situaba a esta secuencia en una región expuesta de la molécula. En la predicción estructural que se realizó con estos resultados el motivo consenso aparecía formando un lazo apical, pero los residuos posicionados en 5' (C₄₀UGAGUG₄₆) se disponían en un dúplex con la secuencia U₅₈ACUGAG₆₄. El procesamiento en el motivo consenso se veía disminuido en presencia del RNA sustrato.

El lugar de anclaje para este consenso en el sustrato fue determinado mediante degradación con RNasa H utilizando un ODN complementario del lugar teórico de unión en el motivo III_f, que participa en la formación de la estructura *pseudoknot*. Debido al alto grado de estructuración de esta región, el RNA sustrato fue procesado débilmente por la RNasa H, aunque se pudo apreciar que la fracción de producto generado disminuía en presencia de HH363-10.

R.6.4.5.- Variante HH363-50

El patrón de degradación para esta molécula mostró que el motivo consenso para el grupo 5 era procesado de manera específica tanto por las RNasas T1 y A como por Pb²⁺, lo cual indicaba que los residuos se hallaban expuestos. El estudio predictivo situaba a este motivo en un lazo apical cerrado por un par G-A (A₄₉-G₅₅), que forma parte del motivo consenso.

En presencia del inhibidor, los nucleótidos del sustrato que componen el sitio de anclaje teórico para HH363-50 quedaban protegidos de la hidrólisis.

R.6.4.6.- Variante HH363-17

Los motivos consenso para los grupos 3 y 6 en HH363-17 no fueron procesados por ninguno de los agentes empleados en el estudio, lo cual implicaba una interacción de estas

secuencias con otros residuos de la molécula. Cuando se realizó el ensayo en presencia de 5'HCV-356 no se apreció ningún cambio en la accesibilidad para los motivos consenso de los grupos 3 y 6.

Cuando se llevaron a cabo ensayos de protección con RNAsas y Pb^{2+} sobre el RNA sustrato acomplejado a la molécula de RNA quimérico no se pudieron apreciar cambios en el patrón de degradación con respecto a la molécula sin acomplejar para ninguna de las dos posiciones teóricas a las cuales debía de anclarse el inhibidor. Por ello se optó por realizar ensayos de degradación con RNasa H utilizando ODNs dirigidos frente a ambas posiciones. Al igual que en el caso de HH363-10, la proporción de RNA sustrato procesada resultó escasa. A pesar de ello, se observó una caída en los niveles de producto cuando el RNA 5'HCV-356 era previamente acomplejado con el inhibidor. Esto pudo ser demostrado para el lugar de anclaje teórico del grupo 6, pero no así para el 3. En este caso la cantidad de producto específico generado se incrementaba en presencia de HH363-17, mientras que, sorprendentemente, la fracción del producto inespecífico de 271 nt se veía drásticamente disminuida.

R.6.4.7.- Variante HH363-18

La molécula HH363-18 presenta tres motivos consenso en su dominio aptámero para los grupos 2, 5 y 7. Los ensayos de degradación permitieron comprobar que el motivo consenso para los grupos 2 y 5 se encontraba en una región expuesta, aunque no así la secuencia consenso para el grupo 7. El análisis predictivo obtenido a partir de los resultados experimentales situaba a estas secuencias en el lazo apical de una estructura en horquilla, mientras que el consenso para el grupo 7 quedaba incluido en el tallo de dicha estructura. La degradación del complejo RNA inhibidor:sustrato mostró que los motivos de los grupos 2 y 5 aparecían protegidos, pero no se pudo apreciar ningún cambio en la accesibilidad en el lugar de anclaje teórico para el consenso del grupo 7, ni para las secuencias que lo flanquean.

Cuando se analizó el patrón de degradación de 5'HCV-356 en presencia del RNA quimérico, únicamente se comprobó la existencia de cambios en la accesibilidad en el dominio 2. La interacción entre el RNA inhibidor y la molécula de sustrato provocó que

los residuos situados en el lazo apical del dominio II, y que inicialmente eran sensibles al ataque hidrolítico, quedasen protegidos. No se observaron modificaciones en la conformación de los lugares teóricos de anclaje para los grupos 5 y 7, por lo que se puede afirmar que la interacción a través del dominio II resulta favorecida.

R.6.4.8.- Variante HH363-32

La variante HH363-32 se analizó para comprobar el papel que el consenso para el grupo 7 y su lugar de anclaje teórico en el RNA sustrato desempeñaban en el establecimiento de la interacción entre ambas moléculas. En los ensayos de degradación se observó que los motivos consenso para los grupos 1 y 7 aparecían sensibles al procesamiento, y quedaban situados, según el estudio predictivo realizado, en un lazo apical y en un lazo interno respectivamente. El consenso para el grupo 4 no era hidrolizado y participaba en la formación de un dúplex. El estudio de la protección ejercida por el inhibidor sobre el RNA sustrato mostró que solamente los residuos que componen la secuencia consenso para el grupo 1 quedaban protegidos del ataque hidrolítico, mientras que no se pudo detectar ningún cambio estructural para los motivos 4 y 7.

Los ensayos de protección a la degradación parcial con RNasas y con Pb^{2+} obtenidos para 5'HCV-356 en presencia de HH363-32 mostraron que los residuos constituyentes del lazo apical IIIId (lugar teórico de unión para el motivo consenso del grupo 1) quedaban protegidos del procesamiento. También se observaba protección en los nucleótidos del dominio IIIe, pero no se apreciaron cambios en la accesibilidad de los nucleótidos componentes del motivo *pseudoknot*, al igual que ocurre en el caso de las variantes HH363-10 y HH363-17.

D.- DISCUSIÓN

La asociación eficaz y específica entre una ribozima y su RNA diana en un contexto intracelular es un factor determinante del que depende en gran medida el éxito de la terapia mediada por RNAs catalíticos. Por tanto, la incorporación a la ribozima de dominios que favorezcan su unión con el sustrato es una aproximación necesaria y que ha demostrado ser efectiva previamente (Puerta-Fernandez *et al.*, 2002; Puerta-Fernandez *et al.*, 2003a; Puerta-Fernandez *et al.*, 2005). Sin embargo, el diseño y elección de estos dominios, así como del lugar al cual anclarlos, no resulta trivial y se hace necesario el desarrollo de estrategias a partir de las cuales se puedan definir los lugares óptimos de anclaje para una ribozima.

En esta memoria se describe el diseño y desarrollo de un método de selección molecular *in vitro* que permite obtener inhibidores de la función del IRES de HCV. Los inhibidores seleccionados presentan dos dominios funcionales: un dominio catalítico, que procesa la región IRES, y un dominio aptámero capaz de unirse a dicha región. Los resultados obtenidos permiten suponer un enorme potencial antiviral en los nuevos inhibidores identificados. Asimismo, es posible pensar en hacer extensiva la estrategia de selección aquí descrita para la obtención de nuevas moléculas destinadas a la inactivación de cualquier RNA viral o celular que se desee bloquear.

D.1.- Diseño de ribozimas dirigidas frente a la región 5'UTR de HCV

Hasta la fecha, las terapias desarrolladas para combatir al HCV no han resultado efectivas debido a la generación de variantes virales resistentes. Los tratamientos actuales basados en una combinación de interferón y ribavirina únicamente consiguen detener la infección en un 40% de los infectados, por lo que es preciso idear nuevas estrategias dirigidas frente a dianas alternativas. La región 5'UTR del genoma de HCV (y más

concretamente el dominio IRES) es un buen candidato para ser utilizado como blanco de acción de los nuevos inhibidores, debido principalmente a que su secuencia se encuentra muy conservada y a que ejerce una función esencial para la multiplicación del virus en el interior celular. De hecho, existen numerosos trabajos en los que se describe el uso de RNAs como inhibidores del inicio de traducción (I.8.4), y recientemente se ha diseñado un ODN *antisense* complementario a la región 3' del IRES que está siendo ensayado clínicamente (McCaffrey *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2004).

La ribozima hammerhead utilizada en este estudio procesa específicamente el genoma de HCV en la posición 363. El sitio diana se encuentra en una región esencial para el virus: por un lado, está incluido en el marco abierto de lectura para la poliproteína viral; por otro, se ha comprobado que esta secuencia es necesaria para la función del IRES (Honda *et al.*, 1996b; Lu y Wimmer, 1996; Reynolds *et al.*, 1995). Recientemente se ha descrito que el sitio de corte y su entorno molecular se encuentran implicados en la formación de una estructura similar al tRNA, que *in vitro* es reconocida y procesada por RNasa P de orígenes diversos en las posiciones 361-363 (Fig. D.1A, D.1B; Nadal *et al.*, 2002; Nadal *et al.*, 2003; Sabariego *et al.*, 2004; Piron *et al.*, 2005). En un estudio llevado a cabo por Piron *et al.* se determinó experimentalmente la estructura secundaria de esta región y se constató su parecido con el del sustrato mínimo para la RNasa P (Fig. D.1C). Como se puede apreciar, el sitio de corte para la ribozima hammerhead aparece expuesto en un lazo que queda cerrado por dos apareamientos consecutivos. El significado biológico de esta estructura se desconoce, aunque se encuentra altamente conservada, por lo que su presencia resulta ventajosa para el virus (Piron *et al.*, 2005); se ha propuesto que podría estar implicada en la captura de factores proteicos importantes en el inicio de traducción (Lyons y Robertson, 2003). Por tanto, su empleo como diana está ampliamente justificado.

La ribozima HH363 ha sido empleada previamente, incluida en vectores adenovirales; en este sistema únicamente era capaz de inhibir parcialmente la replicación viral (Lieber *et al.*, 1996). Nosotros procedimos a analizar este motivo, tanto su actividad catalítica como su afinidad por el RNA sustrato, así como su capacidad para inhibir la función del IRES en un sistema de traducción *in vitro*.

Los resultados obtenidos en los experimentos de asociación y de procesamiento mostraron que HH363 se unía con gran afinidad a su sustrato y lo procesaba eficientemente bajo las condiciones empleadas. Sin embargo, cuando se procedió a caracterizar su

capacidad para bloquear la traducción dependiente de IRES se observó que los excelentes resultados de procesamiento y asociación no se correspondían con el efecto inhibitor observado. La ribozima HH363 se comportaba como un inhibidor poco efectivo cuando su sustrato se encontraba en un contexto molecular diferente. Ello posiblemente fuera debido a la presencia de factores proteicos que interaccionan con el dominio IRES durante el inicio de la síntesis proteica, con los cuales el ribozima debe de competir para unirse a su sitio diana.

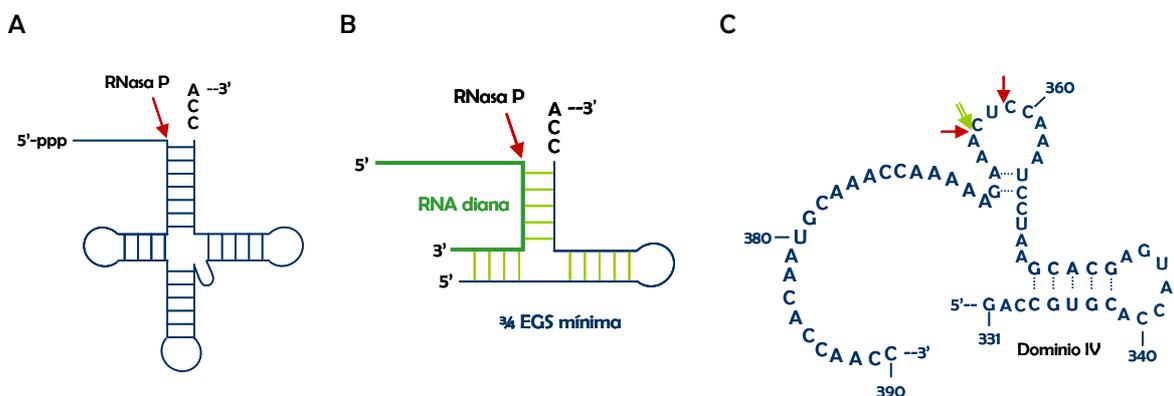


Fig. D.1.- Comparación de la estructura del sustrato natural de la RNasa P con la del RNA sustrato 5'HCV-691 entre las posiciones 331-390. A) Esquema representativo de la estructura del pre-tRNA. El sitio de procesamiento para la RNasa P se indica con una flecha. B) Representación de la secuencia $\frac{3}{4}$ EGS mínima (Yuan y Altman, 1994) unida a un RNA diana y el sitio de reconocimiento para la RNasa P. C) Estructura secundaria del RNA sustrato 5'HCV-691 comprendida entre las posiciones 331-390. Las flechas rojas indican los sitios que son reconocidos y procesados por la RNasa P. El sitio de corte para HH363 se indica por una flecha verde. Adaptado de (Piron *et al.*, 2005).

Por esta razón se hace necesaria la optimización y desarrollo de nuevos inhibidores, capaces de competir de manera efectiva con otras moléculas que puedan unirse al RNA sustrato. La incorporación al motivo catalítico de dominios que favorecen la asociación es una buena aproximación. Para su diseño se llevó a cabo un método de selección molecular *in vitro*.

D.2.- Desarrollo del método de selección molecular *in vitro*

El método de selección desarrollado en este trabajo presenta una serie de características que lo diferencian del resto de aproximaciones abordadas hasta ahora por otros autores (Aldaz-Carroll *et al.*, 2002; Kikuchi *et al.*, 2003; Kikuchi *et al.*, 2005): por un lado, destaca su esquema en dos pasos; por otro, es la primera aproximación en la que se utiliza la región IRES completa, lo cual permite la conservación de la estructura secundaria y las interacciones a larga distancia entre distintos dominios. Esto permite la selección de nuevas moléculas que de otro modo no ha sido posible identificar.

En el primer paso se rescatan variantes activas para la unión al RNA sustrato; en un segundo paso, las moléculas resultantes del primero que aún conservan su capacidad catalítica se mantienen en la población. Esta particularidad condiciona el diseño de la población que va a ser sometida al proceso de selección y las características del RNA sustrato empleado en cada situación.

El diseño de la población viene determinado por la necesidad de conseguir moléculas catalíticamente activas. El esqueleto básico está constituido por la ribozima hammerhead que procesa eficientemente el genoma de HCV en el nucleótido 363 (HH363). Este dominio aporta la capacidad de degradar específicamente el RNA sustrato y se mantiene invariable a lo largo de todo el proceso de selección. La elección de esta ribozima como base para el diseño de la población viene fijada por la necesidad de conseguir catalizadores efectivos que puedan ser recuperados en el segundo paso de selección. La adición del motivo variable en 3' del dominio catalítico introduce la heterogeneidad y potencia la asociación del dominio catalítico al RNA sustrato.

La incorporación en el proceso de selección de dos pasos diferenciados requiere la utilización de sustratos diferentes que se ajusten al procedimiento experimental. El diseño de estas moléculas resulta crítico para el correcto funcionamiento del sistema.

En el primer paso se establece que únicamente se rescaten moléculas capaces de asociarse a la región 5'UTR, independientemente de su capacidad de procesamiento. Para ello es necesario que el RNA sustrato no pueda ser cortado por la ribozima hammerhead. En este punto existen dos posibilidades:

- Una primera opción consistiría en la construcción de una molécula que presentase el sitio de corte mutado, de manera que la catálisis no se produzca. Éste sería el caso del sustrato 5'HCV-691gg, utilizado en los ensayos de asociación. El principal problema que surge es la posible selección de motivos aptámero que no son más que extensiones de la hélice III de la ribozima, lo cual ocurriría como consecuencia de la presencia en el RNA sustrato del lugar de anclaje para el motivo catalítico.

- La segunda opción soluciona el problema planteado por la primera. La construcción de un RNA sustrato que no presenta el lugar de unión y procesamiento del dominio ribozímico evita la selección de extensiones en la hélice III. La molécula diseñada contiene los primeros 356 nt del genoma viral, que permiten el mantenimiento de la estructura secundaria (5'HCV-356).

La conservación de la estructura en el RNA sustrato es un factor que resulta crítico para la selección de aptámeros. Su inmovilización a la columna de sefarosa-estreptavidina requiere también de una aproximación diferente a las descritas hasta la fecha (Kikuchi *et al.*, 2003; Kikuchi *et al.*, 2005). En esos trabajos previos se detalla una estrategia de inmovilización de moléculas de RNA largas mediante la hibridación a través de su extremo 3' con un oligonucleótido biotinilado. Sin embargo, no parece improbable que en nuestra molécula de sustrato esta interacción ocasionara una alteración de la estructura del dominio IV y su entorno molecular. Esto nos impulsó a desarrollar una nueva aproximación, que implica la introducción de nucleótidos biotinilados durante el proceso de transcripción *in vitro*. Dado el carácter voluminoso que presenta el ligando de biotina, es necesario que su incorporación a la molécula de RNA no exceda en una o dos posiciones, para que la estructura secundaria del sustrato se vea afectada mínimamente. Para ello se recurrió al protocolo descrito por Theissen *et al.* (Theissen *et al.*, 1989), con el que es posible marcar las moléculas de RNA durante su síntesis en una única posición teórica.

En el segundo paso se eliminan de la población aquellos representantes que han perdido su capacidad catalítica, para lo cual el sustrato debe de mantener el sitio de procesamiento de la ribozima en la posición 363. El RNA 5'HCV-691 contiene desde el nucleótido +1 hasta el 691 del genoma viral, incorporando así no sólo la secuencia de corte sino también regiones a través de las cuales se establecen interacciones a larga distancia con el dominio IRES. En concreto, se ha descrito que los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 433-439, junto con otras secuencias presentes en 3' de ésta, podrían

potenciar la traducción mediada por el IRES debido a una interacción con las posiciones 27-33 (Honda *et al.*, 1999b; Kim *et al.*, 2003; Beguiristain *et al.*, 2005). Existen también estructuras tipo tallo-lazo integradas en la región que abarca desde el nucleótido 388 hasta el 508 (Smith y Simmonds, 1997; Wang *et al.*, 2000), y cuya formación depende del entorno molecular, en el que se incluye el sitio diana de la ribozima HH363. Por todo lo expuesto, se consideró interesante la incorporación de gran parte de la secuencia codificante de la proteína de la cápsida para posibilitar la adquisición de una estructura similar a la adquirida en el genoma viral, imitándose así el contexto de secuencia en el que se encontrarían los inhibidores seleccionados.

Para la inmovilización de este RNA sustrato se optó por la estrategia seguida por Kikuchi *et al.* (Kikuchi *et al.*, 2003; Kikuchi *et al.*, 2005), en la que la molécula a inmovilizar en la columna de sefarosa-estreptavidina es hibridada a través de su extremo 3' con un ODN complementario cuyo extremo 5' se encuentra biotilado. En este caso, a diferencia de lo que ocurría con la molécula 5'HCV-356, no se espera afectar la estructura global ya que la región 3' no ha sido implicada aún en el establecimiento de interacciones a larga distancia con otras regiones del RNA viral.

Otra de las características que contribuye a la originalidad del método descrito en esta memoria es la selección de moléculas frente a la totalidad de la región 5' UTR del genoma de HCV. En otras aproximaciones desarrolladas hasta ahora para la obtención de aptámeros de RNA frente al IRES de HCV, se había simplificado el diseño mediante la utilización de dominios aislados (Aldaz-Carroll *et al.*, 2002; Kikuchi *et al.*, 2003; Da Rocha Gomes *et al.*, 2004; Kikuchi *et al.*, 2005). Con este tipo de esquema se pueden producir alteraciones estructurales en el RNA sustrato, ya que se han descrito interacciones a larga distancia entre dominios del IRES que configuran la geometría de la molécula (Lafuente *et al.*, 2002). La introducción en nuestro modelo de la secuencia completa permite el establecimiento de dichas interacciones así como la adquisición de una estructura más similar a la real. Ello ha influido en la selección de dominios aptámero capaces de unirse a la región del motivo *pseudoknot* o al lazo IIIe, lugares de anclaje que previamente no habían sido descritos, posiblemente debido a que la estructura adoptada por la molécula que se ha empleado como RNA sustrato es diferente a la adquirida en el caso de la utilización de dominios aislados.

