

RNAs INHIBIDORES FRENTE AL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

Memoria presentada por el licenciado en Biología
Francisco José Sánchez Luque para optar al Título de Doctor.

Fdo.: Francisco José Sánchez Luque

VºBº del Director

Fdo.: Alfredo Berzal Herranz

Doctor en Biología



ipbln



ugr

Universidad
de **Granada**

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", CSIC
y Universidad De Granada

Noviembre 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Francisco José Sánchez Luque
D.L.: GR 229-2013
ISBN: 978-84-9028-305-9

El Doctorando D. Francisco José Sánchez Luque y el Director de la tesis Dr. Alfredo Berzal Herranz, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, Noviembre de 2012.

Director de la Tesis

Doctorando

Fdo.: Dr. Alfredo Berzal Herranz

Fdo.: Francisco José Sánchez Luque

Esta tesis ha sido realizada en el
Laboratorio del Dr. Alfredo Berzal Herranz (Lab. 112)
Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (IPBLN). Granada
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)



Se ha realizado una estancia breve en el
Laboratory of Dr. Ben Berkhout (Lab. of Retrovirology)
Academisch Medisch Centrum
Universiteit van Amsterdam



Esta tesis ha sido financiada por
Fundación para la Investigación y Prevención del SIDA en España (FIPSE)
con el proyecto “Estrategias de selección de moléculas de RNA como herramientas
moleculares para el estudio de la actividad biológica de dominios funcionales del genoma
viral, e identificación de nuevas dianas terapéuticas.” (36472/05)



y el Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) de España
a través del programa de becas de Formación del Profesorado Universitario (FPU).



Parte de los resultados de esta tesis han sido publicados en:

Inhibition of HIV-1 Replication and Dimerization Interference by Dual Inhibitory RNAs.

Sánchez-Luque, FJ., Reyes-Darias, JA., Puerta-Fernández, E., and Berzal-Herranz, A.

Molecules, 15; 4757-4772. November 2010.

Moléculas Inhibidoras del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1),

Procedimiento de Obtención y sus Aplicaciones.

Berzal Herranz, A., Briones Llorente, C., Sánchez Luque, FJ., Cuevas Manrubia, S. y Stich, M.

No. solicitud P201231819. OEPM Madrid, España (2012).

A mi familia,
que tanto han hecho para que llegue este momento.
mis padres,
mi hermano,
mi abuelo.

AGRADECIMIENTOS

La realización de una tesis es una tarea que supera con creces la capacidad de una sola persona. Cualquiera que haya pasado por ello lo sabrá. Hace falta la colaboración profesional de muchas personas y, más importante aún, el apoyo personal de muchas otras. Espero aquí resumir todo este agradecimiento.

Agradezco a mi director de tesis, el Dr. Alfredo Berzal Herranz, por haberme dado la oportunidad de realizar mi doctorado bajo su tutela y por haberme transmitido conocimientos, enfoque científico y contribuido de manera crucial a hacerme el científico que soy hoy día. Especialmente le agradezco haberme introducido en el mundo RNA, que me ha resultado fascinante y en el que pretendo seguir desarrollando mi carrera profesional.

Agradezco a mis padres que humildemente, con gran esfuerzo y amor me hayan dado un hogar, una educación, todos los medios en su mano para poder labrarme una carrera, y que me han servido de guía en mi vida. He de agradecerles que siempre me hayan aguantado el mal genio especialmente agravado durante el doctorado y que siempre estén ahí para cuando los necesito. Agradezco la paciencia que me tienen. Extiendo el agradecimiento a mi hermano, que siempre esté atento para corregir mis despistes. Y también quiero agradecer a mi abuelo, quien no tiene un pelo de tonto, y que me sigue consintiendo como a su nieto favorito aun cuando el ajetreo de mi vida me impide atenderle cuanto debiera.

Agradezco también la colaboración de mis compañeros del laboratorio. A Elena y Alicia por ser las mejores “jefas” que se puede desear, por todo lo que aprendí de vosotras y a Elena por integrarme tan bien entre los becarios del “López”. A Vicente por su gran ayuda y labor técnica, por su amistad, su cercanía y su entusiasmo. A Raquel por su comprensión y alegría y a José por darme conciencia de cómo enfrentarse a la ciencia, y a ambos porque entre los tres hemos superado los mayores escollos. Y a todos los demás miembros transitorios o recientes del laboratorio: Azahara, David, Celeste, Sole, Gema, Ramón y Geni por los buenos momentos vividos.

Agradezco también la colaboración y el acogimiento de mis amigos y compañeros durante la estancia en el AMC de Ámsterdam, especialmente a Eva, Pavlina, Karen, Ter Brake, Nuno y Elena. Y a la okupa Laura.

Agradezco a Joaquín Teixidó y a su grupo en el CIB: Rubén, Natalia, Marisa, Isa y David; y en general a todos los amigos del CIB, el haberme dado mi primer aliento científico. Así como a mis profesores de la UCO más cercanos: José Manuel

Villalba, Encarna Alejandre, Manuel Pineda y José J. Aguilar. Y finalmente, a mis actuales jefes, Manuel Carlos y Mamen Thomas, por la confianza depositada en mí y por ser comprensivos y hasta insistentes con la escritura de mi tesis.

Y bueno, llegado este momento, he de pasar a dar las gracias aquellas personas que han conformado mi familia granadina. La verdad, después del tiempo pasado recuerdo con nostalgia las diferentes etapas y las personas que marcaron cada una de ellas. Creo que es justo empezar por aquellas que compartieron su vida conmigo compartiendo piso o alojándome desinteresadamente cuando lo necesité: Miguel, Antonio y Elena, Xenia y Rocío, Javi, Alejo, Fátima, Rocío, Luismi, Poto, Irene y Araceli. Os agradezco que hayáis sido siempre más, mucho más, que compañeros de piso.

Agradezco el gran apoyo de Sara, Esther, María, Javi y Ceci; la alegría de Gisela, Juandi, Sandra y Sonia; el confesionario de Estévez, recomendable para el equilibrio psicológico del científico; el recreo con los “Los Gañanes” Paco, Patxi, Luís, Miguel, José Manuel, “Canario” y David; el refugio prestado por el 111, Rosa, Belén y MariAscen; las buenas pachangas de fútbol de “los tocapelotas”; las salidas con los ciclistas Gustavo, David Martín y José Antonio; el apoyo de mis nuevos compañeros del 211/212, Poto, Darién, Kamala, Egüi, Paco, Ana y Almu; las charlas científicas con Jordi, el oráculo del RNA; las trepadas con las “lagartijas del club de escalada” Fany, Darío, Poto, Juandi, Sara y Martin; los partidos con los *voley-lovers*; y los ratitos en la huerta Altojardín con Talia, Eguz, Damiá, Marta, MariAscen y María. Y a la archiduquesa Esther, por imponerme el GraphPad que tanto bien me ha hecho.

Y en general, agradezco a la increíble familia de compañeros del IPB-LN, el “López”, todos con los que siempre he podido contar, que te animan y te hacen agradable el trabajo diario, te apoyan en los momentos bajos y te ayudan siempre que lo necesitas. A los buenos compañeros Ezequiel, Carlos, las Elenas, las Martas, Bea, Noe, Inma, Guío, Jean Matthieu, Isa, Toni, David, Antonio Rosal, etc. Y a Vivi, Ángeles, Antonio Caler, Alfonso, Antonio Mérida y Antonio Lario.

Agradezco también el apoyo de mis amigos de Córdoba, dispersos ahora, como yo, por, a pesar del tiempo y el distanciamiento, siempre me han mostrado una sólida e inquebrantable amistad. Les debo realmente mucho. Recordaré siempre la “Conexión Oriente”. A Rafa, María, Miguel, Pepe, Pablo, Rocío, los Fredis, Elena, López, Capi, Araceli e Ilde, Isaac y Valle, Laura y demás cordobeses naturales y adoptivos. Y a María, Rosa y Leo. Y a Juanfran, María, Eva y Dani.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE	1
ACRÓNIMOS PROCEDENTES DEL INGLÉS Y ANGLICISMOS	7
INTRODUCCIÓN	13
I.1. RNA.	15
I.1.1. LA CONCEPCIÓN CLÁSICA DEL RNA.	15
I.1.2. LA REVOLUCIÓN DEL RNA.	16
I.1.2. EL MUNDO RNA.	18
I.2. RNAs CATALÍTICOS.	20
I.2.1. RIBOZIMAS NATURALES.	22
I.2.2. RNAs CATALÍTICOS PEQUEÑOS.	27
I.2.2.1. RIBOZIMA <i>HAMMERHEAD</i> .	29
I.2.2.2. RIBOZIMA <i>HAIRPIN</i> .	32
I.3. RNAs FUNCIONALES NO CATALÍTICOS.	36
I.3.1. <i>RIBOSWITCHES</i> .	36
I.3.2. RNAs <i>ANTISENSE</i> CATALÍTICOS.	38
I.4. INGENIERÍA DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	41
I.4.1. SELECCIÓN MOLECULAR <i>IN VITRO</i> .	42
I.4.1.1. APTÁMEROS.	44
I.3.2.2. RIBOZIMAS ARTIFICIALES.	46
I.4.2. INGENIERÍA CON RNAs NATURALES.	47
I.5. EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA DE TIPO 1 (VIH-1).	51
I.5.1. BIOLOGÍA DEL VIH-1.	53
I.5.1.1. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN.	53
I.5.1.2. ESTRUCTURA DEL GENOMA VIRAL.	54

I.5.1.3. CICLO VIRAL.	55
I.5.2. REGIÓN 5' NO TRADUCIBLE (5'UTR).	58
I.5.2.1. ELEMENTO DE RESPUESTA A LA <i>TRANS</i> -ACTIVACIÓN (TAR).	59
I.5.2.2. ELEMENTO DE POLIADENILACIÓN (<i>POLY-A</i>).	61
I.5.2.3. SITIO DE UNIÓN DEL CEBADOR (PBS).	62
I.5.2.4. SITIO DE INICIO DE LA DIMERIZACIÓN (DIS).	63
I.5.2.5. DONADOR PRINCIPAL DE <i>SPLICING</i> (SD).	66
I.5.2.6. SEÑAL DE EMPAQUETAMIENTO (<i>Psi</i> , Ψ).	67
OBJETIVOS	69
MATERIALES Y MÉTODOS	73
M.1. MATERIALES.	75
M.1.1. PRODUCTOS QUÍMICOS.	75
M.1.2. ENZIMAS.	75
M.1.2.1. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.	75
M.1.2.2. ENZIMAS POLIMERASA DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	75
M.1.2.3. ENZIMAS MODIFICADORAS.	75
M.1.3. RADIOISÓTOPOS.	76
M.1.4. PELÍCULAS AUTORADIOGRÁFICAS.	76
M.1.5. MEDIOS DE CULTIVO.	76
M.1.6. TAMPONES.	77
M.1.7. VECTORES PLASMÍDICOS DE CLONAJE Y EXPRESIÓN.	78
M.1.8. CEPA BACTERIANA.	80
M.1.9. LÍNEAS CELULARES EUCARIÓTICAS.	80
M.1.10. <i>KITS</i> DE PROCEDIMIENTO AUTOMATIZADO.	81
M.1.11. <i>SOFTWARE</i> INFORMÁTICO.	81
M.1.12. CENTRÍFUGAS.	82
M.2. MÉTODOS.	83

M.2.1. SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	83
M.2.1.1. SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS.	83
M.2.1.2. SÍNTESIS DE DNA BICATENARIO POR HIBRIDACIÓN Y EXTENSIÓN.	83
M.2.1.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).	84
M.2.1.4. TRANSCRIPCIÓN DE RNA <i>IN VITRO</i> .	85
M.2.1.5. REACCIÓN DE REVERSOTRANSCRIPCIÓN DE RNA TOTAL DE CÉLULAS.	86
M.2.2. PREPARACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	87
M.2.2.1. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .	87
M.2.2.2. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE CÉLULAS HEK293T.	87
M.2.1.3. EXTRACCIÓN FENÓLICA Y PRECIPITACIÓN.	88
M.2.1.4. EXTRACCIÓN DE DNA DESDE GEL DE AGAROSA.	89
M.2.1.5. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DESDE GEL DE POLIACRILAMIDA.	89
M.2.3. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	90
M.2.3.1. CUANTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA.	90
M.2.2.2. CUANTIFICACIÓN POR MEDIDA RADIOACTIVA EN SOLUCIÓN.	91
M.2.1.3. CUANTIFICACIÓN POR MEDIDA RADIOACTIVA EN GEL.	92
M.2.4. MARCAJE RADIOACTIVO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	92
M.2.4.1. MARCAJE INTERNO DE RNA.	92
M.2.4.2. MARCAJE DE RNA EN EXTREMO 5'.	93
M.2.5. GELES DE ELECTROFORÉISIS.	94
M.2.5.1. GELES DE AGAROSA.	94
M.2.5.2. GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.	94
M.2.5.3. GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NATIVAS.	95
M.2.6. REACCIONES DE CORTE CON RIBOZIMAS.	95
M.2.7. REACCIONES DE DIMERIZACIÓN DEL RNA 5'UTR ₃₀₈ .	96
M.2.8. REACCIONES DE UNIÓN DE APTÁMEROS.	96
M.2.9. MAPEO DE ESTRUCTURA DE RNA CON RNAsas Y ACETATO DE PLOMO.	87
M.2.9.1. DIGESTIONES INCOMPLETAS CON RNAsas Y ACETATO DE PLOMO.	97

M.2.9.2. REACCIÓN DE DIGESTIÓN CON RNASA T1.	99
M.2.9.3. REACCIÓN DE HIDRÓLISIS ALCALINA.	99
M.2.10. SELECCIÓN MOLECULAR <i>IN VITRO</i> .	100
M.2.11. CULTIVO DE CÉLULAS PROCARIOTAS.	102
M.2.12. CRIOCONSERVACIÓN DE CÉLULAS PROCARIOTAS.	102
M.2.13. CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS.	103
M.2.14. CRIOCONSERVACIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS.	103
M.2.15. TRANSFORMACIÓN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .	104
M.2.15.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.	104
M.2.15.2. TRANSFORMACIÓN.	105
M.2.15.3. SELECCIÓN DE CÉLULAS RECOMBINANTES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> . PCR A PARTIR DE COLONIA.	106
M.2.16. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS.	106
M.2.16.1. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS ADHERENTES HEK293T.	106
M.2.15.2. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN JURKAT.	107
M.2.17. INFECCIÓN DE CÉLULAS JURKAT CON VIH-1.	108
M.2.18. CUANTIFICACIÓN DE ANTÍGENO VIRAL p24 EN EL SOBRENADANTE CELULAR.	109
M.2.19. CUANTIFICACIÓN DE mRNAs CELULARES.	110
M.2.20. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE DNA.	110
 RESULTADOS	 113
R.1. RNAs <i>ANTISENSE</i> CATALÍTICOS CONTRA VIH-1.	115
R.1.1. CONSTRUCCIÓN DE LAS MOLÉCULAS QUIMÉRICAS.	117
R.1.2. ANÁLISIS DEL CORTE DE LOS RNAs <i>ANTISENSE</i> CATALÍTICOS <i>IN VITRO</i> .	119
R.1.3. EFECTO DE LOS RNAs <i>ANTISENSE</i> CATALÍTICOS EN LA DIMERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA 5'UTR ₃₀₈ .	123
R.1.4. INHIBICIÓN <i>EX VIVO</i> DE VIH-1 POR CONSTRUCCIONES DE EXPRESIÓN DE RNAs <i>ANTISENSE</i> CATALÍTICOS.	124
R.1.5. INHIBICIÓN <i>EX VIVO</i> DE VIH-1 POR RNAs <i>ANTISENSE</i>	125

CATALÍTICOS PRESINTETIZADOS.	
R.1.6. ANÁLISIS DE LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA MEDIADA POR INTERFERÓN POR LAS CONSTRUCCIONES DE EXPRESIÓN Y LOS RNAs PRESINTETIZADOS.	127
R.1.7. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA DIMERIZACIÓN DEL GENOMA DE VIH-1 Y LA CONFORMACIÓN ESTRUCTURAL DE LA 5'UTR.	129
R.2. APTÁMEROS CONTRA VIH-1.	132
R.2.1. DISEÑO DEL PROCESO DE SELECCIÓN MOLECULAR <i>IN VITRO</i> .	133
R.2.2. SEGUIMIENTO DEL PROCESO DE SELECCIÓN MOLECULAR <i>IN VITRO</i> .	135
R.2.2.1. LA CAPACIDAD DE UNIÓN.	135
R.2.2.2. LA COMPOSICIÓN NUCLEOTÍDICA.	137
R.2.2.3. LA COMPOSICIÓN ESPECÍFICA.	139
R.2.3. ESTRUCTURA <i>IN SILICO</i> DEL RNA 5'UTR ₃₀₈ Y LOS APTÁMEROS: POSIBILIDAD DE UNIÓN.	140
R.2.4. ENSAYOS DE UNIÓN DE LOS APTÁMEROS AL RNA 5'UTR ₃₀₈ .	144
R.2.5. MAPEO DE LA UNIÓN APTÁMERO-5'UTR ₃₀₈ .	145
R.2.6. DISEÑO DE VECTORES DE EXPRESIÓN EUCARIÓTICOS.	150
R.2.7. INHIBICIÓN POST-INTEGRATIVA DE VIH-1 POR APTÁMEROS DE RNA.	151
R.2.8. INHIBICIÓN POST-INTEGRATIVA DE VIH-1 POR CONSTRUCCIONES DE EXPRESIÓN DE APTÁMEROS DE RNA.	152
R.2.9. ANÁLISIS DE LA INDUCCIÓN DE RESPUESTA MEDIADA POR INTERFERÓN DE LOS APTÁMEROS DE RNA PRESINTETIZADOS Y LAS CONSTRUCCIONES DE EXPRESIÓN.	153
R.2.10. INHIBICIÓN PREINTEGRATIVA DE VIH-1 POR CONSTRUCCIONES DE EXPRESIÓN DE APTÁMEROS DE RNA.	155
R.2.11. DISEÑO BIOINFORMÁTICO DE LA MOLÉCULA RNA16(+), INHIBIDORA DE VIH-1.	156
R.2.12. INHIBICIÓN POST-INTEGRATIVA DE VIH-1 POR RNAs SINTÉTICOS DISEÑADOS <i>IN SILICO</i> .	159
R.2.13. ENSAYOS DE UNIÓN DE LAS MOLÉCULAS INHIBIDORAS RNA16(+) Y LOS APTÁMEROS XI1 Y XI21 FLANQUEADOS POR LAS HORQUILLAS DEL snRNA U6.	160

DISCUSIÓN	163
D.1. DISEÑO DE NUEVOS INHIBIDORES PAR VIH-1.	165
D.1.1. RNAs <i>ANTISENSE</i> CATALÍTICOS.	166
D.1.2. APTÁMEROS.	167
D.2. EFECTO ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i> DE LOS RNAs INHIBIDORES.	168
D.2.1. CAPACIDAD DE CORTE DE LOS RNAs <i>ANTISENSE</i> CATALÍTICOS.	168
D.2.2. INHIBICIÓN DE LA DIMERIZACIÓN DEL RNA DE VIH-1 <i>IN VITRO</i> POR LOS RNAs <i>ANTISENSE</i> CATALÍTICOS.	171
D.2.3. UNIÓN DE LOS APTÁMEROS A LA MOLÉCULA DE RNA 5'UTR ₃₀₈ .	174
D.3. INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN VIRAL <i>EX VIVO</i> POR LOS RNAs INHIBIDORES.	179
D.4. ESTUDIOS DE INTERÉS DERIVADOS DE LA UTILIZACIÓN O DISEÑO DE LOS RNAs INHIBIDORES.	183
D.4.1. PAPEL DE LA DOBLE CONFORMACIÓN DE LA 5'UTR EN LA DIMERIZACIÓN DEL RNA DE VIH-1.	184
D.4.2. PROGRESIÓN DE LAS POBLACIONES DE APTÁMEROS DURANTE EL PROCESO SELECTIVO.	186
D.5. EL MOTIVO DE UNIÓN 5'-GGCAAGGA-3': APTÁMEROS XI1, XI21 Y LA MOLÉCULA RNA16(+).	191
CONCLUSIONES	197
REFERENCIAS	201
ANEXO	223

ACRÓNIMOS PROCEDENTES DEL INGLÉS Y ANGLICISMOS

Lista de acrónimos procedentes del Inglés:

- 5'UTR: *5' UnTranslated Region*, región no traducible en 5'.
- ALAL: *Apical Loop-Apical Loop*, interacción lazo apical con lazo apical.
- ALIL: *Apical Loop-Internal Loop*, interacción lazo apical con lazo interno.
- AMD: *Age-related Macular Degeneration*, degeneración macular asociada a la edad.
- APS: *Amonium PerSulfate*, persulfato amónico.
- ATCC: *American Type Culture Collection*, colección americana de cultivos celulares tipo.
- ATP: *Adenosine TriPhosphate*, adenosina trifosfato.
- BGH: *Bovine Growth Hormone*, hormona bovina del crecimiento.
- BMH: *Branched Multiple Hairpins*, ramificada en múltiples horquillas.
- CCR5: *C-C chemokine Receptor 5*, receptor 5 de quimiocinas tipo C-C.
- CD4: *Cluster Differentiation antigen 4*, proteína antigénica de diferenciación 4.
- cDNA: *copy DNA*, DNA copia.
- cdk9: *cyclin-dependent kinase 9*, quinasa nº 9 dependiente de ciclina.
- CIAP: *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, fosfatasa alcalina intestinal de ternera.
- CMV: *CitoMegaloVirus*, citomegalovirus.
- CXCR4: *C-X-C chemokine Receptor 4*, receptor 4 de quimiocinas tipo C-X-C.
- DIS: *Dimerization Initiation Site*, sitio de inicio de la dimerización.
- DLS: *Dimeric Linkage Site*, sitio de ligación dimérica.
- DMSO: *DiMethyl-SulfOxide*, dimetil-sulfóxido.
- DNA: *DeoxiriboNucleic Acid*, ácido deoxirribonucleico.
- DTT: *1,4-Dithiothreitol*, 1,4-ditiotretiol.
- ED: *Ensemble Diversity*, diversidad de ensamblaje.
- EGS: *External Guide Sequence*, secuencia guía externa.
- EMSA; *Electrophoretic Mobility Shift Assay*, ensayo de cambio en la movilidad electroforética.

- Env y env: *from ENvelope*, abreviatura de “envuelta”.
- FBS: *Fetal Bovine Serum*, suero fetal bovino.
- FME: *Frequence of the Minimum Energy structure*, frecuencia de la estructura de mínima energía.
- HER2/neu: *Human Epidermal growth factor Receptor-2*, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.
- IRES: *Internal Ribosome Entry Site*, Sitio de entrada interna del ribosoma.
- LAV: *Lymphadenopathy-Associated Virus*, virus asociado a linfadenopatía.
- LDI: *Long Distance Interaction*, interacción a larga distancia.
- LNA: *Locked Nucleic Acid*, ácido nucleico bloqueado.
- lncRNA: *Long Non-Coding RNA*, RNA largo no codificante.
- LTR: *Long Terminal Repeat*, repetición terminal larga.
- MCS: *MultiCloning Site*, sitio de policlonación.
- mRNA: *Messenger RNA*, RNA mensajero.
- miRNA: *MicroRNAs*.
- NADP: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*, dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato.
- ncRNA: *Non-Coding RNA*, RNA no codificante.
- NMR: *Nuclear Magnetic Resonance*, resonancia magnética nuclear.
- npcRNA: *Non-Protein Coding RNA*, RNA no codificante de proteínas.
- ORF: *Open Reading Frame*, Marco Abierto de Lectura.
- p-TEFb: *positive-Transcription Elongation Factor b*, factor positivo de elongación de la transcripción B.
- PAS: *Primer Activation Signal*, señal de activación del cebador.
- PBS: *Primer Binding Site*, sitio de unión del cebador.
- PCR: *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa.
- PKR: *Protein Kinase RNA-activated*, proteína quinasa activada por RNA.
- PNA: *Peptide Nucleic Acid*, ácido nucleico peptídico.
- PPt: *Poly-Purine Track*, tramo de poli-purinas.
- PUt: *Poly-Uridine Track*, tramo de poli-uridinas.

- RISC: *RNA-Induced Silencing Complex*, complejo de silenciamiento inducido por RNA.
- RNA: *RiboNucleic Acid*, ácido ribonucleico.
- RPR: *RNase P RNA*, RNA de la RNasa P.
- RRE: *Rev-Response Element*, elemento de respuesta a Rev.
- rRNA: *Ribosomal RNA*, RNA ribosomal.
- RT-PCR: *Real Time-PCR*, PCR en tiempo real.
- sArMV: *Satellite of Arabis Mosaic Virus*, satélite del virus del mosaico del *Arabis*.
- scRNA: *Small Cytoplasmic RNA*, RNA pequeño citoplasmático.
- sCYMV: *Satellite of Chicory Yellow Mottle nepoVirus*, satélite del nepovirus del moteado amarillo de la achicoria.
- SD: *major Splicing Donor*, donador principal de *splicing*.
- SDF-1: *Stromal cell-Derived Factor-1*, Factor celular estromal derivado-1.
- SDS: *Sodium Dodecyl Sulphate*, dodecilsulfato sódico.
- SELEX: *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*, evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial.
- siRNA: *Small Interfering RNA*, RNA pequeño interferente.
- SL-#: *Stem-Loop #*, tallo-lazo #.
- snoRNA: *Small Nucleolar RNA*, RNA pequeño nucleolar.
- snRNA: *Small Nuclear RNA*, RNA pequeño nuclear.
- sncRNA: *Small Non-Coding RNAs* RNAs pequeños no codificantes.
- SPR: *Surface Plasmon Resonance*, resonancia en superficie de plasma.
- SRP: *Signal Recognition Particle*, partícula de reconocimiento de la señal.
- sTRSV: *Satellite of Tobacco RingSpot Virus*, satélite del virus de las manchas anulares del tabaco.
- SV40: *Simian Virus 40*, virus 40 del simio.
- TAR (*element*): *Trans-Activation Response (element)*, (elemento de) respuesta a la *trans*-activación.
- tmRNA: *Transferent-Messenger RNA*, RNA transferente mensajero.
- TRBP: *TAR RNA Binding Protein*, proteína de unión a TAR RNA.
- tRNA: *Transferent RNA*, RNA transferente.

- utRNA: *UnTranslated RNA*, RNA no traducible.
- VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*, factor de crecimiento del endotelio vascular

Lista de anglicismos no traducidos y propuestas de traducción en castellano:

- *Antisense*: Antisentido.
- *Cap*: Cofia, caperuza.
- *Core*: Núcleo “viral” (se ha mantenido *core* para no confundir con “núcleo celular”, pues en Inglés *core* y *nucleous* son ambos traducción del Castellano “núcleo”).
- *Decoy*: Señuelo.
- *Frame-shifting*: Cambio del marco abierto de lectura, translectura traduccional.
- *Hairpin*: Horquilla.
- *Hammerhead*: Cabeza de martillo (el término en Inglés se utiliza para designar al tiburón martillo).
- *Kissing loop*: Interacción lazo-lazo.
- *Kissing complex*: Complejo lazo-lazo.
- *Microprocessor*: Microprocesador.
- *Pseudoknot*: Pseudo-nudo.
- *Riboswitch*: Ribointerruptor, riborregulador, interruptor RNA.
- *Sheared*: En cizalla.
- *Spliceosome*: Espliceosoma, Ayustosoma.
- *Splicing*: Corte y empalme, Ajuste, Rearreglo.
- *Wobble*: Bamboleo.

INTRODUCCIÓN

I.1. RNA.

I.1.1. LA CONCEPCIÓN CLÁSICA DEL RNA.

El RNA es un biopolímero del grupo de los ácidos nucleicos y desempeña un papel esencial en la biología de los seres vivos. La unidad básica y repetitiva del RNA es el nucleótido, una molécula orgánica compuesta por un azúcar, una base nitrogenada y un grupo fosfato (H_3PO_4). Existen cuatro nucleótidos, diferenciados en la base nitrogenada, que pueden formar parte del RNA, si bien, pueden sufrir modificaciones posteriores a la síntesis del polímero que cambien la naturaleza de los mismos. El RNA es, por tanto, un heteropolímero y los cuatro nucleótidos constituyentes son los nucleótidos de adenina, guanina, uracilo y citosina. La abundancia y disposición ordenada de estos cuatro nucleótidos varía de unas moléculas de RNA a otras y esto hace que, a diferencia de otros homo o heteropolímeros biológicos como el almidón, la celulosa o el ácido hialurónico, el RNA constituya un cristal aperiódico que, tal como anunció el físico Erwin Schrödinger, le permite almacenar o codificar información (1). Esta última facultad la comparte con el otro ácido nucleico principal: el DNA.

Es difícil precisar cuándo tuvo lugar el descubrimiento del RNA. Friedrich Miescher fue el primero en interesarse por el contenido del núcleo celular (2), al que llamó nucleína. Su discípulo Altmann lo descompuso en un componente proteico y una sustancia con naturaleza acídica carente de azufre y rica en fósforo a la que llamó ácido nucleico (3). Kossel dedujo la existencia de dos tipos de ácidos nucleicos en sus extracciones desde timo y levaduras, y Ascoli y Levene, independientemente, descubrieron que ambos compartían en su composición adenina, citosina y guanina, pero diferían en la cuarta base: timina y uracilo respectivamente. Levene fue quien, además, precisó que el azúcar del primero era 2'-deoxirribosa y el del segundo ribosa (4).

Las funciones del RNA han sido mucho más difíciles de identificar y, aun hoy día, queda mucho por descubrir. Los primeros indicios relacionaron la función del RNA con la síntesis de proteínas. Zamecnik y Palade confirmaron en 1956 (5-6) que los ribosomas descubiertos por Claude (7) en 1940 (llamados así por su alto contenido en RNA) eran los responsables de la síntesis de proteínas, confirmando

así la hipótesis enunciada por Brachet diez años antes. Con el conocimiento de los experimentos de Griffith (8) y Avery, MacLeod y McCarty (9) sobre el papel del DNA como portador de la información genética, Jacob y Monod hipotetizaron en 1961 que la información genética debía fluir a través de un RNA intermediario de vida corta desde el DNA a los ribosomas para la síntesis de proteínas, y tres años más tarde fue descubierto y llamado RNA mensajero (mRNA) por Brenner, Jacob y Meselson (10). Fueron varios científicos, entre los que se encontraba Zamecnik, quienes finalmente descubrieron el RNA adaptador que portaba los aminoácidos activados al ribosoma y que se denominó RNA de transferencia (tRNA) (11).

Con todos estos datos surge la concepción clásica del RNA, como intermediario de la información genética entre el DNA y las proteínas. El DNA sería el portador de la información genética, usado como molde para la síntesis de diferentes moléculas de RNA. Las proteínas y RNAs ribosomales (rRNA) constituirían una partícula no especializada –el ribosoma–, que llevaría a cabo la síntesis de proteínas concretas mediante el descifrado del RNA mensajero y utilizando los aminoácidos cargados en los RNAs transferentes. Francis Crick, en un simposium sobre la síntesis de proteínas, enunció que la información genética debía de fluir desde los ácidos nucleico hacia las proteínas, y no a la inversa (12).

I.1.2. LA REVOLUCIÓN DEL RNA.

El flujo de la información genética desde DNA a RNA y desde éste a Proteínas fue ampliamente aceptado por la comunidad científica, que se mostró reticente a aceptar ciertos descubrimientos contradictorios que surgieron contemporáneamente a los que apoyaban esta visión clásica. Así, ya en 1939, Stanley y Best habían confirmado la naturaleza ribonucleoproteica del virus del mosaico del tabaco (13). Contradiendo los experimentos de Griffith, los científicos Gierer, Schramm y Fraenkel-Conrat demostraron que el RNA de dicho virus era capaz de iniciar, aisladamente, la replicación viral (14-16), estableciendo que también el RNA era capaz de portar y transmitir la información genética.

En 1963 Weissmann (discípulo de Severo Ochoa) y Haruna (discípulo de Spiegelman) aislaron respectivamente enzimas de los bacteriófagos MS2 y Q β capaces de sintetizar RNA sobre un molde de RNA (17-18). Estas enzimas RNA

polimerasas RNA-dependiente se conocen como RNA replicasas y su existencia probaba que el RNA era capaz de replicarse al igual que ya se había descrito para el DNA.

Más sorprendente aún fue el descubrimiento de Howard Temin de 1964, al ver que el virus del Sarcoma de Rous, con genoma de RNA, era capaz de insertar sus genes en el DNA de las células que infectaba (19). Cinco años después Temin y Baltimore independientemente caracterizaron enzimas en los virus del sarcoma de Rous y de la leucemia murina de Reuscher respectivamente, capaces de sintetizar DNA sobre un molde de RNA, esto es, DNA polimerasas RNA-dependientes (20-21). Estas enzimas hoy día se denominan retro o reversotranscriptasas.

Conociendo todos estos datos, Francis Crick contempló este tipo de transferencias de información en la concepción del Dogma Central de la Biología Molecular como “transferencias posibles”, aduciendo que se tenía evidencia de ellas en ciertas células infectadas por virus (22) (Fig. 1). No obstante, catalogaba como “transferencias probables” las que hoy conocemos como replicación del DNA, transcripción y traducción, que se daban normalmente en las células de los seres vivos. Se equivocó. El descubrimiento de elementos genéticos móviles como los retrotransposones y los intrones autocatalíticos bacterianos del grupo II, así como el sistema de silenciamiento génico demostraría que también tienen lugar en células libres de virus.

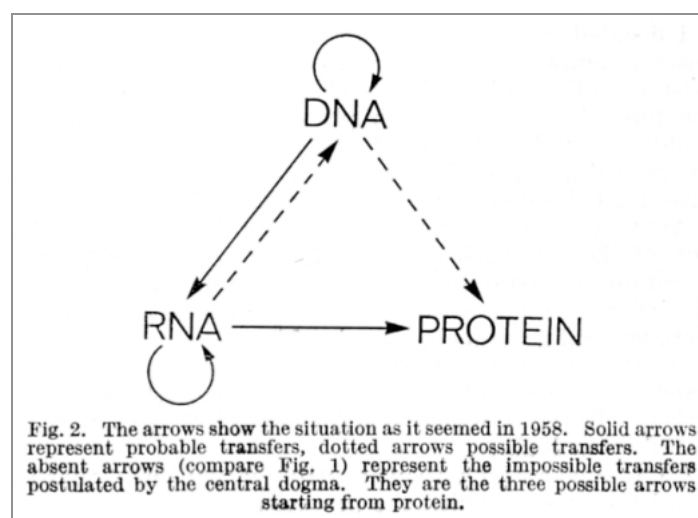


Figura 1. Esquema que muestra la figura 2 y su leyenda utilizadas por Crick en su artículo de 1970: *The Central Dogma of Molecular Biology, Nature* (22). La traducción de la leyenda sería: “Las flechas muestran la situación tal como se creía en 1955. Las flechas continuas representan transferencias probables, las flechas discontinuas transferencias posibles. La ausencia de flechas (comparar Fig.1) representan las

transferencias imposibles postuladas por el dogma central. Éstas son las tres posibles flechas comenzando desde las proteínas”.

I.1.3. EL MUNDO RNA.

A principios de los 80 se tenía una concepción de la vida basada principalmente en DNA y proteínas, aunque el origen de la vida resultaba entonces una cuestión paradójica, pues el DNA codifica las proteínas y éstas replican el DNA. ¿Qué fue primero? Visionarios como Francis Crick, Carl Woese o Leslie Orgel enunciaron y respaldaron la idea de un primitivo mundo basado en el RNA previo al actual. Hubo que esperar hasta la década de los 80 para que se pudiese en evidencia la habilidad del RNA como biocatalizador, al igual que las proteínas, dando una base sólida a esta teoría.

Thomas R. Cech descubrió que un intrón presente en el RNA ribosomal inmaduro de *Tetrahymena* era capaz de autoescindir-se cuando era transcrito *in vitro* y en ausencia de la maquinaria celular necesaria para ello (23). Al mismo tiempo, Sydney Altman trabajaba con la ribonucleasa P (RNasa P) de *Escherichia coli*, una enzima implicada en la maduración de los tRNAs y compuesta por una molécula proteica y otra de RNA, y demostró que esta última era capaz de catalizar la reacción de maduración por sí sola (24). La prueba de que en el mundo actual la información genética de ciertos virus reside en moléculas de RNA en lugar de DNA, y que ciertas reacciones bioquímicas son catalizadas por RNAs en lugar de proteínas, daban sustento a la hipótesis de un mundo prebiótico en el que el RNA sería la base de ambas funciones biológicas, y que habría sido progresivamente sustituido por DNA y proteínas en los casos más favorables para ello. Este periodo de la evolución biológica recibió el nombre de Mundo RNA, término acuñado por Walter Gilbert en 1986.