D.3.- Secuencias seleccionadas

Tras la aplicación de seis ciclos de selección, se rescataron 30 secuencias diferentes de RNA a partir de 60 colonias aisladas. En todas ellas se definieron una serie de motivos conservados que podían aparear teóricamente con secuencias únicas en la región 5'UTR. Algunos de los consensos seleccionados son similares a otros descritos previamente como buenos motivos a través de los cuales interaccionar con el IRES, en concreto los consensos para los grupos 1 (Kikuchi *et al.*, 2005), 2 (Kikuchi *et al.*, 2003; Da Rocha Gomes *et al.*, 2004) y 5 (Aldaz-Carroll *et al.*, 2002). En esos estudios se han caracterizado dichas secuencias y se ha demostrado su interacción con la región IRES a nivel de los dominios IIIId, II y IV respectivamente. No obstante, los motivos identificados en este trabajo diferían de los ya descritos, posiblemente debido a la estrategia de selección en sí o a las secuencias particulares que flanquean los dominios aptámero (tabla D.1). La selección de las cuatro familias restantes resultó original con respecto a los trabajos previos, indicando así que el diseño y desarrollo del método ampliaba los resultados obtenidos hasta la fecha por otros autores.

Consenso	Consenso obtenido por otros autores	Referencia
MCCAAC	5' ACCCA 3'	(Kikuchi <i>et al.</i> , 2005)
YAUGGCU	5' UAUGGCU 3'	(Kikuchi <i>et al.</i> , 2003)
	5' AUGGCU 3'	(Da Rocha Gomes <i>et al.</i> , 2004)
AUYRUNG	5' AUCAUGG 3'	(Aldaz-Carroll <i>et al.</i> , 2002)

Tabla D.1.- Motivos consenso obtenidos por selección *in vitro* frente a dominios de la región IRES de HCV. Se muestran las secuencias consenso identificadas por el proceso de selección descrito en esta memoria similares a las descritas por otros autores.

D.4.- Importancia de los motivos consenso en la unión al RNA sustrato y determinación de los lugares de anclaje

En este apartado se procederá a discutir la implicación de los diferentes motivos consenso en la unión al RNA sustrato, así como de los lugares de anclaje determinados experimentalmente. En la tabla D.2 aparecen recogidas las conclusiones fundamentales obtenidas a partir de los estudios de accesibilidad.

Variante	Grupo	Consenso	Secuencia de anclaje
HH363-24	1	5' MCCAAC 3'	5' - G ₂₆₃ GUUG ₂₆₇ - 3'
HH363-31	2	5' YAUGGCU 3'	5' A ₈₁ GCCAUG ₈₇ 3'
HH363-53	3	5' CCACV 3'	n.d.
HH363-10	4	5' RUUCGNRAK 3'	5' C ₃₀₄ UUGCGAGU ₃₁₂ 3'
HH363-50	5	5' AUVRUNG 3'	5' C ₃₄₀ CAUGAG ₃₄₆ 3'
HH363-17	3	5' CCACV 3'	n.d.
	6	5' YGAGWYY3'	5' G ₃₂₂ GUCUCG ₃₂₈ 3'
HH363-18	2	5' YAUGGCU 3'	5' A ₈₁ GCCAUG ₈₇ 3'
	5	5' UVRUNG 3'	n.d.
	7	5' AUURG 3'	n.d.
HH363-32	1	5' MCCAAC 3'	5' G ₂₆₃ GUUG ₂₆₇ 3'
	4	5' RUUCGNRAK 3'	n.d.
	7	5' AUURG 3'	5' C ₂₉₃ UGAU ₂₉₇ 3'

Tabla D.2.- Secuencias obtenidas tras el método de selección *in vitro* y su lugar de anclaje determinado experimentalmente. Y = C o U; R = G o A; M = A o C; K = G o U; W = A o U; V = A, C o G; N = cualquier nucleótido; n.d. = no detectado.

Se analizaron en total ocho variantes representativas de las distintas familias. En cinco de los casos (HH363-24, HH363-31, HH363-50, HH363-18 y HH363-32) se observó que el comportamiento de los inhibidores era similar. Se determinó la presencia de un motivo consenso situado en un lazo apical (según los análisis predictivos desarrollados con el programa MFold en base a los resultados de accesibilidad), el cual aparecía protegido de

la degradación por RNAsas y/o Pb^{2+} en presencia del RNA sustrato. La realización de esos mismos experimentos sobre la molécula de sustrato mostró que estos inhibidores podían proteger de la hidrólisis residuos complementarios a sus motivos consenso, situados en lazos apicales de diversos dominios del IRES.

Las estructuras tallo-lazo en moléculas de RNA son frecuentes en la naturaleza y se encuentran implicadas en el establecimiento, de una manera eficaz y específica, de interacciones que permiten la regulación de un gran número de procesos celulares (revisado en (Brunel *et al.*, 2002)). En el caso de los RNAs *antisense* naturales, la interacción inicial se produce por complementariedad a través de los nucleótidos expuestos en el lazo y ocurre a gran velocidad; esta unión puede derivar a la formación de un complejo más estable por apareamiento entre los nucleótidos que componen el tallo de las dos moléculas que interactúan, aunque se ha observado que resulta más importante la velocidad a la que se produce la interacción que la estabilidad del complejo formado ((Nordstrom y Wagner, 1994). Por tanto, en principio sería suficiente con secuencias relativamente cortas expuestas en lazos para conseguir una asociación eficaz. En estudios previos llevados a cabo por Chang (Chang y Tinoco, 1997) se determinó mediante NMR la estructura adquirida por el complejo formado entre dos lazos apicales, el del RNA TAR de HIV y su complementario. En ellos se describe que los nucleótidos componentes de los lazos quedan desplazados hacia el lado 3' de la hélice central como consecuencia de la interacción. Estos trabajos, unidos a los datos experimentales de los que disponemos, nos llevan a proponer un modelo de interacción entre estas variantes (HH363-24, HH363-31, HH363-50, HH363-18 y HH363-32) y su lugar de anclaje en el IRES de HCV (Fig. D.2).

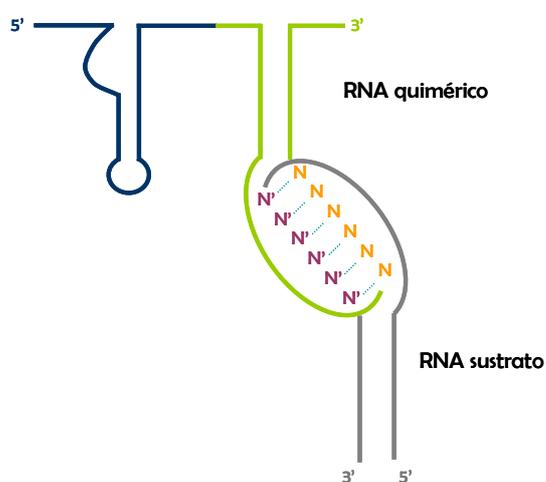


Fig. D.2.- Modelo propuesto para la interacción entre el motivo consenso de las variantes HH363-24, HH363-31, HH363-50, HH363-18 y HH363-32 y su sitio de anclaje en el RNA sustrato. En azul se representa el dominio ribozómico, en verde el dominio aptámero y en gris el sustrato. N, nucleótidos del motivo consenso (en naranja); N', nucleótidos complementarios al motivo consenso en el IRES (en morado).

En trabajos desarrollados previamente por otros autores (Kikuchi *et al.*, 2005) se describe el consenso para el grupo 1 y se define su lugar de anclaje en el lazo apical del **dominio IIIId**. En nuestro caso, dos de los representantes estudiados, **HH363-24** y **HH363-32**, interaccionan con esta región del IRES a través de una secuencia consenso similar. La convergencia en la selección de moléculas de RNA con motivos de unión al dominio IIIId no es casualidad, ya que esta región ha sido definida como un importante lugar de interacción con otros lugares del genoma viral y del dominio IRES (Lafuente *et al.*, 2002). Su papel relevante para el inicio de traducción y, en consecuencia, para el ciclo viral ha permitido sugerir a esta región como una excelente diana terapéutica, lo cual convierte a estos inhibidores en unos excelentes candidatos para su uso como antivirales.

En la estructura determinada por NMR se observa que el lazo apical se encuentra altamente desordenado, aunque en general la estructura secundaria parece robusta (Klinck *et al.*, 2000; Lukavsky *et al.*, 2000). El lazo adopta una estructura denominada giro de la uridina (*U-turn*; Fig. D.3), cuya presencia es fundamental para el mantenimiento de la actividad del IRES (Kieft *et al.*, 1999). El residuo U₂₆₄ queda apilado sobre el par G-C que cierra el tallo, y establece un apareamiento no canónico tipo *wobble* con el nucleótido G₂₆₈; esto determina finalmente que el nucleótido U₂₆₉ quede desplazado y altamente expuesto en solución. Según se ha descrito para otros RNAs, estas estructuras se mantienen por la presencia de interacciones terciarias adicionales con residuos situados en lazos apicales (Conn *et al.*, 1999), lo cual explicaría las relaciones existentes entre el dominio IIIId y otras regiones del RNA viral (Lafuente *et al.*, 2002). Estos datos también permiten sugerir que esta estructura es responsable de la convergencia en la selección de motivos cuyo lugar de anclaje es el lazo apical IIIId, y que la interacción con aptámeros de RNA podría estabilizar la geometría del motivo *U-turn*.

Por otro lado, es importante destacar que las moléculas que interaccionan con el lazo IIIId (HH363-24 y HH363-32) presentan una alta afinidad por el sustrato, probablemente debido a las características estructurales comentadas. En el caso de HH363-32 podría deberse también al hecho de presentar dos lugares de anclaje. La proximidad entre ellos potenciaría la asociación y el establecimiento de uniones de naturaleza terciaria, lo cual explicaría el hecho de que no se detecten cambios en la estructura del RNA quimérico a nivel del consenso 7 y, sin embargo, su presencia induzca protección a la degradación a nivel del dominio IIIe. Esto es algo que puede considerarse posible, ya que el empleo de la

región IRES completa en el proceso de selección puede favorecer el aislamiento de moléculas que se unen a su sustrato a través de múltiples vías.

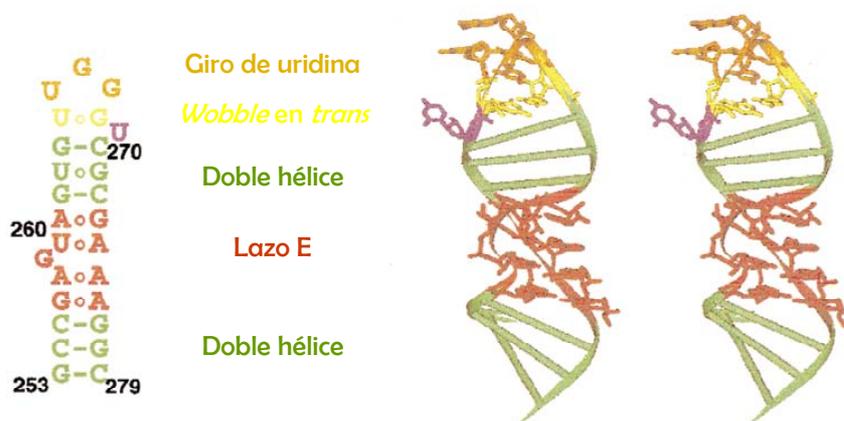


Fig. D.3.- Modelo estructural del dominio III d de la región IRES de HCV. A la izquierda se muestra un diagrama representativo del dominio. A la derecha, una imagen estereoscópica del modelo. Figura tomada de (Klinck *et al.*, 2000).

El lazo apical del **dominio II** ha sido establecido como lugar de interacción para dos de las moléculas analizadas, **HH363-31** y **HH363-18**. El dominio II es esencial para la replicación del genoma viral, y está implicado en la interacción con la subunidad ribosomal 40S a nivel del sitio E (Kieft *et al.*, 2001), por lo que es una excelente diana contra la que dirigir inhibidores de HCV. Se pliega independientemente del resto de la región IRES, adoptando una forma en L debido a la torsión originada por el lazo interno situado en la parte inferior del tallo (Fig. D.4; Lukavsky *et al.*, 2003). Este lazo interno actúa como una bisagra que permite la flexibilidad de la hélice y colabora en la adquisición de la estructura secundaria, debido a que contiene dos sitios de unión para iones Mg^{2+} . El lazo interno localizado en la parte superior del dominio adopta una conformación denominada giro S (*S-turn*), en el cual el residuo G_{94} forma un puente de hidrógeno con el enlace fosfodiéster que une los nucleótidos G_{71} y A_{72} . Esto determina un cambio en la dirección de las hélices que flanquean al motivo, produciendo una pequeña torsión que deja expuesto al solvente el residuo de guanina G_{94} y crea una superficie altamente sensible a la interacción con la subunidad 40S y otras regiones del RNA viral. Esta estructura además desorganiza los

nucleótidos que componen el lazo apical, de manera que las bases quedan parcialmente expuestas y el residuo U₈₆ totalmente desplazado, lo cual contribuye al establecimiento de interacciones con otras moléculas.

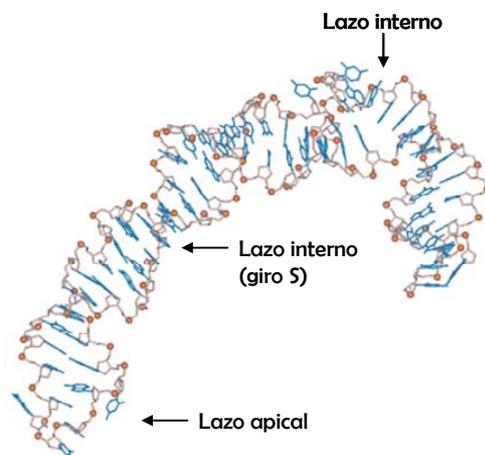


Fig. D.4.- Estructura del dominio II de la región IRES de HCV determinada mediante NMR. Las bases se muestran en azul, el esqueleto ribosa-fosfato en rosa. Se indican los motivos estructurales descritos en el texto. Figura tomada de (Lukavsky *et al.*, 2003).

Esta región ha sido empleada de manera aislada (bien completa o bien sólo su porción apical) para seleccionar aptámeros por los grupos del Dr. Toulmé y el Dr. Nishikawa (Kikuchi *et al.*, 2003; Da Rocha Gomes *et al.*, 2004); las secuencias consenso que portaban los aptámeros identificadas en ambos casos coinciden o contienen el motivo aquí descrito (tabla D.1), a pesar de haber empleado como sustrato moléculas diferentes. Existen dos características estructurales del dominio II que pueden explicar este fenómeno de convergencia en las moléculas seleccionadas: por un lado, se pliega independientemente del resto del IRES; por otro lado, la geometría del lazo apical, al cual se unen los RNAs seleccionados, favorece la exposición al solvente de los nucleótidos, lo cual potencia el establecimiento de interacciones con otras moléculas de RNA. Por último, es importante destacar que en los sistemas de selección mencionados el empleo de fracciones de la región IRES conduce a obviar las interacciones terciarias en las que se ha implicado a este y otros dominios (Lafuente *et al.*, 2002), y que participan en la formación del complejo 80S activo.

La interacción de la molécula HH363-18 con el RNA sustrato merece especial atención, ya que únicamente se pudo detectar la unión a través del dominio II, aunque

presenta motivos consenso para dos grupos más. No obstante, el hecho de que no hayamos podido detectarlo no implica que no sea posible la existencia de un complejo en el que la asociación a través del lazo apical del dominio II quedaría estabilizada por interacciones adicionales que implicarían a los dominios IIIe y IV (lugares teóricos de anclaje para los grupos 5 y 7, respectivamente). De hecho, la proximidad espacial y las interacciones existentes entre los dominios II y IIIef-IV del IRES favorecen esta hipótesis (Lafuente *et al.*, 2002). La interacción lazo-lazo propuesta para HH363-18 y el lazo apical del dominio II podría igualmente verse favorecida por la presencia de un par G-A (A₅₁-G₆₀) cerrando y estabilizando el lazo apical en el que se localiza el motivo consenso para los grupos 2 y 5 (Serra *et al.*, 1993). Esta característica ha sido descrita previamente para aptámeros obtenidos mediante selección *in vitro*, y su presencia se ha asociado con una estabilización del complejo formado entre dos lazos apicales (Duconge y Toulme, 1999; Duconge *et al.*, 2000).

El **dominio IV**, portador del codón de inicio de la traducción, ha sido descrito como lugar de anclaje de aptámeros obtenidos mediante selección molecular *in vitro* (Aldaz-Carroll *et al.*, 2002) En nuestro caso, se comprobó que la variante representativa del grupo 5, **HH363-50**, interaccionaba con el RNA sustrato a nivel del lazo apical, donde se producía una clara resistencia a la degradación (Fig. R.32). Este dominio ha sido propuesto como un excelente lugar de unión de RNAs inhibidores en base a dos criterios: sus características estructurales y la función que ejerce, por lo que los nuevos RNAs quiméricos pertenecientes al grupo 5 se destacan como unos buenos candidatos para inhibir la función del IRES.

La estructura del dominio IV se encuentra altamente conservada entre los diferentes aislados de HCV, y su estabilidad se correlaciona de manera inversa con la eficiencia de traducción (Honda *et al.*, 1996a). Precisamente el equilibrio entre varias conformaciones posibles podría facilitar el anclaje de RNAs quiméricos portadores del consenso 5 a través del lazo apical del dominio IV. La interacción lazo-lazo que se propone en el caso de HH363-50 (Fig. D.2) implicaría la ruptura de un par G-A (A₄₉-G₅₅) que se encuentra cerrando el lazo en el que se expone el motivo consenso en el inhibidor; este hecho podría actuar favoreciendo la unión entre HH363-50 y el dominio IV, de igual manera que se ha

sugerido para HH363-18. Esto está en consonancia con la alta afinidad por el RNA sustrato observada para esta variante.

Los ensayos de protección de la molécula de sustrato en presencia de las variantes **HH363-10** y **HH363-17** demostraron que estos inhibidores se unen al IRES a través del motivo *pseudoknot*. La formación de esta estructura implica al dominio III_f y a una región rica en nucleótidos pirimidínicos (Py-I; Wang *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995). Este motivo se encuentra muy conservado entre los distintos subtipos de HCV (Wang *et al.*, 1995), y también se ha detectado en otras regiones IRES de virus relacionados, como el virus de la diarrea bovina (BVDV, *bovine diarrhea virus*; Wang *et al.*, 1995) y el virus GB (Simons *et al.*, 1996). En la naturaleza, los motivos *pseudoknot* presentan funciones diversas, entre las que se encuentra la de regular el proceso de traducción. En el caso de los IRES virales, se localizan en regiones próximas al codón de inicio de traducción; de hecho, la distancia entre el extremo 3' del *pseudoknot* y el codón AUG suele ser fija, y se establece en 11 nt para HCV. Esto permite la colocación del sitio P de la subunidad 40S en el codón de inicio, por lo que esta estructura podría participar en el inicio de traducción funcionando como un factor más que permite el acoplamiento del complejo 80S (Honda *et al.*, 1996a). Esta importante función hace que los nuevos inhibidores identificados por nuestro sistema de selección *in vitro* resulten muy prometedores, ya que la interrupción del *pseudoknot* bloquea la actividad traduccional dependiente de IRES (Wang *et al.*, 1995).

La unión de moléculas de RNA a esta estructura no había sido descrita previamente, a pesar del desarrollo de métodos de selección *in vitro* encaminados a la obtención de aptámeros de RNA dirigidos frente a distintas regiones del IRES (Kikuchi *et al.*, 2005). Ello posiblemente se deba a que, en estos trabajos, la molécula de sustrato no se encuentra incluida en un entorno molecular apropiado para la adquisición de la estructura *pseudoknot* (Wang *et al.*, 1995). En nuestro caso, la incorporación de la región 5'UTR completa contribuye al establecimiento de un contexto de secuencia apropiado para que tengan lugar interacciones entre regiones distantes del dominio IRES (Wang *et al.*, 1995; Lafuente *et al.*, 2002).