La hipótesis del mundo RNA plantea que los RNAs catalíticos (o funcionales en un sentido más amplio) necesarios para el mantenimiento de los sistemas biológicos primitivos habrían sido progresivamente reemplazados por proteínas. Este reemplazamiento gradual habría comenzado con la inclusión de cofactores proteicos en los RNAs catalíticos, habría evolucionado hacia la existencia de ribonucleoproteínas y, finalmente, proteínas sin factor de RNA (25). Los catalizadores de las reacciones centrales de esta bioquímica primitiva habrían

sufrido una presión selectiva tal que cualquier leve deficiencia catalítica en su transición a proteína habría sido fuertemente desfavorecida, ralentizándose el proceso o “fosilizándose” en estado de RNA (26). Dada la esencialidad de los tRNAs para la traducción, la RNasa P podría bien constituir uno de estos fósiles del mundo RNA. Además, estos fósiles mostrarían una tendencia progresiva al aumento del ratio proteína:RNA en la progresión evolutiva de los seres vivos y así se constata en ejemplos tales como los intrones autocatalíticos *vs spliceosome* o la RNasa P y los ribosomas bacterianos *vs* sus homólogos eucariotas.

Del mismo modo, el DNA habría también reemplazado al RNA en su función de almacenamiento de la información. El DNA es menos reactivo químicamente que el RNA, posiblemente debido a la ausencia del grupo 2'-hidroxilo, y la fidelidad de copia de las polimerasas de RNA actuales es muy inferior a la de las del DNA. De hecho, los coronavirus, virus con grandes genomas de RNA, han desarrollado un sistema de corrección de copia no relacionado con el del DNA pero que vincula el aumento en tamaño del genoma con la necesidad de una replicación más precisa (27). De este modo, el RNA únicamente podría constituir genomas extremadamente pequeños, quedando relegado a ciertos virus del mundo actual y otros elementos genéticos relacionados.

Han sido descritos muchos otros ejemplos de RNA fosilizados en diferentes puntos de la transición hacia proteínas. Los *riboswitches* y las ribozimas libres de proteínas son ejemplos de RNAs funcionales *per se* aún en la actualidad. La RNasa P de muchos organismos o el ribosoma son complejos ribonucleoproteicos en los que aún el RNA es responsable de la actividad catalítica (24,28-29), mientras que en el *spliceosome* las proteínas y el RNA son copartícipes de la misma (30-31). Finalmente, también existen complejos ribonucleoproteicos en los que RNAs no catalíticos actúan como soporte estructural –partícula de reconocimiento de la señal (SRP)–, como centros organizadores de complejos multiproteicos dinámicos –sitios de entrada interna del ribosoma (IRES)– o como guía para la función proteica –complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) y editosoma–.

También existen evidencias del metabolismo central de la célula que respaldan la existencia de un mundo RNA previo. Algunos ejemplos son la existencia de cebadores de RNA en la síntesis del DNA, el hecho de que la síntesis *de novo* de los deoxirribonucleótidos en todos los organismos ocurre a partir de

ribonucleótidos (especialmente la timidina trifosfato desde la uridina trifosfato), o que muchos cofactores universales como el ATP (adenosina trifosfato), el NADP (dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato) o la Coenzima A sean de naturaleza ribonucleotídica.

En la actualidad hay un número creciente de RNAs no codificantes descritos con funciones novedosas. En general se denominan RNAs no codificantes (ncRNAs) a aquellas familias de RNA distintas de los RNAs mensajeros, esto es, que no codifican proteínas. A parte de ribosomales y transferentes, se han descrito pequeños RNAs no codificantes (sncRNAs) como microRNAs (miRNAs), RNAs interferentes pequeños (siRNAs), RNAs pequeños nucleares (snRNAs), RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs), *antisense* RNAs, etc., así como largos RNAs no codificantes (lncRNAs) aparentemente implicados en epigenética (32-33). No obstante, el hecho de que ninguna de estas moléculas de RNA llegue a ser traducida en el ribosoma no implica que no puedan formar parte de un sistema de interpretación de códigos, pues muchos de ellos están implicados en procesos de regulación bastante complejos que podrían asociarse a un cifrado de señales. Es por esto por lo que, a todos ellos, junto con intrones, tRNAs y rRNAs se les ha propuesto agrupar bajo el término de RNAs no traducibles o no codificantes de proteínas (utrRNAs o npcRNAs), que los diferenciarían de los RNAs mensajeros traducibles convencionales (34).

Además de esta variedad de especies de RNA, existe también una gran variedad de motivos funcionales de RNA descritos, tanto en mRNAs y utrRNAs como en genomas de RNA. Éstos abarcan dominios catalíticos, *riboswitches*, aptámeros, intrones, IRES, etc. y muestran la gran plasticidad funcional del RNA, dejando un registro importante de su presencia en los genomas de todos los organismos vivos, así como de virus y elementos génicos relacionados. El estudio funcional de estos dominios y de sus aplicaciones tecnológicas resulta apasionante, estando esta tesis tangencialmente relacionada con esta área.

I.2. RNAs CATALÍTICOS.

En el escenario primigenio en el que el RNA fue a la vez replicativo y catalítico, el propio ácido nucleico se encontraría sometido a presiones selectivas

contrapuestas. En los procesos replicativos, la discriminación de cada base nitrogenada en cuanto al potencial para formar puentes de hidrógeno es crítico para la fidelidad, pues se requieren para el apareamiento de las mismas. Producto de esto es que ninguna de las nucleobases tiene grupos ionizables en condiciones próximas a la neutralidad (35), siendo sus pK_a s *a priori* demasiado bajos (3'5 para adenina y 4'2 para citosina) o demasiado altos (9'8 para guanina y 10'5 para uracilo). Sin embargo, el que no sean ionizables fácilmente reduce reactividad de la molécula (36). Esto, junto con el limitado repertorio de grupos funcionales del que dispone (4 nt frente a los 20 aminoácidos presentes en las proteínas) y su disposición en un esqueleto ribosil-fosfato muy rico en cargas negativas que dificulta, también *a priori*, interacciones inter- e intramoleculares, supone un fuerte impedimento a las funciones catalíticas.

La función catalítica, por tanto, se sustenta en otras propiedades del RNA seleccionadas para contrarrestar sus limitaciones. La flexibilidad del plegamiento del RNA es, por ejemplo, extraordinaria. A pesar de que la mayoría de especies de RNA descritas son monocatenarias, se dan apareamientos de bases intra- e intercatenarios muy específicos por la discriminación de secuencia, que generan hélices y regiones monocatenarias encerradas en lazos apicales, lazos internos y burbujas dentro de las hélices. La tolerancia de apareamientos no canónicos (los más frecuentes, como el GU *wooble*, se muestran en la tabla 1) facilita la adquisición de estructuras secundarias y terciarias complejas necesarias para la función biocatalítica.

Además, la interacción del RNA con otras moléculas puede ocurrir mediante gran variedad de recursos como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas o carga-carga, fuerzas de van der Waals entre apilamientos de los anillos aromáticos de las bases e incluso la modificación instantánea y transitoria de los sustituyentes de las bases en lo que se conoce como tautomería. La reactividad de la molécula se amplía si se consideran las posibilidades reactivas del grupo hidroxilo de los residuos de ribosa o la capacidad de coordinación de iones metálicos o cofactores externos por parte de los grupos químicos del propio RNA, que le permitirían disponer de grupos reactivos extra para mediar catálisis.

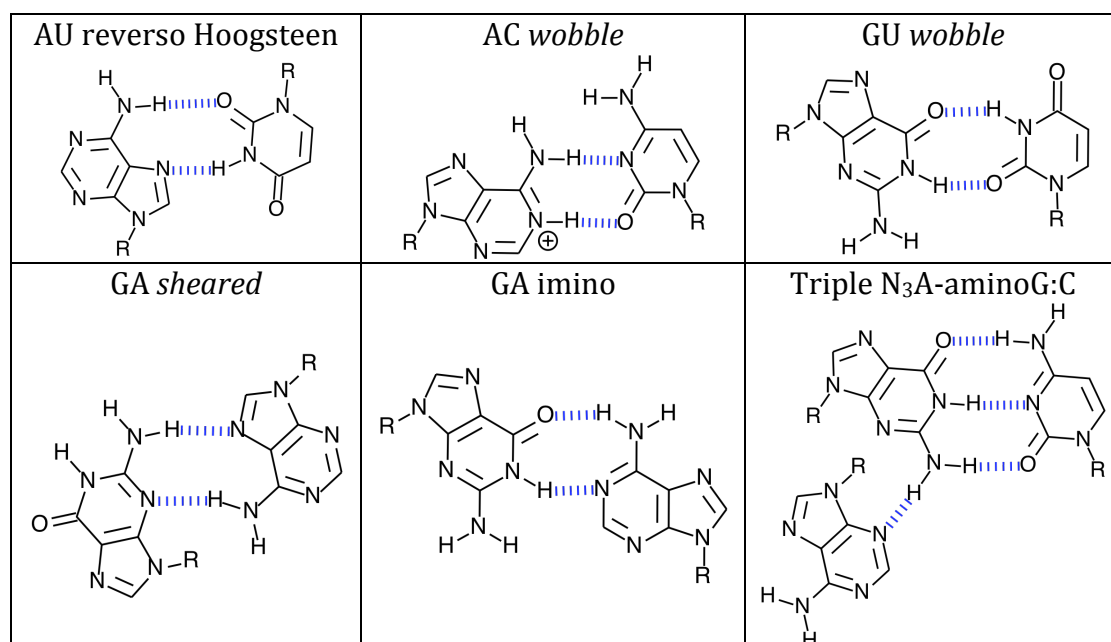


Tabla 1. Apareamientos no canónicos más frecuentes en el RNA (37). En punteado azul se muestran los puentes de hidrógeno que se establecen en cada apareamiento. La R representa la ribosa del nucleótido correspondiente a cada base nitrogenada. Otras interacciones posibles pueden consultarse en http://prion.bchs.uh.edu/bp_type/bp_structure.html

I.2.1. RIBOZIMAS NATURALES.

Varias ribozimas naturales han sido descritas hasta la fecha, todas ellas, con la excepción del ribosoma, catalizan reacciones de corte o ligación de ácidos nucleicos y se pueden clasificar en dos grupos arbitrarios para su descripción: i) grandes y ii) pequeños RNAs catalíticos. Estos últimos serán tratados en más profundidad en el siguiente apartado, limitándonos aquí a dar una breve visión del primer grupo: el ribosoma, la RNasa P, los intrones autocatalíticos de tipo I, de tipo II y el *spliceosome*.

El ribosoma es un complejo ribonucleoproteico responsable de la síntesis de proteínas en todos los organismos vivos. De hecho, la posesión o no de un ribosoma propio ha llegado a sugerirse como criterio para distinguir los organismos vivos y los no vivos. Fue descubierto en 1954 por George E. Palade y se vinculó a la síntesis de proteínas en 1960 (38). Los ribosomas están constituidos por dos subunidades desiguales en tamaño, si bien las eucariotas son ligeramente más grandes que sus homólogas procariontas. El descifrado del código genético y la síntesis proteica que tienen lugar en el ribosoma implican multitud de reacciones enzimáticas tales como acomodación de tRNAs, traslación, decodificación, etc. (39)

pero, es la formación del enlace peptídico o actividad peptidil-transferasa la que se ha demostrado con claridad que es catalizada íntegramente por el RNA ribosomal.

En 1991 Noller localizó el centro activo de esta actividad en el dominio V del rRNA 23S y sus proteínas asociadas (40), si bien más adelante comprobó que la actividad catalítica era especialmente resistente a la retirada progresiva de las proteínas (41). La cristalización de dicha subunidad en su conformación catalítica ponía de evidencia que no había proteínas en 15 a 18 Å alrededor del centro activo (42-45), lo que probaba que el ribosoma era, efectivamente, una ribozima (29). La reacción que tiene lugar consiste en dos transferencias simultáneas de protones: i) desde el nitrógeno α del aminoácido localizado en el sitio A (aceptor) del ribosoma al oxígeno 3' de la adenina terminal del tRNA del sitio P (peptidil); y ii) de éste último al oxígeno 2' de la misma ribosa (Fig 3). Así, en enlace este oxígeno 2' y el péptido se rompe, y éste último es transferido al nitrógeno α del aminoácido del sitio A sin desprotonarse en ningún momento, lo cual estaría muy desfavorecido dado su pK_a e impediría la reacción (35). Ninguno de los nucleótidos esenciales del centro activo del ribosoma está implicado directamente en la reacción (46-49), sino que su papel es coordinar una intrincada red de moléculas de agua que colaboran mediante puentes de hidrógeno a estabilizar las transiciones químicas que tienen lugar (50), no participando en este caso ningún ión Mg^{2+} o K^+ en la reacción (51).

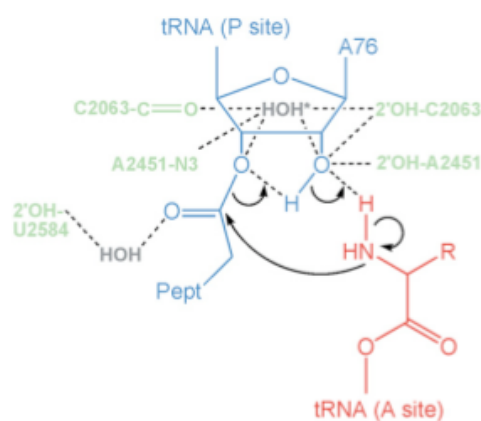


Figura 2. Mecanismo de formación del enlace peptídico mediante transferencia protónica concertada (52). El tRNA del sitio P se muestra en azul, el tRNA del sitio A en rojo, las moléculas de agua coordinadas en gris y los radicales ribosómicos implicados en verde.

La RNasa P fue, en cambio, la primera ribozima descrita (24) y cataliza la eliminación del fragmento 5' de los pre-tRNAs en todos los organismos vivos. La RNasa P está constituida por una molécula de RNA, llamada RPR, y un número variable de proteínas según el organismo del que se trate (53-56). La RNasa P de *Escherichia coli* tiene una única proteína y el RPR (llamado M1) es totalmente activo aisladamente, mientras que en la de humanos hay diez proteínas y la actividad de su RPR (llamado H1) es siete órdenes de magnitud inferior que la del M1 (28).

El RPR presenta un plegamiento característico y conservado en todos los organismos vivos, con dos *pseudoknots* y diferentes hélices alineadas en dos grupos discretos (57) que constituyen los dominios de especificidad y catalítico (Fig. 3). Se distinguen, no obstante, cuatro tipos de RPRs en base a su plegamiento, siendo los paradigmas de cada uno los siguientes: A, de *Escherichia coli*; B, de *Bacillus subtilis*; M, de Archaeas; y la tipo eucariótica (58). Tanto la actividad catalítica como el correcto plegamiento del RPR requieren iones Mg^{2+} . La reacción catalizada consiste en una transesterificación que origina extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo en el punto de corte de la molécula sustrato. La ausencia de estructura cristalina de la RNasa P unida al mismo impide determinar con exactitud las interacciones entre ambos, pero métodos indirectos han permitido confirmar que radicales del sustrato (el grupo 2'-hidroxilo del nucleótido de guanina en 5' del punto de corte, el grupo amino exocíclico de la misma y el grupo 2'-hidroxilo del nucleótido en posición -2) como de la ribozima (hélice P4) parecen coordinar iones Mg^{2+} para la activación de grupos nucleofílicos aportados por las moléculas de agua y responsables de la catálisis del corte (58).

Finalmente, el último grupo de grandes ribozimas son aquellas relacionadas con el *splicing* o eliminación de intrones. Este tipo de procesamiento ocurre en gran cantidad de RNAs de eucariotas superiores si bien, en menor medida, se han descrito casos en eucariotas inferiores y procariontas. De toda la secuencia de un transcrito, sólo algunas regiones llegarán a formar parte del RNA maduro y esto ocurre por el corte y empalme de las mismas. Las regiones eliminadas se denominan intrones y las regiones preservadas exones. En base al tipo de procesamiento que tiene lugar, se distinguen cuatro tipos de intrones denominados intrones autocatalíticos de tipo I; de tipo II; intrones de

arqueobacterias y del tRNA eucariótico; e intrones procesados por *spliceosome*. Como su propio nombre indica, los dos primeros son autocatalíticos, esto es, la eliminación del intrón es catalizada por el propio intrón. El tercer grupo es procesado por una endorribonucleasa proteica y no guarda relación con los RNAs catalíticos. Finalmente, el cuarto grupo de intrones es procesado por el *spliceosome*, que como ya se ha avanzado, es un complejo ribonucleoproteico donde el RNA juega un papel importante en la catálisis.

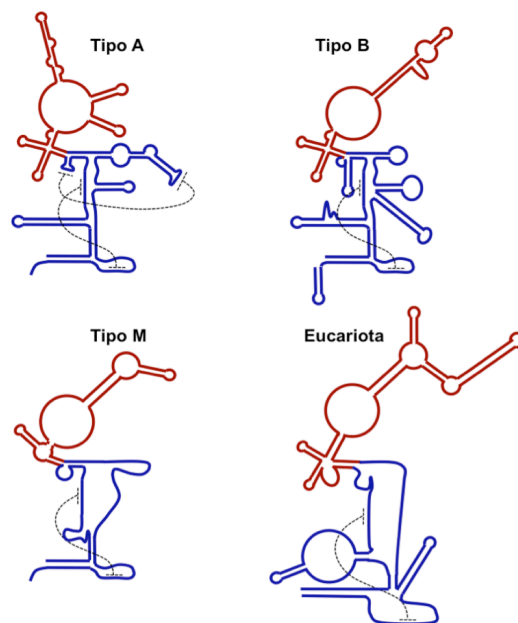


Figura 3. Modelos estructurales de los diferentes RPRs de las RNasas P de tipo A, B, M y eucariota (adaptado de (58)). En rojo se muestra el dominio de especificidad y en azul el dominio catalítico. Las líneas punteadas indican los *pseudoknots* existentes.

El descubrimiento del primer RNA catalítico ocurrió en 1982 y fue el intrón autocatalítico de tipo I del RNA ribosomal de *Tetrahymena*, que catalizaba su propia escisión durante su transcripción *in vitro* (23). Los intrones autocatalíticos de tipo II son mucho más complejos que los anteriores y se encuentran distribuidos por todo el dominio procariota, así como en los orgánulos eucariotas (59-63). Tanto en estos dos casos como en el caso de los intrones procesados por el *spliceosome*, la escisión del intrón ocurre gracias a dos reacciones de transesterificación simétricas. En la primera de ellas se produce el ataque de un radical nucleofílico sobre el fosfato del extremo 5' del intrón. En los intrones autocatalíticos de tipo I este radical es el oxígeno 3' de un nucleótido de guanina exógeno. En cambio, en los intrones de tipo II y en los procesados por el

spliceosome es el oxígeno 2' de un nucleótido de adenina localizado internamente en la secuencia del intrón. La segunda reacción ocurre por el ataque del oxígeno 3' del último nucleótido del exón precedente (liberado en la reacción anterior) sobre el fosfato del extremo 3' del intrón (64-66) (Fig. 4). Los intrones de tipo I se eliminan, por tanto, en forma lineal con el nucleótido de guanina exógeno unido al extremo 5', mientras que en los de tipo II el extremo 5' del intrón queda unido mediante un enlace 2'-5' al residuo interno de adenina. En ambos casos, la orientación espacial de los grupos atacantes se ve favorecida por el plegamiento del propio intrón, mientras que la activación de los grupos atacantes y la estabilización de los salientes ocurre gracias a que iones Mg^{2+} coordinados en el centro catalítico actúan como ácidos y bases de Lewis (67).

Los intrones de tipo II, a menudo, presentan un marco abierto de lectura dentro de su secuencia que codifica una proteína con dominios funcionales de tipo retrotranscriptasa, maturasa, unión a DNA y endonucleasa (68). Esta proteína es capaz de retrotranscribir el intrón e integrarlo en otros puntos del genoma procariota en lo que se denomina *splicing* reverso, conduciendo a la propagación de copias de la secuencia intrónica y haciendo que los intrones autocatalíticos de tipo II puedan catalogarse como elementos genéticos móviles.

El último grupo de intrones relevante desde el punto de vista de la catálisis mediada por RNA es el de los procesados por el *spliceosome*. Éste es un complejo macromolecular dinámico cuyos componentes ribonucleoproteicos entran y salen del mismo secuencialmente durante el proceso de *splicing* en el que tiene lugar el reconocimiento de los extremos del intrón y la catálisis de las dos reacciones de transesterificación (69). Si bien se han descrito dos *spliceosomes* diferentes en función de ciertos componentes alternativos y excluyentes (70), existen ciertas homologías de secuencia y estructura entre los snRNAs constituyentes y los dominios funcionales de los intrones autocatalíticos de tipo II (71), así como en el mecanismo de reacción de ambos (72), que sugieren una relación evolutiva. Los datos experimentales apuntan a que snRNAs y pre-mRNA están altamente implicados en el centro activo y en la coordinación de iones metálicos (30-31,73) y, aunque la estructura cristalina revela la presencia de proteínas en el centro activo (69), se ha probado que los snRNAs U2 y U6 son capaces de catalizar, aunque muy ineficientemente, algunos pasos de la reacción de *splicing* (74).

I.2.2. RNAs CATALÍTICOS PEQUEÑOS.

Los RNAs catalíticos pequeños se caracterizan por ser moléculas de RNA de longitud bastante más reducida que las enumeradas anteriormente (menos de 150 nt) y que catalizan todas una reacción similar de corte del esqueleto azúcar fosfato de la propia molécula. Esta reacción consiste en una transesterificación $S_N2(P)$ (Fig. 4) (75), similar a la catalizada por la ribonucleasa A (RNasa A) (76), que ocurre sobre el fosfato del punto de corte, pues es menos electronegativo que los oxígenos que lo rodean y constituye un centro electrofílico. La reacción depende de tres eventos esenciales: la desprotonación del oxígeno-2' de la ribosa-5'; el cambio de hibridación del fosfato de sp^3 a sp^2 ; y la protonación del oxígeno-5' de la ribosa-3' cuando termina la reacción. El orbital p no híbrido se encuentra enlazado con el oxígeno-5' de la ribosa-3' por uno de sus lóbulos y es atacado en el otro lóbulo por el oxígeno-2' desprotonado de la ribosa-5'. El estado de transición pentacoordinado del fosfato se resuelve con la expulsión del primero, quedando enlazado con el oxígeno 2' de la ribosa-5', reflejado en un cambio de quiralidad del fosfato y ocasionando el corte del RNA en dos moléculas con extremos 2',3'-fosfato cíclico y 5'-hidroxilo (77). Dada la orientación en línea de los lóbulos del orbital p, el grupo atacante debe aproximarse en un ángulo de 180° respecto del saliente, de ahí el nombre de ataque "en línea".

En un principio se sospechó que diferentes cationes bivalentes estarían actuando como aceptores y donadores de protones en esta reacción (67,78-79), pero el hecho de que las ribozimas también fuesen funcionales con la sola presencia de cationes monovalentes o polianiones inertes (80-81) lo descartó e hizo recaer estos papeles sobre el propio RNA (82). La aproximación de los diferentes radicales del RNA participantes en la reacción requiere una torsión de la molécula que implica frecuentemente apareamientos e interacciones no canónicas entre nucleótidos.

Se han descrito numerosos RNAs catalíticos pequeños en todo el espectro de los organismos vivos, agrupándose en cinco tipos según el motivo catalítico: ribozima GlnS, ribozima del RNA satélite *Varkud* (VS) de *Neurospora*, ribozima del virus de la hepatitis *delta* (VHD), ribozima *hammerhead* y ribozima *hairpin*. Las

dos últimas son objeto de estudio en esta tesis y serán descritas en profundidad a continuación.

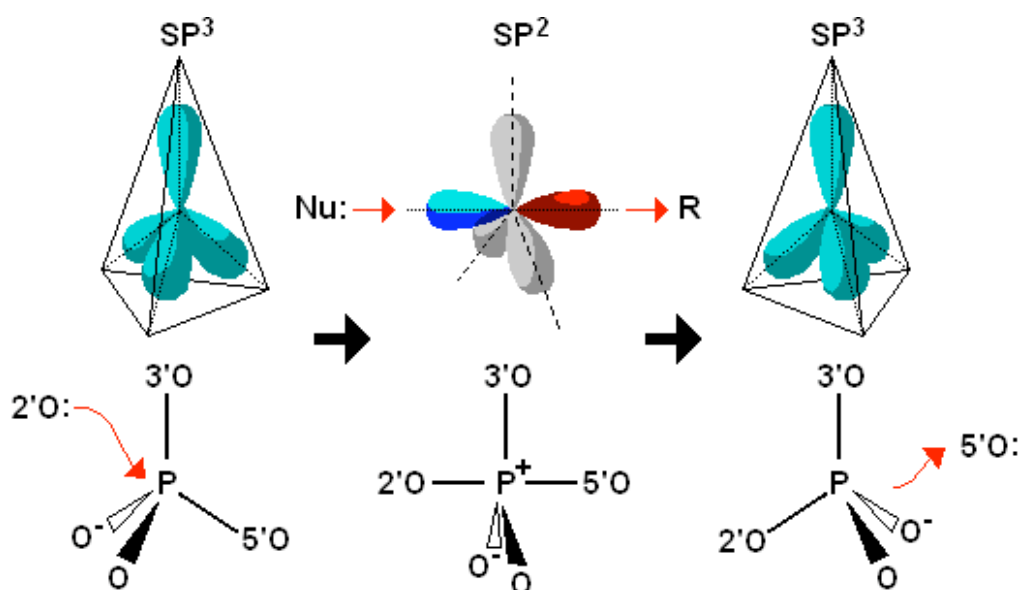


Figura 4. Ataque nucleofílico S_N2 ó sustitución bimolecular nucleofílica. En el estado inicial y final el grupo reactivo se encuentra en estado tetraédrico de hibridación sp^3 , pero durante la reacción cambia a estado sp^2 , donde el orbital “p” no híbrido sustenta el grupo saliente R (oxígeno 5’) en un extremo del eje coordinado y recibe el ataque nucleofílico (oxígeno 2’) en el otro. De este modo, el estado intermedio está pentacoordinado y concluye con la sustitución del grupo saliente por el atacante y el retorno a la hibridación SP^3 acompañado del cambio de quiralidad del fósforo.

La ribozima tipo VHD fue inicialmente descrita en el virus de la hepatitis *delta*, un RNA satélite del virus de la hepatitis B. Este RNA circular se replica mediante el mecanismo del círculo rodante de manera que para madurar sus réplicas desde el concatémero hasta moléculas monoméricas utiliza dominios ribozima codificados en ambas hebras (83-84). Muy recientemente se han descrito ribozimas de este tipo en mensajeros celulares (85) y, muy especialmente, vinculadas a RNAs de elementos móviles (86-87), permitiendo a estos últimos liberarse de co-transcritos celulares. La ribozima corta justo por encima de su dominio catalítico mínimo, permitiendo reconstituirla enteramente en las nuevas copias de estos elementos móviles.

La ribozima GlnS fue descrita en la región 5’ no traducida del gen codificante de la glucosamina-6-fosfato sintetasa (88) y constituye la pieza clave para la regulación de la síntesis de dicho metabolito, pues en presencia del mismo la ribozima se autocorta e inactiva el mensajero que codifica la enzima responsable de ello. El hecho de que la ribozima fuera sensible a un metabolito externo hizo

que fuese descrita inicialmente como un *riboswitch*, pero lejos de existir un cambio conformacional inducido por el metabolito, más bien parece que funciona como cofactor. Concretamente el grupo amino del carbono 2 es quien cede el protón para la estabilización del oxianión saliente (89-91), siendo este un ejemplo de cómo el RNA utiliza grupos químicos de moléculas accesorias para solventar la baja reactividad de los propios.

La ribozima VS de *Neurospora* se localiza en un elemento génico particular: el retroplásmido Varkud. Este plásmido se localiza en las mitocondrias de algunos individuos del hongo *Neurospora* y se replica mediante un intermediario de RNA. La transcripción continua genera concatémeros de RNA que luego se procesan por la ribozima VS (92-93). Esta ribozima es la más grande de los RNAs catalíticos pequeños (150 nt) y es la más desconocida de todas, pues aún no se dispone de su estructura cristalina, pero parece que la catálisis no está mediada por iones metálicos sino por los propios grupos reactivos del RNA (94), incluso podría estar reconstituyendo un centro catalítico similar al de la ribozima *hairpin* que se verá más adelante (95).

En 2004 se describió una actividad catalítica de corte que mediaba la terminación de la transcripción del gen humano de la β -globina (96) y que parece estar implicada en la correcta liberación del mensajero desde el complejo de la polimerasa II (97). No obstante, aún no existen estudios bioquímicos de la naturaleza de la catálisis ni de la estructura de la misma.

1.2.2.1. RIBOZIMA HAMMERHEAD.

La ribozima *hammerhead* fue descrita inicialmente como el elemento por el cual ciertos viroides y RNAs satélites procesaban sus intermediarios de replicación (98-100) de forma similar a como también hace la ribozima VHD. En la actualidad se conocen más representantes activos de este tipo de ribozima localizados en todo el espectro de organismos vivos, desde plantas (101-106) hasta animales como platelmintos (107), insectos (108) o mamíferos (109). Además, estrategias bioinformáticas han llevado a la detección de más motivos tipo *hammerhead* en genes, secuencias repetidas y virus de organismos superiores, muchos de los cuales aún deben ser probados experimentalmente (110-113).

El dominio catalítico mínimo de esta ribozima tiene poco más de 20 nucleótidos, siendo el menor descrito hasta el momento. Esto hace que sea fácilmente obtenido mediante experimentos de selección molecular *in vitro* y que se especule con que los ejemplos descritos hasta el momento puedan más haber surgido independientemente por selección natural que constituir fósiles de RNA distribuidos por transferencia vertical u horizontal (114). Experimentos bioquímicos por deleción y mutación, así como estudios comparativos entre diferentes ribozimas *hammerhead* han permitido identificar un motivo catalítico consenso. Ejemplos de diferentes ribozimas *hammerhead* así como este consenso se muestran en la figura 5.

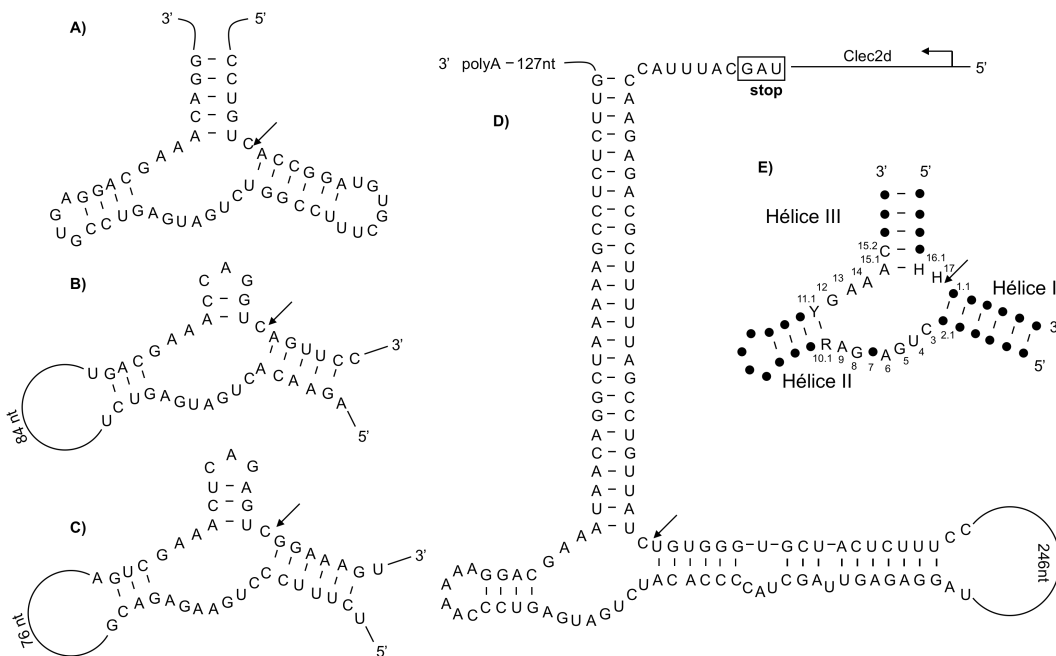


Figura 5. Dominios catalíticos de tipo *hammerhead*. (A) Dominio catalítico de la hebra de polaridad positiva del RNA satélite del virus de las manchas anulares del tabaco (sTRSV) (98). (B) y (C) Dominios catalíticos de las hebras positiva y negativa, respectivamente, del RNA del viroide del manchado solar del aguacate (ASBVd) (99) en sus hebras positiva y negativa respectivamente. (D) Dominio catalítico encontrado en el genoma de ratón (109). (E) Dominio catalítico consenso. Círculo negro: A, U, G ó C; H: A, C ó U; R: A ó G; Y: C ó U. La flecha indica el punto de corte. Las posiciones de los nucleótidos están numeradas según un consenso.

El motivo catalítico consenso consta de tres hélices numeradas de I a III que confluyen en una unión en Y con 1, 3 y 7 nucleótidos desapareados entre ellas (106,115-117). Siguiendo la numeración de la figura 5E, se describe que la posición 7 puede degenerarse, si bien la actividad catalítica mayor se registra con uracilo (116); la hélice II debe ser más larga de dos apareamientos de bases (118)

y el apareamiento más próximo a la unión en Y ha de ser un par $R_{10.1}$ - $Y_{11.1}$, siendo preferible GC (116,118-119); y en la hélice III se prefiere el triplete GUC precediendo el punto de corte, si bien NUH y NHH pueden ser eficientemente procesados (116,120-122).

Los estudios para elucidar la estructura del dominio catalítico mínimo mediante aproximaciones bioquímicas y cristalográficas arrojaron resultados contradictorios (123). El alto dinamismo del núcleo catalítico del dominio mínimo, propiciado por la alta flexibilidad de esta región no estructurada, explicaba estas contradicciones (124) e hizo pensar que este continuo cambio estructural sería el responsable de que con una alta frecuencia las moléculas adquirieran la conformación catalítica correcta y se produjera el corte. La cristalización de la ribozima completa de *Schistosoma mansoni* resolvió este enigma. Existen una serie de interacciones terciarias no canónicas entre el lazo apical de la hélice II y una región distal de la hélice I no presentes en el dominio catalítico mínimo y que se resumen en la figura 6B. Éstas hacen que las hélices I y II se dispusieran de forma paralela, resultando en un reajuste de la estructura del núcleo catalítico en la que los grupos químicos involucrados en la catálisis se posicionan muy próximos a la orientación necesaria para que ésta tenga lugar (125) (Fig. 6). Posteriormente se han descrito ribozimas *hammerhead* en las que esta alineación paralela de las hélices I y II se logra por apareamiento de bases entre los nucleótidos del lazo apical de la hélice II y un lazo apical o una burbuja lateral de la hélice I, formándose lo que se conoce como un *pseudoknot* (126). El conocimiento de estas interacciones ha permitido rediseñar las ribozimas para corte en *trans* (Fig. 5E), incluyéndolas y optimizando su actividad (127).

El corte se produce justo en 3' del nucleótido C_{17} , cuyo grupo hidroxilo 2' se dispone en esta estructura cristalina desviado tan solo 17° de la orientación "en línea" gracias a la interacción de su ribosa con las bases nitrogenadas de G_5 y A_6 . El papel de activación del grupo nucleofílico se le adjudica a G_{12} , cuyo nitrógeno 1 se encuentra a distancia de puente de hidrógeno del oxígeno 2' de C_{17} . No obstante, este nitrógeno no tiene carga negativa formal en su estado natural, lo que sugiere que pueda ser su isómero tautomérico el que verdaderamente active al atacante. G_8 , por su parte, estaría actuando como ácido general para estabilizar el oxianión 5' saliente. Esta G_8 forma un apareamiento Watson-Crick con C_3 en todas las

ribozimas descritas (128), siendo este apareamiento invertible C_8G_3 , lo que sugirió que fuese la ribosa del nucleótido quien aporte el grupo reactivo (129) y la estructura cristalina confirmó que este papel era desempeñado por el hidroxilo 2'. Finalmente, el estado de transición oxifosforano pentavalente está cargado negativamente y se encuentra próximo al también residuo aniónico de A_9 , lo que atribuye el papel estabilizador a cationes inmovilizados por éste último. No obstante, la controversia acerca de la participación de cationes bivalentes, especialmente Mg^{2+} , como activador catalítico y no solo como estabilizador sigue existiendo hasta el día de hoy (130).

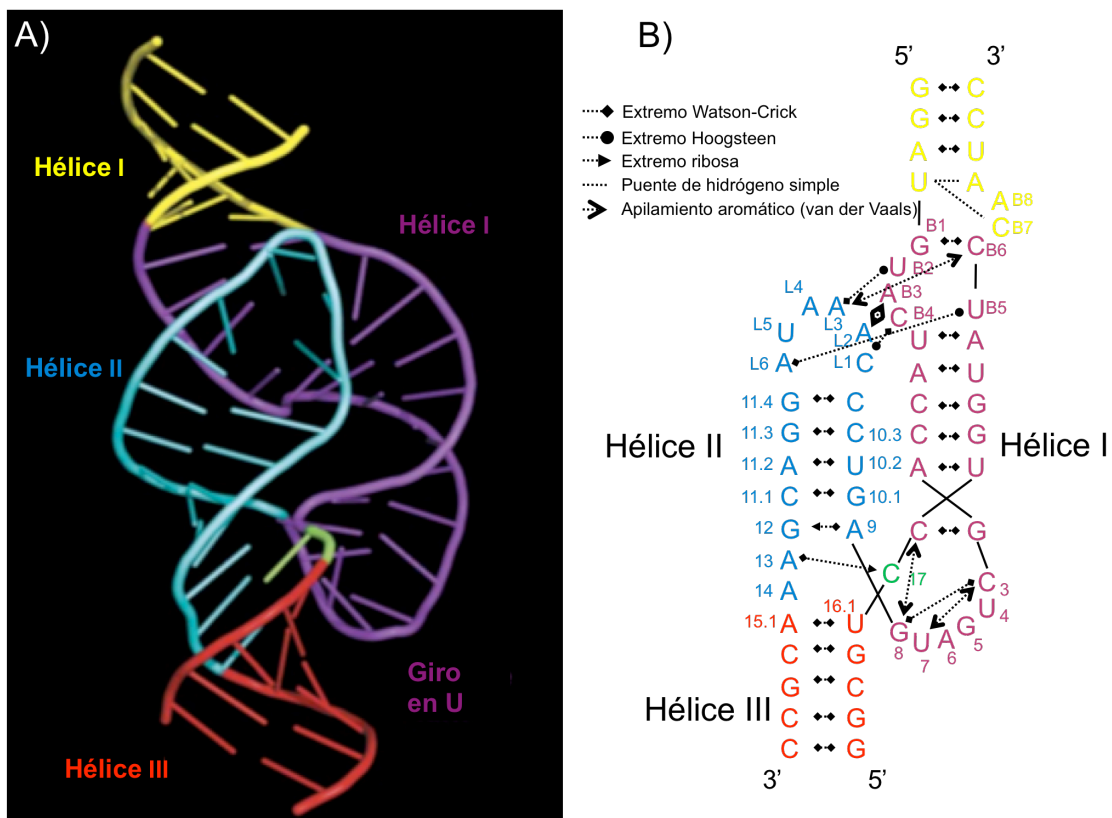


Figura 6. Estructuras tridimensional y secundaria de la ribozima tipo *hammerhead* (modificado de (125)). En (A) se muestra un diagrama de la estructura tridimensional cristalina de la ribozima tipo *hammerhead*. En (B) se representa la estructura secundaria de la ribozima *hammerhead* y se indican las diferentes interacciones terciarias, así como su naturaleza. En código de colores se representan en una y otra figura los diferentes dominios de la ribozima.

I.2.2.2. RIBOZIMA HAIRPIN.

El RNA satélite del virus que causa las manchas anulares de la planta de tabaco también utiliza ribozimas para procesar los concatémeros producto de su

replicación tipo círculo rodante (98,100,131). La ribozima que procesa la hebra positiva es de tipo *hammerhead*, pero el motivo catalítico que procesa la hebra negativa ([-]sTRSV) fue el primer ejemplo de ribozima *hairpin* descrita (132-133) (Fig. 7). Otros ejemplos fueron posteriormente descritos en RNAs satélites del nepovirus del moteado amarillo de la achicoria (sCYMV) y del virus del mosaico de *Arabis* (sArMV) (134) (Fig. 7). Además, la ribozima *hairpin* es el único RNA catalítico pequeño en el que se ha documentado la catálisis de la reacción inversa, esto es, la circularización de los monómeros de hebra negativa de los RNAs satélites para constituir moldes aptos para un segundo paso de síntesis de RNAs de polaridad positiva mediante el mecanismo del ciclo de círculo rodante (98,135).

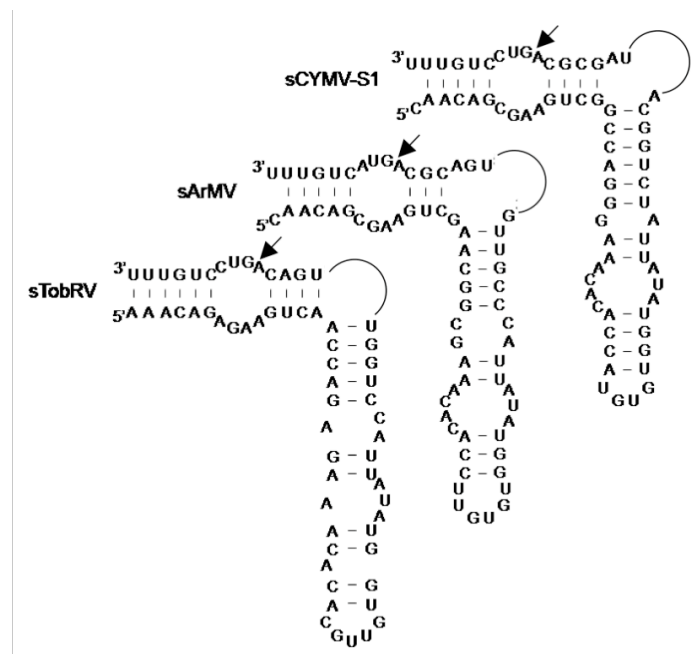


Figura 7. Dominios catalíticos de tipo *hairpin*. Dominios catalíticos descritos en la hebra negativa de los RNAs satélites de los virus de las manchas anulares de la planta de tabaco ([-]sTobRV); del moteado amarillo de la achicoria (sCYMV-S1); y del mosaico del *Arabis* (sArMV).

El motivo catalítico de la ribozima *hairpin* consta de cuatro brazos (nombrados de A a D) que parten de la misma unión y están dispuestos coaxialmente A con D y B con C, y paralelos A con B y C con D (136-137) (Fig. 8A). El apilamiento de hélices está facilitado por cationes metálicos divalentes no implicados en la catálisis (138-140). Los brazos A y B tienen cada uno un lazo interno, localizándose el centro activo en la hendidura entre ambos lazos, y produciéndose el corte en el lazo del brazo A. El dominio catalítico mínimo

prescinde de los brazos C y D (132-133) (Fig. 8B), si bien requiere más magnesio para conseguir el plegamiento óptimo (141-142).

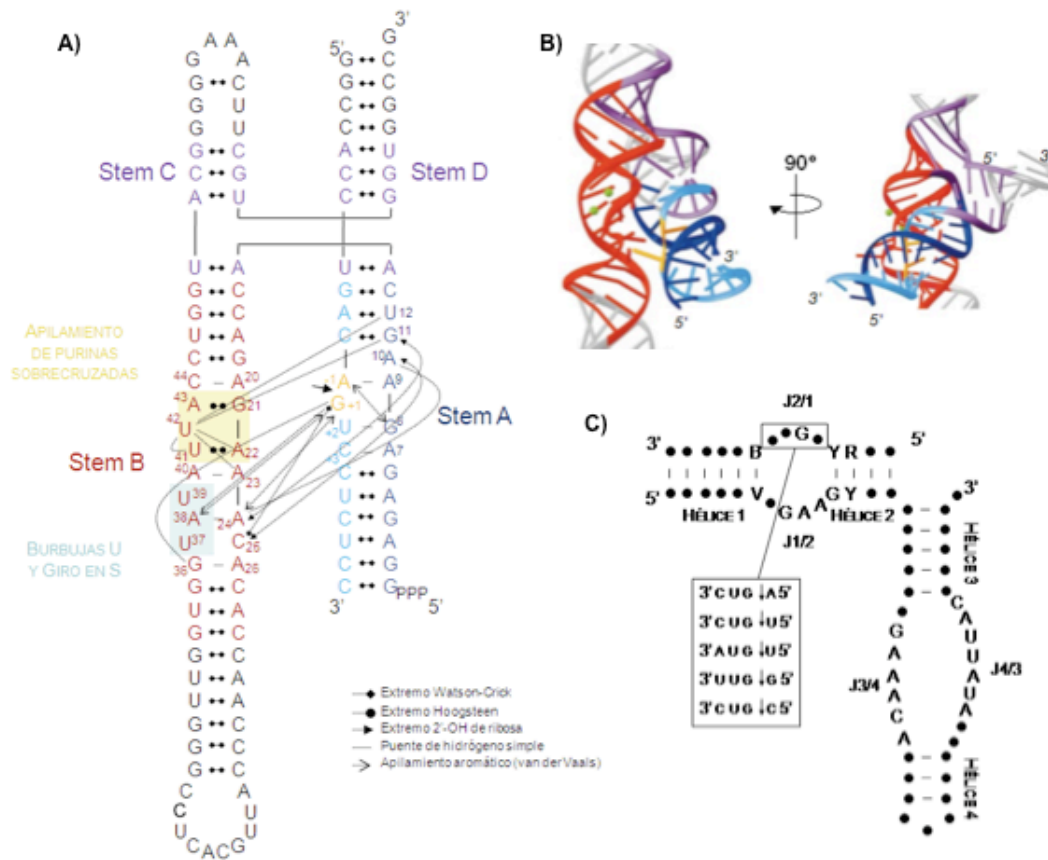


Figura 8. Estructura secundaria y terciaria de la ribozima tipo *hairpin* y su dominio catalítico mínimo (adaptado de (152) y (133)). En A) se muestra la estructura secundaria de la ribozima completa, donde se describen los cuatro brazos (A a D) alineados de dos en dos y apilados de forma paralela. Los brazos A y B disponen de sendos lazos internos entre cuyos nucleótidos se describen diferentes interacciones intra- e interdependientes indicadas mediante el código de signos. Sombreado en amarillo se marcan los nucleótidos implicados en un apilamiento aromático de purinas y sombreado en azul las burbujas mononucleotídicas de uridina que ocasionan un giro en S del esqueleto azúcar-fosfato. En código de color se representan las diferentes fracciones de la molécula utilizada para obtención de la estructura cristalina. La flecha indica el punto de corte (152). En B) se muestran dos vistas de la estructura terciaria de la ribozima *hairpin*. El código de color se corresponde con el usado en A). Las esferas verdes indican iones Ca²⁺ y en gris se marcan regiones prescindibles (152). En C) se representa el dominio catalítico mínimo y los requerimientos de secuencia y estructura secundaria del mismo, así como la nomenclatura para las hélices y las zonas de cadena sencilla. Los círculos negros representan posiciones en las que no es requerido ningún nucleótido concreto siempre que se mantenga la estructura secundaria. El código de letras responde a: B para C, G o U; V para A, C o G; Y para C o U; y R para A o G. En el recuadro se describen las secuencias para la tétada J2/1 obtenidas por mutagénesis, manteniendo fijada la G en 3' del punto de corte, con las que se consigue un procesamiento más eficiente (147).

Estudios de mutación, delección y selección molecular han establecido los requerimientos mínimos de secuencia, de estructura secundaria y la posibilidad de corte de la ribozima en *trans* reconstituyendo el motivo catalítico mediante dos

moléculas de RNA tal como se muestra en la figura 8C (115,136-137,143-146). La mayoría de los residuos esenciales se localizan en regiones de cadena sencilla, si bien existen tres apareamientos esenciales: V₆-B, G₁₁-Y e Y₁₂-R (145) (Fig. 8C).

Experimentos de corte *in vitro* de múltiples variantes manteniendo invariable la G en posición +1 respecto al punto de corte demostraron que la región de cadena sencilla donde éste se produce muestra un sesgo preferencial por las secuencias 3'-CUG*A-5', 3'-CUG*A-5', 3'-CUG*A-5', 3'-CUG*A-5' Y 3'-CUG*A-5' (147) (el asterisco marca el punto de corte). No obstante, esta G que aparece conservada (146) establece un apareamiento Watson-Crick con la C₂₅ que hace que sean intercambiables (148). Además, la selección molecular prueba que los desapareamientos en las hélices tienen menor efecto deletéreo cuanto más retirados estén del lazo interno donde ocurre el corte, mientras que la sustitución U₃₉C o la estabilización de la hélice distal del brazo B (hélice 4 en figura 8C) mejoran la actividad catalítica (145,149-151).

La estructura cristalina de la ribozima en el estado de transición durante la catálisis reveló múltiples interacciones no canónicas que tienen lugar entre los nucleótidos de los lazos internos y sus proximidades tanto en el brazo A, en el brazo B y entre ambos (152). Estas interacciones, algunas de las cuales habían sido descritas con anterioridad mediante aproximaciones bioquímicas, se resumen en la figura 8A (153-156). Los nucleótidos anterior y posterior adquieren la torsión necesaria para que tenga lugar el ataque “en línea” mediante un apilamiento aromático de G₊₁ con las bases A₃₈ y A₂₆, un puente de hidrógeno entre su nitrógeno 7 y el grupo 2'-hidroxilo de A₃₈, y otros dos más con G₃₆; y un apilamiento aromático de A₋₁ sobre G₈ y un puente de hidrógeno con A₉. Ensayos bioquímicos proponían a la propia G₈ como activador del grupo nucleofílico (157) y A₃₈ como responsable de la protonación del oxianión saliente (145,158). La estructura cristalina lo confirma, pues revela que el nitrógeno 1 de G₈ y el nitrógeno 1 de A₃₈ se encuentran a distancia de puente de hidrógeno del 2'-hidroxilo atacante y el oxígeno saliente respectivamente (152). Y de nuevo G₈ y A₃₈, junto con A₉, serían responsables de estabilizar el estado de transición fosfato pentavalente mediante puentes de hidrógeno con sus grupos amino exocíclicos (152,159). Un esquema de estas interacciones durante la catálisis se muestra en la figura 9.

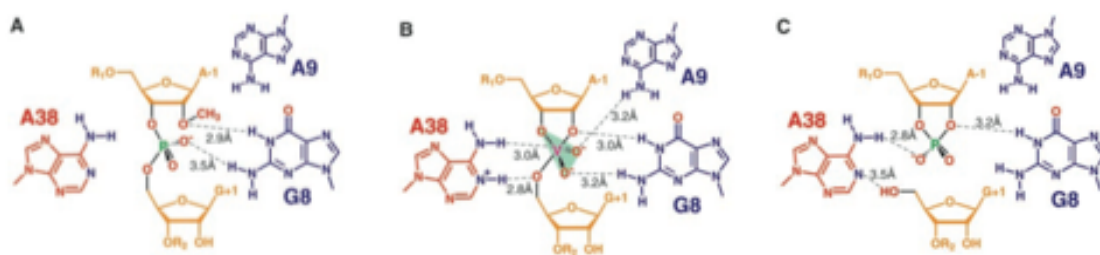


Figura 9. Modelo de catálisis mediada por la ribozima *hairpin* (160).

I.3. RNAs FUNCIONALES NO CATALÍTICOS.

Al igual que RNAs catalíticas, existen varios ejemplos de tipos de RNAs funcionales no catalíticas, dos de los cuales resultan relevantes para esta tesis: *riboswitches* y RNAs *antisense* naturales. Hay que destacar que la función de estas moléculas implica, a menudo, la interacción con otras moléculas de RNA frecuentemente mediada por apareamiento de bases. Por tanto, la discriminación de apareamiento entre las bases que era esencial para los procesos replicativos y no tanto para los catalíticos, adquiere aquí un papel directo en la funcionalidad de la molécula. No obstante, no hay que olvidar que el apareamiento de bases tiene una relevancia intrínseca para cualquier RNA catalítico o no en cuanto afecta al plegamiento adecuado del mismo.

I.3.1. RIBOSWITCHES.

Los *riboswitches* son dominios de RNA que regulan la expresión génica en respuesta a cambios en la concentración de un determinado metabolito. Se encuentran localizados en las regiones no traducibles en 5' de los mensajeros celulares y han sido descritos en todos los dominios de la vida (161-162). El funcionamiento del *riboswitch* se basa en que la unión específica del metabolito al mismo ocasiona un cambio conformacional que es responsable de la modificación de la expresión génica. Esta regulación de la expresión génica puede ocurrir (i) por la formación o eliminación de una estructura de terminación de la elongación, (ii) por el secuestro o exposición de la secuencia de unión del ribosoma (secuencias Shine-Dalgarno o Kozak) o (iii) por la exposición o no de motivos de corte de

RNAsas celulares, afectando en cada caso a la transcripción, la traducción o la estabilidad del mensajero.

Los dos procesos clave, por tanto, para el funcionamiento del *riboswitch* son la unión y la regulación de la expresión (163), y para ello los *riboswitches* suelen tener dos módulos diferenciados: aptámero y plataforma de expresión. El primero es responsable de la unión específica del ligando, mientras que el segundo lo es de modular los cambios en la expresión génica. No obstante, esta diferenciación en módulos no ocurre en todos los casos (Fig. 10)(164). La función del *riboswitch* depende, por tanto, de los parámetros bioquímicos y cinéticos de la unión del ligando y la inducción del cambio conformacional, en equilibrio con la unión del ribosoma o la polimerasa y la velocidad de éstos para superar el *riboswitch* antes de que ejerza su control (165-167).

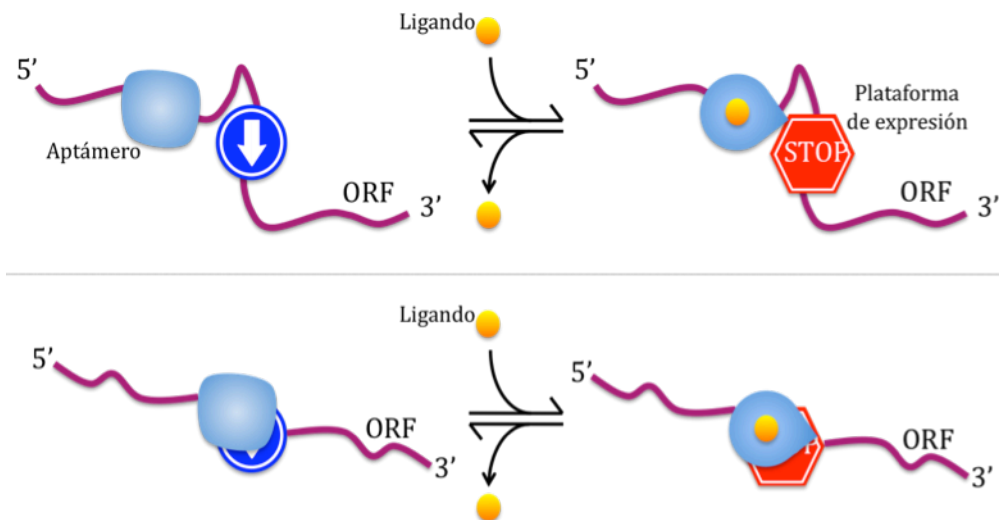


Figura 10. Esquema de *riboswitch*. En la parte superior se representa un *riboswitch* convencional con dominios aptamero y plataforma de expresión diferenciados. En la parte inferior se representa un *riboswitch* no convencional en el que no se diferencian dichos dominios.

La definición inicial de *riboswitch* implica su sensibilidad a la concentración de un metabolito químico. No obstante, se han descrito motivos similares a *riboswitches* que son sensibles a cambios de temperatura (168) o a metabolitos más complejos como RNAs *antisense*, microRNAs (169) o tRNAs (168,170-171). Incluso el término *riboswitch* ha sido aplicado a dominios de RNA con capacidad para plegarse en diferentes conformaciones excluyentes y con funciones distintas sin que ningún ligando medie entre ellos, como es el caso de la región 5' no traducible del RNA del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (172). Finalmente, la

implicación de un cambio conformacional en el funcionamiento del *riboswitch* excluiría a la ribozima GlnS, que fue inicialmente descrita como tal, pues la glucosamina-6-fosfato actúa más como cofactor que como ligando (77,88-90).

I.3.2. RNAs *ANTISENSE* NATURALES.

Los RNAs *antisense* naturales son moléculas de RNA generalmente no traducibles que complementan con un RNA diana y que ejercen como reguladores de la expresión génica mediante la interacción con éste. Fueron inicialmente descritos en bacterias, si bien ya existen ejemplos en todo el espectro de los seres vivos. Existen RNAs *antisense* naturales que son transcritos en la hebra complementaria del RNA diana, mientras que otros son transcritos en regiones distales del genoma. Así, se denominan respectivamente RNAs *antisense* en *cis* o en *trans*. La región solapante de la pareja de RNAs en *cis* es perfectamente complementaria, mientras que en el caso de RNAs en *trans*, solo es parcialmente complementaria y está sujeta a mutaciones divergentes.

Los RNAs *antisense* bacterianos suelen estar preferentemente asociados a fenómenos de regulación de elementos génicos accesorios del tipo control del número de copias de plásmidos, lisogenia o lisis en fagos y movilidad de transposones. Estos RNAs suelen ser de corta longitud (50 a 150 nt) y formar estructuras secundarias y terciarias concisas definidas por diferentes hélices y horquillas. El control que ejercen se efectúa principalmente sobre la expresión génica de algún gen clave del proceso regulado, exponiendo u ocultando diferentes señales reguladoras en el mRNA diana mediante cambios conformacionales inducidos por la interacción entre ambos (revisado en (173) y (174)). Se han descrito alteraciones en la estructura de la región Shine-Dalgarno y el AUG de inicio; generación o eliminación de señales prematuras de terminación de la transcripción; generación de señales de corte para RNasas celulares; e incluso controlando la generación de un cebador para la reversotranscripción de los elementos móviles. Los mecanismos son casi tan variados como el número de RNAs *antisense* descritos, siendo más complejo en el caso de RNAs de función en *trans*, que pueden tener efectos pleiotrópicos sobre diferentes genes.

Los RNAs *antisense* bacterianos, salvo muy pocas excepciones, son capaces autónomamente de discriminar su diana, unírsele y provocar el cambio conformacional responsable de los efectos reguladores. Los RNAs *antisense* eucarióticos, también generados en *trans* y en *cis*, suelen presentar una complejidad funcional que los aleja de este carácter autónomo (175-176). Aunque se han descrito alteraciones en la transcripción, el *splicing* o el transporte al citoplasma, mediados por RNAs *antisense*, generalmente la regulación que ejercen suelen implicar reorganizaciones genómicas, alteraciones de la cromatina, impronta génica, inactivación del cromosoma X o edición de RNA. Igualmente, miRNAs y siRNAs podrían considerarse RNAs *antisense* en *trans* y *cis* respectivamente, si bien su mecanismo de acción es totalmente diferente.

Los RNAs *antisense* bacterianos y sus dianas suelen adoptar estructuras de tipo horquilla con diferentes lazos internos y burbujas. Los lazos apicales de estas horquillas suelen tener entre 5 y 7 nucleótidos desapareados, con un motivo de secuencia tipo YUNR y un motivo estructural de giro en U (177) (Fig. 11). Los nucleótidos expuestos en lazos apicales u otras regiones de cadena sencilla suelen ser complementarios y en esto se basa la especificidad de la primera interacción entre ambos, pues al empaquetar toda su secuencia en hélices evitan posibles interacciones improductivas con otros RNAs, facilitando la especificidad de la unión al exponer un set concreto de nucleótidos. El giro en U del lazo apical consiste en un giro particular del esqueleto azúcar-fosfato que expone las bases en 3' de la uridina del motivo YUNR hacia el solvente y que está sustentado por varias interacciones nucleotídicas no canónicas (Fig. 11). La exposición de estos nucleótidos facilita cualquier tipo de interacción por complementariedad y evita la repulsión que generarían las cargas negativas, fomentando así la afinidad de la interacción. A esto también contribuye el hecho de que, tras la unión, la interacción se extiende progresivamente al resto de ambas moléculas gracias a que las secuencias de las hélices flanqueantes son mutuamente complementarias.

Esta progresión de la interacción entre el RNA *antisense* y su diana puede darse según dos modelos: de dos y de un paso. El modelo de dos pasos es el más complejo y se da en los pares RNAI/RNAII y CopA/CopT que controlan el número de copias de los plásmidos ColE1 y R1 respectivamente (181-182). La unión comienza con una primera interacción reversible entre sendos lazos apicales en

ambos RNAs (*kissing loop*) y es seguida de una extensión hacia los nucleótidos de las hélices flanqueantes (183-186). No obstante, el enrollamiento de las hebras de estas hélices supone una acumulación en la tensión de las mismas conforme progresa la interacción, frenándola antes de que complete la longitud las dos hebras. Para evitar que la interacción revierta se produce una segunda interacción entre regiones distales y complementarias de ambas moléculas, concluyendo con la formación de un complejo con tres hélices intermoleculares y dos intramoleculares (Fig. 12A).

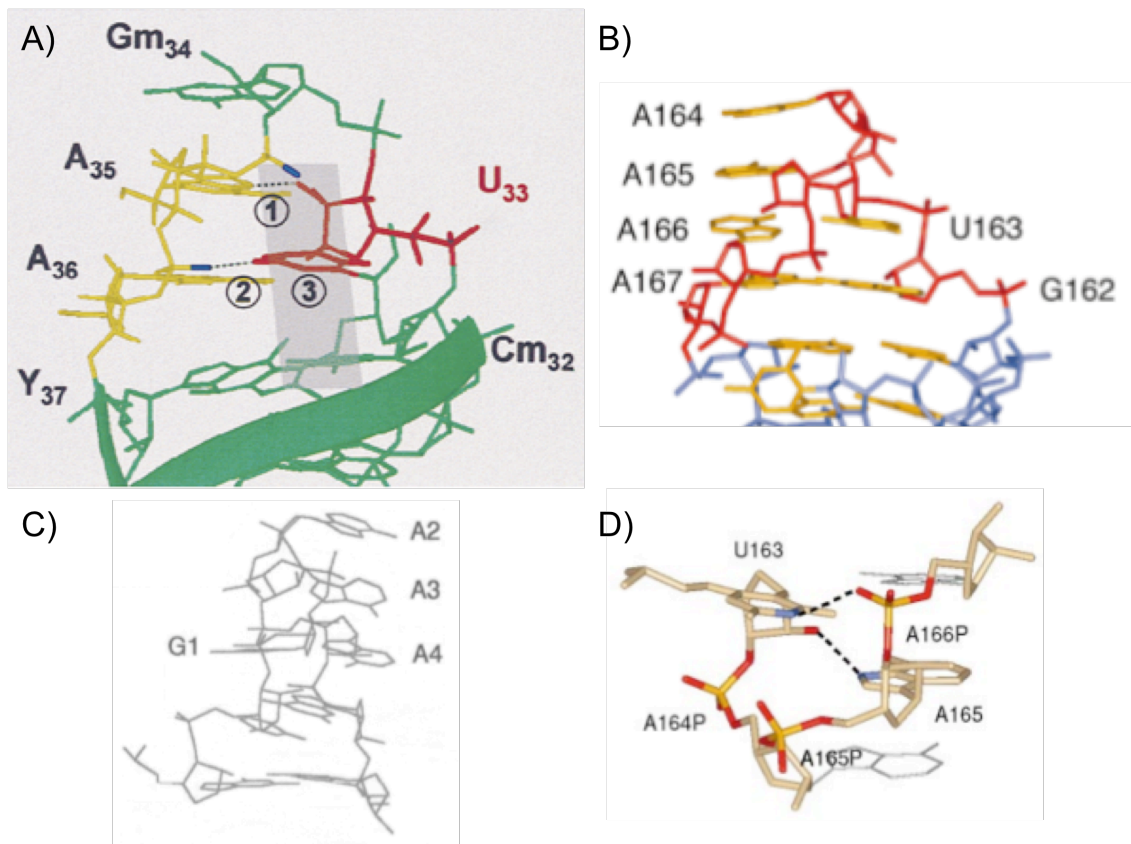


Figura 11. Motivo estructural giro en U (*U-turn*). En (A) se muestra la estructura tridimensional obtenida por cristalografía de rayos X del lazo anticodón del tRNA^{Phe} de levaduras (178). (1) marca el puente de hidrógeno formado por el 2'-hidroxilo de U₃₃ y el nitrógeno 7 de A₃₅ y (2) el formado por nitrógeno 3 de U₃₃ y el fosfato de A₃₆; (3) marca el apilamiento aromático de 2'-O-metilC₃₂, U₃₃ y el fosfato-35 dentro del área sombreada. Los átomos de oxígeno de los grupos fosfato implicados en las interacciones no canónicas se marcan en azul. En (B) se muestra la estructura tridimensional del lazo-A de VIH-1 (179). El esqueleto azúcar fosfato del giro-U se muestra en rojo, el de la hélice en azul y las nucleobases en amarillo. En (C) se muestra la estructura tridimensional obtenida por resonancia magnética nuclear (NMR) del lazo apical de cuatro nucleótidos con el motivo GNRA (180). Nótese que G₁ y A₄ forman un apareamiento *sheared*. En (D) se muestran los puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura de giro en U mostrada en (B) (Nitrógeno 3 U₁₆₃ con el oxígeno del fosfato de A₁₆₅; 2'-hidroxilo de U₁₆₃ con el nitrógeno 7 de A₁₆₅). Nótese que G₁₆₂:A₁₆₇ establecen un apareamiento *sheared* y A₁₆₄, A₁₆₅ y A₁₆₆ apilan aromáticamente (179).

El modelo en un paso se describe en el par *hok/sok* que controla la muerte por pérdida post-segregacional del plásmido R1 en *Escherichia coli* y el par RNA-IN/RNA-OUT que controla la movilidad del transposón Tn10 (187-189). La primera interacción ocurre entre el lazo apical de una molécula y una región en cadena sencilla del extremo 5' de la otra. La progresión de la interacción ocurre en una única dirección en cada molécula, de modo que se produce un cambio de hebra total sin que se acumulen tensiones, formándose un complejo con una única hélice intermolecular (Fig. 12B). En ambos modelos, los desapareamientos puntuales en las horquillas de ambas moléculas facilitan el cambio de cadena, pues el apareamiento perfecto entre ambos RNAs es termodinámicamente más favorable.

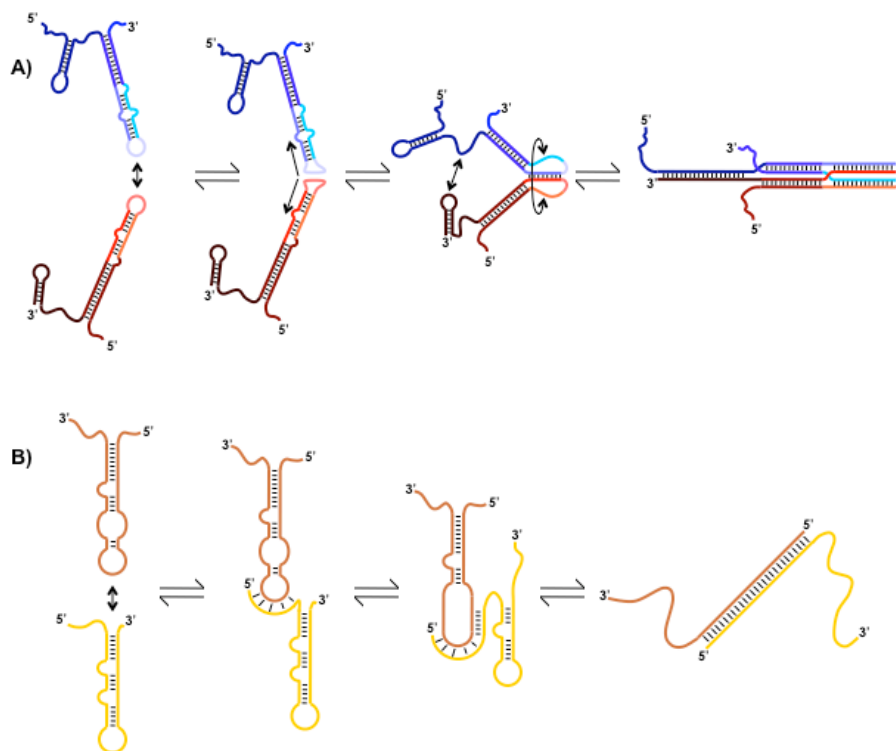


Figura 12. Modelos de interacción de RNAs *antisense* naturales (adaptado de (190) y (187)). En (A) se muestra la interacción entre CopA (rojo) y CopT (azul) según el modelo de dos pasos. Con los códigos de colores se puede seguir la transferencia de cadenas separadas en el tiempo. En (B) se muestra la interacción entre *hok* (marrón) y *sok* (amarillo) por el modelo en un paso.

I.4. INGENIERÍA DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Las diferentes propiedades del RNA y su rol central en el metabolismo de los seres vivos ha supuesto la base para su desarrollo como herramienta

terapéutica para el tratamiento de enfermedades. La selección molecular *in vitro* permite generar moléculas de RNA no naturales dotadas de funciones concretas y cuya aplicación terapéutica ya se está poniendo en práctica. Sin embargo, existe también toda una vertiente de investigación para la utilización y modificación de RNAs naturales con el objetivo de explotar su funcionalidad endógena. La aplicabilidad terapéutica en ambos casos es una de las vertientes principales de estudio.

I.4.1. SELECCIÓN MOLECULAR *IN VITRO*.

La selección molecular *in vitro* es una técnica que permite obtener ácidos nucleicos funcionales mediante su rescate desde una población de moléculas de secuencia aleatoria. Las moléculas de ácido nucleico funcionales generadas hasta la fecha pueden agruparse en ácidos nucleicos catalíticos o en aptámeros en base a si su funcionalidad es catalítica o de unión. En analogía con las moléculas de RNA catalíticas o ribozimas, las moléculas de DNA catalíticas se denominan deoxirribozimas o DNAzimas (*DNAzymes*). Los ligandos de RNA o DNA generados artificialmente se denominan aptámeros (del latín *aptus*, apto, y del griego *meros*, unidad), si bien en la naturaleza también se pueden encontrar aptámeros como los ya descritos que forman parte de los *riboswitches*. Finalmente, las técnicas de selección molecular *in vitro* para la obtención de aptámeros se denominan genéricamente evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial o SELEX por sus siglas en inglés (191).

La tecnología de la selección molecular *in vitro* se basa en reducir una amplia población inicial de moléculas de secuencia aleatoria a unas pocas moléculas que presenten intrínsecamente la habilidad seleccionada por el proceso selectivo. La ventaja principal radica en que con poca longitud de secuencia se consigue una elevada cantidad de variantes, aumentando la posibilidad de encontrar moléculas aptas para cualquier requerimiento en la población inicial (*e.g.* 25 nt aleatorios suponen más de 10^{14} moléculas diferentes). Cada técnica selectiva depende en gran medida de la creatividad del investigador y de la cualidad que se desea seleccionar, si bien de forma general el procedimiento consta de varios pasos como son la preparación de la población; la aplicación del

paso selectivo; la partición de la población en moléculas aptas y moléculas no aptas; el rescate de las primeras; su reamplificación; y su acondicionamiento para la siguiente ronda. Además de esto, pueden incluirse pasos de selección negativa para optimizar la eliminación de moléculas no aptas; aumentarse la presión selectiva del proceso a lo largo de las rondas para superar la desventaja numérica inicial de las moléculas aptas; o incluirse amplificaciones previas para eliminar moléculas defectivas en el proceso de amplificación o productos sintéticos truncados.

Las poblaciones iniciales de DNA pueden generarse fácilmente por síntesis química, mientras que las de RNA pueden, además, ser transcritas usando como molde las anteriores. Generalmente se incluyen secuencias constantes flanqueando la región de secuencia aleatoria para ser utilizadas como zonas de hibridación de cebadores en los procesos de reamplificación, aunque ya se han desarrollado técnicas para prescindir de ellas (192-193). Frecuentemente, de las selecciones sobre poblaciones aleatorias de moléculas de gran longitud se obtienen productos truncados igualmente efectivos, lo que revela que pocos nucleótidos (≈ 15) bastan para albergar motivos funcionales (194-195), con la ventaja de que para posibles aplicaciones futuras moléculas de corta longitud serán preferibles en cuanto a aspectos logísticos y económicos. Así, tradicionalmente suelen utilizarse longitudes de 20 a 90 nt, si bien longitudes mayores facilitan uniones más extensas en caso de aptámeros y obtener estructuras catalíticas más complejas y eficientes en el caso de ribozimas (196-197). La inclusión de dominios funcionales conocidos dentro de la región variable también puede facilitar la generación de estructuras complejas, a perfilar la actividad de una ribozima preexistente o a generar moléculas con actividad alterable a voluntad del investigador (198-203).