Para estos inhibidores, la naturaleza de su interacción con el sustrato es difícil de predecir. El motivo *pseudoknot* presenta una estructura compacta y muy estable, por lo que

sería posible el establecimiento de interacciones terciarias del RNA quimérico con otras regiones del sustrato que favorecerían el anclaje posterior al *pseudoknot*, y que implicarían no sólo motivos de secuencia sino también estructurales. Estas uniones son específicas y dependen de la concentración de RNA, de las condiciones iónicas y de la temperatura. Por tanto, en nuestro modelo y con las condiciones utilizadas se podría sugerir la existencia de un proceso de selección positiva para este tipo de interacciones que favorecerían la evolución hacia estructuras más estables.

Esta hipótesis podría ser igualmente aplicada al caso de la molécula HH363-53. En su dominio aptámero presenta un motivo consenso para el grupo 3 y una secuencia común con la variante HH363-10, que aparecía protegida de la degradación en presencia del RNA sustrato. Aunque no hemos podido establecer con claridad el lugar de anclaje en el IRES, pudimos detectar un cambio de accesibilidad en el dominio IIIe y su entorno molecular, donde se incluye la estructura *pseudoknot*. Es posible que el anclaje a este dominio no sea lo suficientemente estable como para detectarlo en las condiciones que hemos empleado, y que requiera de elementos auxiliares que favorezcan el acceso de los RNAs quiméricos.

Una de las cuestiones que no queda resuelta con los ensayos de accesibilidad realizados es el papel del motivo consenso para el grupo 3 en la interacción con el RNA sustrato. Los estudios realizados sobre los RNAs quiméricos que lo contienen (HH363-53 y HH363-17) y sobre el IRES no aportaron resultados claros. Sin embargo, el hecho de que se trate del tercer grupo más numeroso de variantes seleccionadas sugiere la existencia de una función para esta secuencia; es posible que actúe como un lugar a través del cual establecer una interacción previa que facilita el acceso posterior del RNA quimérico a regiones de estructura más compleja en la molécula de sustrato.

Finalmente, cabe destacar que en la interacción entre todos los RNAs quiméricos y el sustrato el dominio ribozímico desempeña una función fundamental. Esto se observó tras la realización de los ensayos de accesibilidad sobre el sustrato 5'HCV-691gg en presencia de HH363. Se detectó la formación de una especie molecular que migraba más lentamente y que únicamente afectaba a la molécula de sustrato en presencia de la ribozima.

Desconocemos su naturaleza, si bien parece claro que implica directamente a aquellas moléculas que contienen el sitio diana para la ribozima. En este caso se mantenía la interacción a través de los residuos 118-124, por lo que sugerimos que este motivo se comporta como un lugar alternativo de unión. Esta idea se ve reforzada por el hecho de que dichas posiciones presentan complementariedad parcial con la hélice III de la ribozima (Fig. D.5).

No podemos predecir el papel que tiene este segundo lugar de interacción en la unión de los RNAs quiméricos, aunque se podría desempeñar una función facilitadora para la estabilización del complejo formado. La unión a este sitio alternativo competiría por la asociación al sitio diana, lo cual puede ser un argumento que explicaría el descenso en la actividad catalítica de las moléculas seleccionadas con respecto a HH363.

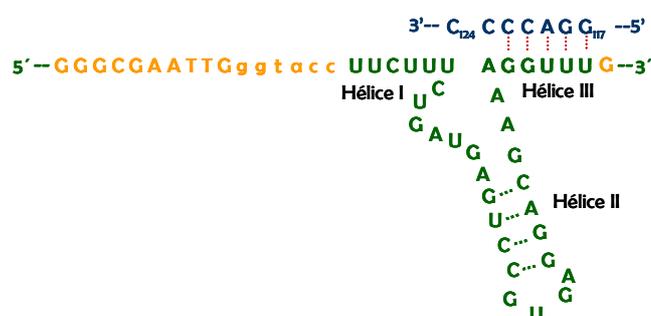


Fig. D.5- Esquema representativo de la interacción propuesta entre HH363 y la secuencia G₁₁₈ACCCC₁₂₄. Se muestra la interacción que implicaría a la hélice III de la ribozima y a los residuos 117-122. En azul se destacan los nucleótidos correspondientes al RNA sustrato, HH363 se muestra en verde. Los residuos adicionales que son incorporados a HH363 durante el proceso de transcripción *in vitro* a partir de la construcción pBSHH363 se indican en naranja. En minúscula se señala el sitio diana para el enzima de restricción *Kpn*I.

D.5.- Asociación de RNAs quiméricos y aptámeros al sustrato 5'HCV-691gg

El objetivo principal del método de selección *in vitro* diseñado era la obtención de moléculas híbridas portadoras de un dominio catalítico y de un dominio aptámero que actuaría facilitando la unión al RNA sustrato. Los ensayos de asociación realizados estaban

encaminados a determinar la capacidad de unión de los RNAs quiméricos al sustrato, y qué importancia en dicha unión tenían los distintos dominios que conforman la molécula híbrida.

En los estudios previos de asociación realizados con la ribozima hammerhead HH363 se observó una alta afinidad de esta molécula por el sustrato en las condiciones empleadas. En dos de los RNAs quiméricos ensayados, HH363-50 y HH363-32, se observó que esta propiedad mejoraba notablemente. (Fig D.6). En el caso de HH363-50 esto puede correlacionarse con el hecho de que el lugar de anclaje para el motivo consenso se encuentra próximo al sitio de unión del dominio catalítico, por lo que se podría esperar un efecto facilitador o cooperativo entre los dos sitios de anclaje. En cuanto a la molécula HH363-32, se determinó un incremento en su afinidad por el RNA sustrato con respecto a HH363 en más de 2.5 veces. Para esta variante se demostró su interacción a nivel del lazo apical del dominio IIIId, y también se observaron cambios en la accesibilidad del sustrato a nivel del dominio IIIe. A pesar de que no se han podido definir los residuos del RNA quimérico implicados en esta última, no se puede descartar que la interacción ocurrida a través del lazo IIIe actúe favoreciendo el anclaje del inhibidor.

Las variantes HH363-24, HH363-31, y HH363-18 no mostraron una mejora de afinidad en relación a HH363, pero sí lograron incrementar la fracción de complejo formado. Todas ellas, junto con HH363-50 y HH363-32, corresponden a moléculas en las que el dominio aptámero adopta una estructura tallo-lazo que expone los nucleótidos pertenecientes al motivo consenso. Los residuos con los que interaccionan, además, se disponen en lazos apicales de estructuras tipo horquilla. Como ya se ha comentado en apartados anteriores, tanto algunos RNAs naturales como otros obtenidos por procesos de selección *in vitro* se unen a sus dianas estableciendo uniones lazo-lazo de una manera rápida y específica, por lo que se podría afirmar que en estas variantes la interacción lazo-lazo favorece la asociación del RNA quimérico a su sustrato.

Las moléculas en las que se observó una mayor pérdida de su capacidad de asociación fueron HH363-53, HH363-10 y HH363-17. En el caso de la variante 53, como ya se ha comentado en el apartado D.4, no se pudo detectar con claridad el sitio de unión en el sustrato, posiblemente debido a la inestabilidad del complejo formado en las condiciones empleadas, por lo que se propone el establecimiento de interacciones terciarias. Las moléculas HH363-10 y HH363-17 comparten una situación similar, ya que

ambas se unen al IRES a través de la estructura *pseudoknot*. El alto grado de compactación existente en esta región dificultaría el acceso y posterior anclaje del RNA quimérico, lo cual redundaría en su afinidad. Estos resultados explicarían la dificultad encontrada para la determinación experimental de los lugares de anclaje en estas variantes.

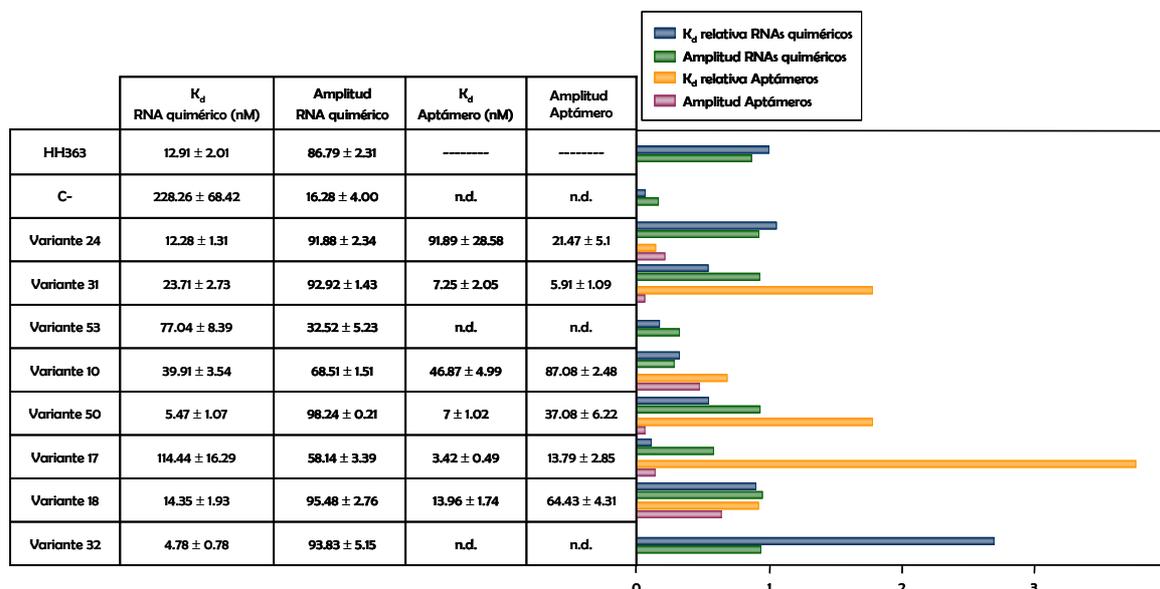


Fig. D.6.- Asociación de los RNAs quiméricos y los aptámeros al sustrato 5'HCV-691gg. En la parte izquierda de la figura se muestran los parámetros cinéticos de K_d y amplitud obtenidos para la reacción de asociación de los diferentes RNAs quiméricos y aptámeros al sustrato, así como para HH363 y C-. En la parte de la derecha se muestra una representación gráfica de dichos parámetros. Los valores de K_d han sido normalizados con respecto a HH363, mientras que los datos de amplitud han sido divididos entre 100. Los valores mostrados son la media de cuatro experimentos independientes ± la desviación estándar.

Todos estos resultados fueron obtenidos utilizando unas condiciones electroforéticas altamente favorables para el mantenimiento de los complejos. Sin embargo, la realización de los ensayos en condiciones electroforéticas menos restrictivas (tampón TBE 1X y temperatura ambiente) demostró una caída sustancial en la capacidad de asociación de HH363 con respecto a los inhibidores quiméricos (datos no mostrados), por lo que se puede asumir que la interacción del dominio catalítico con el sustrato resultaría estabilizada y favorecida por la adición del dominio aptámero en los RNAs quiméricos.

Finalmente se llevaron a cabo ensayos de asociación para comprobar el papel que los dominios aptámero ejercían sobre la capacidad de unión del RNA quimérico. Únicamente las moléculas Ap10 y Ap18 exhibieron valores de K_d y amplitud destacables (Fig. D.6). En estos casos se puede asumir que la unión del RNA quimérico al sustrato está básicamente influida por la interacción del dominio aptámero a su sitio diana, mientras que para el resto de variantes se requiere la presencia de ambos dominios (catalítico y aptámero) para conseguir una asociación efectiva. El hecho de que los RNA aptámero se asocien menos eficientemente a su diana puede venir determinado por varios factores:

- La unión del dominio ribozímico al sustrato es relevante y esencial para conseguir una asociación estable de la molécula completa.

- El motivo catalítico colabora en la adquisición de una estructura funcional de la molécula completa, imprescindible para que la unión tenga lugar. De hecho, las interacciones lazo-lazo que ocurren en los sistemas *antisense* naturales requieren de secuencias adyacentes que favorezcan la progresión hacia complejos más estables (Persson *et al.*, 1990b); este papel podría venir desempeñado, en nuestro caso, por el dominio ribozímico.

En resumen, los resultados obtenidos mediante los ensayos de asociación permitirían concluir que, para cinco de las ocho variantes ensayadas, los dos dominios componentes de los RNAs quiméricos pueden actuar de manera conjunta para promover la asociación efectiva del inhibidor al RNA sustrato.

D.6.- Procesamiento *in vitro* de la región IRES de HCV

El segundo paso del método de selección establece la obtención de moléculas que, aun portando un dominio de RNA capaz de unirse al IRES, mantienen la capacidad de procesar el sustrato. La incorporación de la actividad catalítica supone una ventaja añadida al desarrollo de aptámeros frente a la región IRES de HCV y complementa su capacidad inhibitoria. Para determinar la capacidad catalítica de las moléculas escogidas se realizaron

ensayos cinéticos que permitieron caracterizar la reacción de corte llevada a cabo por las distintas moléculas.

Los resultados que se obtuvieron indicaban que la adición del dominio aptámero afectaba a la capacidad de corte *in vitro* en todas las variantes ensayadas (Fig. D.7). En el caso de HH363-50 la disminución en el valor de k_{obs} no resultó tan acusada, posiblemente debido a la proximidad existente entre el sitio de anclaje para el dominio aptámero y el lugar de procesamiento para HH363.

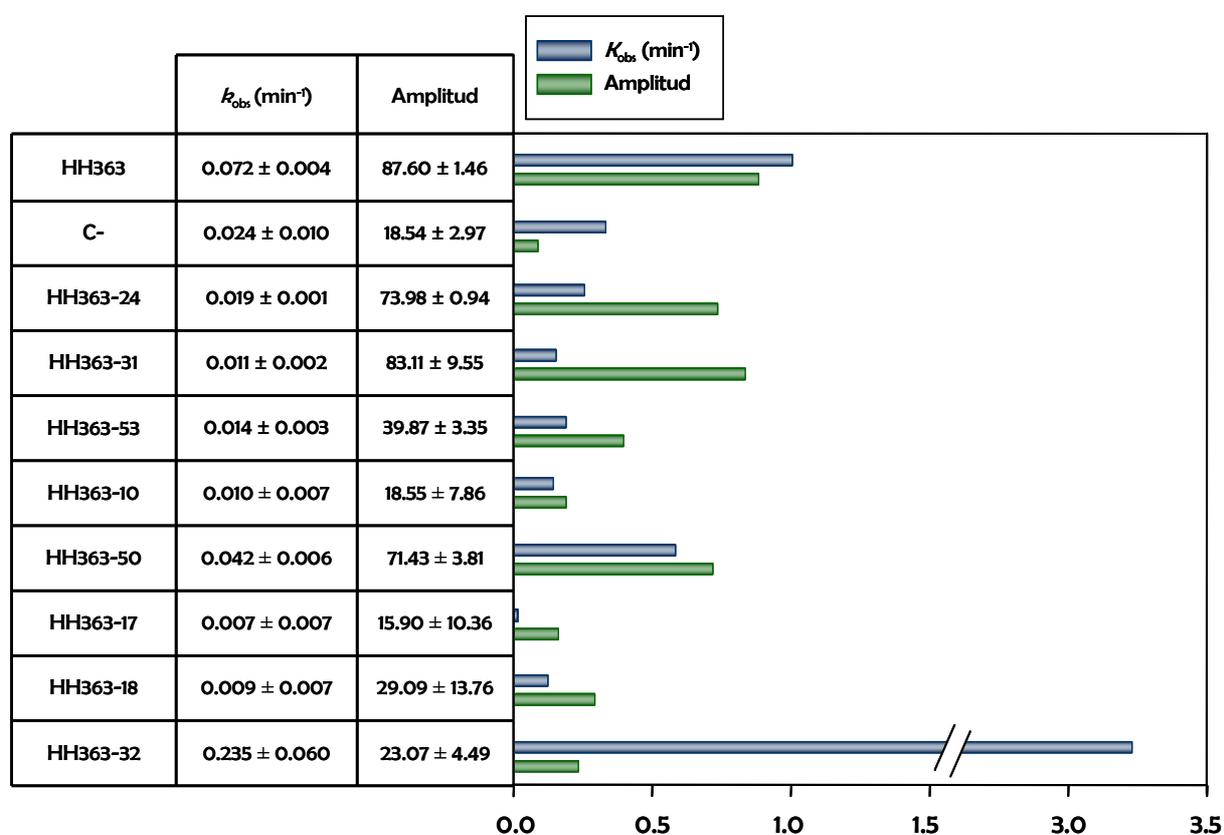


Fig. D.7.- Procesamiento *in vitro* del sustrato 5'HCV-691 por los RNAs quiméricos. A la izquierda de la figura se muestran los parámetros cinéticos obtenidos para la reacción de procesamiento del sustrato 5'HCV-691 por los diferentes RNAs quiméricos, así como por la ribozima convencional (HH363) y un RNA de la población inicial (C-). Los datos mostrados son el resultado de cuatro experimentos independientes. La representación gráfica de estos parámetros se muestra a la derecha de la figura. Los valores de k_{obs} han sido normalizados con el obtenido para HH363. Los de amplitud se han dividido entre 100.

La pérdida de la capacidad catalítica por parte de los RNAs quiméricos puede deberse a varias causas:

- Factores estructurales: la adición del dominio aptámero puede dificultar la adquisición de una estructura funcional, bien porque las hélices I y III de la ribozima establezcan apareamientos con secuencias del dominio aptámero, o simplemente porque existan impedimentos estéricos que dificulten un plegamiento activo del dominio catalítico.

- Distancia espacial entre el lugar de anclaje y el sitio de procesamiento: en trabajos previos desarrollados por la Dra. Puerta-Fernández se demostraba que la distancia lineal entre el sitio de anclaje de un RNA *antisense* catalítico y el sitio de procesamiento no influía en la velocidad de la reacción (Puerta-Fernandez *et al.*, 2002). Sin embargo, a partir de estos resultados no se podía obtener ninguna conclusión acerca de la distancia espacial. En el caso de HH363-50, es posible que la proximidad entre ambos lugares suavice el efecto deletéreo que tiene el dominio aptámero sobre la actividad catalítica. Por otro lado, la molécula HH363-31 es capaz de procesar el sustrato a una extensión final similar a la alcanzada por HH363. La hipótesis planteada para HH363-50 podría extenderse a esta variante, ya que se ha descrito que el dominio II puede establecer interacciones a larga distancia con el dominio IV y la estructura *pseudoknot*, ambos muy próximos espacialmente al sitio de procesamiento.

Estos resultados demuestran el efecto ejercido por el segundo paso selectivo sobre la población, ya que todos los inhibidores probados son capaces de procesar el RNA sustrato, aunque su eficiencia no sea comparable a la de la ribozima convencional HH363.

D.7.- Determinación de la actividad anti-IRES de los RNAs inhibidores

El empleo de los sistemas de traducción *in vitro* para detectar y caracterizar inhibidores de la actividad IRES de HCV está ampliamente extendido y constituye el primer paso en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para la hepatitis C (Alt *et al.*,

1995; Das *et al.*, 1998; Kikuchi *et al.*, 2003; Tallet-Lopez *et al.*, 2003; Kikuchi *et al.*, 2005), por lo que fue el sistema de elección para determinar el efecto inhibitor de las moléculas identificadas.

Los datos obtenidos tras la realización de estos ensayos muestran que tres variantes, HH363-50, HH363-17 y HH363-18, son potentes inhibidores de la actividad del IRES, llegando a disminuir la síntesis de FLuc casi en un 100% (Fig. D.8). Cabe destacar que los RNAs quiméricos ejercen una mayor inhibición que el motivo catalítico *per se*, el cual solamente consigue bloquear la actividad traduccional en un 36%. Estos resultados validan la hipótesis inicial de trabajo, en la que se establece que la incorporación de dominios con capacidad de unión potencia la efectividad de ribozimas en un contexto en el que la asociación al sitio diana puede verse impedida.