El paso selectivo debe diseñarse de manera que se genere una segregación efectiva de las moléculas capaces de superarlo. En el caso de los aptámeros, la adhesión a la diana inmovilizada suele ser utilizada para ello, mientras que en el caso de los ácidos nucleicos catalíticos, la reacción química debe provocar el establecimiento o ruptura de enlaces covalentes entre catalizador y algún substrato inmovilizado (algunos ejemplos se muestran en la tabla 2). La recuperación de las moléculas deseadas es un procedimiento igualmente variable que va desde su elución por choque térmico (204), por agentes desnaturalizantes

(205-207), por competidores (208-209) o por combinaciones de éstos (210). Incluso en ocasiones se practica la reamplificación directa de las moléculas (211-213). En cualquier caso, la amplificación puede realizarse directamente por PCR en el caso de moléculas de DNA, para lo cual luego hay que seleccionar expresamente la hebra deseada (214), o mediante retrotranscripción, PCR y transcripción en el caso de moléculas de RNA.

TÉCNICA	REFERENCIAS
Columna de sefarosa o agarosa	(211,215-216)
Bolitas magnéticas	(204,217-219)
Ultrafiltración con filtros de nitrocelulosa	(191,205,220)
Electroforesis capilar	(221-223)
Citometría de flujo	(224-225)
<i>EMSA</i>	(226)
<i>SPR</i>	(227)
Centrifugación	(228-229)
Captura de proteínas etiquetadas por columna	(230-231)
Adsorción selectiva de proteínas a resinas	(232)

Tabla 2. Estrategias de partición de la población en Selección Molecular *in vitro* (233).

I.4.1.1. APTÁMEROS.

Los aptámeros son oligómeros ácidos nucleicos de cadena sencilla capaces de unirse eficientemente a una diana concreta. El primer aptámero de RNA artificial fue diseñado en 1990 (191,234) y el primero de DNA lo fue en 1992 (235). Con posterioridad se han diseñado aptámeros modificados químicamente (236) y nuevos aptámeros basados en moléculas sintéticas de naturaleza nucleica como los LNAs y los PNAs. Experimentalmente se ha probado la capacidad de síntesis de aptámeros contra dianas de muy diversa naturaleza (214), desde iones inorgánicos (237) a organismos completos (229), pasando por moléculas orgánicas elementales, ácidos nucleicos, proteínas y virus (238-241). La gama en cuanto a la naturaleza de interacciones aptámero-ligando es amplia, citando complementariedad estérica, interacciones aromáticas de las nucleobases, interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno (242-244). Además, cuando el ligando es otro ácido nucleico, suelen darse interacciones por complementariedad de bases entre regiones desapareadas de ambas moléculas (239,245-246), aunque

técnicamente puede darse cualquier tipo de interacción descrita entre ácidos nucleicos, como hélices triples, interacciones tipo *A-minor* y *A-wedge* (247-248).

La aplicabilidad de los aptámeros es múltiple, habiéndose desarrollado aptámeros terapéuticos para neutralizar o bloquear efectores biológicos clave localizados en RNAs virales, proteínas celulares endógenas (priónicas u oncológicas, por ejemplo) y virales (211,228,230,239-240,249-256), así como para dirigir agentes terapéuticos contra dianas concretas (257-258). Igualmente, otros aptámeros son utilizados como herramienta en biología molecular para detectar, seleccionar o procesar sus ligandos (259-262) y para el estudio de la interacción de factores celulares con ácidos nucleicos, obteniendo información acerca de sus requerimientos específicos y facilitando el rastreo de motivos de unión en los genomas y transcriptomas (191). Las principales ventajas de los aptámeros frente a los anticuerpos, sus análogos proteicos, son la independencia total de utilización de animales de experimentación para su obtención, la posibilidad de selección del aptámero en las mismas condiciones ambientales en las que será utilizado, la estabilidad química y la facilidad para su síntesis y para sucesivas renaturalizaciones posteriores.

Actualmente existe un aptámero aprobado para uso terapéutico contra la degeneración macular asociada a la edad (AMD) en Estados Unidos y la Unión Europea, que actúa sobre el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y recibe el nombre comercial de *Macugen* o *Pegaptanib*. Resulta efectivo para combatir el edema causante de la ceguera por diabetes de tipo II y revertir su neovascularización en estadíos tempranos (263-264). El aptámero de RNA REG-1 fue diseñado para unirse al factor de coagulación IXa y bloquear este proceso con el objetivo de tratar enfermedades vasculares cerebrales, cardíacas y periféricas (265). Además, se diseñó un RNA *antisense* inhibidor del mismo para controlar su efecto a voluntad (266). Ambos RNAs, aptámero e inhibidor, se encuentran en fase II de estudio clínico. Los aptámeros NOX-E36 (diseñado para inhibir la señalización que ocasiona nefropatías por infiltración celular derivadas de la diabetes tipo II), NOX-A12 (diseñado para inhibir vasculogénesis, crecimiento tumoral y metástasis por señalización por SDF-1) y Arc1905 (con efecto similares a *Pegaptanib*) se encuentran en fase I (revisado en (267)).

Estos RNAs terapéuticos tienen la desventaja principal de la baja estabilidad o persistencia *in vivo* debido a la ubicuidad de las RNAsas celulares. Las modificaciones químicas de los nucleótidos permiten hacer los extremos o los enlaces internos de las moléculas no procesables por las exo y endorribonucleasas, pero puede comprometer la actividad catalítica o la capacidad de unión de las mismas. Sin embargo, algunas moléculas han sido empíricamente mejoradas con modificaciones químicas, como es el caso del aptámero *Macugen*, que tiene la mayoría de sus residuos nucleotílicos sustituidos por variantes 2'-fluoropirimidina y 2'-O-metilpurinas, además de una deoxitimidina inversa en su extremo 3' y una unidad de polietilenglicol en su extremo 5' (251,268). Especialmente para la generación de moléculas modificadas por selección molecular *in vitro*, se han desarrollado alteraciones químicas de los nucleótidos, como las 2'-fluoropirimidinas, tolerables por las polimerasas comerciales (269), así como también se han conseguido ya polimerasas mutantes capaces de tolerar otro tipo de modificaciones (270).

1.4.1.2. RIBOZIMAS ARTIFICIALES.

La selección molecular *in vitro* ha permitido el diseño de catalizadores de RNA para una gran variedad de procesos bioquímicos, aunque suelen ser unas mil veces más lentas que los actuales biocatalizadores proteicos, las enzimas. No obstante, la selección molecular *in vitro*, entre otras técnicas, ha permitido determinar los requerimientos catalíticos mínimos de las ribozimas naturales (137,145) y explorar la posibilidad de su utilización en *trans* como agentes terapéuticos para la eliminación de RNAs celulares o virales específicos (211,271-272). En esta área, la principal ventaja de estas ribozimas frente a otras estrategias actuales como el RNA de interferencia radica en su funcionamiento autónomo, pues no requiere de maquinaria celular alguna para su función y esto limita los posibles efectos secundarios por saturación de recursos celulares (273).

Sin embargo, el diseño de ribozimas artificiales tiene también una alta trascendencia en las investigaciones científicas acerca del origen de la vida. La teoría de un mundo basado en el RNA como precursor del actual mundo con amplia participación de DNA y proteínas se sustenta en la existencia de fósiles de

RNA en el metabolismo fundamental de los organismos vivos y en el potencial del RNA para catalizar todas las reacciones necesarias para mantener un metabolismo basal. En este último punto entra en juego la selección molecular *in vitro*, pues la generación de ribozimas artificiales ha sido en sí misma prueba de ello (274). Una completa guía de cómo diseñar experimentos de selección *in vitro* de ácidos nucleicos catalíticos se muestra en (275) y una lista de actividades catalíticas mediadas por RNAs artificiales y que apoyaría la teoría del mundo RNA se muestra en (276).

Cabe destacar que la selección molecular *in vitro* combinada con técnicas de evolución molecular basadas en la ligación de fragmentos de secuencia aleatoria para conseguir ribozimas más complejas, han logrado aislar ribozimas con actividad RNA polimerasa, el cual sería un proceso clave para la sustentación del mundo RNA (197,277). También, por selección molecular se han conseguido variar las propiedades de ribozimas ya existentes, como por ejemplo, diseñando una ribozima *hairpin* que requiere una adenina exógena como cofactor para la catálisis (278).

I.4.2. INGENIERÍA CON RNAs NATURALES.

Hace tiempo que quedó claro que el papel del RNA no es sólo el mero portador de la información genética entre DNA y proteínas, y existe una amplia cantidad de RNAs naturales con funciones aplicables en terapéutica. La destrucción de mRNAs o genomas de RNA responsables de ciertas patologías es una aproximación para la que resultan útiles muchas de las ribozimas naturales, pues como ya se avanzó, la mayoría de ellas catalizan el corte de otras moléculas de RNA. En esta área, la utilización de RNAs de interferencia y microRNAs artificiales ha supuesto una revolución (279), pero el hecho de que su funcionamiento sea muy dependiente de la maquinaria celular supone una desventaja. Los RNAs de función autónoma superan este inconveniente y constituyen una alternativa interesante que se viene desarrollando desde antes del descubrimiento de la interferencia génica.

Las secuencias-guía externas (EGSs) constituyen una estrategia para conseguir que la RNasa P corte una molécula de RNA que no es sustrato natural de

la misma (280-281). Estas moléculas son pequeños oligonucleótidos artificiales diseñados para que al hibridar con un RNA diana se forme una estructura que mimetice los substratos de la RNasa P y ocasione el corte del RNA diana por esta última. Los requerimientos de estructura para corte en *trans* mediado por EGSs de la RNasa P de *Escherichia coli*, el RNA M1 y la RNasa P humana se muestran en la figura 13 (280-282), habiéndose obtenido resultados satisfactorios con esta técnica para la degradación de múltiples RNAs virales, incluyendo su aplicación en modelos murinos (283-287). El mismo principio de las EGSs también ha sido explorado para enmascarar o generar sitios de procesamiento de intrones, alterando el procesamiento de *splicing*, y mostrándose útil para el tratamiento de enfermedades genéticas que derivan de procesamientos aberrantes del RNA como la distrofia muscular de Duchenne o la β -talasemia (288-289). La introducción de RNAs catalíticos quiméricos con EGS es otra alternativa y está siendo explorada tanto para degradar RNAs virales o celulares usando el RNA M1 de la RNasa P de *Escherichia coli* (290-292), como para producir variantes aberrantes de *splicing* usando snRNAs que forman parte del *spliceosome* (293-295).

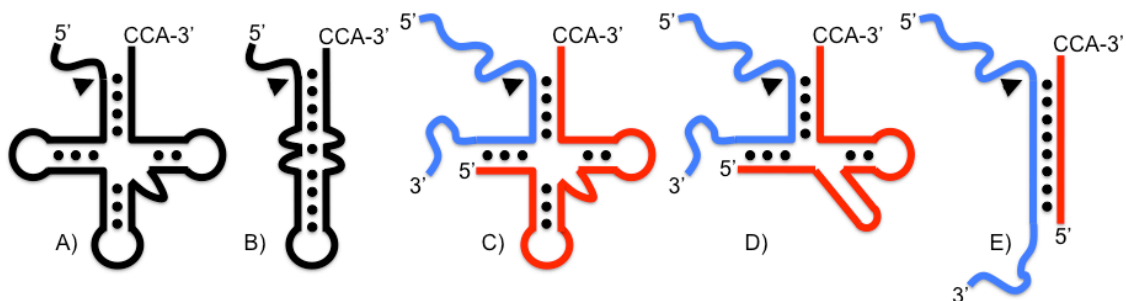


Figura 13. Esquema de los substratos procesados por la RNasa P. (A) representa el esquema de un pre-tRNA. (B) representa el esquema del RNA 4'5S de *Escherichia coli*. (C)(D)(E) representan los requisitos para las EGS (en rojo) y los substratos de corte (azul) necesarios para la RNasa P de *Escherichia coli* (C)(D)(E) y la RNasa P humana (C)(D) (296).

El *splicing* puede ser también alterado mediante la utilización de intrones autocatalíticos de tipo I o elementos del *spliceosome* modificados o guiados para respectivamente reconocer un mRNA diana y realizar *trans-splicing*. Exones de mRNAs celulares portadores de mutaciones patológicas han sido satisfactoriamente reemplazados por versiones no alteradas mediante intrones autocatalíticos de tipo I modificados (297-301) (Fig. 14A) e igualmente se ha

conseguido dirigir la inclusión de secuencias letales en mRNAs específicos, por ejemplo virales, para eliminar las células infectadas antes de que el virus se replique (302-303). Este mismo tipo de correcciones se han logrado utilizando RNAs portadores del exón corregido, una secuencia de interacción con el pre-mRNA mutante y señales específicas de *splicing* para que sea el *spliceosome* endógeno quien lleve a cabo el reemplazo por *trans-splicing* (298) (Fig. 14B). Existe también una línea de investigación, aunque menos avanzada, de la modificación los intrones autocatalíticos de tipo II para realizar *reverso-splicing* en zonas concretas del DNA e inactivar genes patológicos (304) o insertar transgenes (305).

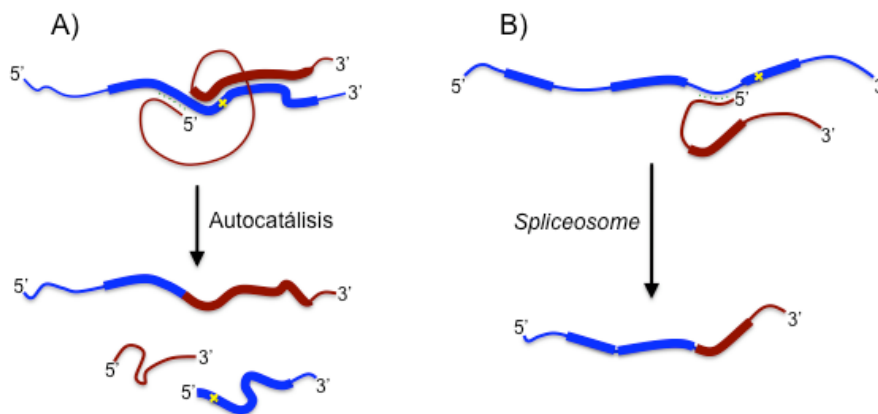


Figura 14. Esquema de estrategias de *trans-splicing* terapéutico mediado por ribozimas derivadas de intrones autocatalíticos de tipo I y por moléculas *pre-trans-splicing* como guía para el *spliceosome*. (A) *Trans-splicing* mediado por ribozimas derivadas del intrón autocatalítico de tipo I. En azul se representa el mRNA y en granate la ribozima correctora. Los segmentos más gruesos son regiones codificantes y la cruz amarilla muestra la mutación. (B) Esquema de corrección de mRNA (azul) mediada por *spliceosome* y PTM (granate). Los segmentos más gruesos representan las regiones codificantes y la cruz amarilla la mutación.

Otro tipo de patologías asociadas al *splicing* se dan por la presencia de mutaciones en regiones responsables de definir los extremos de los exones, produciéndose *splicing* aberrantes, o mutaciones que ocasionan la inclusión de secuencias intrónicas como nuevos exones. El snRNA U1 es responsable de identificar estas regiones y definir con precisión el punto de *splicing*, de manera que se ha utilizado como plataforma para, mediante la introducción de minigenes modificados de snRNAs U1 que aparean con las regiones mutadas, reproducir un correcto *splicing*. Se han obtenido resultados satisfactorios en modelos experimentales de retinitis pigmentosa, fibrosis quística, hemofilia B y atrofia

muscular espinal entre otros (306-307). El snRNA U7 se ha usado para dirigir la síntesis de RNAs que ocultan al *spliceosome* las zonas de reconocimiento de exones aberrantes como el que ocasiona la distrofia muscular de Duchene (308).

Finalmente, las ribozimas *hairpin* y *hammerhead* han sido ampliamente utilizadas como RNAs catalíticos de corte en *trans* para inactivar RNAs celulares diana. La técnica se basa en la reconstitución del motivo catalítico mínimo mediante la interacción de un RNA artificial y el RNA diana de tal manera que el punto de corte se localice en este último (117,309) (Fig. 15). El pequeño tamaño y los escasos requerimientos de secuencia de estas ribozimas permiten dirigir las virtualmente contra cualquier RNA diana. Varias ribozimas de este tipo están en fase clínica de estudio (310), si bien son destacables los fármacos *Angiozyme* (*Sirna Therapeutics Inc in Boulder, CO, USA*) y *Herzyme*. La primera se dirige contra el mensajero del receptor 1 del VEGF y previene la formación de vasos sanguíneos que nutren los tumores, aplicándose para el cáncer colorrectal metastásico (311-312). La segunda se dirige contra el receptor 2 del factor humano de crecimiento epidérmico (HER2/neu) y se encuentra en fase I de estudio clínico para el tratamiento del cáncer de mama y de ovario (313). En esta línea de trabajo, el diseño de ribozimas dirigidas contra los RNAs virales del virus de la hepatitis C (VHC) y el VIH-1 es una estrategia prometedora para el diseño de nuevos fármacos terapéuticos contra estas enfermedades actualmente cronificadas (211,271,314-317).

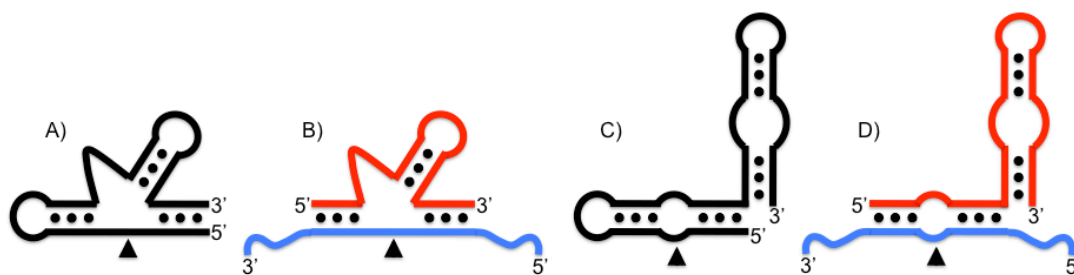


Figura 15. Esquema de los RNAs autocatalíticos *hammerhead* y *hairpin* y sus ribozimas diseñadas por ingeniería para corte en *trans*. (A) representa el RNA autocatalítico de tipo *hammerhead*. (B) representa el RNA *hammerhead* catalítico en *trans* (rojo) y su sustrato (azul). (C) representa el RNA autocatalítico de tipo *hairpin*. (D) representa el RNA *hairpin* catalítico en *trans* (rojo) y su sustrato (azul).

Es de destacar que ciertos RNAs terapéuticos han sido mejorados empíricamente mediante modificaciones químicas para aumentar su estabilidad *in*

vivo al igual que se describió anteriormente con el aptámero *Macugen*. Es el caso de las ribozimas *Angiozyme* y *Herzyme* entre otras, que tienen cuatro uniones tiofosfato y una ribosa inversa 3'-3'-deoxiabásica en uno de los brazos de reconocimiento de la diana.

Las ribozimas *hammerhead* y *hairpin* diseñadas para corte en *trans* tienen, además, la desventaja de que están limitadas por el paso de unión a la diana, la cual en su forma natural se encuentra dentro de su propia molécula. Una estrategia que ha dado buenos resultados para facilitar esta unión es la combinación de la ribozima con una molécula de RNA *antisense* o un aptámero que tengan su diana de unión en la misma molécula donde se encuentra la diana de la ribozima (211,271,314,318), dotando este segundo dominio a la molécula completa de las habilidades de unión de las que carece la ribozima. Esta misma técnica puede utilizarse para conferir propiedades adicionales al inhibidor, como la posibilidad de una regulación alostérica acoplado la unión de un ligando al aptámero o la región *antisense* con la adquisición o pérdida de funcionalidad de la ribozima de un modo similar a como ocurre con los *riboswitches* (319-325). Incluso, un innovador diseño ha conseguido acoplar un aptámero y una ribozima *hammerhead* para que la actividad de la segunda se regule por el metabolito del primero de un modo similar a como ocurre en los *riboswitches*, tanto para corte en *trans* (326) como en *cis* (327).

I.5. EL VIRUS TIPO 1 DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH-1).

Las propiedades de los diferentes RNAs funcionales artificiales y naturales, catalíticos o no, pueden ser aprovechadas mediante técnicas de ingeniería molecular para eliminar o inutilizar diferentes RNAs indeseables como mecanismo terapéutico frente a ciertas enfermedades. Los virus con genoma de RNA son, en esta línea, susceptibles de ser combatidos terapéuticamente mediante este tipo de estrategias. El trabajo de esta tesis se enmarca en utilizar ribozimas, aptámeros y RNAs *antisense* para intervenir directamente el genoma de RNA del Virus de la

Inmunodeficiencia Humana (VIH), un retrovirus con una fase con genoma de RNA dentro de su ciclo de vida.

El VIH es el agente causal del SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida). Se clasifica dentro del género *Lentivirus* en la familia *Retroviridae*, característica porque sus miembros presentan en su ciclo viral un paso de retrotranscripción que produce un flujo de información genética desde RNA hacia DNA. El material genético viral debe acceder al núcleo para integrarse en el genoma de la célula hospedadora y, mientras otros retrovirus aprovechan para ello la disolución de la membrana nuclear durante la división celular, los *Lentivirus* utilizan un transporte activo al núcleo que les posibilita, por tanto, infectar células quiescentes. El largo período de ventana y el lento curso de la infección característico del género es lo que les da nombre.

El VIH infecta principalmente células del sistema inmunitario tales como linfocitos T CD4⁺ y macrófagos, agotando los recursos de dicho sistema y provocando la deficiencia inmunitaria. El periodo de ventana desde la primoinfección hasta que se manifiestan los síntomas es variable y puede llegar a ser muy largo, reservándose el término SIDA para la fase más avanzada de la infección en la que se ha alcanzado el nivel de inmunodeficiencia.

El virus del SIDA fue descubierto simultáneamente por varios grupos entre 1983 y 1984 (328-332), recibiendo diferentes nombres hasta que se uniformó la nomenclatura y se secuenciaron sus genomas, confirmando que consistían en diferentes cepas del mismo virus (333). Hoy en día se conoce que hay dos tipos principales denominados VIH-1 y VIH-2. El tipo I presenta, además, tres grupos principales denominados M (principal, *major*), O (alternativo, *outlier*) y N (nuevo, *new*). Los grupos O y N son, al igual que el VIH-2, endemismos de Camerún y otros países limítrofes del África Occidental Ecuatorial (334). El grupo M del VIH-1 es el agente causal de la actual pandemia de SIDA (335) que, según datos de la Organización Mundial de la Salud, afecta a más de 33 millones de personas en el mundo entero y principalmente a las zonas más deprimidas como el África subsahariana, India, Indochina y Sudamérica.

Los estudios de secuenciación y filogenia de los diferentes tipos y cepas de VIH ha permitido relacionarlos evolutivamente con los virus de la inmunodeficiencia de otros simios (VIS) (336), revelando que el VIH proviene de

una zoonosis polifilética de manera que el tipo I provendría de VIS del chimpancé común (*Pantroglodites troglodites*) (337) y el VIH-2 del VIS del mangabeye fuliginoso (*Cercocebus atys atys*) (334).

I.5.1. BIOLOGÍA DEL VIH-1.

I.5.1.1. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN.

El virión de VIH-1 (Fig. 16) es icosadeltaédrico con un diámetro de unos 110 nm. Dispone de una envoltura externa constituida por una bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula de procedencia que adquiere cuando se desprende de ésta por gemación (*budding*). En esta envuelta se disponen las espículas virales constituidas por dos subunidades proteínicas: la glicoproteína transmembrana gp41 y la glicoproteína de superficie gp120 adherida no covalentemente a la anterior. Además, puede presentar eventualmente otras proteínas de membrana de la célula de procedencia (338-339).

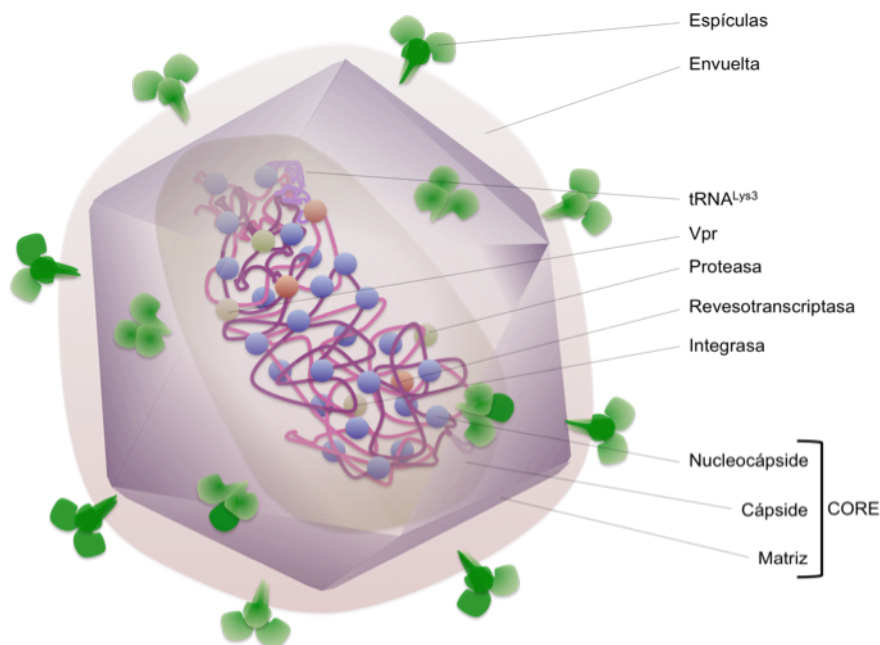


Figura 16. Estructura del virión de VIH-1.

Bajo la envuelta se dispone el *core* (núcleo del virus), una estructura compleja en la que se puede distinguir una matriz proteica amorfa constituida por

la proteína viral p17 donde se encuentra inmersa la cápside. Ésta consiste en un cono proteico producto del ensamblaje de la proteína viral p24 y que alberga dos moléculas de RNA genómico completo, ambas de cadena sencilla y de polaridad positiva, que se encuentran asociadas por sus extremos 5'. Estas dos moléculas de RNA se encuentran estrechamente asociadas a las proteínas p9 y p7, que constituyen la nucleocápside. Además, también dentro de la cápside se alojan moléculas de tRNA^{lys} de la célula de procedencia, así como proteínas virales retrotranscriptasa (p51/p66), proteasa (p11), integrasa (p32) y Vpr (p15).

I.5.1.2. ESTRUCTURA DEL GENOMA VIRAL.

El genoma de VIH-1 integrado en el DNA celular recibe el nombre de provirus (Fig. 37). La secuencia del provirus presenta dos repeticiones terminales largas y directas (LTRs) en sus extremos. En estas LTRs se distinguen tres subregiones, llamadas U3 (única en 3'), R (repetida) y U5 (única en 5'). La región U3 contiene el promotor del virus y, por tanto, no se transcribe en 5' y sólo se encuentra en el extremo 3' del RNA viral. La región R se repite en ambos extremos del RNA viral y comprende desde el nucleótido 454 al 550 del DNA proviral (+1 al +95 del mRNA). La región U5 está presente únicamente en el extremo 5' del RNA, pues se localiza por detrás de la señal de poliadenilación en la región 3' del DNA proviral. Esta disposición especial de las tres regiones se da como resultado del mecanismo de retrotranscripción (I.5.1.3).

En el genoma viral se distinguen tres marcos abiertos de lectura (ORF) principales denominados *gag*, *pol* y *env*, y que codifican para tres grandes proteínas virales precursoras. La proteólisis de estos precursores genera los productos génicos maduros cápside (CA), nucleocápside (NC) y matriz (MA) desde *gag*; las enzimas proteasa (PR), integrasa (IN) y reversotranscriptasa (RT) desde *pol*; y los componentes transmembrana (TM) y de superficie (SU) de las espículas desde *env*. Además, existen otros marcos abiertos de lectura menores que codifican para proteínas reguladoras o accesorias tales como Tat, Rev, Nef, Vpu, Vif y Vpr. Para la expresión de todos estos productos se requiere una combinación de procesos tales como *splicing* alternativo, *frame-shifting* (cambio del marco de lectura) y proteólisis (Fig. 17).

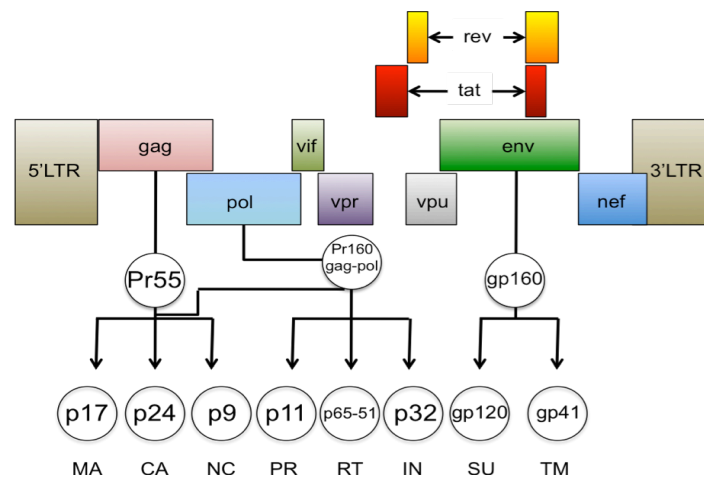


Figura 37. Estructura del virión de VIH-1. Los rectángulos muestran los marcos abiertos de lectura y las regiones repetidas terminales. Los círculos representan los productos proteicos. La nomenclatura de cada producto génico dentro del círculo se basa en el siguiente código binario alfanumérico: p, proteína; gp, glucoproteína; Pr, precursor; y el número indica el peso molecular en kDa. Debajo de cada círculo se abrevia el nombre de cada uno como: MA, proteína de la matriz; CA, proteína de la cápside; NC, proteína de la nucleocápside; PR, proteasa; RT, transcriptasa reversa; IN, integrasa; SU, proteína de superficie de la envuelta; y TM, proteína transmembrana de la envuelta.

I.5.1.3. CICLO VIRAL

Los ciclos virales se pueden dividir en las etapas de infección de la célula, replicación en su interior y salida o abandono de la misma. La infección de la célula tiene lugar por la unión de una proteína viral con un componente celular de superficie que actúa a modo de receptor. En el caso del VIH-1, la proteína gp120 de las espículas del virión interacciona con la proteína de membrana CD4 típica de linfocitos T ayudantes y macrófagos, que actúa como receptor principal. Un cambio conformacional en gp120 expone el sitio de interacción con un segundo receptor, esencial para la infección, y que puede ser el receptor de quimiocina CCR5 o el CXCR4. La unión al correceptor es específica de la cepa viral, R5 y X4 respectivamente, y promueve el cambio conformacional en la proteína gp41 de las espículas que conlleva la fusión de la envuelta viral con la membrana plasmática. Normalmente, por mutación, las cepas R5 derivan en X4, pasando de infectar macrófagos (principalmente portadores de CCR5) a linfocitos (portadores de CXCR4) y produciendo la inmunodeficiencia.

La replicación del virus comienza en el propio virión, donde se dan los primeros eventos de retrotranscripción utilizando el extremo 3' de una molécula

de tRNA^{Lys3} de la célula de procedencia como cebador. La fusión del virus y la nueva célula infectada es seguida de la decapsidación del material genético. El complejo proceso de retrotranscripción de estos virus se esquematiza en la figura 18 y concluye en el citoplasma celular. El DNA copia (cDNA) de doble cadena resultante es transportado al núcleo, donde puede permanecer como elemento episómico o integrarse en el DNA celular. Este último paso es catalizado por la integrasa viral que acompaña al material genético en el virión y parece mostrar preferencia por sitios activos de transcripción (340-341).

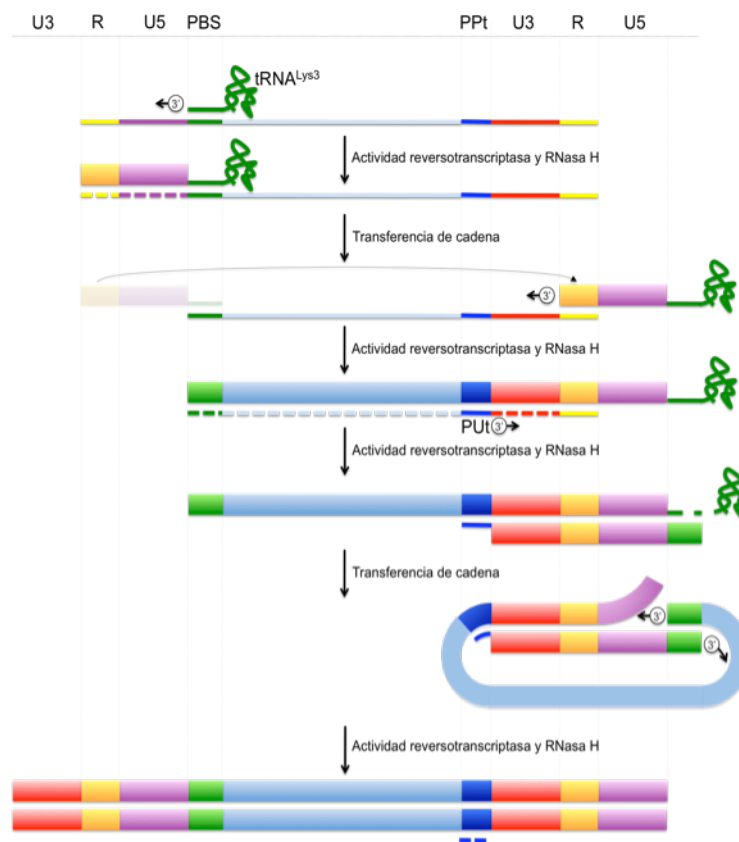


Figura 18. Esquema de la Retrotranscripción de VIH-1. Las líneas delgadas representan RNA y las anchas DNA. U3, Única en 3'; R, Repetición; U5, Única en 5'; PBS, sitio de unión del cebador; PPt, tramo de polipurina; PUt, tramo de poliuridina. Están indicados también los extremos 3' elongables (342).

El DNA proviral dispone de un promotor débil de polimerasa tipo II externo en su extremo 5' que transcribe el genoma completo desde el nucleótido 454. La población de RNA sufre *splicing* alternativo para generar diferentes especies virales subgenómicas que acomodan los distintos ORFs del virus a continuación de la región 5' no traducible portadora del extremo *cap* para poder ser traducidos (Fig. 19). Los mensajeros para traducción de las proteínas estructurales Gag, Pol y

Env portan una señal de retención nuclear RRE que los mantiene en el núcleo en la primera fase de expresión, siendo exportados y traducidos en el citoplasma los mensajeros totalmente procesados y que dirigirán la síntesis de las proteínas reguladoras como Tat, Rev, Nef y Vpr. Éstas acomodarán la célula para la replicación viral, en tanto que Tat será importada al núcleo para inducir fuertemente la transcripción y Rev para anular la señal RRE para dar paso a la expresión de los genes tardíos.

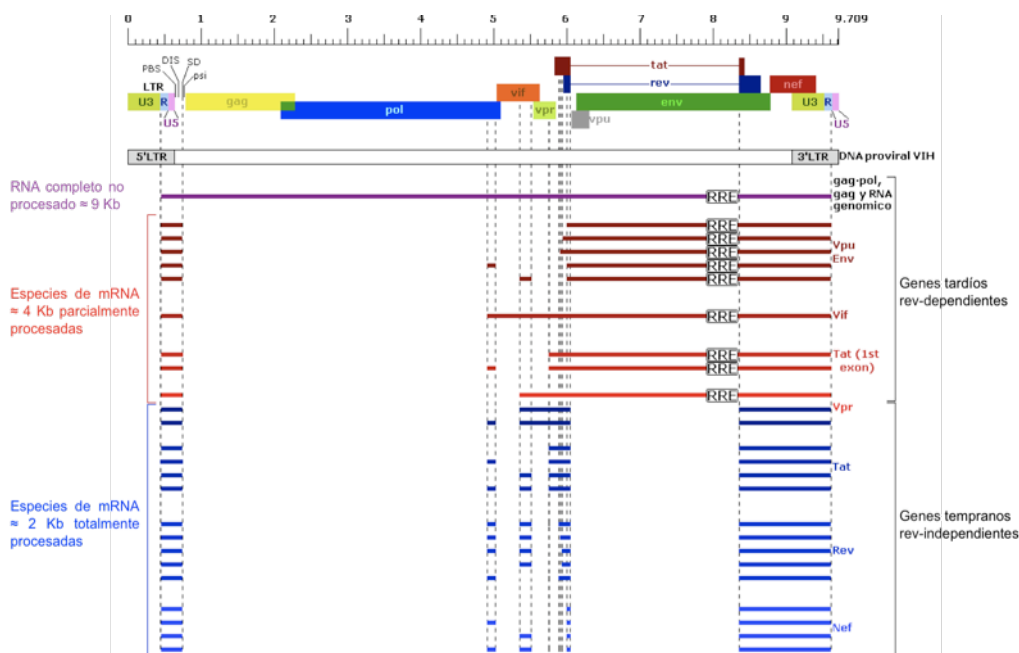


Figura 19. Productos de *splicing* alternativo de VIH-1. En código de colores se representan en la parte superior y a escala las diferentes regiones codificantes y los diferentes dominios de las regiones no traducibles. En línea simple se muestran las diferentes moléculas de RNA generadas por *splicing* alternativo (rojo y azul) de la molécula de RNA genómica (violeta). En tonos rojos se muestran las moléculas de RNA que servirán de molde para traducir los genes tardíos y en tonos azules las que lo harán para los genes tempranos.

Los RNAs no procesados sirven para dirigir la síntesis de la poliproteína Gag (Pr55) y, en muy poco nivel y mediante *frame-shifting* al final del ORF *gag*, la poliproteína de fusión Gag-Pol (Pr160). La poliproteína Env (gp160) se sintetiza traduciendo los mRNAs que han perdido los ORFs *gag* y *pol* por *splicing*. La maduración de estas poliproteínas por proteólisis y el empaquetamiento del virión son procesos acoplados, garantizando así la inclusión de las proteínas maduras de Pol en éste último. Cada virión contiene dos moléculas de RNA viral no procesado por *splicing*, estando las señales necesarias para la dimerización y

empaquetamiento específico de estas dos moléculas localizadas principalmente en la región 5' no traducible.

I.5.2. LA REGIÓN 5' NO TRADUCIBLE (5'UTR).

El extremo 5' de los RNAs virales de VIH-1 consta de una región no traducible portadora de elementos funcionales de RNA que resultan críticos en el ciclo viral. Estos elementos de RNA consisten en dominios de la molécula con una estructura particular y que participan en los procesos de transcripción, retrotranscripción, *splicing*, poliadenilación, dimerización, empaquetamiento y traducción. Todos estos elementos solapan espacialmente en la secuencia de la 5'UTR y presentan una serie de interacciones entre sí que conlleva a la existencia de un equilibrio entre dos conformeros mutuamente excluyentes. Estos dos conformeros se diferencian en el plegamiento global de la región, de modo que cada uno permite e impide respectivamente el correcto ensamblaje de algunos de los elementos funcionales referidos, siendo por tanto determinantes para el destino del RNA viral que los haya adoptado.

Estos dos plegamientos o conformeros se denominan LDI y BMH por sus siglas en Inglés, haciendo referencia a que el primero presenta dos grandes hélices que, aunque con cantidad de desapareamientos puntuales, están termodinámicamente muy favorecidas y el segundo presenta una estructura ramificada en pequeñas horquillas (Fig. 20) (343). Los elementos especialmente implicados en poliadenilación, dimerización y *splicing* se encuentran adecuadamente ensamblados en el conformero BMH y no en el LDI. Cada uno de los diferentes elementos funcionales será tratado con detenimiento a continuación en orden a como se encuentran desde el extremo 5' al extremo 3'.

La naturaleza de los elementos de RNA localizados en esta región y de las relaciones en que se basa su funcionalidad los hace idóneos para dirigir frente a ellos diferentes RNAs inhibidores como agentes terapéuticos. El hecho de que varios de ellos interactúen de forma natural con otros ácidos nucleicos, en ocasiones *antisense*, por medio de sus lazos apicales y que en otros casos sus lazos y burbujas sean responsables de la interacción con diferentes proteínas efectoras, los hace idóneos para inutilizarlos mediante aptámeros o RNAs *antisense*, o para potenciar

mediante éstas herramientas otras tales como ribozimas. A continuación se detallan los diferentes elementos funcionales residentes en la región 5'UTR y su papel en la fisiología viral.

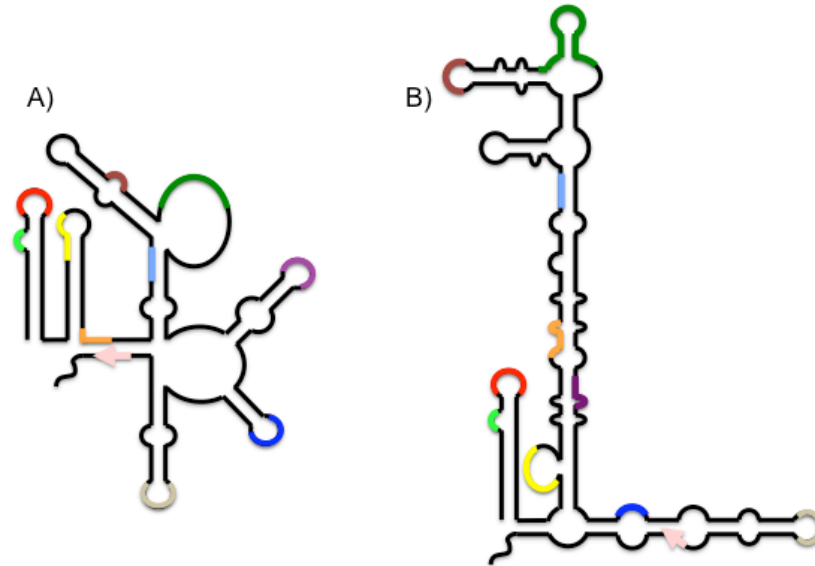


Figura 20. Confómeros de la 5'UTR del RNA genómico. (A) representa el plegamiento BMH y (B) el plegamiento LDI. En código de colores se representan los motivos de secuencia conservados expuestos en los dominios: burbuja TAR (verde claro), lazo TAR (rojo), hexámero de *Poly-A* (amarillo), elemento rico en GU de *Poly-A* (naranja), PAS (celeste), lazo-A (granate), PBS (verde oscuro), DIS (violeta), SD (azul) y ψ (beige). La flecha celeste indica la posición del codón de inicio del ORF *gag*.

I.5.2.1 ELEMENTO DE RESPUESTA A LA *TRANS*-ACTIVACIÓN (TAR).

El elemento TAR se localiza en los primeros 58 nucleótidos de la 5'UTR y consiste en una horquilla con dos nucleótidos desapareados e independientes y una burbuja trinucleotídica en la hebra 5' (Fig. 21A). La burbuja se localiza en posición proximal respecto al lazo apical y sus bases nitrogenadas se encuentran expuestas hacia el solvente gracias a la coordinación de un ión magnesio en su interior (344), lo que permite mantener la estructura para la interacción con el motivo de unión de Tat (345) (Fig. 21B). Por otro lado, la secuencia del lazo apical responde al motivo YUNR descrito en los RNAs *antisense* naturales y muestra una conformación dinámica (346) en la que C₃₀ y G₃₄ aparean al tiempo que se apilan sobre el par C₂₉G₃₆ que cierra el lazo, exponiéndose el resto de bases nitrogenadas al solvente (347) (Fig. 21C).

TAR se encuentra implicado en múltiples procesos de regulación, si bien la activación de la transcripción es el principal de ellos. La proteína viral Tat se une a TAR, para lo que es esencial la burbuja lateral trinucleotídica (348-349), y recluta el factor b positivo de elongación de la transcripción (p-TEFb; complejo de ciclina T1 y quinasa ciclina-dependiente 9 o cdk9), que hiperfosforila el dominio C-terminal de la RNA polimerasa II. Esto produce un incremento de la procesividad y estimula la elongación del RNA en *cis* (350-351). Pero más allá, en los estadios tempranos donde aún no se ha acumulado la proteína Tat, la transcripción del provirus es basal y solo los RNAs totalmente procesados se encuentran en el citoplasma, la unión de las primeras moléculas de Tat a estos RNAs estimula la traducción mediada por IRES (352) por encima de la *cap*-dependiente. De este modo, el virus consigue producir sus RNAs y acumular las proteínas reguladoras que luego permitirán la expresión de los genes tardíos.

TAR también es capaz de ocasionar cierta inhibición de la maquinaria celular de interferencia génica secuestrando uno de sus componentes: la proteína TRBP, descubierta y nombrada precisamente por su unión a TAR (353). Además, la unión de TRBP neutraliza la activación por TAR de la quinasa dependiente de RNA bicatenario (PKR), bloqueando sus efectos antivirales (354). Paralelamente, utilizando esta maquinaria, el virus es capaz de producir cambios en la cromatina donde inserta su cDNA, inhibir la apoptosis y modificar la expresión génica celular por medio de un miRNA generado como subproducto del procesamiento de TAR (355-356).

La similitud entre el lazo apical de TAR y el de los RNAs *antisense* naturales le habilita para interacciones similares a las de los RNAs *antisense*, lo cual ya ha sido proyectado como una posible intervención terapéutica (314,357). Sin embargo, parece que este diseño está seleccionado para que haya una interacción tipo RNA *antisense* natural entre el dominio de RNA TAR repetido en 3' con el dominio de cDNA TAR *antisense* sintetizado en 5' como mecanismo disparador de la primera transferencia de cadena molde que ocurre en el proceso de retrotranscripción (Fig. 18, segundo paso) (358-360). Finalmente, TAR también dispone de un *pseudo*-palíndromo que podría mediar una interacción TAR-TAR entre las dos moléculas empaquetadas en cada virion, constituyendo parte de la estructura de dimerización (Fig. 21D). La correcta disposición de la burbuja

trinucleotídica parece esencial para esta interacción dimerizante, que tiene lugar *in vitro* en presencia de la proteína de la nucleocápsida (361-362).

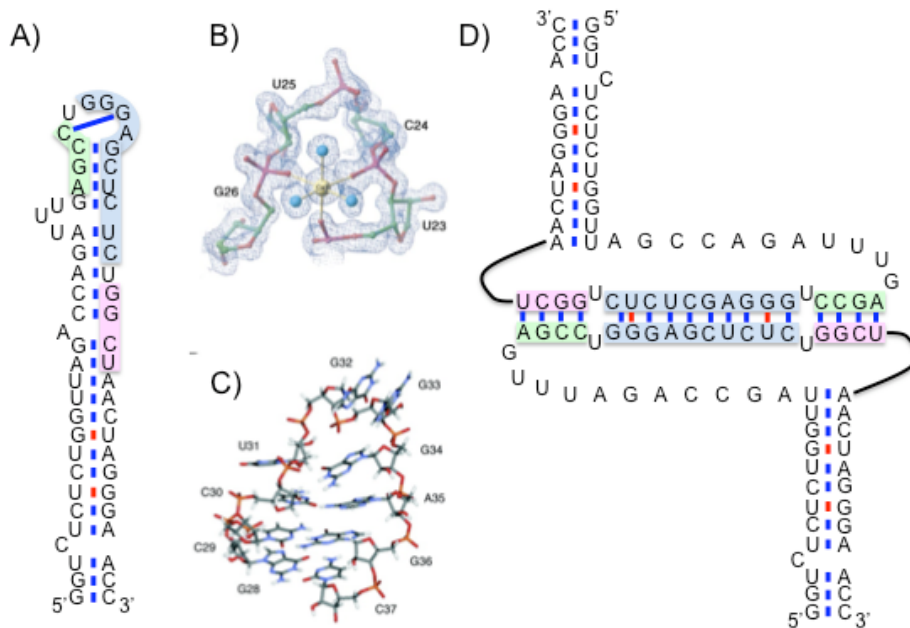


Figura 21. TAR RNA. (A) Modelo de estructura secundaria de TAR. La secuencia *pseudo*-palindrónica propuesta para la homodimerización de TAR se muestra en el mismo código de colores que en (D). (B) Coordinación de ión calcio (II) por la burbuja de TAR según mapa de densidad electrónica. La esfera amarilla representa el ión Ca^{2+} , las esferas azules representan tres moléculas de agua (344). (C) Modelo propuesto para la estructura del lazo apical de TAR (347). (D) Modelo propuesto para la interacción homodimérica de TAR (361).

I.5.2.2. ELEMENTO DE POLIADENILACIÓN (*POLY-A*).

El elemento *Poly-A* tiene una longitud de 47 nt y una estructura de horquilla con dos nucleótidos desapareados e independientes en la hebra 3' del tallo. Se encuentra inmediatamente tras el elemento TAR (nucleótidos 59 a 105), constituyendo ambos dos la región R repetida tanto en 5' como en 3' del mensajero de VIH-1, y es responsable de la poliadenilación de dicho mensajero en la repetición de 3'. Las señales de poliadenilación en humanos constan de un hexámero 5'-AAUAAA-3' entre 10 y 30 nt por encima del punto de corte y una región rica en U o GU inmediatamente después. En el elemento *Poly-A* el hexámero se localiza parcialmente expuesto en el lazo apical, mientras que hay varias regiones ricas en GU, tal vez como redundancia que asegure la poliadenilación, si bien parece que la que hay inmediatamente al final de la hebra 3' del tallo es la principal (363) (Fig. 22).

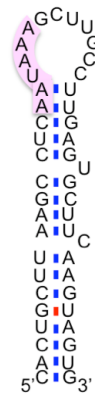


Figura 22. Modelo de plegamiento del elemento *Poly-A* (adaptado de (364)). El hexámero consenso determinado como señal de poliadenilación se encuentra sombreado en violeta.

El hecho de que tan solo el elemento *Poly-A* de 3' sea preferentemente procesado, en lugar del localizado en 5', parece deberse a las diferencias estructurales entre ambos debido al entorno en que se encuentran, aunque también puede achacarse a señales en la región U3 (ausente en la región 5' del RNA) o a la presencia de la maquinaria de inicio de la transcripción.

1.5.2.3. SITIO DE UNIÓN DEL CEBADOR (PBS).

El elemento encargado de reclutar el cebador de RNA necesario para iniciar la reversotranscripción se encuentra localizado entre los nucleótidos 113 y 244. Este RNA cebador es principalmente el tRNA 3 de la lisina (tRNA^{Lys3}, Fig 23A) no aminoacilado, que es empaquetado en el virión. El extremo 3' de este tRNA aparea perfectamente con una región de 18 nt dentro de este elemento y que es propiamente conocida como sitio de unión del cebador, nombre que se extiende a todo el elemento de RNA (PBS). El elemento PBS completo presenta dos posibilidades de plegamiento (343) (Fig. 23B) y contiene dos zonas adicionales que interactúan con el cebador: el lazo-A (365-367) y la secuencia activadora del cebador (PAS) (368) (Fig. 23B y C). De hecho, para poder cambiar artificialmente el cebador por otro tRNA, es necesario acomodar la tres zonas de interacción.

La unión del cebador recuerda al modelo en dos pasos descrito para los RNAs *antisense* naturales, pues consta de una interacción inicial de tipo *kissing loop* entre el anticodón del tRNA y el lazo-A (369), ambos con estructura de giro en U (179), que se extiende a la región PAS y finalmente a la sito de unión del cebador

(nucleótidos 244 a 278) con un lazo interno (lazo B) y un lazo apical en el que se expone un hexámero de secuencia palindrómica flanqueado comúnmente por dos purinas en 5' y una en 3' (Tabla 3, Fig. 24A).

SUBTIPOS (DISTRIBUCIÓN)	LAZO APICAL DIS
A y G (Sudeste asiático y África noroccidental)	5'-AG GUGCAC A-3'
B y D (Europa, Norte y Centroamérica, Oceanía y Asia nororiental)	5'-AA GCGCGC A-3'
C (India y África oriental y meridional)	5'-AA GCGCGC U-3'
F y H (Sudamérica y Centroeuropa)	5'-AA GUGCAC A-3'

Tabla 3. Lazos apicales del dominio DIS (379). En negrita se muestra el hexámero palindrómico.

El palíndromo del lazo apical posibilita la interacción de sendos elementos DIS de dos moléculas diferentes, disparando el proceso de dimerización, mientras el lazo B parece formar parte de la señal de empaquetamiento, pues está implicado en la unión de la proteína nucleocápside (375). Ésta, además, es capaz de estabilizar el *kissing complex* entre dos elementos DIS y extender la unión por complementariedad hacia las hebras flanqueantes *in vitro* (376-378), recordando de nuevo a la interacción entre RNAs *antisense* naturales (379) (Fig. 24).

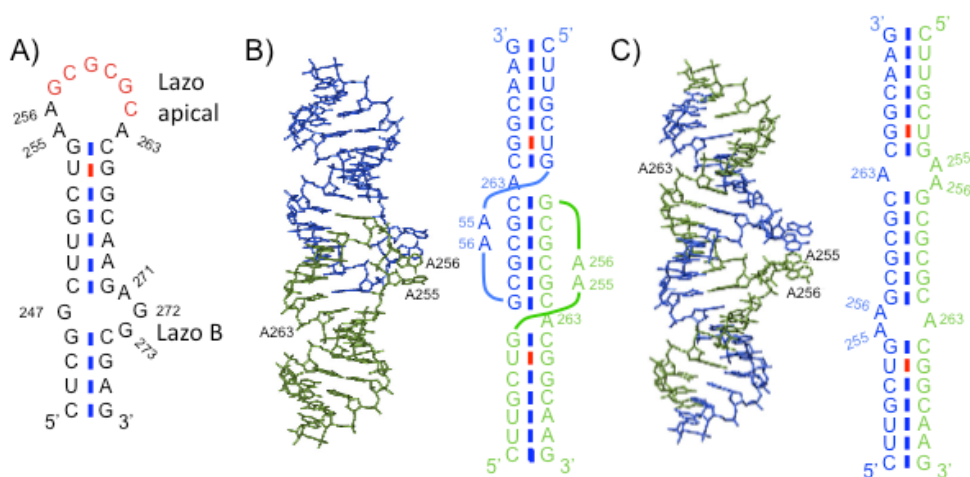


Figura 24. Elemento DIS, kissing complex DIS-DIS y dúplex DIS-DIS del subtipo B. (A) Modelo de plegamiento del DIS propuesto para la cepa NL43. En rojo se muestra el hexámero palindrómico. (B) Estructura obtenida por NMR y esquema del *kissing complex* DIS homodimérico subtipo B donde se representa en verde y azul las distintas moléculas y se puede observar el apilamiento cuádruple de adeninas (255,256:256,255) y la posición hacia la hélice de la A₂₆₃ (382). (C) Estructura obtenida por NMR y esquema del dúplex DIS-DIS subtipo B (382). El par anómalo G:A se muestra en amarillo, los apareamientos Watson-Crick en azul y los *wobble* en rojo. El código de colores azul y verde denota las dos hebras que participan en el dúplex.

El elemento DIS ha sido perfilado por la evolución para interactuar con otra molécula de RNA idéntica (380) y, si bien existen discrepancias en cuanto a la orientación de los nucleótidos desapareados, el *kissing complex* inicial presenta una hélice α intermolecular constituida por sendos hexámeros, coaxialmente alineada con las hélices de los tallos de sendas moléculas (381-382) (Fig. 24), y progresa hasta un dúplex extendido frenándose en el lazo B (379).

No obstante, la estructura completa del DLS no se conoce con precisión, habiéndose documentado que muchas otras regiones dentro de la 5'UTR de VIH-1 pueden estar implicadas directa o indirectamente en la dimerización. En cualquier caso, sigue existiendo controversia acerca de si los efectos de las deleciones de los diferentes elementos sobre la dimerización se debe a una participación directa en la dimerización o a la perturbación estructural que la deleción supone sobre los verdaderos dominios de dimerización. Evidencias experimentales sugieren la interacción directa homodimérica de TAR a través del *pseudo*-palíndromo que contiene (Fig. 21D y Fig. 25A) (361,383) y la interacción directa intermolecular U5-AUG (384-385) (Fig. 25B y C), si bien resultados más recientes apuntan a que la ausencia de éstas regiones conllevan un ensamblaje deficiente de DIS (386).

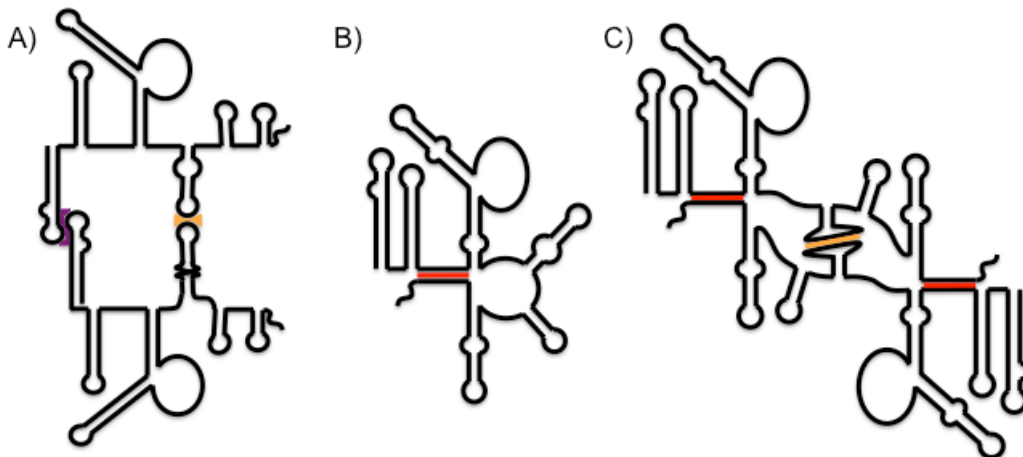


Figura 25. Modelado de la DLS del RNA de VIH-1. En (A) se muestra el modelo de estructura dimérica por dos puntos: homodimerización de DIS (amarillo) y homodimerización de TAR (violeta) (361). En (B) se muestra una estructura BMH donde se indica la interacción U5-AUG en rojo. En (C) se muestra el modelo de estructura dimérica con homodimerización de DIS (amarillo) e interacciones U5-AUG intermoleculares (rojo) (384).

I.5.2.5. DONADOR PRINCIPAL DE *SPLICING* (SD).

El elemento donador principal de *splicing* (SL-2 o SD) se encuentra entre los nucleótidos 283 y 301 y consiste en una horquilla con un nucleótido desapareado en la hebra 3' (Fig. 26). Salvo la actividad IRES Tat-dependiente que media la traducción de los mRNAs virales tempranos (352,387), la traducción de los mRNAs virales es *cap*-dependiente. Los diferentes ORFs son traducidos gracias a un complejo *splicing* alternativo que genera una gran variedad de RNAs subgenómicos en los que cada ORF se encuentra inmediatamente por debajo de la región 5'UTR. El SD es el donador de *splicing* para la mayoría de los casos, existiendo aceptores de *splicing* cerca del inicio de cada ORF (Fig. 19).

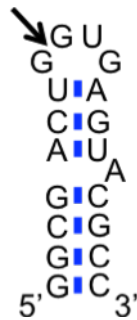


Figura 26. Modelo de plegamiento del SD. La flecha indica el punto de corte.

El punto de *splicing* (*) se localiza en 3' del nucleótido 287, en un motivo de secuencia que se ajusta al consenso de las señales de *splicing* 5'-MAG*GURAGU-3'. Se han descrito igualmente secuencias potenciadoras e inhibidoras del *splicing* tanto en la región U5 como en la zona proximal del ORF *gag* (388). La horquilla del SD se encuentra en un delicado equilibrio de estabilidad, pues ha de ser lo suficientemente estable como para estructurarse adecuadamente, pero lo suficientemente lábil como para que la maquinaria de *splicing* la abra y procese. Mutantes virales estabilizadores o desestabilizadores de la estructura son defectivos y se rescatan mediante nuevas mutaciones que restauran las propiedades originales (389). La mutación del consenso de *splicing* ha revelado la existencia de otros puntos de *splicing* críticos en 3' del anterior, uno a 4 nt (5'-₂₇₉UGA*GUA₂₈₅-3')(390) y otro a 50 nt (388).

I.5.2.6. SEÑAL DE EMPAQUETAMIENTO (*PSI*, Ψ).

El empaquetamiento selectivo del RNA genómico de VIH-1 en los viriones denota la existencia de alguna señal en el mismo reconocible por la nucleocápside. Esta señal, llamada Psi o ψ , ha sido acotada a una estructura de tres horquillas que contiene el SL1 o DIS, el SL2 o SD y una tercera horquilla conocida como SL3, (375,391) (Fig. 27). El elemento SL3 es la señal principal de empaquetamiento, se localiza entre los nucleótidos 307 y 331 y consiste en una horquilla con un lazo interno, estando tanto éste como el lazo apical involucrados en el reconocimiento por la proteína nucleocápside (392-393). Los dedos de zinc de la proteína parecen insertarse tanto en el tetranucleótido 5'-GGAG-3' del lazo apical de SL3 como en el 5'-GGUG-3' del de SL2 (394-395) y, al igual que ocurría con este último, mutaciones estabilizadoras o desestabilizadoras de la horquilla resultan defectivas (396). El equilibrio mediado entre las formas BMH y LDI parece estar controlado por la interacción entre la región del AUG del ORF *gag* y la zona U5 de la 5'UTR (Fig. 25B). Esta interacción promueve la forma BMH, bloqueando la traducción al ocluir el codón de inicio AUG y favoreciendo la dimerización al permitir el ensamblaje del elemento DIS. Este cambio estructural global parece ir acompañado de la exposición de motivos de unión de la proteína nucleocápsida, estando todos estos procesos acoplados con el empaquetamiento (397).

Adicionalmente a esta región, se ha documentado cierta implicación directa en el encapsidación por parte de una región rica en AU localizado en 5' del elemento ψ (398) y de una pequeña horquilla conocida como SL4 (nucleótidos 341 a 352)(399-400). Esta última presenta un motivo tetranucleótido 5'-GNRA-3' en su lazo apical (Fig. 27). También se ha descrito cierta implicación por parte de los elementos TAR y *Poly-A* (401), si bien la compleja red de interacciones entre los diferentes elementos funcionales dificulta la determinación del grado de implicación directa y no elimina la posibilidad de que la influencia de estos dominios consista en alguna alteración del plegamiento global de la 5'UTR (402).

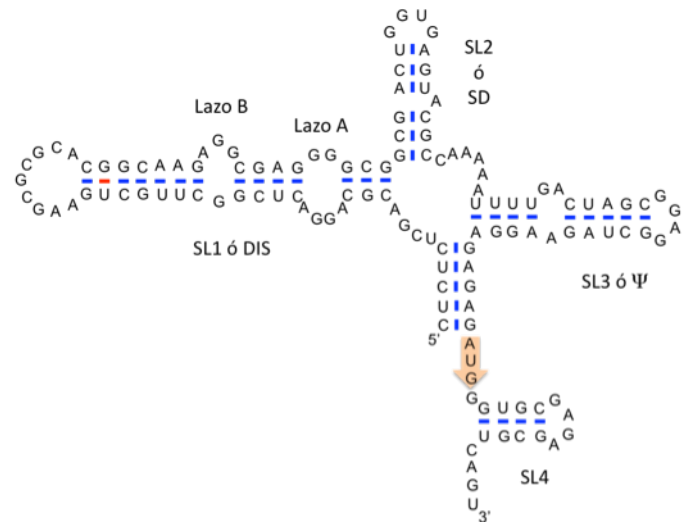


Figura 27. Modelo propuesto para la señal de empaquetamiento de VIH-1 en la región 5' del RNA genómico (adaptado de (393)). La flecha indica el codón de inicio del ORF *gag*.

OBJETIVOS

Los objetivos planteados para la realización de esta tesis son:

- Estudio de las capacidades del dominio DIS del genoma viral de RNA del VIH-1 como diana de moléculas *antisense* y *decoy* conjugadas en RNAs *antisense* catalíticos. Diseño de moléculas quiméricas con dominio tipo ribozima *hairpin* o *hammerhead* y dominio tipo DIS *antisense* y DIS *decoy*. Estudio de la funcionalidad *in vitro* de estas moléculas.

- Diseño de aptámeros de RNA contra la 5'UTR del RNA de VIH-1 común a todos los RNAs virales genómico y subgenómicos (nucleótidos 1 al 308 del RNA de VIH-1). Caracterización bioquímica *in vitro* de estas moléculas.

- Estudio de la capacidad de inhibición del VIH-1 *ex vivo* por parte de ambos tipos de moléculas de RNA diseñadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

M.1. MATERIALES

M.1.1. PRODUCTOS QUÍMICOS.

Los productos químicos utilizados para la realización del trabajo experimental que se describe se adquirieron de las casas comerciales SIGMA (St. Louis, Misuri, EEUU), MERCK (Damstadt, Alemania), AMRESCO (Solon, Ohio, EEUU), SERVA (Heidelberg, Alemania), PANREAC (Barcelona, España), PROMEGA (Madison, Wisconsin, EEUU), AMBION (Austin, Texas, EEUU), INVITROGEN (Carlsbad, California, EEUU) y ROCHE (Basilea, Suiza).

M.1.2. ENZIMAS.

M.1.2.1. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Las enzimas de restricción fueron adquiridas de las casas comerciales NEW ENGLAND BIOLABS (Boston, Massachusetts, EEUU), FERMENTAS (Burlington, Canadá) y ROCHE.

M.1.2.2. ENZIMAS POLIMERASA DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

- T7 RNA polimerasa purificada en el laboratorio.
- Taq DNA polimerasa de BIOTOOLS (Madrid, España).
- Reversotranscriptasa de ROCHE.
- Reversotranscriptasa y DNA replicasa de *Thermus Thermophilus* (Tth) de PROMEGA.

M.1.2.3. ENZIMAS MODIFICADORAS.

- Las enzimas modificadoras más frecuentes fueron:
- Fosfatasa alcalina intestinal de ternero, CIAP de ROCHE.
- T4 polinucleótido kinasa de ROCHE.

- T4 DNA ligasa de ROCHE.
- RQ1 DNasa de PROMEGA.
- RNasa A pancreática de AMRESCO.
- RNasa T1 de IRL (INDRUSTRIAL RESEARCH LIMITED, Wellington, Nueva Zelanda).

M.1.3. RADIOISÓTOPOS.

El marcaje radiactivo de RNAs se realizó a lo largo de toda la molécula incorporando α P³²UTP en el proceso de transcripción o en el extremo 5' de la misma mediante fosforilación usando γ P³²ATP como fuente de grupo fosfato. Ambos productos fueron adquiridos de AMERSHAM y, posteriormente, de GENERAL ELECTRICS HEALTH CARE (Chalfont St. Giles, Reino Unido) con actividades específicas entre 3000 y 5000 Ci/mmol.

M.1.4. PELÍCULAS AUTORRADIOGRÁFICAS.

Las películas autorradiográficas X-OMAT AR 5 y Curix RP2 fueron adquiridas respectivamente de las casas comerciales KODAK (Rochester, Nueva York, EEUU) y AGFA (Mortsel, Bélgica).

M.1.5. MEDIOS DE CULTIVO.

- MEDIO LB LÍQUIDO para cultivo bacteriano en suspensión. Bactotripton (DIFCO LABORATORIES; Detroit, Michigan, EEUU) 10 g/l, extracto de levadura (LABORATORIOS CONDA; Madrid, España) 5 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7.

- MEDIO LB-AGAR para cultivo bacteriano en placa. LB líquido con 15% de agar. Para la selección de transformantes positivos para la incorporación de vectores portadores del gen de resistencia a ampicilina, este medio fue suplementado con antibiótico ampicilina 50 μ g/ml. Para la identificación de transformantes positivos para la ligación de insertos en el vector pGEM®-T *easy* por medio del sistema de la β -galactosidasa/X-gal, el medio fue suplementado con

5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) 40 μ g/ml e isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 150 μ g/ml.

- MEDIO DE CONGELACIÓN PARA BACTERIAS. LB con 25% de glicerol final.

- SUERO BOVINO FETAL (FBS) (GIBCO, parte de INVITROGEN): No es un medio en sí, pero se utiliza para suplementar los medios de cultivo eucarióticos RPMI y DMEM. El sistema del complemento presente en el suero se inactiva por calor mediante una incubación a 56°C durante 30 minutos.

- MEDIO DMEM (PAA LABORATORIES GMBH, THE CELL CULTURE COMPANY, Pasching, Austria) para cultivo de células eucariotas. El medio se suplementa con 10% de FBS, L-glutamina 2 mM (SIGMA) y gentamicina 40 mg/l (SIGMA), así como los correspondientes antibióticos necesarios para el mantenimiento de las características específicas de las líneas celulares.

- MEDIO RPMI (PAA LABORATORIES GMBH) para cultivo de células eucariotas: El medio se suplementa de la misma forma que el anterior.

- MEDIO DE CONGELACIÓN PARA CÉLULAS EUCARIOTAS. Este medio se prepara usando como componente principal el medio de cultivo básico de mantenimiento de la línea celular en cuestión (RPMI o DMEM) suplementado con L-glutamina 2 mM, gentamicina 40 mg/l, DMSO al 10% y FBS a un porcentaje variable entre el 20 y el 80% según la fragilidad celular en el proceso de descongelación. Las líneas más frágiles presentan una supervivencia a la descongelación mayor cuando se congelan a porcentajes de FBS elevados.

- MEDIO OPTIMEM (PAA LABORATORIES GMBH) para transfección de células eucariotas.

M.1.6. TAMPONES.

- TAMPÓN DE ELECTROFORESIS TAE 1X: tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM.

- TAMPÓN DE ELECTROFORESIS TBE 1X: tris-borato 45 mM y EDTA 1 mM.

- TAMPÓN DE ELECTROFORESIS PARA GELES NATIVOS: tris-acético 50 mM y acetato de magnesio 10 mM.

- TAMPÓN TMN 1X: tris-acetato 20 mM, acetato de magnesio 10 mM y cloruro sódico 0'1 M.

- TAMPÓN TE: tris-clorhídrico 10 mM pH7'5 y 1 mM EDTA pH8. El pH final se ajusta a 7'4.

- TAMPÓN NO-DESNATURALIZANTE PARA CARGA EN GELES DE AGAROSA 10X: glicerol 50% (v/v), xilencianol 0'4% (p/v) y azul de bromofenol 0'4% (p/v) en agua.

- TAMPÓN DESNATURALIZANTE PARA CARGA EN GELES DE POLIACRILAMIDA 2X: formamida desionizada 94% (v/v), xilencianol 0'025% (p/v), azul de bromofenol 0'025% (p/v) y EDTA 17 mM.

- TAMPÓN NO-DESNATURALIZANTE PARA CARGA EN GELES DE POLIACRILAMIDA 2X: glicerol 30% (v/v), TMN 5X 20% (v/v), xilencianol 0'4% (p/v), azul de bromofenol 0'4% (p/v) y tRNA 4% (p/v) en agua.

- TAMPÓN DE ELUCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DESDE GELES DE POLIACRILAMIDA 1X: acetato amónico 0'5 M, SDS 0'1% (p/v) y EDTA 1 mM pH8.

- TAMPÓN FOSFATO SALINO: cloruro sódico 0'8% (p/v), cloruro potásico 0'02% (p/v), bifosfato sódico 0'144% (p/v), bifosfato potásico 0'024% (p/v) en agua a pH final 7'4.

- TAMPÓN DE CORTE *IN VITRO* PARA RIBOZIMAS *HAIRPIN* Y *HAMMERHEAD*: tris-clorhídrico 50 mM pH7'5 y cloruro de magnesio 10 mM.

- TAMPÓN DE DIMERIZACIÓN PARA 5'UTR DE VIH-1 1X: cacodilato sódico 50 mM pH 7'5, cloruro potásico 0'3 M y cloruro de magnesio 5 mM.

- TAMPÓN DE MONOMERIZACIÓN PARA 5'UTR DE VIH-1 1X: cacodilato sódico 50 mM pH 7'5, cloruro potásico 50 mM y cloruro de magnesio 0'1 mM.

M.1.7. VECTORES PLASMÍDICOS DE CLONAJE Y EXPRESIÓN.