Los RNAs aptámero también inactivan parcialmente la función del IRES, destacando la molécula Ap18, en la que la inhibición alcanza un valor próximo al 90% (Fig. D.8). Resulta interesante comprobar que en cuatro de las ocho variantes ensayadas (HH363-53, HH363-50, HH363-17 y HH363-18) los RNAs quiméricos presentan una actividad superior a la demostrada por el RNA aptámero, coincidiendo tres de ellos con las moléculas que suprimen de manera más potente la actividad del IRES.

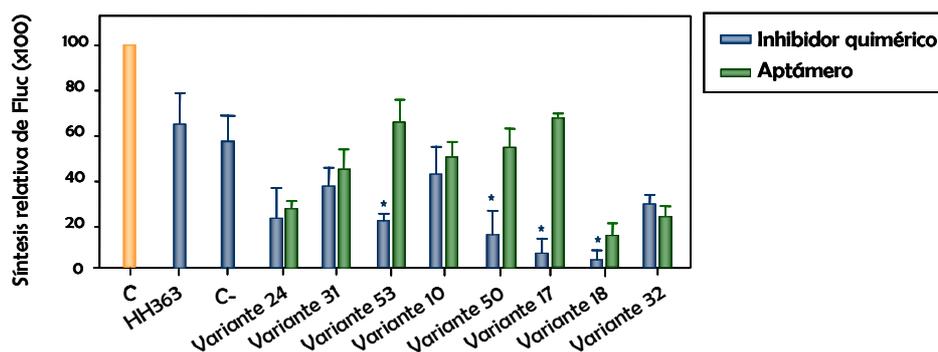


Fig. D.8.- Inhibición de la traducción *in vitro* dependiente del IRES. Representación gráfica de los valores de inhibición obtenidos para HH363, C-, los distintos RNAs quiméricos y sus correspondientes RNAs aptámeros a una concentración de inhibidor de 5 μ M. Con un asterisco se indican las diferencias significativas ($p = 0.070$) observadas entre el inhibidor quimérico y su aptámero.

Para algunas de las moléculas probadas (HH363-24, HH363-50, HH363-18 y HH363-32), los datos de inhibición se pueden correlacionar con los valores de K_d obtenidos *in vitro* (tabla D.3). Sin embargo, las moléculas HH363-53 y HH363-17 demuestran una baja afinidad por el sustrato *in vitro* pero son unos inhibidores eficientes del IRES. Esto refleja la importancia que tiene, no sólo la capacidad de unión, sino la función desempeñada por el lugar de anclaje. En este caso, los inhibidores afectan al motivo *pseudoknot*, esencial en el proceso de inicio de traducción (Wang *et al.*, 1995).

Variante	Inhibidor	K_d (nM)	% de inhibición
Variante 24	HH363-24	12.28 ± 1.31	78.38
	Aptámero 24	91.89 ± 28.58	74.00
Variante 31	HH363-31	23.71 ± 2.73	64.06
	Aptámero 31	7.25 ± 2.05	56.57
Variante 53	HH363-53	77.04 ± 8.39	65.29
	Aptámero 53	n.d.	28.66
Variante 10	HH363-10	39.91 ± 3.54	58.84
	Aptámero 10	46.87 ± 4.99	51.55
Variante 50	HH363-50	5.47 ± 1.07	85.66
	Aptámero 50	7.00 ± 1.02	46.89
Variante 17	HH363-17	114.44 ± 16.29	93.61
	Aptámero 17	3.42 ± 0.49	34.34
Variante 18	HH363-18	14.35 ± 1.93	96.88
	Aptámero 18	13.96 ± 1.74	86.15
Variante 32	HH363-32	4.78 ± 0.78	76.41
	Aptámero 32	n.d.	69.55

Tabla D.3.- Asociación e inhibición de los RNAs seleccionados a la región IRES de HCV. Se muestran los valores de K_d y el porcentaje de inhibición obtenido a una concentración de 5 μ M de inhibidor. n.d. = no determinado.

Algunas de las moléculas seleccionadas manifiestan un gran potencial como agentes antivirales, debido a su efecto inhibidor del IRES y al sitio al que están dirigidos. Por ejemplo, las variantes pertenecientes al grupo 1 resultan de especial interés por su

unión a través del dominio IIIId. Esta región presenta una gran importancia como diana terapéutica, ya que está implicado en la interacción con la subunidad ribosomal 40S (Kolupaeva *et al.*, 2000) y en la adquisición de una estructura terciaria funcional por parte del IRES (Kieft *et al.*, 1999; Jubin *et al.*, 2000; Lafuente *et al.*, 2002). Como consecuencia de su importancia biológica presenta un alto grado de conservación entre todos los aislados descritos (Smith *et al.*, 1995). Todas estas características han propiciado que en los últimos años surjan trabajos en los que se describen moléculas que van dirigidas exclusivamente a este dominio (Ray y Das, 2004; Tallet-Lopez *et al.*, 2003; Kikuchi *et al.*, 2005).

También resultan prometedores los resultados de inhibición obtenidos para HH363-50, representante del grupo 5, cuyo lugar de anclaje se sitúa en el dominio IV. Este dominio presenta una estructura tallo-lazo en la que se encuentra expuesto el codón de inicio de la traducción. El mantenimiento de esta estructura resulta esencial para el correcto posicionamiento de la subunidad ribosomal 40S (Honda *et al.*, 1996a). Por tanto, la importancia biológica de este dominio y su alto grado de conservación lo convierten en una excelente diana terapéutica.

Finalmente, la selección de moléculas con capacidad de unión a la estructura *pseudoknot* ha supuesto una gran novedad y ha permitido la identificación de potentes inhibidores, ya que una alteración estructural en este motivo tiene como consecuencia un bloqueo en el inicio de traducción dependiente de IRES (Wang *et al.*, 1995).

En conclusión, se puede afirmar que en los experimentos de inhibición realizados se pone de manifiesto el gran potencial antiviral de estas nuevas moléculas obtenidas por selección. Los resultados obtenidos muestran que el empleo combinado de dos dominios funcionales mejora significativamente la actividad anti-IRES, con respecto a aquellas otras moléculas que sólo portan uno de ellos. Este incremento de los RNAs quiméricos con respecto a la ribozima convencional y los aptámeros posiblemente se deba a una mayor efectividad en la capacidad de unión al RNA sustrato, más que a una mejora en la etapa química de corte. En cualquier caso, únicamente la actividad combinada de los dos dominios consigue inhibir la actividad del IRES hasta casi un 100%.

A la hora de considerar el potencial de estas moléculas como inhibidores es necesario tener en cuenta la estructura en cuasiespecies que presenta el genoma de HCV (Martell *et al.*, 1992). A pesar del alto grado de conservación del dominio IRES, las secuencias virales circulantes en un paciente son ligeramente distintas unas de otras. No obstante, las dianas seleccionadas son secuencias poco variables entre pacientes, por lo que pueden considerarse unos buenos candidatos como blanco de acción para los inhibidores. En cualquier caso, y para evitar la aparición de variantes resistentes, se podría proponer el uso combinado de diversos RNAs anti-IRES con especificidades distintas.

Los excelentes resultados obtenidos impulsan la necesidad de realizar un análisis de la actividad de estas moléculas en un modelo celular. Debido a la ausencia de un sistema de cultivo del virus, una aproximación alternativa sería el empleo de replicones. En los últimos años se han desarrollado modelos que imitan el proceso de replicación viral (revisado en (Bartenschlager, 2005)), y que han sido utilizados para la caracterización de diversos inhibidores y fármacos (Yokota *et al.*, 2003; Beaulieu *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2004b; Kanda *et al.*, 2004; Kronke *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2004; Tanabe *et al.*, 2004; Korf *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2005). Aunque los resultados aquí presentados no se corresponden con una situación infectiva real, disponemos de una batería de moléculas inhibitoras del IRES de HCV que suponen un excelente punto de partida para el análisis posterior en sistemas más complejos, y que se presentan como potenciales herramientas terapéuticas.

Finalmente, cabe destacar la importancia y utilidad del proceso de selección diseñado, que ha permitido la identificación de estas nuevas moléculas químicas y que puede hacerse extensivo para la obtención de inhibidores dirigidos frente a cualquier RNA que se desee inactivar.

C.- CONCLUSIONES

1.- La ribozima HH363 manifestó una gran capacidad de unión y procesamiento *in vitro* de su RNA sustrato, la región IRES de HCV. En un sistema de traducción *in vitro*, HH363 se comportaba como un inhibidor moderado de la función del IRES.

2.- El método de selección molecular *in vitro* desarrollado en dos pasos funciona de manera eficaz para identificar nuevos RNAs inhibidores basados en la ribozima HH363. En una primera etapa se seleccionan moléculas que portan un dominio de RNA con gran afinidad por el IRES de HCV; en el segundo paso se aíslan las variantes catalíticamente activas.

3.- Las moléculas resultantes de la sexta ronda de selección fueron capaces de unirse al sustrato y degradarlo específicamente *in vitro*. Este hecho demuestra que el método de selección es efectivo durante sus dos etapas.

4.- Todas las variantes identificadas se pueden distribuir en siete familias, definidas cada una por un motivo consenso complementario a una secuencia única en la región IRES de HCV.

5.- Se escogieron ocho variantes representativas de las siete familias. Los RNAs quiméricos presentaron capacidad de unión a su RNA sustrato *in vitro*, confirmando el funcionamiento del proceso selectivo aplicado durante el primer paso. Los mayores incrementos en la afinidad con respecto a HH363 se consiguieron en aquellas moléculas en las que el sitio de anclaje para el dominio aptámero se encontraba próximo al sitio de procesamiento. Asimismo, se observó una mejora en la eficiencia de asociación en los inhibidores quiméricos que contienen el motivo consenso expuesto en un lazo apical. En general, las moléculas de RNA aptámero manifestaron una pobre afinidad por el sustrato, demostrándose la necesidad de ambos dominios para la formación del complejo.

6.- Los RNAs quiméricos identificados procesaron específicamente su sustrato, aunque menos eficientemente que la ribozima HH363, confirmando el funcionamiento del segundo paso de selección.

7.- Los resultados obtenidos mediante estudios de accesibilidad demostraron que los motivos consenso de los RNAs quiméricos para las variantes 24, 31, 50, 18 y 32 son responsables de la interacción con el RNA sustrato. Los dominios de la región IRES a través de los cuales se unen los inhibidores se corresponden con las secuencias complementarias al motivo consenso, a excepción de la variante 53.

8.- Tanto los RNAs quiméricos como los dominios aptámero que se han escogido como representativos de cada una de las familias inhiben de manera significativa la traducción dependiente del IRES en un sistema de transcripción-traducción *in vitro*, lográndose una disminución en la actividad de hasta un 95%. Los inhibidores más potentes de la función del IRES corresponden con los RNAs quiméricos de las variantes 50, 17 y 18. Esto indica que el empleo combinado de dos dominios funcionales en una misma molécula mejora notablemente su capacidad inhibidora con respecto a ribozimas y aptámeros convencionales. Los resultados obtenidos avalan la utilidad del método de selección descrito y permiten hacer extensivo su uso para la obtención de nuevos RNAs inhibidores dirigidos frente a otras dianas virales y celulares.

B.- BIBLIOGRAFÍA

Adams, P.L., Stahley, M.R., Kosek, A.B., Wang, J. y Strobel, S.A. (2004) Crystal structure of a self-splicing group I intron with both exons. *Nature*, **430**, 45-50.

Aldaz-Carroll, L., Tallet, B., Dausse, E., Yurchenko, L. y Toulme, J.J. (2002) Apical loop-internal loop interactions: a new RNA-RNA recognition motif identified through *in vitro* selection against RNA hairpins of the hepatitis C virus mRNA. *Biochemistry*, **41**, 5883-5893.

Alt, M., Eisenhardt, S., Serwe, M., Renz, R., Engels, J.W. y Caselmann, W.H. (1999) Comparative inhibitory potential of differently modified antisense oligodeoxynucleotides on hepatitis C virus translation. *Eur J Clin Invest*, **29**, 868-876.

Alt, M., Renz, R., Hofschneider, P.H. y Caselmann, W.H. (1997) Core specific antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides as potent and specific inhibitors of hepatitis C viral translation. *Arch Virol*, **142**, 589-599.

Alt, M., Renz, R., Hofschneider, P.H., Paumgartner, G. y Caselmann, W.H. (1995) Specific inhibition of hepatitis C viral gene expression by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Hepatology*, **22**, 707-717.

Altman, S. (1995) RNase P in Research and Therapy. *Bio/Technology*, **13**, 327-329.

Altman, S., Kirsebom, L. y Talbot, S. (1993) Recent studies of ribonuclease P. *Faseb J*, **7**, 7-14.

Amin, M.A., Awadein, M.R. y Gabr, H. (2005) Evaluation of the inhibitory effect of antisense oligodeoxynucleotides on the growth of hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma cells *in vitro*. *Chin J Dig Dis*, **6**, 142-148.

Amiri, K.M. y Hagerman, P.J. (1994) Global conformation of a self-cleaving hammerhead RNA. *Biochemistry*, **33**, 13172-13177.

Amiri, K.M. y Hagerman, P.J. (1996) The global conformation of an active hammerhead RNA during the process of self-cleavage. *J Mol Biol*, **261**, 125-134.

Anderson, P., Monforte, J., Tritz, R., Nesbitt, S., Hearst, J. y Hampel, A. (1994) Mutagenesis of the hairpin ribozyme. *Nucleic Acids Res*, **22**, 1096-1100.

Asano, K., Niimi, T., Yokoyama, S. y Mizobuchi, K. (1998) Structural basis for binding of the plasmid Collb-P9 antisense Inc RNA to its target RNA with the 5'-rUUGGCG-3' motif in the loop sequence. *J Biol Chem*, **273**, 11826-11838.

Atsumi, S., Ikawa, Y., Shiraishi, H. y Inoue, T. (2001) Design and development of a catalytic ribonucleoprotein. *Embo J*, **20**, 5453-5460.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. y Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, **289**, 905-920.

Barroso-del Jesus, A., Puerta-Fernandez, E., Tapia, N., Romero-Lopez, C., Sanchez-Luque, F.J. y Berzal-Herranz, A. (2005) Inhibition of HIV-1 replication by an improved hairpin ribozyme that includes an RNA decoy. *RNA biology*, **2**, 75-79.

Barroso-delJesus, A. y Berzal-Herranz, A. (2001a) En busca de nuevos agentes antivirales: Ribozimas y estrategias de aplicación. *Virología*, **8**, 47-67.

Barroso-delJesus, A. y Berzal-Herranz, A. (2001b) Selection of targets and the most efficient hairpin ribozymes for inactivation of mRNAs using a self-cleaving RNA library. *EMBO Rep*, **2**, 1112-1118.

Barroso-delJesus, A., Tabler, M. y Berzal-Herranz, A. (1999) Comparative kinetic analysis of structural variants of the hairpin ribozyme reveals further potential to optimize its catalytic performance. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **9**, 433-440.

Bartel, D.P. y Szostak, J.W. (1993) Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences [see comment]. *Science*, **261**, 1411-1418.

Bartenschlager, R. (2005) The hepatitis C virus replicon system: From basic research to clinical application. *J Hepatol*, **43**, 210-216.

Bartosch, B., Dubuisson, J. y Cosset, F.L. (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med*, **197**, 633-642.

Baskerville, S. y Bartel, D.P. (2002) A ribozyme that ligates RNA to protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9154-9159.

Bassi, G.S., Mollegaard, N.E., Murchie, A.I., von Kitzing, E. y Lilley, D.M. (1995) Ionic interactions and the global conformations of the hammerhead ribozyme. *Nat Struct Biol*, **2**, 45-55.

Bassi, G.S., Murchie, A.I., Walter, F., Clegg, R.M. y Lilley, D.M. (1997) Ion-induced folding of the hammerhead ribozyme: a fluorescence resonance energy transfer study. *Embo J*, **16**, 7481-7489.

Beales, L.P., Rowlands, D.J. y Holzenburg, A. (2001) The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus visualized by electron microscopy. *Rna*, **7**, 661-670.

Beattie, T.L., Olive, J.E. y Collins, R.A. (1995) A secondary-structure model for the self-cleaving region of *Neurospora* VS RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4686-4690.

Beaudry, A.A. y Joyce, G.F. (1992) Directed evolution of an RNA enzyme. *Science*, **257**, 635-641.

Beaulieu, P.L., Bousquet, Y., Gauthier, J., Gillard, J., Marquis, M., McKercher, G., Pellerin, C., Valois, S. y Kukolj, G. (2004) Non-nucleoside benzimidazole-based allosteric inhibitors of the hepatitis C virus NS5B polymerase: inhibition of subgenomic hepatitis C virus RNA replicons in Huh-7 cells. *J Med Chem*, **47**, 6884-6892.

Been, M.D. y Perrotta, A.T. (1991) Group I intron self-splicing with adenosine: evidence for a single nucleoside-binding site. *Science*, **252**, 434-437.

Beguiristain, N., Robertson, H.D. y Gomez, J. (2005) RNase III cleavage demonstrates a long range RNA: RNA duplex element flanking the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Nucleic Acids Res*, **33**, 5250-5261.

Bellecave, P., Andreola, M.L., Ventura, M., Tarrago-Litvak, L., Litvak, S. y Astier-Gin, T. (2003) Selection of DNA aptamers that bind the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus and inhibit viral RNA synthesis *in vitro*. *Oligonucleotides*, **13**, 455-463.

Berzal-Herranz, A., Joseph, S. y Burke, J.M. (1992) *In vitro* selection of active hairpin ribozymes by sequential RNA- catalyzed cleavage and ligation reactions. *Genes Dev*, **6**, 129-134.

Berzal-Herranz, A., Joseph, S., Chowrira, B.M., Butcher, S.E. y Burke, J.M. (1993) Essential nucleotide sequences and secondary structure elements of the hairpin ribozyme. *Embo J*, **12**, 2567-2573.

Bevilacqua, P.C. (2003) Mechanistic considerations for general acid-base catalysis by RNA: revisiting the mechanism of the hairpin ribozyme. *Biochemistry*, **42**, 2259-2265.

Birikh, K.R., Heaton, P.A. y Eckstein, F. (1997) The structure, function and application of the hammerhead ribozyme. *Eur J Biochem*, **245**, 1-16.

Biroccio, A., Hamm, J., Incitti, I., De Francesco, R. y Tomei, L. (2002) Selection of RNA aptamers that are specific and high-affinity ligands of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*, **76**, 3688-3696.

Bonen, L. y Vogel, J. (2001) The ins and outs of group II introns. *Trends Genet*, **17**, 322-331.

Bramlage, B., Luzzi, E. y Eckstein, F. (2000) HIV-1 LTR as a target for synthetic ribozyme-mediated inhibition of gene expression: site selection and inhibition in cell culture. *Nucleic Acids Res*, **28**, 4059-4067.

Branch, A.D. y Robertson, H.D. (1984) A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science*, **223**, 450-455.

Branch, A.D. y Robertson, H.D. (1991) Efficient trans cleavage and a common structural motif for the ribozymes of the human hepatitis delta agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10163-10167.

Brantl, S. y Wagner, E.G. (2000) Antisense RNA-mediated transcriptional attenuation: an *in vitro* study of plasmid pT181. *Mol Microbiol*, **35**, 1469-1482.

Breaker, R.R. y Joyce, G.F. (1994) A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol*, **1**, 223-229.

Brown, E.A., Zhang, H., Ping, L.H. y Lemon, S.M. (1992) Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res*, **20**, 5041-5045.

Brown, J.W. (1999) The Ribonuclease P Database. *Nucleic Acids Res*, **27**, 314.

Brown, J.W., Nolan, J.M., Haas, E.S., Rubio, M.A., Major, F. y Pace, N.R. (1996) Comparative analysis of ribonuclease P RNA using gene sequences from natural

microbial populations reveals tertiary structural elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3001-3006.

Brown-Driver, V., Eto, T., Lesnik, E., Anderson, K.P. y Hanecak, R.C. (1999) Inhibition of translation of hepatitis C virus RNA by 2'-modified antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **9**, 145-154.

Brunel, C., Marquet, R., Romby, P. y Ehresmann, C. (2002) RNA loop-loop interactions as dynamic functional motifs. *Biochimie*, **84**, 925-944.

Brunel, C., Romby, P., Westhof, E., Ehresmann, C. y Ehresmann, B. (1991) Three-dimensional model of Escherichia coli ribosomal 5 S RNA as deduced from structure probing in solution and computer modeling. *J Mol Biol*, **221**, 293-308.

Bukh, J., Purcell, R.H. y Miller, R.H. (1992) Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 4942-4946.

Burke, D.H., Hoffman, D.C., Brown, A., Hansen, M., Pardi, A. y Gold, L. (1997) RNA aptamers to the peptidyl transferase inhibitor chloramphenicol. *Chem Biol*, **4**, 833-843.

Burke, J.M. y Berzal-Herranz, A. (1993) *In vitro* selection and evolution of RNA: applications for catalytic RNA, molecular recognition, and drug discovery. *Faseb J*, **7**, 106-112.

Buzayan, J.M., Gerlach, W.L. y Bruening, G. (1986a) Non-enzymatic cleavage and ligation of RNAs complementary to a plant virus satellite RNA. *Nature*, **323**, 349-353.

Buzayan, J.M., Gerlach, W.L. y Bruening, G. (1986b) Satellite tobacco ringspot virus RNA: A subset of the RNA sequence is sufficient for autolytic processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8859-8862.

Buzayan, J.M., Hampel, A. y Bruening, G. (1986c) Nucleotide sequence and newly formed phosphodiester bond of spontaneously ligated satellite tobacco ringspot virus RNA. *Nucleic Acids Res*, **14**, 9729-9743.

Carola, C. y Eckstein, F. (1999) Nucleic acid enzymes. *Curr Opin Chem Biol*, **3**, 274-283.

Cate, J.H., Gooding, A.R., Podell, E., Zhou, K., Golden, B.L., Kundrot, C.E., Cech, T.R. y Doudna, J.A. (1996) Crystal structure of a group I ribozyme domain: principles of RNA packing. *Science*, **273**, 1678-1685.

Cech, T.R. (1986) RNA as an enzyme. *Sci Am*, **255**, 64-75.

Cech, T.R. (1990) Self-splicing of group I introns. *Annu Rev Biochem*, **59**, 543-568.

Cech, T.R. (2000) Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science*, **289**, 878-879.

Cech, T.R., Zaug, A.J. y Grabowski, P.J. (1981) *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell*, **27**, 487-496.

Chang, K.Y. y Tinoco, I., Jr. (1997) The structure of an RNA "kissing" hairpin complex of the HIV TAR hairpin loop and its complement. *J Mol Biol*, **269**, 52-66.

Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W. y Houghton, M. (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, **244**, 359-362.

Chowrira, B.M., Berzal-Herranz, A. y Burke, J.M. (1991) Novel guanosine requirement for catalysis by the hairpin ribozyme. *Nature*, **354**, 320-322.

- Ciesiolka, J. y Yarus, M.** (1996) Small RNA-divalent domains. *Rna*, **2**, 785-793.
- Conaty, J., Hendry, P. y Lockett, T.** (1999) Selected classes of minimised hammerhead ribozyme have very high cleavage rates at low Mg²⁺ concentration. *Nucleic Acids Res*, **27**, 2400-2407.
- Conn, G.L., Draper, D.E., Lattman, E.E. y Gittis, A.G.** (1999) Crystal structure of a conserved ribosomal protein-RNA complex. *Science*, **284**, 1171-1174.
- Connell, G.J. y Yarus, M.** (1994) RNAs with dual specificity and dual RNAs with similar specificity. *Science*, **264**, 1137-1141.
- Crick, F.H.** (1968) The origin of the genetic code. *J Mol Biol*, **38**, 367-379.
- Crooke, S.T.** (1998) Molecular mechanisms of antisense drugs: RNase H. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **8**, 133-134.
- Crooke, S.T.** (1999) Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta*, **1489**, 31-44.
- Crooke, S.T.** (2004) Progress in antisense technology. *Annu Rev Med*, **55**, 61-95.
- Cuenoud, B. y Szostak, J.W.** (1995) A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity. *Nature*, **375**, 611-614.
- Da Rocha Gomes, S., Dausse, E. y Toulme, J.J.** (2004) Determinants of apical loop-internal loop RNA-RNA interactions involving the HCV IRES. *Biochem Biophys Res Commun*, **322**, 820-826.
- Daros, J.A., Marcos, J.F., Hernandez, C. y Flores, R.** (1994) Replication of avocado sunblotch viroid: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12813-12817.

Das, S., Ott, M., Yamane, A., Tsai, W., Gromeier, M., Lahser, F., Gupta, S. y Dasgupta, A. (1998) A small yeast RNA blocks hepatitis C virus internal ribosome entry site (HCV IRES)-mediated translation and inhibits replication of a chimeric poliovirus under translational control of the HCV IRES element. *J Virol*, **72**, 5638-5647.

Davies, R.W., Waring, R.B., Ray, J.A., Brown, T.A. y Scazzocchio, C. (1982) Making ends meet: a model for RNA splicing in fungal mitochondria. *Nature*, **300**, 719-724.

De la Pena, M., Gago, S. y Flores, R. (2003) Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *Embo J*, **22**, 5561-5570.

Declercq, R., Van Aerschot, A., Read, R.J., Herdewijn, P. y Van Meervelt, L. (2002) Crystal structure of double helical hexitol nucleic acids. *J Am Chem Soc*, **124**, 928-933.

Denman, R.B. (1999) Hairpin ribozyme specificity in vivo: a case of promiscuous cleavage. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 356-360.

Di Serio, F., Daros, J.A., Ragozzino, A. y Flores, R. (1997) A 451-nucleotide circular RNA from cherry with hammerhead ribozymes in its strands of both polarities. *J Virol*, **71**, 6603-6610.

Donis-Keller, H. (1979) Site specific enzymatic cleavage of RNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 179-192.

Doudna, J.A. y Cech, T.R. (2002) The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature*, **418**, 222-228.

Duconge, F., Di Primo, C. y Toulme, J.J. (2000) Is a closing "GA pair" a rule for stable loop-loop RNA complexes? *J Biol Chem*, **275**, 21287-21294.

Duconge, F. y Toulme, J.J. (1999) *In vitro* selection identifies key determinants for loop-loop interactions: RNA aptamers selective for the TAR RNA element of HIV-1. *Rna*, **5**, 1605-1614.

Dworkin, J.P., Lazcano, A. y Miller, S.L. (2003) The roads to and from the RNA world. *J Theor Biol*, **222**, 127-134.

Earnshaw, D.J., Masquida, B., Muller, S., Sigurdsson, S.T., Eckstein, F., Westhof, E. y Gait, M.J. (1997) Inter-domain cross-linking and molecular modelling of the hairpin ribozyme. *J Mol Biol*, **274**, 197-212.

Eckstein, F., Kore, A.R. y Nakamaye, K.L. (2001) *In vitro* selection of hammerhead ribozyme sequence variants. *ChemBiochem*, **2**, 629-635.

Eguchi, Y. y Tomizawa, J. (1991) Complexes formed by complementary RNA stem-loops. Their formations, structures and interaction with ColE1 Rom protein. *J Mol Biol*, **220**, 831-842.

Ehresmann, C., Baudin, F., Mougel, M., Romby, P., Ebel, J.P. y Ehresmann, B. (1987) Probing the structure of RNAs in solution. *Nucleic Acids Res*, **15**, 9109-9128.

Ekland, E.H. y Bartel, D.P. (1995) The secondary structure and sequence optimization of an RNA ligase ribozyme. *Nucleic Acids Res*, **23**, 3231-3238.

Ekland, E.H. y Bartel, D.P. (1996) RNA-catalysed RNA polymerization using nucleoside triphosphates. *Nature*, **382**, 373-376.

Ekland, E.H., Szostak, J.W. y Bartel, D.P. (1995) Structurally complex and highly active RNA ligases derived from random RNA sequences. *Science*, **269**, 364-370.

Elayadi, A.N. y Corey, D.R. (2001) Application of PNA and LNA oligomers to chemotherapy. *Curr Opin Investig Drugs*, **2**, 558-561.

Ellington, A.D. y Szostak, J.W. (1990) *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, **346**, 818-822.

Epstein, L.M. y Gall, J.G. (1987) Self-cleaving transcripts of satellite DNA from the newt. *Cell*, **48**, 535-543.

Famulok, M. y Szostak, J.W. (1992) Stereospecific Recognition of Tryptophan Agarose by *in Vitro* Selected RNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3990-3991.

Feldstein, P.A., Buzayan, J.M. y Bruening, G. (1989) Two sequences participating in the autolytic processing of satellite tobacco ringspot virus complementary RNA. *Gene*, **82**, 53-61.

Ferbeyre, G., Bourdeau, V., Pageau, M., Miramontes, P. y Cedergren, R. (2000) Distribution of hammerhead and hammerhead-like RNA motifs through the GenBank. *Genome Res*, **10**, 1011-1019.

Ferbeyre, G., Smith, J.M. y Cedergren, R. (1998) Schistosome satellite DNA encodes active hammerhead ribozymes. *Mol Cell Biol*, **18**, 3880-3888.

Ferguson, A., Boomer, R.M., Kurz, M., Keene, S.C., Diener, J.L., Keefe, A.D., Wilson, C. y Cload, S.T. (2004) A novel strategy for selection of allosteric ribozymes yields RiboReporter sensors for caffeine and aspartame. *Nucleic Acids Res*, **32**, 1756-1766.

Ferre-D'Amare, A.R., Zhou, K. y Doudna, J.A. (1998) Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature*, **395**, 567-574.

Fletcher, S.R., Ali, I.K., Kaminski, A., Digard, P. y Jackson, R.J. (2002) The influence of viral coding sequences on pestivirus IRES activity reveals further parallels with translation initiation in prokaryotes. *Rna*, **8**, 1558-1571.

Flores, R., Navarro, J.A., de la Pena, M., Navarro, B., Ambros, S. y Vera, A. (1999) Viroids with hammerhead ribozymes: some unique structural and functional aspects with respect to other members of the group. *Biol Chem*, **380**, 849-854.

Forster, A.C. y Altman, S. (1990) External guide sequences for an RNA enzyme. *Science*, **249**, 783-786.

Forster, A.C. y Symons, R.H. (1987a) Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell*, **49**, 211-220.

Forster, A.C. y Symons, R.H. (1987b) Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell*, **50**, 9-16.

Franch, T., Petersen, M., Wagner, E.G., Jacobsen, J.P. y Gerdes, K. (1999) Antisense RNA regulation in prokaryotes: rapid RNA/RNA interaction facilitated by a general U-turn loop structure. *J Mol Biol*, **294**, 1115-1125.

Frank, B.L. y Goodchild, J. (1997) Selection of accessible sites for ribozymes on large RNA transcripts. *Methods Mol Biol*, **74**, 37-43.

Friebe, P. y Bartenschlager, R. (2002) Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol*, **76**, 5326-5338.

Friebe, P., Boudet, J., Simorre, J.P. y Bartenschlager, R. (2005) Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol*, **79**, 380-392.

Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N. y Bartenschlager, R. (2001) Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol*, **75**, 12047-12057.

Fukuda, K., Umehara, T., Sekiya, S., Kunio, K., Hasegawa, T. y Nishikawa, S. (2004) An RNA ligand inhibits hepatitis C virus NS3 protease and helicase activities. *Biochem Biophys Res Commun*, **325**, 670-675.

Fukuda, K., Vishnuvardhan, D., Sekiya, S., Hwang, J., Kakiuchi, N., Taira, K., Shimotohno, K., Kumar, P.K. y Nishikawa, S. (2000) Isolation and characterization of RNA aptamers specific for the hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease. *Eur J Biochem*, **267**, 3685-3694.

Gast, F.U., Amiri, K.M. y Hagerman, P.J. (1994) Interhelix geometry of stems I and II of a self-cleaving hammerhead RNA. *Biochemistry*, **33**, 1788-1796.

Geiger, A., Burgstaller, P., von der Eltz, H., Roeder, A. y Famulok, M. (1996) RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res*, **24**, 1029-1036.

Gerdes, K., Gultyaev, A.P., Franch, T., Pedersen, K. y Mikkelsen, N.D. (1997) Antisense RNA-regulated programmed cell death. *Annu Rev Genet*, **31**, 1-31.

Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. y Yarus, M. (1995) Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem*, **64**, 763-797.

Golden, B.L., Kim, H. y Chase, E. (2005) Crystal structure of a phage Twort group I ribozyme-product complex. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 82-89.

Green, R., Ellington, A.D. y Szostak, J.W. (1990) *In vitro* genetic analysis of the Tetrahymena self-splicing intron. *Nature*, **347**, 406-408.

Guatelli, J.C., Whitfield, K.M., Kwoh, D.Y., Barringer, K.J., Richman, D.D. y Gingeras, T.R. (1990) Isothermal, *in vitro* amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 7797.

Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. y Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, **35**, 849-857.

Guo, F., Gooding, A.R. y Cech, T.R. (2004) Structure of the Tetrahymena ribozyme: base triple sandwich and metal ion at the active site. *Mol Cell*, **16**, 351-362.

Guo, H.C. y Collins, R.A. (1995) Efficient trans-cleavage of a stem-loop RNA substrate by a ribozyme derived from neurospora VS RNA. *Embo J*, **14**, 368-376.

Haas, E.S. y Brown, J.W. (1998) Evolutionary variation in bacterial RNase P RNAs. *Nucleic Acids Res*, **26**, 4093-4099.

Haldane, J.B.S. (1929) The origin of life. *Rationalist Annu*, **148**, 3-10.

Haller, A.A. y Sarnow, P. (1997) *In vitro* selection of a 7-methyl-guanosine binding RNA that inhibits translation of capped mRNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8521-8526.

Hammann, C. y Lilley, D.M. (2002) Folding and activity of the hammerhead ribozyme. *ChemBiochem*, **3**, 690-700.

Hampel, A. y Tritz, R. (1989) RNA catalytic properties of the minimum (-)sTRSV sequence. *Biochemistry*, **28**, 4929-4933.

Hampel, A., Tritz, R., Hicks, M. y Cruz, P. (1990) 'Hairpin' catalytic RNA model: evidence for helices and sequence requirement for substrate RNA. *Nucleic Acids Res*, **18**, 299-304.

Han, J. y Burke, J.M. (2005) Model for general acid-base catalysis by the hammerhead ribozyme: pH-activity relationships of G8 and G12 variants at the putative active site. *Biochemistry*, **44**, 7864-7870.

Hanahan, D. y Meselson, M. (1983) Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol*, **100**, 333-342.

Hanecak, R., Brown-Driver, V., Fox, M.C., Azad, R.F., Furusako, S., Nozaki, C., Ford, C., Sasmor, H. y Anderson, K.P. (1996) Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus gene expression in transformed hepatocytes. *J Virol*, **70**, 5203-5212.

Harada, K. y Orgel, L.E. (1993) *In vitro* selection of optimal DNA substrates for T4 RNA ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1576-1579.

Haseloff, J. y Gerlach, W.L. (1988) Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature*, **334**, 585-591.

Heckman, J.E., Lambert, D. y Burke, J.M. (2005) Photocrosslinking detects a compact, active structure of the hammerhead ribozyme. *Biochemistry*, **44**, 4148-4156.

Heidenreich, O., Benseler, F., Fahrenholz, A. y Eckstein, F. (1994) High activity and stability of hammerhead ribozymes containing 2'- modified pyrimidine nucleosides and phosphorothioates. *J Biol Chem*, **269**, 2131-2138.

Heidenreich, O., Pieken, W. y Eckstein, F. (1993) Chemically modified RNA: approaches and applications. *Faseb J*, **7**, 90-96.

Heintges, T., Encke, J., zu Putlitz, J. y Wands, J.R. (2001) Inhibition of hepatitis C virus NS3 function by antisense oligodeoxynucleotides and protease inhibitor. *J Med Virol*, **65**, 671-680.

Hellen, C.U. y Pestova, T.V. (1999) Translation of hepatitis C virus RNA. *J Viral Hepat*, **6**, 79-87.

Hernandez, C., Daros, J.A., Elena, S.F., Moya, A. y Flores, R. (1992) The strands of both polarities of a small circular RNA from carnation self-cleave *in vitro* through alternative double- and single-hammerhead structures. *Nucleic Acids Res*, **20**, 6323-6329.

Hernandez, C. y Flores, R. (1992) Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave *in vitro* via hammerhead structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 3711-3715.

Herschlag, D. (1991) Implications of ribozyme kinetics for targeting the cleavage of specific RNA molecules *in vivo*: more isn't always better. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6921-6925.

Hertel, K.J., Pardi, A., Uhlenbeck, O.C., Koizumi, M., Ohtsuka, E., Uesugi, S., Cedergren, R., Eckstein, F., Gerlach, W.L., Hodgson, R. y et al. (1992) Numbering system for the hammerhead. *Nucleic Acids Res*, **20**, 3252.

Hjalt, T.A. y Wagner, E.G. (1995) Bulged-out nucleotides in an antisense RNA are required for rapid target RNA binding *in vitro* and inhibition *in vivo*. *Nucleic Acids Res*, **23**, 580-587.

Hofmann, H.P., Limmer, S., Hornung, V. y Sprinzl, M. (1997) Ni²⁺-binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a G-A base pair. *Rna*, **3**, 1289-1300.

Honda, M., Beard, M.R., Ping, L.H. y Lemon, S.M. (1999a) A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol*, **73**, 1165-1174.

Honda, M., Brown, E.A. y Lemon, S.M. (1996a) Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *Rna*, **2**, 955-968.

Honda, M., Ping, L.H., Rijnbrand, R.C., Amphlett, E., Clarke, B., Rowlands, D. y Lemon, S.M. (1996b) Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology*, **222**, 31-42.

Honda, M., Rijnbrand, R., Abell, G., Kim, D. y Lemon, S.M. (1999b) Natural variation in translational activities of the 5' nontranslated RNAs of hepatitis C virus genotypes 1a and 1b: evidence for a long-range RNA-RNA interaction outside of the internal ribosomal entry site. *J Virol*, **73**, 4941-4951.

Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C.M. y McKeating, J.A. (2003) Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 7271-7276.

Huang, F. y Yarus, M. (1997) Versatile 5' phosphoryl coupling of small and large molecules to an RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8965-8969.

Hughes, R.A., Robertson, M.P., Ellington, A.D. y Levy, M. (2004) The importance of prebiotic chemistry in the RNA world. *Curr Opin Chem Biol*, **8**, 629-633.

Hutchins, C.J., Rathjen, P.D., Forster, A.C. y Symons, R.H. (1986) Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res*, **14**, 3627-3640.

Hwang, B., Cho, J.S., Yeo, H.J., Kim, J.H., Chung, K.M., Han, K., Jang, S.K. y Lee, S.W. (2004a) Isolation of specific and high-affinity RNA aptamers against NS3 helicase domain of hepatitis C virus. *Rna*, **10**, 1277-1290.

Hwang, D.R., Tsai, Y.C., Lee, J.C., Huang, K.K., Lin, R.K., Ho, C.H., Chiou, J.M., Lin, Y.T., Hsu, J.T. y Yeh, C.T. (2004b) Inhibition of hepatitis C virus replication by arsenic trioxide. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 2876-2882.

Illangasekare, M., Sanchez, G., Nickles, T. y Yarus, M. (1995) Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA. *Science*, **267**, 643-647.

Inchauspe, G., Abe, K., Zebedee, S., Nasoff, M. y Prince, A.M. (1991) Use of conserved sequences from hepatitis C virus for the detection of viral RNA in infected sera by polymerase chain reaction. *Hepatology*, **14**, 595-600.

Ishida, S., Kaito, M., Kohara, M., Tsukiyama-Kohora, K., Fujita, N., Ikoma, J., Adachi, Y. y Watanabe, S. (2001) Hepatitis C virus core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. *Hepatol Res*, **20**, 335-347.

Ishizaka, M., Ohshima, Y. y Tani, T. (1995) Isolation of active ribozymes from an RNA pool of random sequences using an anchored substrate RNA. *Biochem Biophys Res Commun*, **214**, 403-409.