- pUC19: plásmido de alto número de copias derivado de los plásmidos pBR322 y M13mp19. Fue diseñado como vector de clonación para transformación en *Escherichia coli* (403). Tiene un tamaño de 1.686 pb y presenta un origen de replicación tipo ColE1. Codifica para el gen de la β -lactamasa, lo que le habilita para conferir resistencia a ampicilina, y presenta un sitio de policlonación (MCS) en el marco abierto de lectura del péptido α de la β -galactosidasa, lo que permite el rastreo de su presencia en las células por color diferencial en presencia de X-gal.

Su digestión con *MspI* genera fragmentos de 509, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67 y 46 pb. Esta digestión es utilizada como marcador de peso molecular para electroforesis en gel de agarosa.

- pGEM®3ZF(-): plásmido de alto número de copias derivado de pUC19 y diseñado como vector de clonación para transformación de *Escherichia coli* (403). Posee dos orígenes de replicación, uno de tipo ColE1 para *Escherichia coli* y otro del fago filamentoso f1 para producción de DNA de cadena sencilla. Confiere resistencia a ampicilina en bacterias. El MCS se encuentra flanqueado por los promotores utilizados por las RNAs polimerasas de los bacteriófagos SP6 y T7 (en adelante SP6P y T7P) para la transcripción *in vitro* del inserto.

- pCDNA3™ (INVITROGEN): plásmido de alto número de copias derivado de pUC19 y diseñado para la expresión en células eucariotas, distribuido por INVITROGEN. Posee orígenes de replicación ColE1 para *Escherichia coli*, el origen del SV40 para células eucariotas y el origen de f1 para obtención de DNA de cadena sencilla. Confiere resistencia a ampicilina en bacterias y neomicina en células de mamífero (bajo el control del promotor del SV40). El MCS se encuentra flanqueado por el promotor temprano del citomegalovirus humano (CMV) y la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (BGH) para su expresión eucariótica. El promotor de CMV es de tipo pol-II. El MCS también está flanqueado de los promotores SP6P y T7P para la transcripción *in vitro* del inserto.

- pU6: plásmido de alto número de copias derivado de pCDNA3™ en el que se han sustituido el promotor del CMV y la señal de poliadenilación de BGH por las correspondientes al snRNA U6 humano separadas por los sitios de restricción para las enzimas *KpnI* y *ApaI* que permiten el clonaje (404). El promotor U6 es de tipo pol-III. El plásmido conserva los orígenes de replicación ColE1 y SV40 y los genes de resistencia a ampicilina y neomicina.

- pGEM®-T EASY (PROMEGA): es un DNA lineal bicatenario de 3015 pb de longitud y con un único residuo de timina protuberante en sus extremos 5' diseñado expresamente para el clonaje de productos de PCR. Codifica para la β -lactamasa, lo que le habilita para conferir resistencia a ampicilina en su forma circularizada con inserto en células transformadas. El amplicón se inserta interrumpiendo el gen de la β -galactosidasa, lo que, además, permite la identificación de clones positivos frente a posibles recircularizaciones por color

diferencial. Flanqueando al sitio de clonación hay varios sitios únicos de corte para diferentes enzimas de restricción, así como los promotores T7P y SP6P, y los sitios estándar de hibridación de los oligonucleótidos universales *Forward* y *Reverse*.

- pNL4.3: plásmido de alto número de copias y con una longitud de 14.824 pb. Es un derivado de pUC18 en el que se ha insertado en el lugar del MCS el genoma completo proviral de VIH-1. Este genoma es un híbrido de las cepas NY5/BRU (LAV-1) y tiene una longitud total de 9.709 pb. Su transfección en células permisivas produce partículas infecciosas y replicativas (405). Su número de acceso en el *GenBank* es AF324493.

M.1.8. CEPA BACTERIANA.

La cepa bacteriana que se utilizó para el clonaje de vectores y la producción de plásmidos fue *Escherichia coli* DH5 α (406-407). Especificaciones: F'/*endA1 hsdR17*(r_k-m_k+) *supE44 thi-1 recA1 gyrA* (Nal_r) *relA1* Δ (*LacI*ZYA-*argF*)U169 *deoR* (ϕ 80*dlac* Δ (*lacZ*)M15).

M.1.9. LÍNEAS CELULARES EUCARIÓTICAS.

- HEK 293T: línea celular adherente de morfología epitelial procedente de riñón embrionario humano (408). Constituye un derivado de la línea celular HEK293 altamente transfectable que expresa constitutivamente el gen sensible a la temperatura del antígeno T grande del SV40. Actualmente ya no se distribuyen y han sido descatalogadas de la *American Type Culture Collection* (ATCC), aunque sí son accesibles su línea de origen, HEK293 (n^o ATCC: CRL-1573), y un derivado suyo más transfectable aún, HEK293T/17 (n^o ATCC: CRL-11268). Estas células son permisivas al VIH-1 pero insensibles a la infección.

- JURKAT: línea celular de crecimiento en suspensión y morfología linfoblástica procedentes de la inmortalización de linfocitos T aislados de sangre periférica de un paciente de leucemia aguda de células T de 14 años de edad (409). Actualmente se encuentran descatalogadas en la ATCC y sólo es accesible un derivado de segunda generación llamado Jurkat *Clone E6-1* (n^o ATCC: TIB-152). Estas células son sensibles y permisivas a la infección por VIH-1.

M.1.10. KITS DE PROCEDIMIENTO AUTOMATIZADO.

- ROCHE *High Pure Plasmid Isolation Kit*: Para extracción de DNA plasmídico desde cultivo bacteriano para trabajo *in vitro*.
- QUIAGEN (Venlo, Países Bajos) *Plasmid Mini Kit*: Para preparación de DNA plasmídico desde cultivo bacteriano para transfección en células eucariotas.
- QUIAGEN *HiSpeed Plasmid Maxi Kit*: Para preparación a gran escala de DNA plasmídico desde cultivo bacteriano.
- PROMEGA *Wizard SV gel and PCR Clean-Up System*: Para extracción y purificación de DNA desde geles de agarosa.
- THERMO SCIENTIFIC (Waltham, Massachusetts, EEUU) *ReddyMix PCR Master Mix*: Para preparación rápida de PCR como, por ejemplo, para chequeo de clones positivos por PCR de colonia.
- BIO-RAD (Hercules, California, EEUU) *iTaq fast SYBR Green Supermix with ROX*: Para cuantificación relativa de mRNAs virales por PCR-tiempo real (RT-PCR).
- BIO-RAD *Genscreen HIV-1 Ag Assay*: Para cuantificación de antígeno viral p24 en el sobrenadante celular.

M.1.11. SOFTWARE INFORMÁTICO.

- *Microsoft Word*: de MICROSOFT CORPORATION (Redmond, Washington, EEUU).
- *Microsoft Excell*: de MICROSOFT CORPORATION.
- *Microsoft Power-Point*: de MICROSOFT CORPORATION.
- *EndNote X.0.2*: de THOMSON REUTERS (Nueva York, EEUU).
- *Adobe Acrobat 5.0*: de ADOBE SYSTEMS INC. (San José, California, EEUU).
- *Graph Pad*: de GRAPH PAD SOFTWARE INC. (La Jolla, California, EEUU).
- *Sigma Plot v8.02*: de SPSS INC (Chicago, Illinois, EEUU).
- *EnzymeX 3*: obtenido libremente de mekentosj.com.
- *Oligo Explorer v1.1.0*: de OLIGOSOFTWARE Teemu Kuulasmaa©.
- *Oligo Analyzer v1.0.2*: de OLIGOSOFTWARE Teemu Kuulasmaa©.
- *4peaks v1.7*: obtenido libremente de mekentosj.com.

- *DNA/SIS max v2.00.000.002*: de HITACHI SOFTWARE ENGINEERING CO., LTD. (San Franciso Sur, California, EEUU).

- *Image Quant v5.2*: de MOLECULAR DYNAMICS (parte de GE HEALTH CARE).

- *mFold*: desarrollado por Zuker, M en 2003 (410).

- *Vienna Package*: desarrollado por Gruber *et al.* en 2008 (411).

- *ABI PRISM 7000 SDS Software v1.1*: de APPLIED BIOSYSTEMS (Foster City, California, EEUU).

- *SOFTmax Pro v.4.3.1*: de MOLECULAR DEVICES (Silicon Valley, California, EEUU).

M.1.12. CENTRÍFUGAS.

De las distintas centrifugaciones que se detallan en el apartado de métodos, a parte de temperatura y tiempo, se indica la aceleración centrífuga que sufre la muestra expresada en veces la gravedad terrestre (g).

Las centrífugas utilizadas en los procedimientos *in vitro* (principalmente M.2.2) fueron dos modelos:

- *MiniSpin Plus* de EPPENDORF (Hamburgo, Alemania): Utilizada para las centrifugaciones a temperatura ambiente. El radio de su rotor es de 6'03 cm. El valor común de aceleración centrífuga que se indica es de 14.100 g, que se corresponde con 14.500 rpm en esta centrífuga.

- *Centrifuge 5415R* de EPPENDORF: Utilizada principalmente para las centrifugaciones a 4°C. El radio de su rotor es de 8'03 cm. El valor común de aceleración centrífuga que se indica es de 16.100 g, que se corresponde con 13.200 rpm en esta centrífuga.

En cualquiera de los dos casos, para cualquier otro valor, la interconversión se consigue fácilmente con la siguiente fórmula:

$$g = (1'119 \times 10^{-5}) \times rpm^2 \times r$$

donde "g" es la aceleración centrífuga medida en veces la gravedad terrestre, "rpm" son las revoluciones por minuto del rotor y "r" es el radio del

rotor. Esto queda como $g = 6'747 \cdot 10^{-5} \cdot \text{rpm}^2$ para la *MiniSpin Plus* y como $g = 8'985 \cdot 10^{-5} \cdot \text{rpm}^2$ para la *Centrifuge 5415R*.

Adicionalmente, se utilizó para el trabajo con cultivos celulares eucariotas una centrífuga EPPENDORF *Centrifuge 5810R* de rotor vasculante. Para este caso, en el apartado de métodos correspondiente se indica directamente las revoluciones por minuto a que se centrifugaban los cultivos.

Por último, para la preparación de bacterias competentes (M.2.15.1) se utilizaron centrífugas BECKMAN (Brea, California, EEUU) de los modelos *J2-MC* y *Avanti™ J-25 Centrifuge* con los rotores JA-20, JA-25.50 y JA-14 según el volumen del cultivo.

M.2. MÉTODOS

M.2.1. SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

M.2.1.1. SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

La síntesis de los oligodeoxirribonucleótidos especificados se realizó en el Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC) con un equipo automático *Applied Biosystems 3400 DNA synthesizer* (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA, USA) basado en química estándar de oxidación de fosforoamiditas por iodina. La síntesis se realizó a una escala de $0'2 \mu\text{M}$ y la desprotección de los oligonucleótidos se realizó con amonía concentrada a 55°C durante 16 horas.

La síntesis de los oligorribonucleótidos fue realizada por *IBA Nucleic Acids Synthesis* (IBA GMBH, Göttingen, Alemania).

M.2.1.2. SÍNTESIS DE DNA BICATENARIO POR HIBRIDACIÓN Y EXTENSIÓN.

Para la generación de moldes de transcripción muy pequeños se procedió como se describe a continuación. Oligodeoxirribonucleótidos parcialmente complementarios en sendos extremos 3' son hibridados y extendidos con Taq DNA

polimerasa (BIOTOOLS). Para ello, 200 pmoles de cada oligodeoxirribonucleótido fueron sometidos a una temperatura de 95°C durante 2 minutos y seguidamente se produjo un descenso la misma a razón de 0'1°C/minuto hasta la temperatura óptima de hibridación, que se mantuvo durante 2 minutos. En ese punto se añadieron 0'5 U de enzima y se incubó la reacción de extensión a 72°C durante 60 minutos. La temperatura de hibridación de los oligodeoxirribonucleótidos se calculó atendiendo exclusivamente a la región complementaria entre ambos y utilizando el *software* informático OligoAnalyzer. Todo el proceso se hizo a 1X de tampón de reacción suministrado por el fabricante y 0'05 mM de cada deoxinucleótido trifosfato (dNTPs).

M.2.1.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La PCR estándar para trabajo en biología molecular se hizo con la enzima Taq DNA polimerasa de BIOTOOLS. De forma habitual las reacciones de PCR se hicieron en un volumen final de 50 µl a concentración de 1X del tampón distribuido por el fabricante, donde se incluyen entre 15 y 30 pmoles de cada cebador; 1 U de enzima; y entre 40 y 100 ng de molde. La reacción completa puede escalarse a diferentes volúmenes finales según sea necesario.

El protocolo estándar seguido consistió en una desnaturalización inicial de 95-98°C durante 2 minutos seguida de una serie limitada de ciclos de tres temperaturas: desnaturalización a 95-98°C durante 30 segundos; hibridación de cebadores a una temperatura adecuada durante 30 segundos; y reacción de extensión a 72°C durante 30 segundos. Finalmente, se aplicó una extensión final a 72°C de 7 a 10 minutos.

La temperatura de hibridación de los cebadores se calculó con el *software* informático OligoAnalyzer. El número de ciclos oscilaba en torno a 25 y, ocasionalmente, cuando alguno de los cebadores no hibridaba completamente con la diana, se introdujo una primera ronda de 5 ciclos con una temperatura de hibridación adecuada a la región capaz de hibridar y luego se procedió normalmente utilizando la temperatura calculada para el cebador completo.

Igualmente, en la amplificación de determinadas secuencias fue preciso añadir algún agente desnaturalizante que evitase la formación de estructuras

intracatenarias que interfieran con la polimerasa y ocasionen amplificaciones abortivas. El agente utilizado en este caso fue DMSO al 0'1% de concentración final.

Ocasionalmente, en lugar de Taq DNA polimerasa de BIOTOOLS, se utilizó el Kit *ReddyMix* de THERMO SCIENTIFIC. Este kit suministraba una mezcla maestra 2X con todos los componentes necesarios para la PCR al que únicamente había que añadir los cebadores y el molde. Normalmente este kit se utilizó para chequeo de clones recombinantes por PCR de colonia, pues la mezcla permitía su carga directa tras la reacción en geles de agarosa e incorporaba glicerol y colorante para la electroforesis. Normalmente la reacción se llevaba a cabo en 10 μ l de volumen final con 5 μ l de mezcla, 3-5 pmoles de cada cebador y añadiendo como molde una fracción de la colonia recogida con un palillo o una punta de micropipeta estériles. Las condiciones de amplificación y la excepciones descritas anteriormente son igualmente aplicables a esta reacción.

M.2.1.4. TRANSCRIPCIÓN DE RNA *IN VITRO*.

Las moléculas de RNA se sintetizaron enzimáticamente mediante transcripción *in vitro* con la enzima T7 RNA polimerasa. La enzima fue obtenida por el personal técnico del laboratorio desde la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) pQE9T-pREP4 mediante técnicas cromatográficas (318) y su actividad se estimó mediante transcripciones comparativas con lotes anteriores ya establecidos.

Se utilizaron dos tipos de DNA molde: plásmidos digeridos con enzimas de restricción adecuadas y moldes obtenidos por PCR. En ambos casos el final de transcripción ocurre por caída de la polimerasa al finalizar el molde, por lo que, en el caso de plásmidos, éstos debían ser digeridos con una enzima de restricción cuya diana de corte se localizase inmediatamente en 3' de la secuencia a transcribir y ésta debía ir precedida del promotor de la polimerasa del bacteriófago T7. En cualquier caso, los moldes fueron purificados de gel de agarosa o por extracción fenólica y precipitación (M.2.2.3).

La reacción de transcripción estándar se llevó a cabo en 50 μ l de volumen final en un tampón de Tris-clorhídrico 40 mM pH7'9, cloruro de magnesio 6 mM, espermidina 2 mM, cloruro sódico 10 mM, DTT 20 mM, tritón X100 0'01%, NTPs 1 mM cada uno, 0'5 U/ μ l de inhibidor de RNasas y una cantidad estimada en 0'5 U/ μ l

de T7 RNA polimerasa. Como molde se añadieron 2 a 3 μg de DNA y la reacción se incubó durante 2 horas a 37°C. Tras esto, el molde de DNA se eliminó mediante adición de RQ1 DNasa 1 U/ μg de DNA molde e incubación 30 minutos a 37°C. El resultado de la transcripción era habitualmente purificado en gel de poliacrilamida desnaturalizante (M.2.2.5).

Ocasionalmente y para conseguir una mayor producción de RNA se añadieron hasta 10 μg de DNA molde, 5 mM de NTPs, 2'5 U/ μl de inhibidor de RNasas y 2'5 U/ μl de enzima dejando la reacción a 37°C durante toda la noche.

Tan solo en el caso en que el DNA molde sea un plásmido digerido, era posible prescindir del tratamiento con RQ1 DNasa, pues la purificación por gel separa suficientemente el transcrito del molde. En el caso de producción de RNAs desnudos para transfección en células eucariotas (M.2.16.1), la purificación por gel resultaba tóxica para las células (datos no mostrados), por lo que se procedió a hacer una extracción fenólica y precipitación directa de la mezcla de transcripción (M.2.2.3). En este caso, la integridad de los RNAs era chequeada *a posteriori* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (M.2.5.2).

M.2.1.5. REACCIÓN DE REVERSOTRANSCRIPCIÓN DESDE RNA TOTAL DE CÉLULAS.

La reacción de reverso transcripción se hizo con la enzima *RT Transcriptor Reverse-Transcriptor* de ROCHE modificando el protocolo recomendado por el fabricante para introducir un paso de degradación de DNA contaminante por RQ1 DNasa tal como se indica a continuación.

Se partió de 100 ng de RNA total de células (M.2.2.2) que se incubaron durante 20 minutos a 37°C con 0'5 U de RQ1 DNasa y 20 U de RNase inhibitor en 11 μl de volumen final. Tras esto, se desnaturalizó la enzima y cualquier estructura de RNA formada mediante una incubación a 65°C durante 10 minutos y, después, se redujo la temperatura hasta 4°C.

En este momento, se llevó la mezcla a un volumen final de 20 μl a 1X de tampón recomendado por el fabricante junto con 3'2 μg de hexámeros de secuencia aleatoria, dNTPs a concentración final de 1 mM y 10 U de enzima. La hibridación de los hexámeros se realizó a 25°C durante 10 minutos y la reacción de

reversotranscripción a 60°C durante una hora. Finalmente la enzima se inactivó a 85°C durante 5 minutos. Las muestras pueden preservarse a 4°C o -20°C.

M.2.2. PREPARACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

M.2.2.1. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DE *ESCHERICHIA COLI*.

- *HIGH PURE PLASMID ISOLATION KIT* (ROCHE): Este método se utilizó para obtención de DNA plasmídico a pequeña escala para trabajo *in vitro* siguiendo las indicaciones del fabricante.

- *PLASMID MINI KIT* (QUIAGEN): Este método se utilizó para obtención de DNA plasmídico a pequeña escala para transfección en células eucarióticas siguiendo las indicaciones del fabricante.

- *HiSPEED PLASMID MAXI KIT* (QUIAGEN): Este método se utilizó para obtención de DNA plasmídico a gran escala y es igualmente útil para transfección de células eucarióticas como para trabajo *in vitro*.

M.2.2.2. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE CÉLULAS HEK293T.

La extracción de RNA total de células se hizo mediante el procedimiento con reactivo INVITROGEN *Trizol Reagent* siguiendo las instrucciones del fabricante con las puntualizaciones detalladas a continuación:

- La línea celular HEK293T se sometió a diferentes tratamientos en placas de cultivo de 24 pocillos en condiciones en que se alcance un nivel de alta confluencia en el momento de la extracción.

- Tras eliminar el sobrenadante del pocillo por aspiración, se inició la extracción con la adición de 800 µl de Trizol.

- La fase acuosa obtenida tras la separación de las fases orgánicas mediante aplicación de cloroformo se transfirió a un tubo nuevo, donde se le añadió 1 U de RQ1 DNasa y se incubó a 37°C durante 30 minutos para eliminar la posible contaminación de DNA genómico. Tras esto, se añadieron 160 µl de cloroformo, se agitó la muestra 15 segundos manualmente y se centrifugó a 16.100 g y 4°C

durante 15 minutos. La fase acuosa obtenida se transfirió a un tubo nuevo y se prosiguió con las instrucciones del fabricante.

- Al finalizar la extracción y secar al aire el RNA total extraído, fue preciso ser expresamente celoso en que el precipitado no se secase demasiado, pues la muestra puede perder solubilidad y no ser posible su resuspensión en agua. La concentración del RNA se midió por espectrometría (2.3.1) y su integridad se chequeó por electroforesis en gel de agarosa (2.5.1).

M.2.2.3. EXTRACCIÓN FENÓLICA Y PRECIPITACIÓN.

Este procedimiento se utilizó para purificar ácidos nucleicos desde cualquier mezcla de reacción o elución. La muestra de ácido nucleico a purificar se llevó con agua a 150 μ l de volumen final o se dividió en alícuotas de este volumen si se procedía de más cantidad. Se utilizaron tubos de 1'5 ml.

Se añadieron 150 μ l de fenol saturado a la muestra, se agitó en vórtex y se centrifugó a 14.100 g durante 5 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se le añadieron 150 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1, se agitó en vórtex hasta mezclar las fases y se centrifugó de nuevo 14.100 g durante 5 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se le añadieron 0'4 μ g de glucógeno (recomendado para moléculas de pequeño tamaño), 15 μ l de acetato sódico 3M (pH5'2 para RNA y 6'01 para DNA) y 450 μ l de etanol absoluto. Esta mezcla se incubó a -80°C durante un mínimo de 30 minutos. Luego, se centrifugó a 4°C y 16.100 g durante un mínimo también de 30 minutos. El sobrenadante fue descartado por inversión del tubo y se añadieron cuidadosamente gota a gota sobre la pared del tubo, cuidando no despegar el precipitado, 250 μ l de etanol 70% para DNA y 80% para RNA. Se volvió a centrifugar cada tubo durante 5 minutos a 4°C y 16.100 g, y se volvió a descartar el sobrenadante por inversión. Seguidamente, se secó el precipitado al aire o en vacío. Finalmente, la muestra se resuspendió en el volumen deseado de agua o tampón y se cuantificó su concentración (M.2.3).

En el caso de RNAs para transfección en células eucariotas o para trabajo *in vitro* especialmente sensible a la presencia de sales, se insertó un paso adicional tras la extracción con cloroformo-alcohol isoamílico. Esta fase acuosa fue purificada

adicionalmente mediante columna de *sephadex* G25 previamente a la precipitación.

M.2.2.4. EXTRACCIÓN DE DNA DESDE GEL DE AGAROSA.

- MÉTODO POR CONGELACIÓN CON FENOL: Este método se utilizó para una máxima recuperación de muestra y es especialmente recomendable para fragmentos de pequeño tamaño. Tras la separación de la muestra por electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio (M.2.5.1), la banda correspondiente se identificó por iluminación con luz ultravioleta, se recortó del gel con una hoja de bisturí y se transfirió a un tubo de 1'5 ml. Se trituró el fragmento de agarosa con ayuda de un émbolo y se añadió igual relación de volumen en μl de fenol saturado por μg de agarosa. El homogeneizado resultante se congeló a -80°C durante 1 minuto y se centrifugó seguidamente durante 5 minutos a 14.500 g a temperatura ambiente.

Tras la centrifugación, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y sometida a una extracción fenólica y precipitación (M.2.2.3).

- *WIZARD® SV GEL AND PCR CLEAN-UP SYSTEM* (PROMEGA): Se siguieron las instrucciones dadas por el fabricante.

M.2.2.5. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DESDE GEL DE POLIACRILAMIDA.

La extracción de ácidos nucleicos desde geles de poliacrilamida se realizó tal como se describe a continuación. Se practicaron electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (M.2.5.2) con las muestras deseadas. En caso de ácidos nucleicos no marcados radiactivamente, la banda deseada fue detectada por sombra al UV sobre silicagel. Se utilizó para ello una placa de vidrio con una capa de silicagel 60 F254 debidamente envuelta en plástico autoadherente¹. Sobre esta placa se colocó el gel y se iluminó con luz UV a 254 nm de modo que la placa entera emite fluorescencia verde salvo donde las bandas de

¹ Este plástico autoadherente no debe ser capaz de filtrar la luz ultravioleta ni la fluorescencia que emite el F254. Este material se adquiere en comercios no especializados, con lo cual es preciso probar varias marcas hasta conseguir una que reúna estas características.

ácidos nucleicos absorben la radiación e impiden que llegue a excitar el fluorocromo del silicagel.

Los ácidos nucleicos marcados radiactivamente fueron localizados mediante película autorradiográfica. Para ello, el gel se transfirió a una película autorradiográfica revelada que actúa como soporte. El conjunto debidamente envuelto en plástico autoadherente se incubó durante unos minutos en un cassette de exposición oscura con una película nueva. La autorradiografía resultante del revelado de la película se utilizó como patrón para localizar las bandas de ácidos nucleicos resueltas por la electroforesis.

Las bandas de interés fueron recortadas con ayuda de una hoja de bisturí, troceadas y transferidas a tubos de 1'5 ml. Seguidamente se les añadió un volumen de tampón de elución (M.1.6) a cada uno suficiente para que se sumerja toda la acrilamida. La mezcla de elución se incubó toda la noche a 37°C en caso de DNA, y a 4°C con agitación leve en caso de RNA. Finalmente, el volumen de tampón de elución se transfirió a tubos nuevos y se les practicó una extracción fenólica y precipitación (M.2.2.3).

M.2.3. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

M.2.3.1. CUANTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA.

La cuantificación por espectrometría se basa en la facultad de los ácidos nucleicos de absorber radiación a 260 nm gracias a los anillos aromáticos de las bases nitrogenadas.

Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro modelo *NanoDrop*® ND-1000 UV-Vis *Spectrophotometer* (NANODROP TECHNOLOGIES, Wilmington, DE, USA) a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. El volumen medido era de 2 μ l y el aparato se calibró con los coeficientes de extinción molar 50 $(\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ para DNA bicatenario, 40 $(\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ para RNA y 37 $(\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ DNA monocatenario. Se consideró como criterio de pureza una relación de densidad óptica a 260 nm / 280 nm de entre 1'8 y 2.

M.2.3.2. CUANTIFICACIÓN POR MEDIDA RADIATIVA EN SOLUCIÓN.

Este método se utilizó para cuantificar la cantidad de ácido nucleico marcado internamente durante su síntesis, en este caso RNA durante su transcripción. El RNA era marcado por adición durante la transcripción de $\alpha P^{32}UTP$. Tras la adecuada purificación y resuspensión en agua del RNA, se cuantificó el número de desintegraciones por minuto (DPM) de las muestras en el contador de radioisótopos *QuickCountTM* (BIOSCAN, Washington, DC, USA). Este aparato mide la radiación tipo Cerenkov derivada de la emisión de partículas radiactivas y no la desintegraciones radiactivas en sí. Esto hace, además, que el material del tubo, la naturaleza del solvente y el volumen del mismo afecten a la medición. Es por esto, por lo que el aparato se calibró para generar un valor de DPMs, CPMs o cuentas totales a partir de la medición registrada usando un tubo de 1'5 ml estándar y diferentes volúmenes de solvente (10, 20, 50, 100 y 500 μ l). Por eso, la medición se hizo siempre en un tubos similares y en uno de estos volúmenes finales usando el factor de calibración correspondiente.

La concentración final se calculó desde las DPMs aplicando la siguiente fórmula matemática:

$$[X] pmol/\mu l = DPM \times \frac{1 \mu Ci}{2'2 \times 10^6 DPM} \times \frac{1 pmol RNA}{U \text{ por molécula}} \times \frac{pmol UTP \text{ fría añadido}}{\mu Ci \alpha P^{32} UTP \text{ añadido}} \times \frac{1}{f} \times \frac{1}{\mu l(VF)}$$

El valor U corresponde al número de residuos de uracilo presentes en la molécula. El valor VF se corresponde con el volumen final de la muestra. El valor f corresponde al factor de decaimiento del isótopo P^{32} y se interpreta como la relación entre la actividad de la fecha de medida respecto de la actividad de la fecha de calibración del isótopo que proporciona el fabricante. Se despeja de la siguiente ecuación:

$$A = A_0 \times e^{-b \times T}; \quad \frac{A}{A_0} = e^{-b \times T} = f;$$

Para el isótopo P^{32} el periodo (T) es la diferencia de tiempo entre la medición y la calibración del fabricante medido en días; y b es una constante cuyo valor es -0'049.

M.2.3.3. CUANTIFICACIÓN POR MEDIDA RADIATIVA EN GEL.

Este procedimiento se aplicó para la cuantificación de fragmentos concretos de ácidos nucleicos separados mediante electroforesis en gel. Aunque puede calcularse una cantidad total de RNA referida a una muestra de concentración conocida, habitualmente este método se utilizó para realizar cuantificaciones relativas de unos productos respecto de otros, con lo que verdaderamente no se cuantifica la cantidad de materia sino la actividad específica de cada molécula o producto.

Para ello, los geles fueron secados o congelados y, seguidamente, expuestos durante toda la noche con una pantalla de material excitable por radiación (europio) (AMERSHAM BIOSCIENCES *Storage Phosphor Screen*). Un escáner de fluorescencia de tipo *STORM 820* (MOLECULAR DYNAMICS, parte de AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) o *TYPHOON 9400 Variable Mode Imager* (AMERSHAM BIOSCIENCES) se utilizó para revelar el resultado de la incubación. La imagen resultante mostró las diferentes bandas de producto radioactivo presentes en la muestra de electroforesis y el *software* informático *ImageQuant v2.5* (M.1.11) se utilizó para la cuantificación de la intensidad de radiación de cada producto.

M.2.4. MARCAJE RADIOACTIVO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

M.2.4.1. MARCAJE INTERNO DE RNA.

El marcaje interno del RNA se realizó mediante la utilización de $\alpha P^{32}UTP$ como substrato para la síntesis de la molécula. De los tres fosfatos que contienen los NTPs, tan solo el αP perdura en el RNA transcrito (M.1.3).

El producto de partida distribuido por el fabricante se encontraba a una concentración de 25 $\mu Ci/\mu l$ en su fecha de calibración. Normalmente, para la transcripción de moléculas de las que luego se iba a hacer un seguimiento

exhaustivo se añadía a la mezcla de transcripción estándar (M.2.1.4) una cantidad de 50 μCi y se rebajaba la cantidad de UTP no marcado (en adelante “frío”) de 1 mM a 0'4 mM para llegar a un compromiso entre favorecer la incorporación y mantener unos índices de transcripción aceptables. Si por el contrario, sólo interesaba hacer un seguimiento de las especies de RNA en las subsiguientes reacciones químicas, el marcaje solía ser más leve para reducir el gasto de material radiactivo y los residuos generados. En este caso se añadían a la mezcla de transcripción 5 μCi e, igualmente, se rebaja la cantidad de UTP frío a 0'4 mM.

M.2.4.2. MARCAJE DE RNA EN EXTREMO 5'.

El marcaje radioactivo en el extremo 5' de moléculas de RNA transcritos *in vitro* se hizo por desfosforilación y posterior fosforilación utilizando como fuente de fosfato $\gamma\text{P}^{32}\text{ATP}$ (M.1.3), pues es el fosfato- γ de esta molécula el que resulta transferido.

Los RNAs se sintetizaron por transcripción *in vitro* (M.2.2.4) y fueron purificados desde gel de poliacrilamida (M.2.5.2). Los RNAs purificados se desfosforilaron utilizando CIAP (M.1.2.3). Para ello, 100 pmoles de cada RNA se incubaron en 10 μl de volumen final a concentración 1X del tampón recomendado por el fabricante y 1 U de enzima durante 30 minutos a 37°C. Para detener el proceso, a cada muestra se le practicó una extracción fenólica seguida de precipitación (M.2.2.3). Cada RNA fue cuantificado tras la purificación por espectrometría.

Cada RNA desfosforilado se fosforiló de nuevo utilizando como donador de fosfato el $\gamma\text{P}^{32}\text{ATP}$ y enzima T4 polinucleótido kinasa (M.1.2.3). Para ello se tomaron 15 pmoles de cada RNA y se incubaron en 10 μl de volumen final a 1X de tampón recomendado por el fabricante y junto con 1 U de enzima y entre 40 y 70 μCi de $\alpha\text{P}^{32}\text{ATP}$.

En el caso de RNAs pre-sintetizados químicamente, puesto que presentaban un extremo 5'-hidroxilo, el marcaje radioactivo se hizo directamente por fosforilación tal como se ha explicado en el párrafo anterior.

La reacción de marcaje fue directamente purificada de gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (M.2.5.2).

M.2.5. GELES DE ELECTROFORESIS.

M.2.5.1. GELES DE AGAROSA.

Los geles de electroforesis se prepararon al 0'8-2% (p/v) de agarosa (FMC BIOPRODUCTS; Rockland, Maine, USA) en TAE 1X con 100 µg/ml de bromuro de etidio. Para cargarlas en gel se añadió a las muestras tampón desnaturante de alta densidad descrito en M.1.6. a una concentración final de 1X. La electroforesis se desarrolló en tampón TAE 0'5-1X. Los fragmentos de DNA fueron visualizados con luz ultravioleta a 312 nm.

M.2.5.2. GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.

La solución de partida utilizada para la fabricación de los geles era de acrilamida:bisacrilamida (38:2). Los geles se prepararon del 4 al 20% de acrilamida (p/v) y 7 M de urea en TBE 1X. Como catalizadores de la reacción de polimerización se utilizó persulfato amónico (APS) (0'0625% p/v) y TEMED (0'0625% v/v).

A los geles se les practicó una pre-electroforesis durante 30 minutos con una intensidad de corriente continua de 36 mA en TBE 0'5-1X. Las muestras se prepararon en tampón desnaturante de formamida 1X (M.1.6), se desnaturaron a 95°C durante 2 minutos y se preservaron en hielo antes de cargarlas en el gel. La electroforesis se realizó en las mismas condiciones que la pre-electroforesis.

Para purificar fragmentos concretos de RNA se utilizaron geles de 1'5 mm de grosor mientras que para resolver ensayos analíticos se utilizaron geles de 0'8 mm y 21 cm de longitud y para ensayos de estructura geles de 0'4 mm y 37 cm de longitud.

Tras la electroforesis, los geles analíticos y de estructura eran transferidos a una lámina de papel Whatman, cubiertos de plástico autoadherente y secados al vacío en un secador de geles a 80°C. Para visualizar las bandas correspondientes a

los diferentes productos de RNA marcados y resueltos en la electroforesis se procedió tal como se indica en M.2.3.3.

M.2.5.3. GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NATIVAS.

Los geles nativos de poliacrilamida se prepararon desde la misma solución maestra que los desnaturalizantes (M.2.5.2). La preparación es similar, salvo que no se añade urea y se hace a una concentración 1X de tampón de electroforesis nativo (M.1.6). Se utilizan polimerizantes APS y TEMED de igual manera.

Los geles se prepararon al 4-6% de poliacrilamida (p/v). La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis nativo (M.1.6) y a 4°C. Durante la electroforesis se corre una primera carga de tampón de carga nativo (M.1.6) con tRNA. Las muestras se preparan a 1X de tampón de carga nativo y se preservan en hielo hasta el momento de la carga. La pre-electroforesis y la electroforesis nunca se realizan a un amperaje superior a 15 mA para geles de 14 cm de longitud y 0'8 mm de grosor.

Los geles, tras la electroforesis, se transferían a láminas de papel Whatman y se secaban y analizaban de igual forma que los anteriores (M.2.3.3).

M.2.6. REACCIONES DE CORTE CON RIBOZIMAS.

Las reacciones de corte se realizaron en 8 µl de volumen final con 192 nmoles de substrato y 19'2 pmoles de RNA catalítico, esto es a una relación 100:1 molar. Ambas moléculas de RNA se marcaron a lo largo de toda la cadena durante la transcripción (M.2.4.1) y posteriormente se purificaron de gel (los RNAs catalíticos fueron marcados con menor actividad específica –una décima parte– tal como se detalla en dicho procedimiento). Seguidamente, ambas moléculas fueron desnaturalizadas a 65°C durante 10 minutos y renaturalizadas a 37°C durante otros 10 minutos por separado y en tampón de corte 1X (M.1.6). Réplicas de cada ensayo se incubaron a 37°C durante un tiempo variable de 0 a 90 minutos, deteniéndose las reacciones por adición de igual volumen de tampón de carga desnaturalizante 2X (M.1.6). Las muestras se mantuvieron en hielo hasta el momento de ser cargadas en geles de electroforesis.

Las reacciones de corte se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (M.2.5.2). Para ello, las muestras fueron desnaturalizadas a 95°C durante 2 minutos y cargadas directamente sin enfriar en geles con pre-electroforesis en marcha. Se recurrió a esta metodología para evitar la aparición de bandas retardadas en el gel correspondientes a complejos entre moléculas con dominios DIS *sense* o *antisense*. Se dedujo que esta dimerización era capaz de producirse en el propio tampón desnaturalizante (M.1.6) durante el paso en hielo previo a ser cargadas en el gel de electroforesis.

La cuantificación de los diferentes productos de corte (M.2.3.3) permitió calcular la cantidad relativa de substrato digerido a lo largo del tiempo para establecer una cinética.

M.2.7. REACCIONES DE DIMERIZACIÓN DEL RNA 5'UTR₃₀₈.

Las reacciones de dimerización se realizaron con 157 nmoles de RNA 5'UTR marcado internamente (M.2.1.4) en 10 µl de volumen final de reacción. Las dimerizaciones se interfirieron con 3'14 pmoles de los diferentes RNAs catalíticos fríos. Ambos RNAs fueron mezclados en 8 µl de agua, desnaturalizados a 65°C durante 10 minutos y renaturalizados a 37°C durante 10 minutos. En este momento se añadieron 2 µl de tampón de dimerización 5X (M.1.6).

La reacción se incubó durante 20 minutos a 37°C y se detuvo añadiéndole igual volumen de tampón nativo de carga (M.1.6). El resultado se resolvió en geles de poliacrilamida nativos en TBE 1X (M.1.6). La electroforésis se realizó también con TBE 1X como tampón, a 4°C y a no más de 15 mA por gel de 14 cm de longitud y 0.8 mm de grosor.

Se procedió con una reacción sin RNA catalítico frío como control positivo de dimerización (M.1.6) y otro también sin RNA catalítico frío y con 2 µl de tampón monomerizante 5X como control negativo de dimerización (M.1.6).

M.2.8. REACCIONES DE UNIÓN DE APTÁMEROS.

Las reacciones de unión de aptámeros aislados o poblaciones de diferentes rondas de selección al RNA de la 5'UTR se realizaron en tampón TMN 1X utilizando

el aptámero o la población marcada a lo largo de la molécula con $\alpha\text{P}^{32}\text{UTP}$ durante su transcripción y la molécula de RNA de la 5'UTR fría.

Para establecer los parámetros químicos de la unión se hizo una tanda de ensayos en los que se fijaba una cantidad de RNA marcado constante y se incubaba con concentraciones crecientes de molécula 5'UTR. Ambas moléculas fueron desnaturalizadas a 65°C durante 10 minutos y renaturalizadas a 37°C durante otros 10 minutos por separado. La reacción de unión se inició con la mezcla de las dos moléculas y se prolongó durante 30 minutos a 37°C.

Estas reacciones se detuvieron mediante la adición de un volumen de tampón nativo de carga 2X (M.1.6) y el resultado se resolvió en geles nativos de poliacrilamida (M.2.5.3). De la cuantificación de los diferentes complejos de unión aptámero-molécula diana y la fracción libre del aptámero (M.2.3.3), se obtuvieron patrones de unión ajustables a los modelos matemáticos: hiperbólico de único sitio de unión (Ecuación 1) y modelo de cooperatividad de Hill de único sitio de unión (Ecuación 2):

$$\text{Ec.1: } Y = B_{max} \cdot X / (K_D + X) \qquad \text{Ec.2: } Y = B_{max} \cdot X^h / (K_D^h + X^h)$$

donde B_{max} es el valor máximo de Y (cuando X tiende a ∞); K_D es el valor de X cuando $Y = B_{max}/2$. Para la ecuación de Hill, h es el coeficiente de Hill e indica el grado de cooperatividad (positiva si $h > 0$ y negativa si $h < 0$).

M.2.9. MAPEO DE ESTRUCTURA DE RNA CON RNAsas y ACETATO DE PLOMO.

M.2.9.1. MAPEO DE ESTRUCTURA DEL RNA CON RNAsas Y ACETATO DE PLOMO.

El objetivo de estos experimentos es detectar la estructura secundaria de una molécula de RNA en base a la diferente sensibilidad de sus nucleótidos al corte con RNAsas y acetato de plomo en función de su disposición de cadena sencilla y cadena doble. La unión de otras moléculas de RNA a la molécula analizada puede traducirse en cambios estructurales en la misma que se detectan mediante

comparación del patrón de degradación con el de un control negativo en presencia de una molécula indiferente.

Para hacer este tipo de reacciones se partió de una cantidad de RNA 5'UTR marcado radiactivamente en su extremo 5' (M.2.4.2) de aproximadamente 100 cuentas por segundo (cps) por reacción. Esta cantidad en μg normalmente es inferior a 2 pmoles de RNA, lo cual nos da un margen para el tratamiento con otros RNAs que beneficie la relación 5'UTR vs aptámero a favor del segundo.

Concretamente las cantidades son 100 cps de 5'UTR y 60 pmoles de aptámero o una cantidad similar en peso de tRNA como control negativo (1'28 μg) y el procedimiento utilizado se detalla a continuación. Ambos RNAs fueron desnaturalizados a 65°C durante 10 minutos y renaturalizados a 37°C durante otros 10 minutos por separado, en TMN 1X y un volumen final de 2'5 μl cada uno. Luego, se mezclaron y se dejaron interaccionar 30 minutos a 37°C.

En este momento se realizó la degradación con los diferentes agentes para comparar los patrones estructurales del 5'UTR unido a los diferentes aptámeros con respecto al control sin aptámero (donde se utiliza como RNA compensador el tRNA). Para ello, cada muestra es degradada en una mezcla final de 10 μl a TMN 1X que contiene: 1'5 μg de tRNA y, según el caso, 0'05 U RNasa T1, 0'2 ng de RNasa A ó una concentración final de 3 mM de acetato de plomo (*Lead (II) Tetrahydrid Acetate*, MERCK). Las tres degradaciones se realizan a 4°C a diferentes tiempos: con RNasa T1 durante 2 minutos; con acetato de plomo durante 20 minutos; y con RNasa A durante 30 minutos.

Las reacciones se detuvieron con la adición de un volumen de tampón de carga denaturalizante 2X para geles de poliacrilamida (M.1.6) y fueron resueltas inmediatamente por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% desnaturalizantes de 30 cm de longitud y 0'4 mm de grosor (M.2.2.3). Las muestras fueron desnaturalizadas a 95°C durante 2 minutos y preservadas en hielo hasta la carga.

Normalmente se hacían dos geles gemelos y se cargaba la mitad de cada muestra en cada uno de manera que en uno de ellos la electroforesis se detuvo cuando el colorante azul de bromofenol avanzó hasta quedar a 4 cm aproximadamente del borde del gel (donde aún los fragmentos más pequeños no han salido) y en el otro se matuvo durante 3-4 horas para resolver la parte más

próxima a 3' de la molécula. La electroforesis se realizó en geles de electroforesis de 0'4 mm de grosor y 37 cm de longitud con tampón TBE 0'5 X y a una intensidad de corriente constante de 25 mA por gel.

M.2.9.2. REACCIÓN DE DIGESTIÓN CON RNasa T1.

La digestión en condiciones desnaturizantes con RNasa T1 sirvió para conseguir un marcador de peso molecular correspondiente a los tamaños de todos los fragmentos comprendidos entre el extremo 5' y cualquier nucleótido de guanina de la molécula. Esto es necesario para interpretar los geles de estructura por RNasas y acetato de plomo (M.2.9.1), ya que facilita la identificación de las posiciones de corte de estos agentes y la propia RNasa T1.

Para esta reacción se incubaron 100 cps de RNA 5'UTR marcado radiactivamente en 5' (M.2.4.2) con 0'05 U de RNasa T1, 3 µg de tRNA y tampón 1X de digestión con RNasa T1 (M.1.2.3) en un volumen final de 10 µl durante 1-2 minutos a 65°C.

La reacción se detuvo por adición de un volumen de tampón desnaturizante de carga 2X (M.1.6) y fue conservada en hielo. Antes de la carga las muestras se desnaturizaron a 95°C durante 1 minuto. Normalmente, de esta reacción se cargó la mitad del volumen en dos geles gemelos tal como se detalla en M.2.9.

M.2.9.3. REACCIÓN DE HIDRÓLISIS ALCALINA.

La reacción de hidrólisis alcalina tenía el propósito de generar un patrón de degradación del RNA en fragmentos con una diferencia de tamaño de un nucleótido que sirva para, por comparación, determinar con exactitud el tamaño de los diferentes fragmentos generados en los mapeos de estructura. Esta reacción se realizó con 100 cps de RNA 5'UTR marcado radiactivamente en su extremo 5' (M.2.4.2) en un volumen final de 10 µl en un tampón de carbonato y bicarbonato sódico 0'17 M cada uno, pH 9'5 y en presencia de 1 µg de tRNA. La reacción tuvo lugar a 95°C durante 1-2 minutos, se detuvo mediante la adición de tampón de carga desnaturizante para geles de poliacrilamida (M.1.6) y fue preservada en hielo

hasta el momento de la carga en dos geles gemelos. Igualmente a los dos casos anteriores, sólo se cargó en cada gel la mitad de la reacción.

M.2.10. SELECCIÓN MOLECULAR *IN VITRO*.

La selección molecular *in vitro* se realizó con una población de partida que contiene 25 nucleótidos de secuencia aleatoria con dos regiones flanqueantes de secuencia conocida. Esta población de partida se consiguió transcribiendo (M.2.1.4) un molde de DNA generado por hibridación y extensión (M.2.1.2) de los oligodeoxirribonucleótidos 5'EcoRIK y 3'RANDOMK.

- 5'EcoRIK: 5'-GGATAATACGACTCACTATAGGGAATTCAA-3'

- 3'RANDOMK: 5'-GTCGAGCTCGTAGTATCAGATCACTCCATNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNTTGAATTCCTATAGTG-3'

La diana fue transcrita (M.2.1.4) desde un molde de DNA generado por PCR (M.2.1.3) sobre el plásmido pNL4.3 con los cebadores 5'T7pNL4.3 y 3'T7pNL4.3. Estos cebadores hibridan respectivamente en el extremo 5' y 3' de la región 5'UTR común a todos los mRNAs virales, y el primero de ellos incorporó el T7P. La transcripción se escaló a un volumen final de 500 µl con una concentración final de UTP-biotinilado (ROCHE) de 0'106 mM. La secuencia de estos cebadores es:

- 5'T7pNL4.3: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGTCTCTCTGGTTAG-3'

- 3'T7pNL4.3: 5'-AATTTTTGGCGTACTCACCAGT-3'

Ambas transcripciones fueron fenolizadas, precipitadas (M.2.2.3) y resuspendidas respectivamente en 1 ml de TMN 1X y tampón de unión (BB) recomendado por el fabricante de las columnas de cromatografía. Para llevar a cabo el fraccionamiento necesario en el proceso se utilizaron minicolumnas cromatográficas de sefarosa-estreptavidina (*HiTrapTM Streptavidine HP*, AMERSHAM BIOSCIENCES).

Para el paso de fluidos a través de las columnas se siguieron las recomendaciones del fabricante tal como se detalla a continuación. Las columnas se equilibraron con 10 ml de BB y luego se introdujo el RNA 5'UTR biotilado y previamente desnaturalizado a 65°C durante 10 minutos y renaturalizado a 37°C durante 10 minutos. Luego se lavó la columna con otros 10 ml de BB y se equilibró con 10 ml de TMN 1X. Seguidamente se introdujo la población de moléculas de

RNA y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura de unión. La temperatura de incubación para la unión fue de 25°C para las tres primeras rondas y de 37°C para las demás. La fracción de la población no adherida se eliminó mediante lavado con 10 ml de TMN 1X a temperatura de unión y la fracción unida se recupera por elución con 10 ml de TMN 1X a 95°C.

De los 10 ml recuperados se utilizaron las 4 primeras fracciones de 1 ml, se concentraron mediante el kit de *Centricon Ultracel YM-3* (AMICON BIOSEPARATIONS, MILLIPORE) y se precipitaron para ser resuspendidas en 20 µl de agua. En cada ronda se guardaban 10 µl como reserva de seguridad y los otros 10 µl eran retrotranscritos y amplificados por PCR mediante el kit de *Tth DNA polymerase* (PROMEGA) siguiendo las especificaciones del fabricante y utilizando los cebadores 3'XhoIK (5'-GTCGAGCTCGTAGTATCAGATCACTCCAT-3') y 5'EcoRIK. El reamplificado era fenolizado, precipitado y resuspendido en 20 µl de agua (M2.2.3). De nuevo, 10 µl se preservaban como reserva de seguridad y los restantes eran usados como molde de una nueva transcripción (M.2.1.4) con la que se reiniciaba otra ronda.

Las columnas de cromatografía fueron reutilizadas durante tres rondas. Antes de cada ronda la molécula de 5'UTR incorporada fue desnaturalizada renaturalizada mediante el paso de 10 ml de tampón TMN 1X a 95°C y 10 ml de tampón TMN 1X a 37°C. Cada tres rondas se desechaba la columna y se utilizaba una nueva, donde se introducía una nueva carga de molécula 5'UTR biotinilada.

Para el primer ciclo se utilizaron dos columnas ensambladas en tandem de modo que tan solo la columna inferior contenía molécula diana. Tras la incubación para unión las columnas fueron desensambladas y sólo se lavó y se eluyeron moléculas de la columna inferior. De este modo se estableció paso de selección negativa contra moléculas que pudieran seleccionarse por unión inespecífica a la columna.

Se hicieron un total de 14 rondas. La población inicial teórica se estimó en más de 10^{14} moléculas, número de variantes posibles con 25 nucleótidos de secuencia aleatoria. Las columnas utilizadas en las rondas I a X contenían una cantidad estimada de moléculas 5'UTR suficientes para satisfacer una relación 1:1 con respecto a la cantidad de variantes. En las rondas XI a XIV esta cantidad se redujo, estimándose una relación 1:1.000 molar entre 5'UTR y población.

Fracciones representativas de los amplificadores de DNA de algunas poblaciones fueron ligados en el vector *pGEM®-T easy* (M.1.7) siguiendo las indicaciones del fabricante y dicha ligación fue utilizada para transformar bacterias *Escherichia coli* DH5 α (M.2.15). Un número representativo de clones de cada transformación fueron secuenciados automáticamente (M.2.20) para seguimiento de la selección.

M.2.11. CULTIVO DE CÉLULAS PROCARIOTAS.

Los cultivos bacterianos de *Escherichia coli* DH5 α para la preparación de células competentes, para la congelación de cepas transformadas o para la extracción de DNA plasmídico se hicieron en medio LB líquido a 37°C y en agitación evitando no alcanzar la fase estacionaria del crecimiento. En los casos pertinentes se adicionó al medio antibiótico ampicilina a una concentración final de 50 μ g/ml para garantizar la preservación del plásmido deseado portador del gen de resistencia.

Los cultivos bacterianos de cepas transformadas o de siembra por agotamiento para aislamiento de colonias se hicieron en placas de Petri con medio LB-agar suplementado con antibiótico ampicilina, así como con X-gal e IPTG en caso pertinente para la identificación de inserciones positivas por color diferencial (M.1.15). Estos cultivos se incubaron en estufas a 37°C durante toda la noche para obtener colonias. Para el análisis de las colonias transformadas y la preservación de la posible cepa de interés hasta su criopreservación se utilizaron cultivos en LB-agar de las mismas características donde se practica siembra en estrías ordenadas de colonias tomadas con puntas de pipeta o palillos estériles.

M.2.12. CRIOPRESERVACIÓN DE CÉLULAS PROCARIOTAS.

Las estrías de aquellos clones que se seleccionaron para su criopreservación se utilizaron para inocular un minicultivo de 5 ml que se creció toda la noche. Una fracción de este minicultivo fue utilizada como un preinóculo para un nuevo cultivo que se creció hasta alcanzar una DO_{600nm} entre 0'4 y 0'6. En esta fase, 500 μ l de cultivo fueron mezclados con igual volumen de LB-glicerol 1:1

y congelados directamente a -80°C para su conservación. En ocasiones este mismo procedimiento se inició inoculando un cultivo desde otro vial criocongelado si se necesitaba hacer un duplicado del vial criocongelado.

M.2.13. CULTIVO DE CÉLULAS EUCARIOTAS.

La línea celular HEK293T se cultivó en medio DMEM suplementado con L-glutamina 2 mg/l, FBS 10% y gentamicina 40 mg/l en incubadores a 37°C y 5% de presión parcial de CO_2 . Periódicamente los cultivos habían de ser propagados para evitar un estado de confluencia máxima. Esta propagación se conseguía tripsinizando la monocapa celular; eliminando el medio con tripsina mediante centrifugado de células a 1.200 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y aspiración del sobrenadante; y la posterior resuspensión del *pellet* celular. Como medida estándar de células semiconfluentes, la dilución realizada fue a una décima parte de las células iniciales.

La línea celular Jurkat se cultivó en medio RPMI suplementado con L-glutamina 2 mg/l, FBS 10% y gentamicina 40 mg/l en incubadores a 37°C y 5% de presión parcial de CO_2 . Periódicamente las células fueron propagadas para evitar una acidificación excesiva del medio y un deterioro del cultivo. Esta propagación se conseguía diluyendo una décima fracción del cultivo en un volumen similar al original con medio fresco.

Los medios de cultivo eran preparados en campana de flujo laminar, filtrados con filtros de $0.22\ \mu\text{m}$ o con sistemas de filtrado por vacío *SteriCup* (ambos de Millipore) y alícuotados en tubos estériles de 50 ml que se mantenían a 4°C hasta su uso. Los medios de congelación eran preparados y filtrados de igual manera, y se conservaban congelados a -20°C hasta su uso.

M.2.14. CRIOCONSERVACIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS.

Para conservar líneas celulares, éstas fueron primero cultivadas hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Los cultivos, tripsinizados en caso de ser adherentes, se centrifugaron para sedimentar sus células y éstas fueron resuspendidas en un volumen adecuado de medio de congelación para conseguir

una concentración final de células de entre 10^6 y 10^7 células/ml. Para la congelación se alicuotaron 2 ml de cultivo para congelación en cada criotubo y se congelaron mediante un descenso progresivo de la temperatura desde 4°C hasta los -195°C del vapor de nitrógeno líquido.

M.2.15. TRANSFORMACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI*.

M.2.15.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.

Las células competentes que se utilizaron fueron células competentes para transformación por choque térmico, preparadas por el método del cloruro cálcico (412), o células competentes para transformación por electroporación (*i.e.* células electrocompetentes).

- CÉLULAS COMPETENTES PARA TRANSFORMACIÓN POR CHOQUE TÉRMICO: Un cultivo de *Escherichia coli* DH5 α se creció en LB líquido a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de entre 0'4 y 0'6. Como preinóculo de dicho cultivo se utilizó un minicultivo de 5 ml inoculado directamente desde la estirpe congelada en glicerol y crecido del mismo modo durante toda la noche. El cultivo principal fue centriugado a 4°C durante 7 minutos a 6.000 g para sedimentar las células. El sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en 0'5 volúmenes de cloruro cálcico 50 mM a 4°C. Este cultivo fue seguidamente incubado 30 minutos en hielo e inmediatamente centrifugado de nuevo del mismo modo, descartando el sobrenadante y resuspendiendo las células en 0'05 volúmenes del original a una concentración de cloruro cálcico 50 mM a 4°C. Estas células fueron conservadas en estado de competencia durante 48 horas a 4°C.

- CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES: Se creció un cultivo de *Escherichia coli* DH5 α en 0'5-1 litro de LB durante 4-5 horas en agitación a 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0'6. Como preinóculo se utilizaron 1'25-2'5 ml de un minicultivo de 25 ml crecido desde una única colonia durante una noche a 37°C en agitación. Cuando se alcanzó la DO_{600nm} de 0'6, el cultivo se colocó en hielo durante 15-25 minutos y se centrifugó a 4.000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y se hicieron 2-3 lavados del siguiente modo: se resuspendió el precipitado con cuidado en 250 ml de agua miliQ estéril a 4°C, se centrifugó a 4.000 g durante 10

minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se realizó un lavado adicional del mismo modo pero con 250 ml de agua miliQ al 10% de glicerol. Seguidamente, se resuspendió el precipitado en 0'85-1 ml de agua miliQ al 10% de glicerol estéril y a 4°C pipeteando y se colocó el vial en hielo para posteriormente alicuotar el contenido. Las alícuotas se fueron colocando en una mezcla de nieve carbónica y etanol, para luego guardarlas a -80°C hasta su uso.

M.2.15.2. TRANSFORMACIÓN.

- TRANSFORMACIÓN POR CHOQUE TÉRMICO: Las células preparadas por el método del carbonato cálcico fueron transformadas por choque térmico tal como se describe a continuación. Entre 10 y 100 ng de DNA fueron añadidos a 200 µl de células competentes. Esta mezcla se incubó 30 minutos a 4°C previamente a un choque térmico de 42°C durante 90 segundos para luego enfriarla rápidamente en hielo durante 5 minutos. A continuación se añadió 1 ml de LB precalentado a 37°C a la mezcla y se incubó durante 30 minutos a 37°C en agitación suave.

Habitualmente se sembraron dos placas de LB-agar con células transformadas. En una de ellas se sembraron 200 µl de cultivo transformado. Paralelamente, las células del resto del cultivo se sedimentaron mediante centrifugado, el sobrenadante fue descartado, y el sedimento fue resuspendido en 200 µl de medio LB líquido y sembrado. Las placas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche para conseguir colonias aisladas.

- TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN: En el caso de las células electrocompetentes fue preciso extremar la cautela con la muestra de DNA. Se tienen más garantías de éxito cuanto menor es la cantidad de sales en la muestra de DNA y menor la temperatura a la que se produce la descarga eléctrica (sin llegar a la congelación). La muestra de DNA se dializó contra agua destilada mediante membranas MILLIPORE MF™ de diálisis de 0'025 µm VSWP durante 30 minutos y las cubetas de electroporación se enfriaron previamente. Se mezclaron 50 µl de células con entre 10 y 100 ng de DNA en cada cubeta y la mezcla se sometió a una descarga eléctrica en el electroporador BTX *ELECTRO CELL MANIPULATOR®600* (Condiciones: 129 Ω *resistance timing*; 2'5 kV/*resistance* y 2'4 kV *charging voltage*). Se añadió 1 ml de LB líquido precalentado a cada cubeta de

electroporación y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se sembraron 200 µl de este cultivo en una placa de LB-agar y ésta se incubó a 37°C durante toda la noche. El resto se conservó a 4°C en previsión de una nueva siembra.

M.2.15.3. SELECCIÓN DE CÉLULAS RECOMBINANTES DE *ESCHERICHIA COLI*. PCR A PARTIR DE COLONIA.

Para la selección de las células transformadas (M.2.15.2), el cultivo resultante de la electroporación o el choque térmico fue plaqueado en LB-agar suplementado con el antibiótico al que confiere resistencia el DNA transformado, en este caso ampicilina (M.1.5). En el caso de plásmidos cuyo sitio de policlonación se encuentre interrumpiendo el gen de la β-galactosidasa (como pGEM-T *easy*), la reducida longitud de secuencias con que se trabajó aumentaba la posibilidad de que la interrupción de dicho gen por el inserto no sea improductiva, de modo que, a pesar de la discriminación de colonias por color diferencial en placas con IPTG y X-gal, los clones fueron chequeados por PCR a partir colonia.

Para la PCR a partir de colonia se utilizó el *kit ReddyMix* (M.1.10) con dos cebadores. Para chequear inserciones direccionales concretas se utilizó un cebador que hibridaba en el vector cerca del MCS y otro que hibridaba en el inserto de tal manera que sólo ante un clonaje en la dirección adecuada se podía producir una amplificación productiva. Para chequear inserción positiva o negativa en cualquier sentido se utilizaron cebadores que hibridaban en el vector a ambos lados del sitio de clonación y la discriminación se hizo por tamaño del amplificado. El tamaño de los amplificados se deduce de su electroforesis en geles de agarosa.

M.2.16. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS.

M.2.16.1. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS ADHERENTES HEK293T.

Las línea celular HEK293T se creció en monocapa en medio DMEM suplementado (M.1.5). Estas transfecciones se realizaron en placas de 24 pocillos para poder someter a las células a diferentes tratamientos. Se hicieron dos tipos de ensayos: cotransfección de pNL4.3 junto con RNAs desnudos o bien junto con

plásmidos de expresión pU6. También, para generar partículas virales de VIH-1 infectivas se transfectaron cultivos celulares de la línea HEK293T exclusivamente con pNL4.3, de modo que se utilizaba el sobrenadante como medio infeccioso.

En cualquiera de los tres casos el procedimiento fue similar y se describe a continuación. El día previo a la transfección se sembraron 250.000 células en cada pocillo de la placa en un volumen final de 500 μ l de medio DMEM suplementado sin antibiótico alguno (está contraindicado por el fabricante de los agentes transfectantes).

El día de la transfección se prepararon, para cada pocillo de células, una mezcla en tubos de polipropileno de 0'5 ml que contenía 25 μ l de medio de cultivo OPTIMEM (M.1.5) y 100 ng de pNL4.3 más el agente inhibidor testado, que fue, 500 ng de cada RNA presintetizado o 300 ng de vector de expresión pU6. Para conseguir sobrenadantes infecciosos únicamente se transfectaron los 100 ng de pNL4.3. En otro tubo similar se prepararon, también para cada pocillo de células, 25 μ l de OPTIMEM con 1 μ l de lipofectamina (INVITROGEN *Lipofectamine 2000 reagent*) y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente.

Tras esto, la solución de agente transfectante y de mezcla a transfectar se juntaron en un solo tubo y se incuban a temperatura ambiente durante 20 minutos para que se produjese la asociación entre lipofectamina y ácidos nucleicos. Tras los 20 minutos la reacción de asociación se detuvo con la adición de 450 μ l de medio DMEM suplementado sin antibiótico. Acto seguido se eliminó el sobrenadante de los pocillos por aspiración y se añade la mezcla de transfección.

Los sobrenadantes fueron recogidos 48 horas después y la concentración de antígeno p24 viral en los mismos fue medida (M.2.18). Los sobrenadantes virales para ser utilizados como medios infecciosos en otras células fueron alicuotados y preservados a -80°C indefinidamente.

M.2.16.2. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN JURKAT.

La línea celular Jurkat creció en suspensión en medio RPMI suplementado (M.1.5). La transfección se realizó en placas de 24 pocillos utilizando 300 ng de DNA plasmídico pU6 para cada uno tal como se describe a continuación.

El día de la transfección se plaquearon 250.000 células en 500 μ l de RPMI suplementado y sin antibiótico en cada pocillo de una placa de 24. A continuación, se prepararon dos tubos de poliestireno de 0'5 ml con 50 μ l de OPTIMEM (M.1.5) en cada uno de ellos. En uno se añadieron 300 ng del DNA a transfectar y en el otro 1 μ l de lipofectamina (INVITROGEN *Lipofectamine 2000 reagent*) y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de mezclarlos e incubarlos de nuevo a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras esto se les añadió a cada mezcla 450 μ l de RPMI suplementado y sin antibiótico. Finalmente, los 500 μ l de mezcla total fueron añadidos al pocillo con el cultivo.

M.2.17. INFECCIÓN DE CÉLULAS JURKAT CON VIH-1.

La infección se realizó con sobrenadantes celulares de HEK293T transfectados con pNL4.3 (M.2.16.1) recogidos tras 48 horas. Estos sobrenadantes se alicuotearon y se conservaron a -80°C hasta el momento de la infección.

La infección se produjo a 24 y a 48 horas tras la transfección de las células Jurkat (M.2.16.2) y se utilizaron 250.000 células para cada ensayo. Puesto que se ha comprobado que la línea celular Jurkat duplica su población en 24 horas, en el primer caso se tomó la mitad del volumen de cultivo transfectado (500 μ l) y en el segundo una cuarta parte (250 μ l). Estos volúmenes fueron transferidos a tubos estériles de 15 ml y a los que se añaden los 20 ng de antígeno p24 viral de un sobrenadante obtenido como se describe en M.2.16.1. y previamente titulado (M.2.18).

Los cultivos infectados fueron agitados suavemente e incubados en estufas a 37°C y presión de CO₂ del 5% durante 3 horas con el tapón ligeramente desenroscado para que se produzca el intercambio de gases. Tras las 3 horas, los cultivos fueron centrifugados a 1.250 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue retirado por aspiración, el precipitado de células fue resuspendido en 500 μ l de medio RPMI suplementado y el cultivo resultante fue transferido a un pocillo de una placa de 24.

Tras 5 días desde la infección los sobrenadantes celulares fueron analizados para cuantificar el antígeno p24 viral presente en los mismos (M.2.18).

M.2.18. CUANTIFICACIÓN DE ANTÍGENO VIRAL p24 EN EL SOBRENADANTE CELULAR.

Para esta cuantificación se utilizó el kit BIO-RAD *Genscreen HIV-1 Ag Assay* basado en la técnica de enzima-inmunoensayo que genera unas lecturas colorimétricas obtenidas en un lector de placas *VERSAmax Microplates Reader* (MOLECULAR DEVICES). Para realizar una cuantificación absoluta se calibró una recta de regresión calculada con mediciones de concentraciones conocidas de antígeno p24 viral.

El volumen de muestra necesario para cada medición era de 150 μ l y el rango de detección que mantiene una escala lineal era muy estrecho, con lo que fue preciso hacer diluciones de los sobrenadantes celulares a medir y extrapolar los datos de aquellas cuyas mediciones se encontraban dentro del rango fiable.

Así pues, cada sobrenadante celular de cultivos de la línea HEK293T fue transferido a tubos de 1'5 ml directamente y se practicaron diluciones seriadas de 1 orden de magnitud en volúmenes de 1 ml de medio de cultivo. Los cultivos de la línea Jurkat infectados fueron transferidos a tubos de 1'5 ml y éstos centrifugados a 270 g (2.000 rpm en una centrífuga *MiniSpin Plus* EPPENDORF) durante 3 minutos para precipitar las células y poder transferir el sobrenadante viral limpio a tubos nuevos. Es desde estos sobrenadantes desde los que se procedió a hacer las diluciones seriadas.

Las diluciones fueron almacenadas a -80°C hasta el momento del análisis. Normalmente, en el momento de la extracción, se analizó una serie de diluciones del control negativo sin agente inhibidor para establecer el rango de dilución en el que se había de medir en el resto de muestras.

Para la medición de las muestras se procedió tal como indican las instrucciones del fabricante del kit. Toda la manipulación se realizó en campana de flujo laminar dentro de una sala de cultivo de nivel de bioseguridad P2 extendido. Los residuos líquidos y el material de plástico que entró en contacto con los cultivos fue almacenado en un contenedor específico al efecto e inactivado mediante adición de virucida (*Virkon S*, de DU PONT). Tras esto, los residuos líquidos fueron aspirados y depurados por la vía normal de residuos líquidos de la instalación. Los residuos sólidos, en cambio, fueron subsiguientemente

autoclavados dentro de la instalación antes de que fuesen desechados por la vía normal de residuos sólidos de la misma.

M.2.19. CUANTIFICACIÓN DE mRNAs CELULARES.

La detección de la inducción de la respuesta a interferón se realizó mediante PCR semicuantitativa sobre cDNA procedente de RNA total extraído de células (M.2.2.2) utilizando dos parejas de cebadores. La primera de ellas amplificó sobre el cDNA procedente del mRNA del gen estimulado por interferón nº56 (ISG56), que se usó como indicador de la inducción de la respuesta a interferón. La segunda pareja de cebadores lo hacía sobre el cDNA procedente del mRNA del gen de la GAPDH, que se utilizó como control interno de normalización. La secuencia de los cebadores era:

- ISG56/5': 5'-CTTGAGCCTCCTTGGGTTCG-3'.
- ISG56/3': 5'-GCTGATATCTGGGTGCCTAAG-3'.
- GAPDH/5': 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'.
- GAPDH/3': 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'.

Para las diferentes reacciones se utilizaron 2'5 µl del producto de la reacción de reversotranscripción (M.2.1.5). La reacción se realizó en 10 µl de volumen final con 5 µl de 2X *Reddy Mix*, 3 pmoles de cebadores GAPDH/5' y GAPDH/3', y 10 pmoles de cebadores ISG56/5' e ISG56/3'. Se utilizó un protocolo estándar (M.2.5.1) en el que se realizaron 30 ciclos de amplificación con una temperatura de hibridación de 55°C y un tiempo de extensión de 1 minuto.

El resultado de las amplificaciones se resolvió en geles de agarosa al 2% (M.2.1.3).

M.2.20. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE DNA.

Las reacciones de secuenciación de DNA se realizaron en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (CSIC) con un equipo 3130xl *Genetic Analyzer* (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, CA, USA). Se siguieron las indicaciones que se detallan en la página web de dicho servicio

www.ipb.csic.es. Las secuencias fueron analizadas posteriormente con los softwares *4peaks* y *DNA/SIS Max*.

RESULTADOS

R.1. RNAs *ANTISENSE* CATALÍTICOS CONTRA VIH-1.

En esta primera parte de resultados se describirá el desarrollo de RNAs quiméricos compuestos de una región con función ribozima dirigida contra la región 5'UTR común a todos los RNAs virales, combinada con otra con función *antisense* o *decoy* dirigida contra la región DIS con el propósito de interferir con la dimerización (Fig. 28).

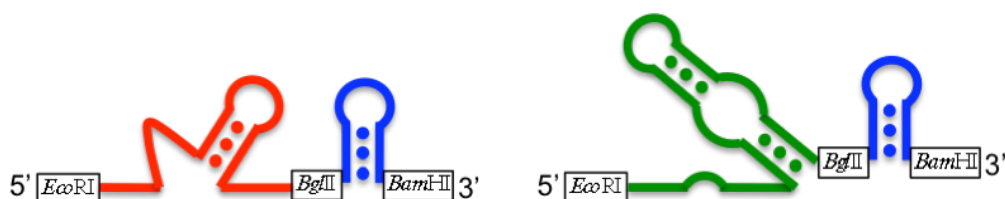


Figura 28. Representación esquemática de las quimeras ensayadas. En cada construcción se combinó una región con función ribozima en 5' y otra con función anti-DIS en 3' (azul). Se usaron motivos catalíticos de corte en *trans* de tipo *hammerhead* (rojo) y de tipo *hairpin* (verde).

La cepa de VIH-1 con la que se trabajó fue la denominada NL4.3, de tipo X4 y con subtipo DIS LAI. La secuencia de la región 5'UTR común se muestra a continuación. En negrita se destaca el fragmento que se utilizará para los experimentos *in vitro* y que se denominará 5'UTR₃₀₈; subrayado se indica el AUG de inicio de traducción.

```

5' GGGUCUCUCU GGUUAGACCA GAUCUGAGCC UGGGAGCUCU CUGGCUAACU
AGGGAACCCA CUGC UUAAGC CUCAAUAAAG CUUGCCUUGA GUGCUCAAAG
UAGUGUGUGC CCGUCUGUUG UGUGACUCUG GUAACUAGAG AUCCUCAGA
CCCUUUUAGU CAGUGUGGAA AAUCUCUAGC AGUGGCGCCC GAACAGGGAC
UUGAAAGCGA AAGUAAAGCC AGAGGAGAUC UCUCGACGCA GGACUCGGCU
UGCUGAAGCG CGCACGGCAA GAGGCGAGGG GCGGCGACUG GUGAGUACGC
CAAAAUUUU GACUAGCGGA GGCUAGAAGG AGAGAGAUGG GUGCGAGAGC
GUCGGUAUUA AG...3'

```

Como RNAs catalíticas en *trans* se utilizaron los dominios mínimos de las ribozimas *hairpin* y *hammerhead* (respectivamente HH y HP en adelante). La

secuencia de las regiones de interacción entre los dominios catalíticos en *trans* y la diana fueron diseñados adecuadamente para aparear con las regiones en torno a la posición +113 y +159 de la diana 5'UTR₃₀₈. Se ha comprobado previamente que estas regiones cumplen los requerimientos mínimos de secuencia para el corte por ribozimas (Tabla 4), lo cual ha sido ratificado experimentalmente (271). La capacidad catalítica de ambas ribozimas ha resultado significativamente mejorada mediante su combinación con dominios *antisense* y aptámeros contra la región TAR (271), asociándose su capacidad inhibidora a una mejora en la interacción de la ribozima con la diana ocasionada por la región anti-TAR.