Jackson, R.J. (1991) Potassium salts influence the fidelity of mRNA translation initiation in rabbit reticulocyte lysates: unique features of encephalomyocarditis virus RNA translation. *Biochim Biophys Acta*, **1088**, 345-358.

Jadhav, V.R. y Yarus, M. (2002) Acyl-CoAs from coenzyme ribozymes. *Biochemistry*, **41**, 723-729.

Jaeger, J.A., Turner, D.H. y Zuker, M. (1990) Predicting optimal and suboptimal secondary structure for RNA. *Methods Enzymol*, **183**, 281-306.

Jaeger, L., Wright, M.C. y Joyce, G.F. (1999) A complex ligase ribozyme evolved *in vitro* from a group I ribozyme domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14712-14717.

Jarrell, K.A., Dietrich, R.C. y Perlman, P.S. (1988) Group II intron domain 5 facilitates a trans-splicing reaction. *Mol Cell Biol*, **8**, 2361-2366.

Jarvis, T.C., Wincott, F.E., Alby, L.J., McSwiggen, J.A., Beigelman, L., Gustofson, J., DiRenzo, A., Levy, K., Arthur, M., Matulic-Adamic, J., Karpeisky, A., Gonzalez, C., Woolf, T.M., Usman, N. y Stinchcomb, D.T. (1996) Optimizing the cell

efficacy of synthetic ribozymes. Site selection and chemical modifications of ribozymes targeting the proto-oncogene c-myc. *J Biol Chem*, **271**, 29107-29112.

Jeffries, A.C. y Symons, R.H. (1989) A catalytic 13-mer ribozyme. *Nucleic Acids Res*, **17**, 1371-1377.

Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A. y Polisky, B. (1994) High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*, **263**, 1425-1429.

Jenne, A. y Famulok, M. (1998) A novel ribozyme with ester transferase activity. *Chem Biol*, **5**, 23-34.

Ji, H., Fraser, C.S., Yu, Y., Leary, J. y Doudna, J.A. (2004) Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 16990-16995.

Johnston, W.K., Unrau, P.J., Lawrence, M.S., Glasner, M.E. y Bartel, D.P. (2001) RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension. *Science*, **292**, 1319-1325.

Joseph, S., Berzal-Herranz, A., Chowrira, B.M., Butcher, S.E. y Burke, J.M. (1993) Substrate selection rules for the hairpin ribozyme determined by *in vitro* selection, mutation, and analysis of mismatched substrates. *Genes Dev*, **7**, 130-138.

Joseph, S. y Burke, J.M. (1993) Optimization of an anti-HIV hairpin ribozyme by *in vitro* selection. *J Biol Chem*, **268**, 24515-24518.

Joyce, G.F. (2002) The antiquity of RNA-based evolution. *Nature*, **418**, 214-221.

Jubin, R., Vantuno, N.E., Kieft, J.S., Murray, M.G., Doudna, J.A., Lau, J.Y. y Baroudy, B.M. (2000) Hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) stem loop IIIId

contains a phylogenetically conserved GGG triplet essential for translation and IRES folding. *J Virol*, **74**, 10430-10437.

Juneau, K., Podell, E., Harrington, D.J. y Cech, T.R. (2001) Structural basis of the enhanced stability of a mutant ribozyme domain and a detailed view of RNA--solvent interactions. *Structure (Camb)*, **9**, 221-231.

Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., Yokoi, M., Ishida, S., Suzuki, S. y Kohara, M. (1994) Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol*, **75 (Pt 7)**, 1755-1760.

Kanda, T., Yokosuka, O., Imazeki, F., Tanaka, M., Shino, Y., Shimada, H., Tomonaga, T., Nomura, F., Nagao, K., Ochiai, T. y Saisho, H. (2004) Inhibition of subgenomic hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells: ribavirin induces mutagenesis in HCV RNA. *J Viral Hepat*, **11**, 479-487.

Kapadia, S.B., Brideau-Andersen, A. y Chisari, F.V. (2003) Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2014-2018.

Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T. y Shimotohno, K. (1990) Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9524-9528.

Kato, Y., Kuwabara, T., Warashina, M., Toda, H. y Taira, K. (2001) Relationships between the activities *in vitro* and *in vivo* of various kinds of ribozyme and their intracellular localization in mammalian cells. *J Biol Chem*, **276**, 15378-15385.

Kawazoe, N., Teramoto, N., Ichinari, H., Imanishi, Y. y Ito, Y. (2001) *In vitro* selection of nonnatural ribozyme-catalyzing porphyrin metalation. *Biomacromolecules*, **2**, 681-686.

Kazakov, S. y Altman, S. (1992) A trinucleotide can promote metal ion-dependent specific cleavage of RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7939-7943.

Kennell, J.C., Saville, B.J., Mohr, S., Kuiper, M.T., Sabourin, J.R., Collins, R.A. y Lambowitz, A.M. (1995) The VS catalytic RNA replicates by reverse transcription as a satellite of a retroplasmid. *Genes Dev*, **9**, 294-303.

Kieft, J.S., Zhou, K., Jubin, R. y Doudna, J.A. (2001) Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *Rna*, **7**, 194-206.

Kieft, J.S., Zhou, K., Jubin, R., Murray, M.G., Lau, J.Y. y Doudna, J.A. (1999) The hepatitis C virus internal ribosome entry site adopts an ion-dependent tertiary fold. *J Mol Biol*, **292**, 513-529.

Kiga, D., Futamura, Y., Sakamoto, K. y Yokoyama, S. (1998) An RNA aptamer to the xanthine/guanine base with a distinctive mode of purine recognition. *Nucleic Acids Res*, **26**, 1755-1760.

Kikuchi, K., Umehara, T., Fukuda, K., Hwang, J., Kuno, A., Hasegawa, T. y Nishikawa, S. (2003) RNA aptamers targeted to domain II of hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region. *J Biochem (Tokyo)*, **133**, 263-270.

Kikuchi, K., Umehara, T., Fukuda, K., Kuno, A., Hasegawa, T. y Nishikawa, S. (2005) A hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES) domain III-IV-targeted aptamer inhibits translation by binding to an apical loop of domain IIIId. *Nucleic Acids Res*, **33**, 683-692.

Kim, Y.K., Lee, S.H., Kim, C.S., Seol, S.K. y Jang, S.K. (2003) Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *Rna*, **9**, 599-606.

Klinck, R., Westhof, E., Walker, S., Afshar, M., Collier, A. y Aboul-Ela, F. (2000) A potential RNA drug target in the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *Rna*, **6**, 1423-1431.

Koch, J.L., Boulanger, S.C., Dib-Hajj, S.D., Hebbar, S.K. y Perlman, P.S. (1992) Group II introns deleted for multiple substructures retain self-splicing activity. *Mol Cell Biol*, **12**, 1950-1958.

Kolb, F.A., Engdahl, H.M., Slagter-Jager, J.G., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Westhof, E., Wagner, E.G. y Romby, P. (2000) Progression of a loop-loop complex to a four-way junction is crucial for the activity of a regulatory antisense RNA. *Embo J*, **19**, 5905-5915.

Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V. y Hellen, C.U. (2000) An enzymatic footprinting analysis of the interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *J Virol*, **74**, 6242-6250.

Komatsu, Y., Nobuoka, K., Karino-Abe, N., Matsuda, A. y Ohtsuka, E. (2002) *In vitro* selection of hairpin ribozymes activated with short oligonucleotides. *Biochemistry*, **41**, 9090-9098.

Kore, A.R., Vaish, N.K., Kutzke, U. y Eckstein, F. (1998) Sequence specificity of the hammerhead ribozyme revisited; the NHH rule. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4116-4120.

Korf, M., Jarczak, D., Beger, C., Manns, M.P. y Kruger, M. (2005) Inhibition of hepatitis C virus translation and subgenomic replication by siRNAs directed against highly conserved HCV sequence and cellular HCV cofactors. *J Hepatol*, **43**, 225-234.

Kronke, J., Kittler, R., Buchholz, F., Windisch, M.P., Pietschmann, T., Bartenschlager, R. y Frese, M. (2004) Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J Virol*, **78**, 3436-3446.

Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E. y Cech, T.R. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*, **31**, 147-157.

Kumar, P.K., Machida, K., Urvil, P.T., Kakiuchi, N., Vishnuvardhan, D., Shimotohno, K., Taira, K. y Nishikawa, S. (1997) Isolation of RNA aptamers specific to the NS3 protein of hepatitis C virus from a pool of completely random RNA. *Virology*, **237**, 270-282.

Kuo, M.Y., Sharmeen, L., Dinter-Gottlieb, G. y Taylor, J. (1988) Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus. *J Virol*, **62**, 4439-4444.

Kuwabara, T., Amontov, S.V., Warashina, M., Ohkawa, J. y Taira, K. (1996) Characterization of several kinds of dimer minizyme: simultaneous cleavage at two sites in HIV-1 tat mRNA by dimer minizymes. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2302-2310.

Lafuente, E., Ramos, R. y Martinez-Salas, E. (2002) Long-range RNA-RNA interactions between distant regions of the hepatitis C virus internal ribosome entry site element. *J Gen Virol*, **83**, 1113-1121.

Lato, S.M., Boles, A.R. y Ellington, A.D. (1995) *In vitro* selection of RNA lectins: using combinatorial chemistry to interpret ribozyme evolution. *Chem Biol*, **2**, 291-303.

Lau, M.W., Cadieux, K.E. y Unrau, P.J. (2004) Isolation of fast purine nucleotide synthase ribozymes. *J Am Chem Soc*, **126**, 15686-15693.

Lauhon, C.T. y Szostak, J.W. (1995) RNA aptamers that bind flavin and nicotinamide redox cofactors. *J Am Chem Soc*, **117**, 1246-1257.

Lease, R.A. y Belfort, M. (2000) A trans-acting RNA as a control switch in *Escherichia coli*: DsrA modulates function by forming alternative structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9919-9924.

Lederberg, E.M. y Cohen, S.N. (1974) Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol*, **119**, 1072-1074.

Lee, J.F., Hesselberth, J.R., Meyers, L.A. y Ellington, A.D. (2004) Aptamer database. *Nucleic Acids Res*, **32**, D95-100.

Lee, T.C., Sullenger, B.A., Gallardo, H.F., Ungers, G.E. y Gilboa, E. (1992) Overexpression of RRE-derived sequences inhibits HIV-1 replication in CEM cells. *New Biol*, **4**, 66-74.

Lehman, N. y Joyce, G.F. (1993) Evolution *in vitro* of an RNA enzyme with altered metal dependence. *Nature*, **361**, 182-185.

Lieber, A., He, C.Y., Polyak, S.J., Gretch, D.R., Barr, D. y Kay, M.A. (1996) Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes. *J Virol*, **70**, 8782-8791.

Lieber, A. y Strauss, M. (1995) Selection of efficient cleavage sites in target RNAs by using a ribozyme expression library. *Mol Cell Biol*, **15**, 540-551.

Lindell, M., Romby, P. y Wagner, E.G. (2002) Lead(II) as a probe for investigating RNA structure *in vivo*. *Rna*, **8**, 534-541.

Liu, F. y Altman, S. (1994) Differential evolution of substrates for an RNA enzyme in the presence and absence of its protein cofactor. *Cell*, **77**, 1093-1100.

Lohse, P.A. y Szostak, J.W. (1996) Ribozyme-catalysed amino-acid transfer reactions. *Nature*, **381**, 442-444.

Long, D.M. y Uhlenbeck, O.C. (1993) Self-cleaving catalytic RNA. *Faseb J*, **7**, 25-30.

Long, D.M. y Uhlenbeck, O.C. (1994) Kinetic characterization of intramolecular and intermolecular hammerhead RNAs with stem II deletions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6977-6981.

Lorsch, J.R. y Szostak, J.W. (1994a) *In vitro* evolution of new ribozymes with polynucleotide kinase activity. *Nature*, **371**, 31-36.

Lorsch, J.R. y Szostak, J.W. (1994b) *In vitro* selection of RNA aptamers specific for cyanocobalamin. *Biochemistry*, **33**, 973-982.

Lu, H.H. y Wimmer, E. (1996) Poliovirus chimeras replicating under the translational control of genetic elements of hepatitis C virus reveal unusual properties of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1412-1417.

Lukavsky, P.J., Kim, I., Otto, G.A. y Puglisi, J.D. (2003) Structure of HCV IRES domain II determined by NMR. *Nat Struct Biol*, **10**, 1033-1038.

Lukavsky, P.J., Otto, G.A., Lancaster, A.M., Sarnow, P. y Puglisi, J.D. (2000) Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function. *Nat Struct Biol*, **7**, 1105-1110.

Lyons, A.J., Lytle, J.R., Gomez, J. y Robertson, H.D. (2001) Hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA contains a tertiary structural element in a functional domain of stem-loop II. *Nucleic Acids Res*, **29**, 2535-2541.

Lyons, A.J. y Robertson, H.D. (2003) Detection of tRNA-like structure through RNase P cleavage of viral internal ribosome entry site RNAs near the AUG start triplet. *J Biol Chem*, **278**, 26844-26850.

Lytle, J.R., Wu, L. y Robertson, H.D. (2002) Domains on the hepatitis C virus internal ribosome entry site for 40s subunit binding. *Rna*, **8**, 1045-1055.

Ma, C. y Simons, R.W. (1990) The IS10 antisense RNA blocks ribosome binding at the transposase translation initiation site. *Embo J*, **9**, 1267-1274.

Macejak, D.G., Jensen, K.L., Jamison, S.F., Domenico, K., Roberts, E.C., Chaudhary, N., von Carlowitz, I., Bellon, L., Tong, M.J., Conrad, A., Pavco, P.A. y Blatt, L.M. (2000) Inhibition of hepatitis C virus (HCV)-RNA-dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes. *Hepatology*, **31**, 769-776.

Macejak, D.G., Jensen, K.L., Pavco, P.A., Phipps, K.M., Heinz, B.A., Colacino, J.M. y Blatt, L.M. (2001) Enhanced antiviral effect in cell culture of type 1 interferon and ribozymes targeting HCV RNA. *J Viral Hepat*, **8**, 400-405.

Majerfeld, I. y Yarus, M. (1994) An RNA pocket for an aliphatic hydrophobe. *Nat Struct Biol*, **1**, 287-292.

Malmgren, C., Engdahl, H.M., Romby, P. y Wagner, E.G. (1996) An antisense/target RNA duplex or a strong intramolecular RNA structure 5' of a translation initiation signal blocks ribosome binding: the case of plasmid R1. *Rna*, **2**, 1022-1032.

Mannironi, C., Di Nardo, A., Fruscoloni, P. y Tocchini-Valentini, G.P. (1997) *In vitro* selection of dopamine RNA ligands. *Biochemistry*, **36**, 9726-9734.

Manoharan, M. (1999) 2'-carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy: importance of conformation, configuration and conjugation. *Biochim Biophys Acta*, **1489**, 117-130.

Marschall, P., Thomson, J.B. y Eckstein, F. (1994) Inhibition of gene expression with ribozymes. *Cell Mol Neurobiol*, **14**, 523-538.

Martell, M., Esteban, J.I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J. y Gomez, J. (1992) Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol*, **66**, 3225-3229.

McCaffrey, A.P., Meuse, L., Karimi, M., Contag, C.H. y Kay, M.A. (2003) A potent and specific morpholino antisense inhibitor of hepatitis C translation in mice. *Hepatology*, **38**, 503-508.

McClain, W.H., Guerrier-Takada, C. y Altman, S. (1987) Model substrates for an RNA enzyme. *Science*, **238**, 527-530.

McGinness, K.E. y Joyce, G.F. (2002) RNA-catalyzed RNA ligation on an external RNA template. *Chem Biol*, **9**, 297-307.

Meyer, K., Basu, A., Saito, K., Ray, R.B. y Ray, R. (2005) Inhibition of hepatitis C virus core protein expression in immortalized human hepatocytes induces cytochrome c-independent increase in Apaf-1 and caspase-9 activation for cell death. *Virology*, **336**, 198-207.

Michel, F., Hanna, M., Green, R., Bartel, D.P. y Szostak, J.W. (1989) The guanosine binding site of the Tetrahymena ribozyme. *Nature*, **342**, 391-395.

Miller, S.L. (1953) A production of aminoacids under possible primitive Earth conditions. *Science*, **117**, 528-529.

Miller, W.A. y Silver, S.L. (1991) Alternative tertiary structure attenuates self-cleavage of the ribozyme in the satellite RNA of barley yellow dwarf virus. *Nucleic Acids Res*, **19**, 5313-5320.

Mills, D.R., Peterson, R.L. y Spiegelman, S. (1967) An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **58**, 217-224.

Morita, K., Hasegawa, C., Kaneko, M., Tsutsumi, S., Sone, J., Ishikawa, T., Imanishi, T. y Koizumi, M. (2002) 2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids (ENA): highly nuclease-resistant and thermodynamically stable oligonucleotides for antisense drug. *Bioorg Med Chem Lett*, **12**, 73-76.

Morris, K.N., Jensen, K.B., Julin, C.M., Weil, M. y Gold, L. (1998) High affinity ligands from *in vitro* selection: complex targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2902-2907.

Murray, J.B., Dunham, C.M. y Scott, W.G. (2002) A pH-dependent conformational change, rather than the chemical step, appears to be rate-limiting in the hammerhead ribozyme cleavage reaction. *J Mol Biol*, **315**, 121-130.

Nadal, A., Martell, M., Lytle, J.R., Lyons, A.J., Robertson, H.D., Cabot, B., Esteban, J.I., Esteban, R., Guardia, J. y Gomez, J. (2002) Specific cleavage of hepatitis C virus RNA genome by human RNase P. *J Biol Chem*, **277**, 30606-30613.

Nadal, A., Robertson, H.D., Guardia, J. y Gomez, J. (2003) Characterization of the structure and variability of an internal region of hepatitis C virus RNA for M1 RNA guide sequence ribozyme targeting. *J Gen Virol*, **84**, 1545-1548.

Nakagawa, M., Sakamoto, N., Enomoto, N., Tanabe, Y., Kanazawa, N., Koyama, T., Kurosaki, M., Maekawa, S., Yamashiro, T., Chen, C.H., Itsui, Y., Kakinuma, S. y Watanabe, M. (2004) Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun*, **313**, 42-47.

Nakamaye, K.L. y Eckstein, F. (1994) AUA-cleaving hammerhead ribozymes: attempted selection for improved cleavage. *Biochemistry*, **33**, 1271-1277.

Navarro, B. y Flores, R. (1997) Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11262-11267.

Nesbitt, S., Hegg, L.A. y Fedor, M.J. (1997) An unusual pH-independent and metal-ion-independent mechanism for hairpin ribozyme catalysis. *Chem Biol*, **4**, 619-630.

Nielsen, P.E. (1993) Peptide nucleic acid (PNA): a model structure for the primordial genetic material? *Orig Life Evol Biosph*, **23**, 323-327.

Nieuwlandt, D. (2000) *In vitro* selection of functional nucleic acid sequences. *Curr Issues Mol Biol*, **2**, 9-16.

Nieuwlandt, D., Wecker, M. y Gold, L. (1995) *In vitro* selection of RNA ligands to substance P. *Biochemistry*, **34**, 5651-5659.

Nishikawa, F., Funaji, K., Fukuda, K. y Nishikawa, S. (2004) *In vitro* selection of RNA aptamers against the HCV NS3 helicase domain. *Oligonucleotides*, **14**, 114-129.

Nishikawa, F., Kakiuchi, N., Funaji, K., Fukuda, K., Sekiya, S. y Nishikawa, S. (2003) Inhibition of HCV NS3 protease by RNA aptamers in cells. *Nucleic Acids Res*, **31**, 1935-1943.

Nordstrom, K. y Wagner, E.G. (1994) Kinetic aspects of control of plasmid replication by antisense RNA. *Trends Biochem Sci*, **19**, 294-300.

Nulf, C.J. y Corey, D. (2004) Intracellular inhibition of hepatitis C virus (HCV) internal ribosomal entry site (IRES)-dependent translation by peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs). *Nucleic Acids Res*, **32**, 3792-3798.

Ohkawa, J., Yuyama, N., Takebe, Y., Nisikawa, S., Homann, M., Sczakiel, G. y Taira, K. (1993) Multiple site-specific cleavage of HIV RNA by transcribed ribozymes from shotgun-type trimming plasmid. *Nucleic Acids Symp Ser*, 121-122.

Ohman, M. y Wagner, E.G. (1989) Secondary structure analysis of the RepA mRNA leader transcript involved in control of replication of plasmid R1. *Nucleic Acids Res*, **17**, 2557-2579.

Oparin, A.I. (1924) *Proiskhozhdenie zhizny*, Moscow.

Oparin, A.I. (1936) *Vozniknovenie zhizny na zemle*, Moscow.

Oparin, A.I. (1938) *The origin of life*, New York.

Orgel, L.E. (1968) Evolution of the genetic apparatus. *J Mol Biol*, **38**, 381-393.

Otto, G.A., Lukavsky, P.J., Lancaster, A.M., Sarnow, P. y Puglisi, J.D. (2002) Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40S interaction. *Rna*, **8**, 913-923.

Pan, T. y Uhlenbeck, O.C. (1992a) *In vitro* selection of RNAs that undergo autolytic cleavage with Pb²⁺. *Biochemistry*, **31**, 3887-3895.

Pan, T. y Uhlenbeck, O.C. (1992b) A small metalloribozyme with a two-step mechanism. *Nature*, **358**, 560-563.

Pan, W., Craven, R.C., Qiu, Q., Wilson, C.B., Wills, J.W., Golovine, S. y Wang, J.F. (1995) Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11509-11513.

Pan, W.H., Xin, P., Bui, V. y Clawson, G.A. (2003) Rapid identification of efficient target cleavage sites using a hammerhead ribozyme library in an iterative manner. *Mol Ther*, **7**, 129-139.

Paulous, S., Malnou, C.E., Michel, Y.M., Kean, K.M. y Borman, A.M. (2003) Comparison of the capacity of different viral internal ribosome entry segments to direct translation initiation in poly(A)-dependent reticulocyte lysates. *Nucleic Acids Res*, **31**, 722-733.

Pelham, H.R. y Jackson, R.J. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem*, **67**, 247-256.

Penedo, J.C., Wilson, T.J., Jayasena, S.D., Khvorova, A. y Lilley, D.M. (2004) Folding of the natural hammerhead ribozyme is enhanced by interaction of auxiliary elements. *Rna*, **10**, 880-888.

Perez-Ruiz, M., Barroso-DelJesus, A. y Berzal-Herranz, A. (1999) Specificity of the hairpin ribozyme. Sequence requirements surrounding the cleavage site. *J Biol Chem*, **274**, 29376-29380.

Perrotta, A.T. y Been, M.D. (1991) A pseudoknot-like structure required for efficient self-cleavage of hepatitis delta virus RNA. *Nature*, **350**, 434-436.

Perrotta, A.T. y Been, M.D. (1992) Cleavage of oligoribonucleotides by a ribozyme derived from the hepatitis delta virus RNA sequence. *Biochemistry*, **31**, 16-21.

Persson, C., Wagner, E.G. y Nordstrom, K. (1990a) Control of replication of plasmid R1: formation of an initial transient complex is rate-limiting for antisense RNA--target RNA pairing. *Embo J*, **9**, 3777-3785.

Persson, C., Wagner, E.G. y Nordstrom, K. (1990b) Control of replication of plasmid R1: structures and sequences of the antisense RNA, CopA, required for its binding to the target RNA, CopT. *Embo J*, **9**, 3767-3775.

Pieken, W.A., Olsen, D.B., Benseler, F., Aurup, H. y Eckstein, F. (1991) Kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes. *Science*, **253**, 314-317.

Piganeau, N., Thuillier, V. y Famulok, M. (2001) *In vitro* selection of allosteric ribozymes: theory and experimental validation. *J Mol Biol*, **312**, 1177-1190.

Pinard, R., Lambert, D., Walter, N.G., Heckman, J.E., Major, F. y Burke, J.M. (1999) Structural basis for the guanosine requirement of the hairpin ribozyme. *Biochemistry*, **38**, 16035-16039.

Piron, M., Beguiristain, N., Nadal, A., Martinez-Salas, E. y Gomez, J. (2005) Characterizing the function and structural organization of the 5' tRNA-like motif within the hepatitis C virus quasispecies. *Nucleic Acids Res*, **33**, 1487-1502.

Pley, H.W., Flaherty, K.M. y McKay, D.B. (1994) Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature*, **372**, 68-74.

Podar, M., Chu, V.T., Pyle, A.M. y Perlman, P.S. (1998) Group II intron splicing in vivo by first-step hydrolysis. *Nature*, **391**, 915-918.

Porta, H. y Lizardi, P.M. (1995) An allosteric hammerhead ribozyme. *Biotechnology (N Y)*, **13**, 161-164.

Prabhu, R., Vittal, P., Yin, Q., Flemington, E., Garry, R., Robichaux, W.H. y Dash, S. (2005) Small interfering RNA effectively inhibits protein expression and negative strand RNA synthesis from a full-length hepatitis C virus clone. *J Med Virol*, **76**, 511-519.

Prody, G.A., Bakos, J.T., Buzayan, J.M., Schneider, I.R. y Bruening, G. (1986) Autolytic Processing of Dimeric Plant Virus Satellite RNA. *Science*, **231**, 1577-1580.

Puerta-Fernandez, E., Barroso-del Jesus, A., Romero-Lopez, C. y Berzal-Herranz, A. (2003a) HIV-1 TAR as anchoring site for optimized catalytic RNAs. *Biol Chem*, **384**, 343-350.

Puerta-Fernandez, E., Barroso-DelJesus, A. y Berzal-Herranz, A. (2002) Anchoring hairpin ribozymes to long target RNAs by loop-loop RNA interactions. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **12**, 1-9.

Puerta-Fernandez, E., Jesus, A.B., Romero-Lopez, C., Tapia, N., Martinez, M.A. y Berzal-Herranz, A. (2005) Inhibition of HIV-1 replication by RNA targeted against the LTR region. *Aids*, **19**, 863-870.

Puerta-Fernandez, E., Romero-Lopez, C., Barroso-delJesus, A. y Berzal-Herranz, A. (2003b) Ribozymes: recent advances in the development of RNA tools. *FEMS Microbiol Rev*, **27**, 75-97.

Pyle, A.M. (1993) Ribozymes: a distinct class of metalloenzymes. *Science*, **261**, 709-714.

Pyle, A.M. (1996) *Catalytic reaction mechanism and structural features of group II intron ribozymes*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

Qin, P.Z. y Pyle, A.M. (1999) Antagonistic substrate binding by a group II intron ribozyme. *J Mol Biol*, **291**, 15-27.

Raleigh, E.A., Lech, K. y Brent, R. (1989) Unidad 1.4. In Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*. Publishing associates and Wiley Interscience, New York.

Ramos, R. y Martinez-Salas, E. (1999) Long-range RNA interactions between structural domains of the aphthovirus internal ribosome entry site (IRES). *Rna*, **5**, 1374-1383.

Randall, G., Grakoui, A. y Rice, C.M. (2003) Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 235-240.

Rastogi, T. y Collins, R.A. (1998) Smaller, faster ribozymes reveal the catalytic core of Neurospora VS RNA. *J Mol Biol*, **277**, 215-224.

Ray, P.S. y Das, S. (2004) Inhibition of hepatitis C virus IRES-mediated translation by small RNAs analogous to stem-loop structures of the 5'-untranslated region. *Nucleic Acids Res*, **32**, 1678-1687.

Reich, C., Olsen, G.J., Pace, B. y Pace, N.R. (1988) Role of the protein moiety of ribonuclease P, a ribonucleoprotein enzyme. *Science*, **239**, 178-181.

Reynolds, J.E., Kaminski, A., Carroll, A.R., Clarke, B.E., Rowlands, D.J. y Jackson, R.J. (1996) Internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA: the ribosome entry site is at the authentic initiation codon. *Rna*, **2**, 867-878.

Reynolds, J.E., Kaminski, A., Kettinen, H.J., Grace, K., Clarke, B.E., Carroll, A.R., Rowlands, D.J. y Jackson, R.J. (1995) Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *Embo J*, **14**, 6010-6020.

Rhie, A., Kirby, L., Sayer, N., Wellesley, R., Disterer, P., Sylvester, I., Gill, A., Hope, J., James, W. y Tahiri-Alaoui, A. (2003) Characterization of 2'-fluoro-RNA aptamers that bind preferentially to disease-associated conformations of prion protein and inhibit conversion. *J Biol Chem*, **278**, 39697-39705.

Rijnbrand, R., Bredenbeek, P., van der Straaten, T., Whetter, L., Inchauspe, G., Lemon, S. y Spaan, W. (1995) Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation. *FEBS Lett*, **365**, 115-119.

Rijnbrand, R.C. y Lemon, S.M. (2000) Internal ribosome entry site-mediated translation in hepatitis C virus replication. *Curr Top Microbiol Immunol*, **242**, 85-116.

Ringquist, S., Jones, T., Snyder, E.E., Gibson, T., Boni, I. y Gold, L. (1995) High-affinity RNA ligands to Escherichia coli ribosomes and ribosomal protein S1: comparison of natural and unnatural binding sites. *Biochemistry*, **34**, 3640-3648.

Robertson, D.L. y Joyce, G.F. (1990) Selection *in vitro* of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*, **344**, 467-468.

Robertson, M.P. y Ellington, A.D. (1999) *In vitro* selection of an allosteric ribozyme that transduces analytes to amplicons. *Nat Biotechnol*, **17**, 62-66.

Robertson, M.P. y Ellington, A.D. (2000) Design and optimization of effector-activated ribozyme ligases. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1751-1759.

Robertson, M.P. y Ellington, A.D. (2001) *In vitro* selection of nucleoprotein enzymes. *Nat Biotechnol*, **19**, 650-655.

Robertson, M.P., Knudsen, S.M. y Ellington, A.D. (2004) *In vitro* selection of ribozymes dependent on peptides for activity. *Rna*, **10**, 114-127.

Roehr, B. (1998) Fomivirsen approved for CMV retinitis. *J Int Assoc Physicians AIDS Care*, **4**, 14-16.

Rogers, J. y Joyce, G.F. (2001) The effect of cytidine on the structure and function of an RNA ligase ribozyme. *Rna*, **7**, 395-404.

Rojas, A.A., Vazquez-Tello, A., Ferbeyre, G., Venanzetti, F., Bachmann, L., Paquin, B., Sbordoni, V. y Cedergren, R. (2000) Hammerhead-mediated processing of satellite pDo500 family transcripts from Dolichopoda cave crickets. *Nucleic Acids Res*, **28**, 4037-4043.

Ronfort, C., De Breyne, S., Sandrin, V., Darlix, J.L. y Ohlmann, T. (2004) Characterization of two distinct RNA domains that regulate translation of the *Drosophila* gypsy retroelement. *Rna*, **10**, 504-515.

Rossi, J.J. (1995) Controlled, targeted, intracellular expression of ribozymes: progress and problems. *Trends Biotechnol*, **13**, 301-306.

Ruffner, D.E., Stormo, G.D. y Uhlenbeck, O.C. (1990) Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction. *Biochemistry*, **29**, 10695-10702.

Rupert, P.B. y Ferre-D'Amare, A.R. (2001) Crystal structure of a hairpin ribozyme-inhibitor complex with implications for catalysis. *Nature*, **410**, 780-786.

Sabariegos, R., Nadal, A., Beguiristain, N., Piron, M. y Gomez, J. (2004) Catalytic RNase P RNA from *Synechocystis* sp. cleaves the hepatitis C virus RNA near the AUG start codon. *FEBS Lett*, **577**, 517-522.

Sakamoto, N., Wu, C.H. y Wu, G.Y. (1996) Intracellular cleavage of hepatitis C virus RNA and inhibition of viral protein translation by hammerhead ribozymes. *J Clin Invest*, **98**, 2720-2728.

Saksmerprome, V., Roychowdhury-Saha, M., Jayasena, S., Khvorova, A. y Burke, D.H. (2004) Artificial tertiary motifs stabilize trans-cleaving hammerhead ribozymes under conditions of submillimolar divalent ions and high temperatures. *Rna*, **10**, 1916-1924.

Salehi-Ashtiani, K. y Szostak, J.W. (2001) *In vitro* evolution suggests multiple origins for the hammerhead ribozyme. *Nature*, **414**, 82-84.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.

Sargueil, B., Hampel, K.J., Lambert, D. y Burke, J.M. (2003) *In vitro* selection of second site revertants analysis of the hairpin ribozyme active site. *J Biol Chem*, **278**, 52783-52791.

Sargueil, B., McKenna, J. y Burke, J.M. (2000) Analysis of the functional role of a G.A sheared base pair by *in vitro* genetics. *J Biol Chem*, **275**, 32157-32166.

Sargueil, B., Pecchia, D.B. y Burke, J.M. (1995) An improved version of the hairpin ribozyme functions as a ribonucleoprotein complex. *Biochemistry*, **34**, 7739-7748.

Sassanfar, M. y Szostak, J.W. (1993) An RNA motif that binds ATP. *Nature*, **364**, 550-553.

Saville, B.J. y Collins, R.A. (1991) RNA-mediated ligation of self-cleavage products of a *Neurospora* mitochondrial plasmid transcript. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 8826-8830.

Scott, W.G., Finch, J.T. y Klug, A. (1995) The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage. *Cell*, **81**, 991-1002.

Scott, W.G., Murray, J.B., Arnold, J.R., Stoddard, B.L. y Klug, A. (1996) Capturing the structure of a catalytic RNA intermediate: the hammerhead ribozyme. *Science*, **274**, 2065-2069.

Seelig, B. y Jaschke, A. (1999) A small catalytic RNA motif with Diels-Alderase activity. *Chem Biol*, **6**, 167-176.

Sen, A., Steele, R., Ghosh, A.K., Basu, A., Ray, R. y Ray, R.B. (2003) Inhibition of hepatitis C virus protein expression by RNA interference. *Virus Res*, **96**, 27-35.

Serra, M.J., Lyttle, M.H., Axenson, T.J., Schadt, C.A. y Turner, D.H. (1993) RNA hairpin loop stability depends on closing base pair. *Nucleic Acids Res*, **21**, 3845-3849.

Sharmeen, L., Kuo, M.Y., Dinter-Gottlieb, G. y Taylor, J. (1988) Antigenomic RNA of human hepatitis delta virus can undergo self-cleavage. *J Virol*, **62**, 2674-2679.

Shi, J., Du, J., Ma, T., Pankiewicz, K.W., Patterson, S.E., Tharnish, P.M., McBrayer, T.R., Stuyver, L.J., Otto, M.J., Chu, C.K., Schinazi, R.F. y Watanabe, K.A. (2005) Synthesis and anti-viral activity of a series of d- and l-2'-deoxy-2'-fluororibonucleosides in the subgenomic HCV replicon system. *Bioorg Med Chem*, **13**, 1641-1652.

Simmonds, P., Holmes, E.C., Cha, T.A., Chan, S.W., McOmish, F., Irvine, B., Beall, E., Yap, P.L., Kolberg, J. y Urdea, M.S. (1993) Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol*, **74**, 2391-2399.

Simoës, E.A. y Sarnow, P. (1991) An RNA hairpin at the extreme 5' end of the poliovirus RNA genome modulates viral translation in human cells. *J Virol*, **65**, 913-921.

Simons, J.N., Desai, S.M., Schultz, D.E., Lemon, S.M. y Mushahwar, I.K. (1996) Translation initiation in GB viruses A and C: evidence for internal ribosome entry and implications for genome organization. *J Virol*, **70**, 6126-6135.

Simorre, J.P., Legault, P., Baidya, N., Uhlenbeck, O.C., Maloney, L., Wincott, F., Usman, N., Beigelman, L. y Pardi, A. (1998) Structural variation induced by different nucleotides at the cleavage site of the hammerhead ribozyme. *Biochemistry*, **37**, 4034-4044.

Siwkowski, A., Humphrey, M., De-Young, M.B. y Hampel, A. (1998) Screening for important base identities in the hairpin ribozyme by *in vitro* selection for cleavage. *Biotechniques*, **24**, 278-284.

Sledjeski, D.D., Gupta, A. y Gottesman, S. (1996) The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *Escherichia coli*. *Embo J*, **15**, 3993-4000.

Smith, D.B., Mellor, J., Jarvis, L.M., Davidson, F., Kolberg, J., Urdea, M., Yap, P.L. y Simmonds, P. (1995) Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol*, **76 (Pt 7)**, 1749-1761.

Smith, D.B. y Simmonds, P. (1997) Characteristics of nucleotide substitution in the hepatitis C virus genome: constraints on sequence change in coding regions at both ends of the genome. *J Mol Evol*, **45**, 238-246.

Soler, M., McHutchison, J.G., Kwoh, T.J., Dorr, F.A. y Pawlotsky, J.M. (2004) Virological effects of ISIS 14803, an antisense oligonucleotide inhibitor of hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES), on HCV IRES in chronic hepatitis C patients and examination of the potential role of primary and secondary HCV resistance in the outcome of treatment. *Antivir Ther*, **9**, 953-968.

Song, J., Geltinger, C., Sun, K., Kanazawa, I. y Yokoyama, K.K. (1999) Direct lysis method for the rapid preparation of plasmid DNA. *Anal Biochem*, **271**, 89-91.

Spahn, C.M., Kieft, J.S., Grassucci, R.A., Penczek, P.A., Zhou, K., Doudna, J.A. y Frank, J. (2001) Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science*, 291, 1959-1962.

Stahley, M.R. y Strobel, S.A. (2005) Structural evidence for a two-metal-ion mechanism of group I intron splicing. *Science*, 309, 1587-1590.

Stougaard, P., Molin, S. y Nordstrom, K. (1981) RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 6008-6012.

Suga, H., Cowan, J.A. y Szostak, J.W. (1998) Unusual metal ion catalysis in an acyl-transferase ribozyme. *Biochemistry*, 37, 10118-10125.

Sullenger, B.A., Gallardo, H.F., Ungers, G.E. y Gilboa, E. (1990) Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication. *Cell*, 63, 601-608.

Summerton, J. (1999) Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim Biophys Acta*, 1489, 141-158.

Sun, L., Cui, Z., Gottlieb, R.L. y Zhang, B. (2002) A selected ribozyme catalyzing diverse dipeptide synthesis. *Chem Biol*, 9, 619-628.

Sun, L.Q., Cairns, M.J., Saravolac, E.G., Baker, A. y Gerlach, W.L. (2000) Catalytic nucleic acids: from lab to applications. *Pharmacol Rev*, 52, 325-347.

Symons, R.H. (1992) Small catalytic RNAs. *Annu Rev Biochem*, 61, 641-671.

Symons, R.H. (1997) Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucleic Acids Res*, 25, 2683-2689.

Takamizawa, A., Mori, C., Fuke, I., Manabe, S., Murakami, S., Fujita, J., Onishi, E., Andoh, T., Yoshida, I. y Okayama, H. (1991) Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol*, **65**, 1105-1113.

Takigawa, Y., Nagano-Fujii, M., Deng, L., Hidajat, R., Tanaka, M., Mizuta, H. y Hotta, H. (2004) Suppression of hepatitis C virus replicon by RNA interference directed against the NS3 and NS5B regions of the viral genome. *Microbiol Immunol*, **48**, 591-598.

Tallet-Lopez, B., Aldaz-Carroll, L., Chabas, S., Dausse, E., Staedel, C. y Toulme, J.J. (2003) Antisense oligonucleotides targeted to the domain IIIId of the hepatitis C virus IRES compete with 40S ribosomal subunit binding and prevent *in vitro* translation. *Nucleic Acids Res*, **31**, 734-742.

Tanabe, Y., Sakamoto, N., Enomoto, N., Kurosaki, M., Ueda, E., Maekawa, S., Yamashiro, T., Nakagawa, M., Chen, C.H., Kanazawa, N., Kakinuma, S. y Watanabe, M. (2004) Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon- alpha. *J Infect Dis*, **189**, 1129-1139.

Tang, J. y Breaker, R.R. (1997) Examination of the catalytic fitness of the hammerhead ribozyme by *in vitro* selection. *Rna*, **3**, 914-925.

Tarasow, T.M., Tarasow, S.L. y Eaton, B.E. (1997) RNA-catalysed carbon-carbon bond formation. *Nature*, **389**, 54-57.

Theissen, G., Richter, A. y Lukacs, N. (1989) Degree of biotinylation in nucleic acids estimated by a gel retardation assay. *Anal Biochem*, **179**, 98-105.

Thomson, B.J. y Finch, R.G. (2005) Hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect*, **11**, 86-94.

Thomson, J.B., Sigurdsson, S.T., Zeuch, A. y Eckstein, F. (1996) *In vitro* selection of hammerhead ribozymes containing a bulged nucleotide in stem II. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4401-4406.

Thomson, J.B., Tuschl, T. y Eckstein, F. (1997) The Hammerhead Ribozyme. In Eckstein, F., and Lilley, D. M. J. (ed.), *Catalytic RNA*. Springer, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Vol. 10, pp. 173-196.

Thomssen, R., Bonk, S. y Thiele, A. (1993) Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, **182**, 329-334.

Tomizawa, J. (1986) Control of ColE1 plasmid replication: binding of RNA I to RNA II and inhibition of primer formation. *Cell*, **47**, 89-97.

Tomizawa, J. (1990) Control of ColE1 plasmid replication. Intermediates in the binding of RNA I and RNA II. *J Mol Biol*, **212**, 683-694.

Tomizawa, J. y Itoh, T. (1981) Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNA I with primer transcript. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 6096-6100.

Tomizawa, J., Itoh, T., Selzer, G. y Som, T. (1981) Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 1421-1425.

Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. y Nomoto, A. (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol*, **66**, 1476-1483.

Tucker, C.E., Chen, L.S., Judkins, M.B., Farmer, J.A., Gill, S.C. y Drolet, D.W. (1999) Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in rhesus monkeys. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **732**, 203-212.

Tuerk, C. y Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **249**, 505-510.

Tuschl, T. y Eckstein, F. (1993) Hammerhead ribozymes: importance of stem-loop II for activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6991-6994.

Tuschl, T., Gohlke, C., Jovin, T.M., Westhof, E. y Eckstein, F. (1994) A three-dimensional model for the hammerhead ribozyme based on fluorescence measurements. *Science*, **266**, 785-789.

Uhlenbeck, O.C. (1987) A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature*, **328**, 596-600.

Umehara, T., Fukuda, K., Nishikawa, F., Kohara, M., Hasegawa, T. y Nishikawa, S. (2005) Rational design of dual-functional aptamers that inhibit the protease and helicase activities of HCV NS3. *J Biochem (Tokyo)*, **137**, 339-347.

Unrau, P.J. y Bartel, D.P. (1998) RNA-catalysed nucleotide synthesis. *Nature*, **395**, 260-263.

Urey, H.C. (1952) On the early chemical history of the earth and the origin of life. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **38**, 351-363.

Urvil, P.T., Kakiuchi, N., Zhou, D.M., Shimotohno, K., Kumar, P.K. y Nishikawa, S. (1997) Selection of RNA aptamers that bind specifically to the NS3 protease of hepatitis C virus. *Eur J Biochem*, **248**, 130-138.

Vaish, N.K., Heaton, P.A. y Eckstein, F. (1997) Isolation of hammerhead ribozymes with altered core sequences by *in vitro* selection. *Biochemistry*, **36**, 6495-6501.

Vaish, N.K., Heaton, P.A., Fedorova, O. y Eckstein, F. (1998) *In vitro* selection of a purine nucleotide-specific hammerheadlike ribozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2158-2162.

van Biesen, T., Soderbom, F., Wagner, E.G. y Frost, L.S. (1993) Structural and functional analyses of the FinP antisense RNA regulatory system of the F conjugative plasmid. *Mol Microbiol*, **10**, 35-43.

Van Eden, M.E., Byrd, M.P., Sherrill, K.W. y Lloyd, R.E. (2004) Demonstrating internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNAs using stringent RNA test procedures. *Rna*, **10**, 720-730.

Vo, N.V., Oh, J.W. y Lai, M.M. (2003) Identification of RNA ligands that bind hepatitis C virus polymerase selectively and inhibit its RNA synthesis from the natural viral RNA templates. *Virology*, **307**, 301-316.

Wagner, E.G., Altuvia, S. y Romby, P. (2002) Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv Genet*, **46**, 361-398.

Wagner, E.G., Blomberg, P. y Nordstrom, K. (1992) Replication control in plasmid R1: duplex formation between the antisense RNA, CopA, and its target, CopT, is not required for inhibition of RepA synthesis. *Embo J*, **11**, 1195-1203.

Wakita, T., Moradpour, D., Tokushihge, K. y Wands, J.R. (1999) Antiviral effects of antisense RNA on hepatitis C virus RNA translation and expression. *J Med Virol*, **57**, 217-222.

Wakita, T. y Wands, J.R. (1994) Specific inhibition of hepatitis C virus expression by antisense oligodeoxynucleotides. *In vitro* model for selection of target sequence. *J Biol Chem*, **269**, 14205-14210.

Wallace, S.T. y Schroeder, R. (1998) *In vitro* selection and characterization of streptomycin-binding RNAs: recognition discrimination between antibiotics. *Rna*, **4**, 112-123.

Wallis, M.G., Streicher, B., Wank, H., von Ahsen, U., Clodi, E., Wallace, S.T., Famulok, M. y Schroeder, R. (1997) *In vitro* selection of a viomycin-binding RNA pseudoknot. *Chem Biol*, **4**, 357-366.

Wallis, M.G., von Ahsen, U., Schroeder, R. y Famulok, M. (1995) A novel RNA motif for neomycin recognition. *Chem Biol*, **2**, 543-552.

Walter, N.G., Hampel, K.J., Brown, K.M. y Burke, J.M. (1998) Tertiary structure formation in the hairpin ribozyme monitored by fluorescence resonance energy transfer. *Embo J*, **17**, 2378-2391.

Wang, C., Le, S.Y., Ali, N. y Siddiqui, A. (1995) An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *Rna*, **1**, 526-537.

Wang, C., Sarnow, P. y Siddiqui, A. (1993) Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol*, **67**, 3338-3344.

Wang, C., Sarnow, P. y Siddiqui, A. (1994) A conserved helical element is essential for internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol*, **68**, 7301-7307.

Wang, T.H., Rijnbrand, R.C. y Lemon, S.M. (2000) Core protein-coding sequence, but not core protein, modulates the efficiency of cap-independent translation directed by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J Virol*, **74**, 11347-11358.

Warashina, M., Kuwabara, T., Kato, Y., Sano, M. y Taira, K. (2001) RNA-protein hybrid ribozymes that efficiently cleave any mRNA independently of the structure of the target RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5572-5577.

Watson, S.R., Chang, Y.F., O'Connell, D., Weigand, L., Ringquist, S. y Parma, D.H. (2000) Anti-L-selectin aptamers: binding characteristics, pharmacokinetic parameters, and activity against an intravascular target in vivo. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **10**, 63-75.

Wecker, M., Smith, D. y Gold, L. (1996) *In vitro* selection of a novel catalytic RNA: characterization of a sulfur alkylation reaction and interaction with a small peptide. *Rna*, **2**, 982-994.

Weiner, A.M. y Maizels, N. (1987) tRNA-like structures tag the 3' ends of genomic RNA molecules for replication: implications for the origin of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7383-7387.

Welch, P.J., Tritz, R., Yei, S., Leavitt, M., Yu, M. y Barber, J. (1996) A potential therapeutic application of hairpin ribozymes: *in vitro* and in vivo studies of gene therapy for hepatitis C virus infection. *Gene Ther*, **3**, 994-1001.

Werner, M., Rosa, E. y George, S.T. (1997) Design of short external guide sequences (EGSs) for cleavage of target molecules with RNase P. *Nucleic Acids Symp Ser*, 19-21.

Williams, K.P., Ciafre, S. y Tocchini-Valentini, G.P. (1995) Selection of novel Mg(2+)-dependent self-cleaving ribozymes. *Embo J*, **14**, 4551-4557.

Williamson, C.L., Desai, N.M. y Burke, J.M. (1989) Compensatory mutations demonstrate that P8 and P6 are RNA secondary structure elements important for processing of a group I intron. *Nucleic Acids Res*, **17**, 675-689.

Willis, M.C., Collins, B.D., Zhang, T., Green, L.S., Sebesta, D.P., Bell, C., Kellogg, E., Gill, S.C., Magallanez, A., Knauer, S., Bendele, R.A., Gill, P.S. y Janjic, N. (1998) Liposome-anchored vascular endothelial growth factor aptamers. *Bioconjug Chem*, **9**, 573-582.

Wilson, C. y Szostak, J.W. (1995) *In vitro* evolution of a self-alkylating ribozyme. *Nature*, **374**, 777-782.

Wilson, D.S. y Szostak, J.W. (1999) *In vitro* selection of functional nucleic acids. *Annu Rev Biochem*, **68**, 611-647.

Wilson, J.A., Jayasena, S., Khvorova, A., Sabatinos, S., Rodrigue-Gervais, I.G., Arya, S., Sarangi, F., Harris-Brandts, M., Beaulieu, S. y Richardson, C.D. (2003) RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2783-2788.

Wilson, J.A. y Richardson, C.D. (2005) Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. *J Virol*, **79**, 7050-7058.

Woese, C. (1967) *The Genetic Code: The molecular basis for gene expression*, New York.

Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. y Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res*, **17**, 3469-3478.

Woodson, S.A. y Cech, T.R. (1989) Reverse self-splicing of the tetrahymena group I intron: implication for the directionality of splicing and for intron transposition. *Cell*, **57**, 335-345.

Wu, C.H. y Wu, G.Y. (1998) Targeted inhibition of hepatitis C virus-directed gene expression in human hepatoma cell lines. *Gastroenterology*, **114**, 1304-1312.

Wu, J. y Nandamuri, K.M. (2004) Inhibition of hepatitis viral replication by siRNA. *Expert Opin Biol Ther*, **4**, 1649-1659.

Yamada, O., Kraus, G., Sargueil, B., Yu, Q., Burke, J.M. y Wong-Staal, F. (1996) Conservation of a hairpin ribozyme sequence in HIV-1 is required for efficient viral replication. *Virology*, **220**, 361-366.

Yang, J., Zimmerly, S., Perlman, P.S. y Lambowitz, A.M. (1996) Efficient integration of an intron RNA into double-stranded DNA by reverse splicing. *Nature*, **381**, 332-335.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**.

Yokota, T., Sakamoto, N., Enomoto, N., Tanabe, Y., Miyagishi, M., Maekawa, S., Yi, L., Kurosaki, M., Taira, K., Watanabe, M. y Mizusawa, H. (2003) Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep*, **4**, 602-608.

You, S., Stump, D.D., Branch, A.D. y Rice, C.M. (2004) A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, **78**, 1352-1366.

Yu, Q., Pecchia, D.B., Kingsley, S.L., Heckman, J.E. y Burke, J.M. (1998) Cleavage of highly structured viral RNA molecules by combinatorial libraries of hairpin ribozymes. The most effective ribozymes are not predicted by substrate selection rules. *J Biol Chem*, **273**, 23524-23533.

Yuan, Y. y Altman, S. (1994) Selection of guide sequences that direct efficient cleavage of mRNA by human ribonuclease P. *Science*, **263**, 1269-1273.

Zaug, A.J. y Cech, T.R. (1986) The intervening sequence RNA of Tetrahymena is an enzyme. *Science*, **231**, 470-475.

Zhang, B. y Cech, T.R. (1997) Peptide bond formation by *in vitro* selected ribozymes. *Nature*, **390**, 96-100.

Zhang, H., Hanecak, R., Brown-Driver, V., Azad, R., Conklin, B., Fox, M.C. y Anderson, K.P. (1999) Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus (HCV) gene expression in livers of mice infected with an HCV-vaccinia virus recombinant. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**, 347-353.

Zhang, J., Yamada, O., Sakamoto, T., Yoshida, H., Araki, H., Murata, T. y Shimotohno, K. (2005a) Inhibition of hepatitis C virus replication by pol III-directed overexpression of RNA decoys corresponding to stem-loop structures in the NS5B coding region. *Virology*.

Zhang, Y.C., Taylor, M.M., Samson, W.K. y Phillips, M.I. (2005b) Antisense inhibition. In Phillips, M.I. (ed.), *Methods in Molecular Medicine. Antisense therapeutics*. Humana Press, Totowa, New Jersey, Vol. 106, pp. 11-34.

Zoumadakis, M. y Tabler, M. (1995) Comparative analysis of cleavage rates after systematic permutation of the NUX consensus target motif for hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res*, **23**, 1192-1196.

Zuker, M. (1989) Computer prediction of RNA structure. *Methods Enzymol*, **180**, 262-288.

Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3406-3415.

A.- ABREVIATURAS

ALIL	Interacciones establecidas entre un lazo apical y un lazo interno (<i>Apical loop-internal loop interactions</i>)
Ap	Aptámero
APS	Amonio persulfato
ASBV	Viroide del manchado solar del aguacate (<i>Avocado sunblotch viroid</i>)
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATPasa	Adenosina 5'-trifosfatasa
BNA	<i>Bridged nucleic acid</i>
BVDV	Virus de la diarrea bovina (<i>Bovine diarrhea virus</i>)
°C	Grados Celsius
CAD	Enfermedad de las arterias coronarias
CChMVd	Viroide del moteado clorótico del crisantemo (<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i>)
cDNA	DNA complementario
Ci	Curio
CLL	Leucemia linfática crónica
CML	Leucemia mieloide crónica (<i>Chronic myeloid leukaemia</i>)
CMV	Citomegalovirus
cpm	Cuentas por minuto
CRE	Elemento de respuesta en <i>cis</i> (<i>cis-response element</i>)
CTE	Elemento constitutivo de transporte (<i>Constitutive transport element</i>)
dATP	Desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	Desoxicitosina 5'-trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
dGTP	Desoxiguanosina 5'-trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa

dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
dpm	Desintegraciones por minuto
d.s	Desviación estándar
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Desoxitimidina 5'-trifosfato
EBS	Secuencia de unión del exón (<i>Exon binding sequence</i>)
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
EGF-R	Receptor del factor de crecimiento endotelial (<i>Endotelium growth factor receptor</i>)
EGS	Secuencia guía externa (<i>external guide sequence</i>)
EGTA	Ácido etilen-glicol bis(2-aminoetiléter) N, N, N'N' tetra-acético
eIF2	Factor 2 de inicio de la traducción eucariótica
eIF3	Factor 3 de inicio de la traducción eucariótica
EMCV	Virus de la encefalomiocarditis
Fig.	Figura
FMN	Flavín mononucleótido
FRET	Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (<i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
fRNAs	RNAs funcionales (<i>Functional RNAs</i>)
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenada
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
h	Horas
H	Hélice
HBV	Virus de la hepatitis B (<i>Hepatitis B virus</i>)
HCV	Virus de la hepatitis C (<i>Hepatitis C virus</i>)
HDV	Virus de la hepatitis δ (<i>Hepatitis δ virus</i>)
HH	Ribozima hammerhead
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (<i>Human immunodeficiency virus</i>)
HNA	Ácido nucleico de hexitol (<i>Hexitol nucleic acid</i>)

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High performance liquid chromatography</i>).
IBS	Secuencia de unión del intrón (<i>Intron binding sequence</i>)
IGS	Secuencia guía interna (<i>internal guide sequence</i>)
IFN	Interferón
IMPDH	Inosín monofosfato deshidrogenasa
IRES	Sitio de entrada interna del ribosoma (<i>Internal ribosome entry site</i>)
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase
K_d	Constante de disociación
kDa	KiloDalton
k_{obs}	Constante catalítica observada o tasa de corte
k_{rel}	Constante catalítica relativa
LB	Medio Luria-Bertani
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLr	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
LNA	Ácido nucleico bloqueado (<i>Locked nucleic acid</i>)
MCS	Sitio de clonaje múltiple
min	Minuto
miRNA	MicroRNA
MM	Mieloma múltiple
mRNA	RNA mensajero
NAD	Nicotinamín adenín dinucleótido
NADPH	Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato-H
NEB	<i>New England Biolabs</i>
ncRNAs	RNAs no codificantes (<i>non-coding RNAs</i>)
nm	Nanometros
NMR	Resonancia magnética nuclear (<i>Nuclear magnetic resonance</i>)
NS	No estructural
NSCLC	Cáncer de pulmón invasivo (<i>Non-small cell lung cancer</i>)
nt	Nucleótido
NTP	Nucleósido trifosfato

ODN	Oligodesoxinucleótido
OMS	Organización mundial de la salud
pb	Pares de bases
PBS	Sitio de unión de cebador (<i>Primer binding site</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PKA	Proteín kinasa C
PKC	Proteín kinasa C
PLMVVd	Viroide del mosaico latente del melocotonero (<i>Peach latent mosaic viroid</i>)
PNA	Ácido nucleico peptídico (<i>Peptide nucleic acid</i>)
PPi	Pirofosfato inorgánico
Pre-mRNA	RNA mensajero inmaduro
Pre-tRNA	RNA de transferencia inmaduro
PTB	Proteína de unión a secuencias polipirimidínicas (<i>Polypyrimidine tract-binding protein</i>)
p/v	Peso/volumen
RAF	
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA (<i>RNA-dependent RNA polimerase</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
RNAi	Interferencia de RNA
rRNA	RNA ribosómico
RNP	Ribonucleoproteína
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
RRE	Elemento de respuesta a Rev
RRL	Lisados de reticulocito de conejo (<i>Rabbit reticulocyte lysates</i>)
sArMV	RNA satélite del virus del mosaico del <i>Arabis</i> (<i>Arabis mosaic virus</i>)
sBYDV	RNA satélite del virus del enanismo amarillento de los cereales (<i>satellite RNA of barley yellow dwarf virus</i>)

sChYMoV	RNA satélite del virus del moteado amarillo de la achicoria (<i>satellite RNA of chycoria yellow mottle virus</i>)
SDS	Duodecil sulfato sódico
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
siRNAs	RNAs interferentes pequeños (<i>small interferent RNAs</i>)
sLTSV	RNA satélite del virus del rayado transitorio de la alfalfa (<i>satellite RNA lucerne transient streak virus</i>)
sRYMoV	RNA satélite del virus del moteado amarillento del arroz (<i>satellite RNA of the rice yellow mottle virus</i>)
sSCMoV	RNA satélite del virus del moteado del trébol subterráneo (<i>satellite RNA of the subterranean clover mottle virus</i>)
sSNMoV	RNA satélite del virus del moteado de <i>Solanum nodiflorum</i> (<i>satellite RNA of the Solanum nodiflorum mottle virus</i>)
sTRSV	RNA satélite del virus de las manchas en anillo del tabaco (<i>satellite RNA of the tobacco ringspot virus</i>)
SV40	Virus 40 del simio
sVTMoV	RNA satélite del virus del moteado aterciopelado del tabaco (<i>satellite RNA of the velvet tobacco mottle virus</i>)
T7p	Promotor para la RNA polimerasa del fago T7
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
TAR	Región de respuesta a la transactivación
TBE	Tampón Tris-borato-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamino
TGF	Factor de crecimiento tumoral (<i>Tumoral growth factor</i>)
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMN	Tampón Tris-magnesio-cloruro sódico
TNA	Ácido nucleico compuesto por treosa (<i>Threose nucleic acid</i>)
TNF	Factor de necrosis tumoral (<i>Tumoral necrosis factor</i>)
Tris	Trihidroximetil amino metano
tRNA	RNA de transferencia
U	Unidades de enzima
UTR	Región no traducible (<i>Untranslated region</i>)

UV	Ultravioleta
VEGF	Factor vascular de crecimiento endotelial (<i>vascular endothelium growth factor</i>)
VEGF-R	Receptor del factor vascular de crecimiento endotelial (<i>Vascular endothelium growth factor receptor</i>)
VR	Región variable
VS	Satélite de Varkud
v/v	Volumen/volumen
X-gal	5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-galactopiranosido