Requerimiento <i>hairpin</i>	5' -NNRYN	GNNBNNNNN-3'
Secuencia NL4.3 113	5' -UGCCC	GUCUGUUGU-3'
Secuencia NL4.3 159	5' -UUUUA	GUCAGUGUG-3'
Requerimiento <i>hammerhead</i>	5' -NNNNNNHH	NNNNNN-3'
Secuencia NL4.3 113	5' -UGCCCGUC	UGUUGU-3'
Secuencia NL4.3 159	5' -UUUUAGUC	AGUGUG-3'

Tabla 4. Posiciones óptimas para el corte con ribozimas. Las secuencias se representan con el código N, para cualquier nucleótido; B, para C, G ó U; H para A, C ó U; Y para C ó U; y R para A ó G.

La región DIS podría constituir otro punto de anclaje para facilitar del mismo modo la interacción de la ribozima con su diana. Esta idea viene apoyada por el mecanismo natural de actuación de la región DIS, involucrada en interacciones estables RNA-RNA previamente descritas en la introducción. Las moléculas quiméricas ribozima-anti-DIS podrían no solo mejorar la actividad catalítica de corte de la diana, sino también interferir con la función natural de la región DIS, teniendo un doble efecto inhibitorio. Como dominio anti-DIS fueron utilizados dos tipos de moléculas DIS: *sense* y *antisense*, ambas correspondientes a la horquilla apical del domino (Fig. 29).

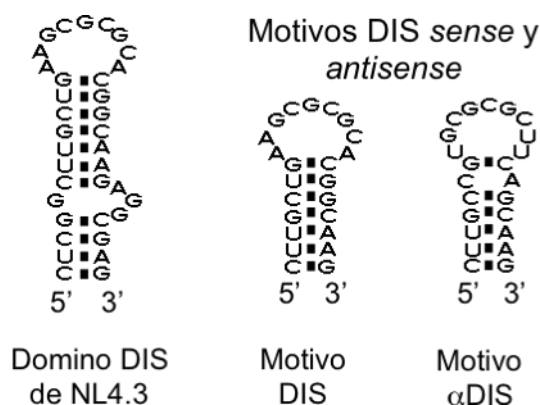


Figura 29. Motivos DIS referentes al estudio. A la izquierda se muestra el dominio DIS de la cepa NL4.3. La horquilla por encima del lazo interno fue utilizada como motivo *sense* en los RNAs quiméricos, así como su secuencia *antisense*, ambas denominadas respectivamente DIS y αDIS en la parte derecha.

R.1.1. CONSTRUCCIÓN DE LAS MOLÉCULAS QUIMÉRICAS.

Para la construcción de las moléculas quiméricas se diseñaron pares de oligodeoxirribonucleótidos sintéticos capaces de hibridar y generar un fragmento de DNA bicatenario con extremos protuberantes similares a los que habrían quedado por la digestión enzimática con las enzimas de los sitios de clonación (Fig. 30). Siguiendo esta estrategia se diseñaron fragmentos de DNA con la secuencia de las ribozimas *hammerhead* y *hairpin* dirigidas ambas contra las posiciones 113 y 159 y flanqueadas por extremos protuberantes en 5' y 3' respectivamente para su clonación en sitios de corte por *EcoRI* y *BglIII*.

Del mismo modo, se diseñaron fragmentos con la secuencia del motivo DIS *decoy* y DIS *antisense* mostrados en la figura 29 flanqueadas por extremos protuberantes en 5' y 3' respectivamente para su clonación en los sitios de corte por *BglIII* y *BamHI*. Todos los fragmentos fueron fosforilados con T4 polinucleótido kinasa para conseguir extremos 5'-fosfato, pues los oligonucleótidos sintéticos tienen extremos 5'-hidroxilos incompatibles con las reacciones de ligación.

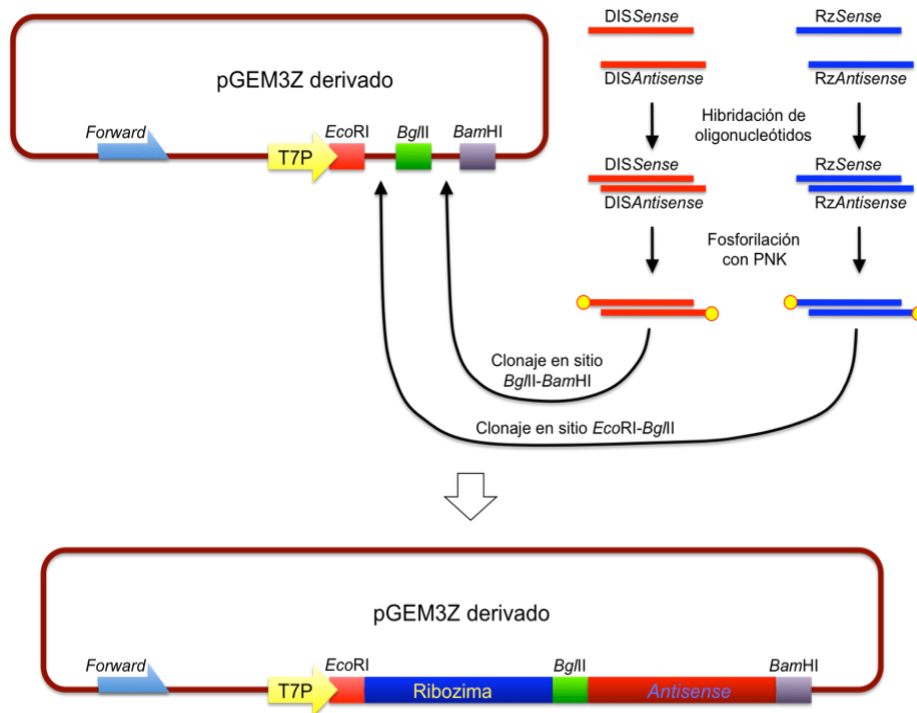


Figura 30. Esquema de estrategia de construcción para vectores portadores de la secuencia de los RNAs *antisense* catalíticos. Las construcciones disponen de un sitio de hibridación del cebador estándar *Forward* en 5' del promotor de la T7 RNA polimerasa.

Los fragmentos con las cuatro ribozimas (HH113, HH159, HP113 y HP159) fueron clonados entre los sitios de corte de las enzimas *EcoRI* y *BglII* en el vector de clonación pGEM®3Zf. A cada una de las cuatro construcciones se les clonó tanto el dominio DIS *decoy* o *antisense* entre los sitios de corte de las enzimas *BglII* y *BamHI*, generándose las ocho construcciones que se muestran en la figura 31. A todas estas construcciones se las denominó serie pK seguida del nombre de la ribozima y el dimino *antisense* o *decoy* que portaban.

Como sistema de expresión para ensayos *ex vivo* en cultivos celulares de la línea HEK293T se utilizó el promotor del snRNA U6, siendo la base para las construcciones el plásmido pU6 (404). En este plásmido el sitio de clonación de secuencias para expresión se encuentra flanqueado por dianas de las enzimas de restricción *KpnI* y *ApaI*. Por eso, para las construcción de estos nuevos vectores se procedió amplificando por PCR las secuencias de la serie pK con cebadores que incorporasen los sitios de restricción *KpnI* y *ApaI* en los extremos 5' y 3' respectivamente. Estos cebadores fueron 5'*KpnI*pK (5'-GACTCGGTACCGGGCGAA TT-3') y 3'*ApaI*pK (5'-TCTAGAGGGCCCTTGC-3').

	<i>EcoRI</i>	<i>Hammerhead</i>	<i>BglIII</i>	DIS o α DIS	<i>BamHI</i>
HH113 DIS	5'-GAAUUC	ACAACACUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAACGGGCA	AGAUCU	CUUGCUGAAGCGCGCACGGCAAG	GGAUCC-3'
HH113 α DIS	5'-GAAUUC	ACAACACUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAACGGGCA	AGAUCU	CUUGCUGCGCGCUUCAGCAAG	GGAUCC-3'
HH159 DIS	5'-GAAUUC	CACACUCUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAACUAAAA	AGAUCU	CUUGCUGAAGCGCGCACGGCAAG	GGAUCC-3'
HH159 α DIS	5'-GAAUUC	CACACUCUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAACUAAAA	AGAUCU	CUUGCUGCGCGCUUCAGCAAG	GGAUCC-3'

	<i>EcoRI</i>	<i>Hairpin</i>	<i>BglIII</i>	DIS o α DIS	<i>BamHI</i>
HH113 DIS	5'-GAAUUC	ACAACAAGAAGGCAACCAGAGAAACACACGACGUAAGUCGUGGUACAUAUACUGGUA	AGAUCU	CUUGCUGAAGCGCGCACGGCAAG	GGAUCC-3'
HH113 α DIS	5'-GAAUUC	ACAACAAGAAGGCAACCAGAGAAACACACGACGUAAGUCGUGGUACAUAUACUGGUA	AGAUCU	CUUGCUGCGCGCUUCAGCAAG	GGAUCC-3'
HH159 DIS	5'-GAAUUC	CACACUAGAAGAAAACCAGAGAAACACACGACGUAAGUCGUGGUACAUAUACUGGUA	AGAUCU	CUUGCUGAAGCGCGCACGGCAAG	GGAUCC-3'
HH159 α DIS	5'-GAAUUC	CACACUAGAAGAAAACCAGAGAAACACACGACGUAAGUCGUGGUACAUAUACUGGUA	AGAUCU	CUUGCUGCGCGCUUCAGCAAG	GGAUCC-3'

Figura 31. RNAs antisense catalíticos contruidos. La figura muestra las secuencias de las diferentes construcciones generadas. Los diferentes bloques de las quimeras están separados por las enzimas de restricción correspondientes. A la izquierda de cada línea se muestra el nombre de la construcción correspondientes. En sombreado se destacan las regiones en cada RNA catalítico que constituyen los puntos de interacción con la diana.

La digestión con estas dos enzimas de restricción de amplificandos y vector permitió la ligación de los mismos. A esta serie de construcciones se les llamó genéricamente pU6 y, lamentablemente, algún tipo de incompatibilidad sólo permitió conseguir exitosamente las construcciones pU6HH113 α DIS, pU6HP113 α DIS, pU6HP159 α DIS, pU6HP113DIS, pU6HH159 α DIS y pU6HP159DIS. La síntesis de RNAs en el interior celular bajo esta construcción genera transcritos flanqueados por las horquillas 5' y 3' del propio snRNA U6 (Fig. 32).

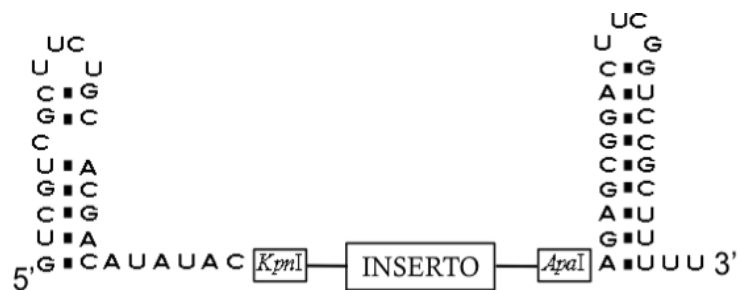


Figura 32. Esquema de los RNAs utilizados *ex vivo* tanto presintetizado *in vitro* como mediante su síntesis dirigida bajo el promotor U6 mediante transfección de vectores plasmídicos. Los RNAs inhibidores fueron clonados entre los sitios *KpnI* y *ApaI* dentro del vector pU6 de modo que los RNAs quiméricos se encuentran flanqueados por las horquillas del snRNA U6.

R.1.2. ANÁLISIS DEL CORTE DE LOS RNAs ANTISENSE CATALÍTICOS *IN VITRO*.

Los RNAs *antisense* catalíticos fueron transcritos *in vitro* usando como molde de DNA las construcciones descritas en el apartado anterior (R.1.1.) digeridas con las enzimas *BamHI* o *BglIII* según se desee obtener una construcción

quimérica o únicamente la ribozima correspondiente. El RNA de la región 5'UTR₃₀₈ utilizado como diana también fue obtenido por transcripción *in vitro*. El molde para esta transcripción consistió en un DNA producto de PCR sobre el vector pNL4.3 con los cebadores 5'T7-pNL4.3 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGTCTCTCTG GTTAC-3') y 3'T7-pNL4.3 (5'-AATTTTTGGCGTACTCACCAGT-3').

Los RNAs fueron marcados radiactivamente a lo largo de toda su longitud mediante la adición de ³²P-αUTP a la mezcla de transcripción. El marcaje fue diferencial, con diez veces menos actividad específica para los RNA inhibidores que para el sustrato (M.2.4.1). La concentración de los RNAs se calculó en base a los niveles de lectura radiactiva de los productos purificados (M.2.3.2). Los ensayos de corte se realizaron tal como se detalla en M.2.6.

En un primer lugar se ensayaron diferentes relaciones estequiométricas de corte entre el sustrato 5'UTR₃₀₈ y los RNAs catalíticos. Se fijó una cantidad de sustrato 5'UTR₃₀₈ de 192 pmoles y se ensayaron excesos de 1, 10, 100, 200 y 500 veces, obteniéndose que una relación 1:100 era suficiente para saturar la reacción de corte (Fig. 33, A). En los ensayos con algunas de las construcciones quiméricas, pero con ninguno de los dominios ribozímicos unitarios, aparecieron dobletes o bandas de retardo en gel sobre aquellos RNAs que contenían la región DIS (tanto en el producto no cortado como en el producto de corte 3'; Fig. 33, B).

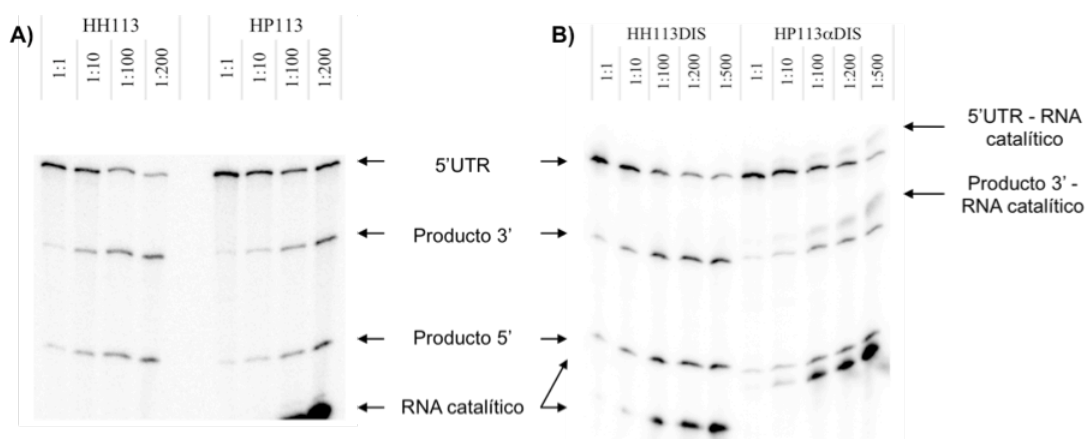


Figura 33. Calibración de la relación estequiométrica sustrato : ribozima para el corte con RNAs catalíticos. (A) Ejemplo de calibración para las ribozimas HH113 y HP113. Se ensayaron excesos de 1, 10, 100 y 200 veces más ribozima respecto de sustrato (molar) y se observó que el ratio 1:100 es suficiente para obtener un máximo de corte. (B) Ejemplo de calibración para RNAs quiméricos mediante ensayo de excesos de 1, 10, 100, 200 y 500 veces (molar) de RNA *antisense* catalítico respecto al sustrato. Pueden observarse bandas de retraso en la quimera HP113αDIS por encima del producto no cortado y del producto 3' del corte. Ambas se asocian con productos diméricos junto con la quimera.

La aparición de estas bandas se consiguió eliminar evitando la incubación de 2 minutos en hielo tras la desnaturalización a 95°C que se hace previamente a la carga en gel, y haciendo la carga sin detener la electroforesis. Estas bandas se asociaron a complejos heterodiméricos entre la región DIS de la molécula de 5'UTR₃₀₈ o su producto cortado y la región anti-DIS de las quimeras.

Con esta relación 1:100 de sustrato y RNA inhibidor, y las mismas condiciones de corte y electroforéticas, se procedió a realizar una cinética de corte con cada una de las construcciones descritas anteriormente. Se obtuvieron muestras de la progresión de la reacción a 10, 30, 60 y 90 minutos a los que se les pudo ajustar una curva cinética de tipo hiperbólico en cada una de las construcciones (Fig. 34).

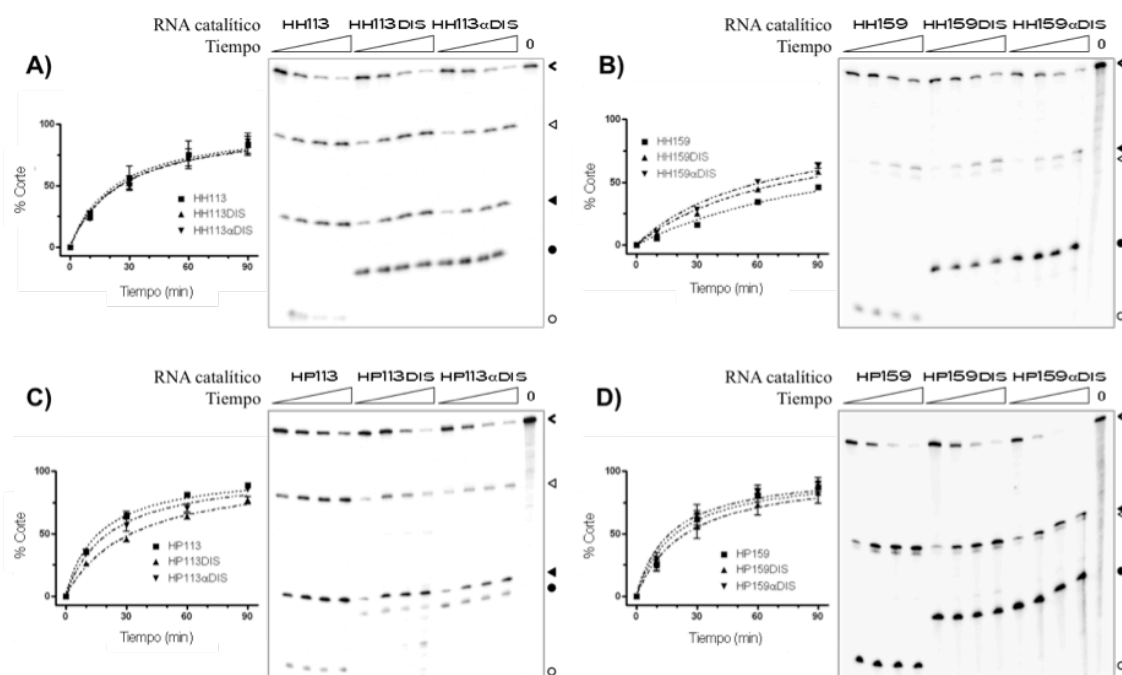


Figura 34. Cinéticas de corte de los RNAs quiméricos y las ribozimas individuales. Cada panel representa el análisis de una reacción de corte resuelta en gel desnaturante de poliacrilamida donde pueden observarse la evolución del producto no cortado y de los dos productos de corte a lo largo de tiempo tanto para la ribozima simple como para los combinados con las regiones DIS y α DIS. El código a la derecha de cada gel significa: punta de flecha, sustrato no cortado (5'UTR₃₀₈); triángulo relleno, producto de corte 5'; triángulo vacío, producto de corte 3'; círculo relleno, RNA *antisense* catalítico; círculo vacío, ribozima. Adjunto se muestra el resultado de la cuantificación de dicha reacción de corte y el ajuste hiperbólico calculado tras el análisis de tres replicados independientes.

El corte máximo predicho para todas las moléculas se fijó en el 100%, pues sin esta restricción, en ocasiones, se conseguían parámetros ligeramente

superiores por una cuestión de error experimental. Se calculó el parámetro $T_{1/2}$ como el tiempo que tarda cada RNA catalítico en cortar la mitad de moléculas de substrato presentes en la reacción y se utilizó para determinar el efecto sobre la catálisis de la ribozima de la adición de dominios DIS o α DIS en 3' de la misma. Los datos numéricos extraídos de estas cinéticas se muestran en la tabla 5.

RNA	$T_{1/2}$ (minutos)	Factor de incremento $T_{1/2}$	R^2
HH113	22.89 ± 9.88	1	0.8824
HH113DIS	24.92 ± 7.43	1.08	0.9417
HH113 α DIS	25.4 ± 5.88	1.11	0.9667
HP113	16.25 ± 2.17	1	0.9863
HP113DIS	32.34 ± 5.17	1.98	0.9823
HP113 α DIS	20.99 ± 3.75	1.28	0.9746
HH159	118.9 ± 39.54	1	0.9764
HH159DIS	75.48 ± 15.15	0.63	0.986
HH159 α DIS	62.25 ± 14.57	0.52	0.9783
HP159	19.47 ± 6.05	1	0.9369
HP159DIS	24.44 ± 10.08	1.25	0.8942
HP159 α DIS	16.61 ± 5.28	0.85	0.9322

Tabla 5. Parámetros cinéticos de las diferentes construcciones. Para todos los ajustes hiperbólicos se obtuvieron valores máximos para el corte ligeramente superiores al 100%, por eso se reajustó la curva para un valor máximo de 100% en detrimento del coeficiente R^2 . Se definió el coeficiente $T_{1/2}$ como el tiempo en minutos que tarda en alcanzarse un 50% de corte y el factor de incremento de dicho coeficiente para cada RNA *antisense* catalítico está referido a la ribozima simple correspondiente.

En lo que se refiere a las ribozimas sin fracción anti-DIS añadida, parece que el motivo *hairpin* es más activo catalíticamente que el *hammerhead*. Así, las ribozimas HP113 y HP159 tienen los valores de $T_{1/2}$ más bajos, de $16'25 \pm 2'17$ y $19'47 \pm 6'05$ respectivamente. Sin embargo, también parece que la posición de corte influye en la capacidad catalítica de las ribozimas, pues también en las ribozimas *hammerhead*, a pesar de tener valores más altos de $T_{1/2}$, la HH113 lo tiene menor que la HH159 ($22'89 \pm 9'88$ y $118'9 \pm 39'54$ respectivamente). La adición de los dominios anti-DIS no tiene efecto significativo en las ribozimas HH113 y HP159. En cambio, la ribozima HP113, la más activa, experimenta una reducción de su actividad casi duplicando su $T_{1/2}$, mientras que la HH159, la menos activa, se ve significativamente mejorada reduciéndolo a la mitad (Tabla 5).

R.1.3. EFECTO DE LOS RNAs *ANTISENSE* CATALÍTICOS EN LA DIMERIZACIÓN *IN VITRO* DE LA 5'UTR₃₀₈.

Una vez comprobada la actividad catalítica de las quimeras, se procedió a analizar la funcionalidad de la molécula anti-DIS como potencial inhibidor de la dimerización. Los ensayos de inhibición de la dimerización por los RNAs quiméricos se realizan tal como se indica en M.2.7. Básicamente, se mezcla un exceso de 20 veces de RNA inhibidor respecto del RNA 5'UTR₃₀₈, siendo desnaturalizados y renaturalizados en agua, para minimizar cualquier tipo de interacción previa durante estos procesos. La reacción de dimerización se inició llevando la mezcla a una concentración final de tampón de dimerización de 1X y transcurre a 37°C. Controles con tampón de monomerización y de dimerización ambos a concentración final 1X y sin RNA inhibidor alguno, nos permiten diferenciar dímero de monómero. Las reacciones de dimerización fueron resueltas en geles nativos de poliácridamida al 4% en TBE 1X y con tampón de electroforesis también TBE 1X (Fig. 35).

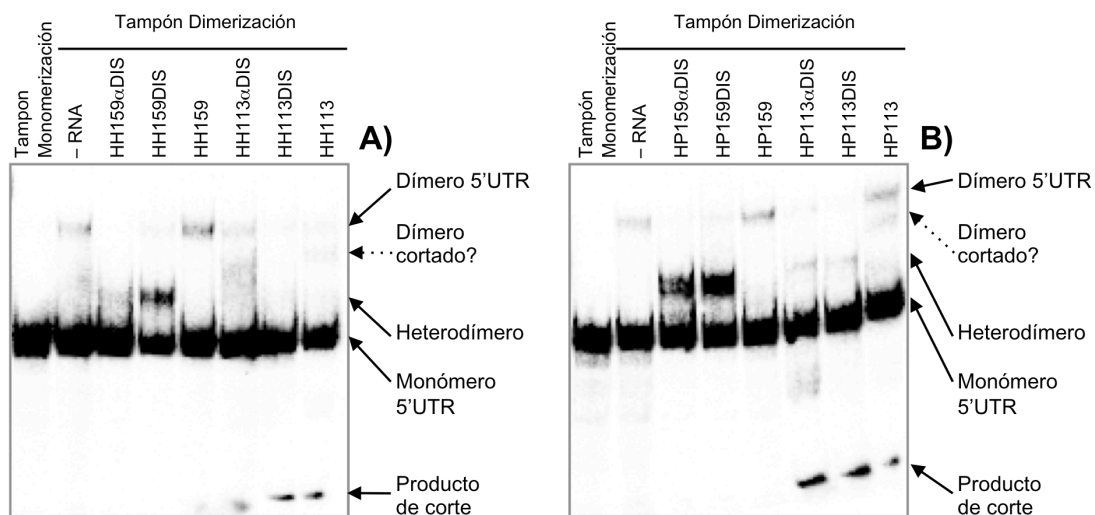


Figura 35. Inhibición de la dimerización de la 5'UTR₃₀₈ *in vitro*. Cada panel representa los resultados de inhibición de reacciones de dimerización del RNA 5'UTR₃₀₈ para las diferentes variantes *hammerhead* (A) y *hairpin* (B). A la derecha de cada gel se indican cuáles son las bandas homodiméricas de la 5'UTR₃₀₈, las monoméricas y las heterodiméricas 5'UTR₃₀₈:RNA *antisense* catalítico. Las bandas de migración más rápida que se detectan en los tratamientos con RNAs *antisense* catalíticos contra la región 113 podrían atribuirse a productos de corte.

Todas las moléculas quiméricas son capaces de inhibir la formación de dímero de 5'UTR₃₀₈ *in vitro*. Destacan las moléculas HH159 α DIS y HP159 α DIS que casi, si no completamente, inhiben la formación de dímero. Coincidentemente, en los tratamientos con moléculas quiméricas aparecen complejos que migran en gel en una posición intermedia entre el monómero y el dímero, lo que es consistente con la suposición de que las moléculas quiméricas heterodimerizan con la molécula 5'UTR₃₀₈, correspondiéndose este complejo con el heterodímero. Ni la ribozima HH159 ni la HP159 inhiben la dimerización. Los tratamientos con las variantes HH113 y HP113 sí que generan un complejo intermedio, a pesar de no tener dominio anti-DIS. Sin embargo, este complejo migra más lento que el anterior. Es de destacar que todas las variantes dirigidas contra la región 113 siguen siendo catalíticamente activas en el tampón de dimerización, diferentes del tampón de corte. Esto se refleja en la aparición de un producto de corte que migra más rápido que ninguno de los complejos. Este nuevo complejo intermedio que aparece incluso en las ribozimas 113 solas, podría ser resultado del corte de los integrantes del dímero. Si bien la ribozima HP113 no es capaz de interferir con la formación de dímero, forma este complejo intermedio, mientras que con la ribozima HH113 el dímero incluso se reduce.

R.1.4. INHIBICIÓN *EX VIVO* DE VIH-1 POR CONSTRUCCIONES DE EXPRESIÓN DE RNAs *ANTISENSE* CATALÍTICOS.

Para validar la potencialidad inhibidora de las construcciones en terapia génica se procedió a cuantificar el efecto inhibidor de los RNAs *antisense* catalíticos *ex vivo* mediante su expresión bajo el promotor del snRNA U6. Para ello, se transfectaron cultivos celulares de la línea HEK293T con cada uno de plásmidos de la serie pU6 RNA *antisense* catalítico junto con el plásmido pNL4.3 en una relación 10:1 molar. Pasadas 48 horas tras la transfección, se procedió a cuantificar el antígeno viral p24 producido en el sobrenadante celular. Los resultados muestran una inhibición de los niveles de antígeno de $92'68 \pm 1'31$ % y $83'64 \pm 3'78$ % respectivamente cuando se ensayan las construcciones pU6 HH113 α DIS y pU6 HP159DIS. Las construcciones pU6 HP113 α DIS y pU6 HH159 α DIS registraron

inhibiciones en torno al 50 % mientras que las pU6 HP159 α DIS y pU6 HP113DIS no mostraron inhibiciones significativas (Fig. 36).

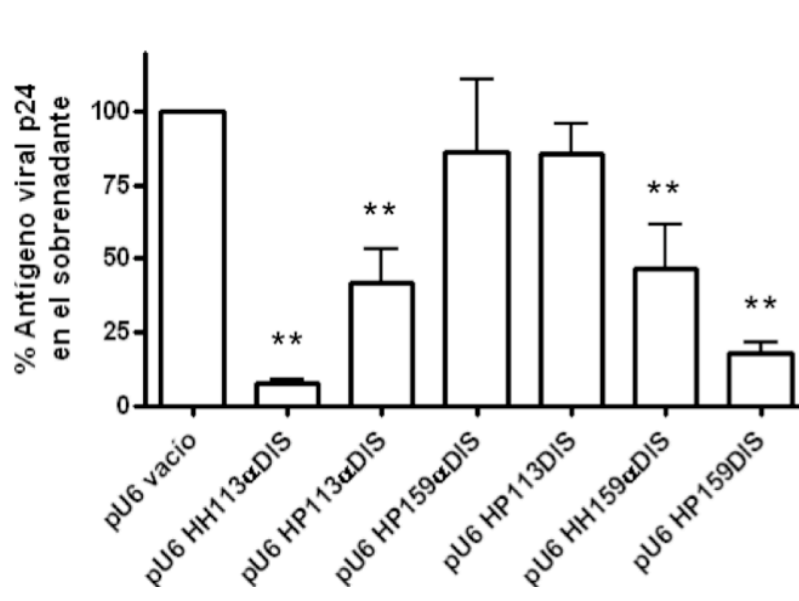


Figura 36. Inhibición postintegrativa de VIH-1 por plásmidos de expresión de RNAs *antisense* catalíticos *ex vivo*. Los diferentes plásmidos fueron cotransfectados en cultivos de la línea celular HEK293T con DNA proviral pNL4.3. El resultado muestra las reducciones del antígeno viral p24 producido en el sobrenadante celular 48 horas post-transfección. Las diferencias significativas respecto del control presentan $p < 0.01$ (**, ANOVA de una cola con 99% de confianza) y son resultado de la medida de tres replicados independientes.

La línea celular HEK293T no expresa el receptor ni los correceptores virales aunque sí se puede recrear multiplicación viral una vez tiene el DNA proviral en su interior. Esto supone que la transfección con pNL4.3 mimetiza el estado post-integrativo del ciclo de replicación viral y que el antígeno p24 registrado en el sobrenadante celular se corresponde con el resultado de un único ciclo viral (pues no puede haber reinfecciones). Así pues, la inhibición registrada en este ensayo se debe al efecto de los RNAs *antisense* catalíticos sintetizados *ex vivo* sobre los eventos post-integrativos del ciclo viral.

R.1.5. INHIBICIÓN *EX VIVO* DE VIH-1 POR RNAs *ANTISENSE* CATALÍTICOS PRESINTETIZADOS.

En una aproximación de orientación farmacológica, se procedió a estudiar el efecto inhibitor de los RNAs *antisense* catalíticos mediante administración

directa de los mismos a las células. Los distintos RNAs se sintetizaron *in vitro* mediante transcripción con T7 RNA polimerasa. Los moldes de DNA fueron obtenidos por amplificación sobre la serie de construcciones pU6 con los cebadores 5'T7U6 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGGTGCTCGCTTCGGCAGCACAT-3') y 3'ApalU6 (5'-AGCGGGCCCAAAAAGCGGACCGAAGTCCGC3'). Con estos cebadores se logró incorporar el promotor de la T7 RNA polimerasa en 5' de los amplificadores y de la transcripción resultan RNAs que contienen tanto la región *antisense* catalítica como las horquillas del snRNA U6, de modo que los RNAs son similares a aquellos que se transcribirían intracelularmente mediante las construcciones pU6.

Las transcripciones fueron purificadas directamente por extracción fenólica y precipitación. Su integridad tras el procesamiento se comprobó mediante electroforesis en gel desnaturante 7 M urea, al 4% de poliacrilamida teñido tras la electroforesis con bromuro de etidio. Como control negativo se utiliza un RNA constituido por las dos horquillas del snRNA U6 sin ninguna molécula de RNA inhibidora entre ambas. Este control se consigue transcribiendo un molde de PCR generado desde el pU6 vacío.

El ensayo se realizó de forma similar a como se describe para las construcciones pU6 (R.1.4). Se cotransfectaron cultivos celulares de la línea HEK293T con plásmido pNL4.3 y cada uno de los RNAs inhibidores en una relación 1:5 en peso. Tras 48 horas desde la transfección, se midió la cantidad de antígeno p24 viral en el sobrenadante celular y se obtuvo una inhibición significativa del 80% por parte del RNA HH113 α DIS. No se detectaron inhibiciones significativas por ningún otro de los RNAs desnudos (Fig. 37).

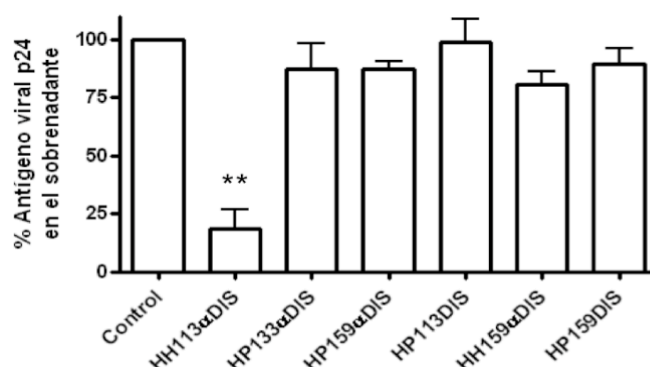


Figura 37. Inhibición postintegrativa de VIH-1 *ex vivo* por RNAs *antisense* catalíticos presintetizados. Los resultados muestran los niveles del antígeno viral p24 en el sobrenadante celular de cultivos HEK293T cotransfectados con pNL4.3 y los

diferentes RNAs *antisense* catalíticos presintetizados 48 horas tras la transfección. Los resultados muestran la cuantificación de tres réplicas independientes y las diferencias significativas (**) indican $p < 0.01$ (ANOVA de una cola con 99% de confianza).

R.1.6. ANÁLISIS DE LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA MEDIADA POR INTERFERÓN POR LAS CONSTRUCCIONES DE EXPRESIÓN Y LOS RNAs PRESINTETIZADOS.

Una consideración importante a tener en cuenta cuando se analiza inhibición mediante ensayos en que se introducen en las células DNAs o RNAs obtenidos *in vitro* es comprobar que ésta no se debe a procesos derivados de la cascada de señalización del interferón. En nuestro caso, el RNA desnudo está altamente estructurado y el DNA de las construcciones pU6 ha sido generado en bacterias y no tiene los motivos CpG metilados, como lo están en las células, por lo que es preciso comprobar este nuevo parámetro.

Para ello se extrajo RNA total de células cotransfectadas con pNL4.3 y los plásmidos de la serie pU6 en el momento de la medición del antígeno p24 viral, esto es, 48 horas tras la transfección.

Este RNA total fue retrotranscrito (M.2.1.5) utilizando hexámeros de secuencia aleatoria y el cDNA originado fue utilizado como molde para una PCR semicuantitativa con dos parejas de cebadores: una para el gen GAPDH (utilizado como control interno) y otra para el gen ISG56 (gen 56 inducido por interferón). Este último es indetectable en condiciones basales y sufre una elevada inducción mediada por interferón, con lo que servirá de indicador.

Como control de inducción positiva se utilizó RNA total de células transfectadas con RNA sintético bicatenario *Poly-I:C*, fuerte inductor de interferón. Las células transfectadas solamente con pNL4.3 se usaron como control negativo. Igualmente se utilizó un control de PCR sin molde para descartar contaminaciones de la PCR y un control de retrotranscripción sin retrotranscriptasa para descartar contaminaciones de DNA genómico en el molde final para la PCR.

Se pudo comprobar como, en el momento en que se registra la inhibición por los DNAs de la serie pU6, no se está produciendo respuesta a interferón (Fig. 38). La inducción del gen ISG56 por construcciones pU6 HH159 α DIS y pU6 HP159DIS es detectable, si bien, la banda de amplificación de la GAPDH utilizada

como control de normalización indica que esta inducción es muy inferior a la obtenida por *Poly-I:C*.

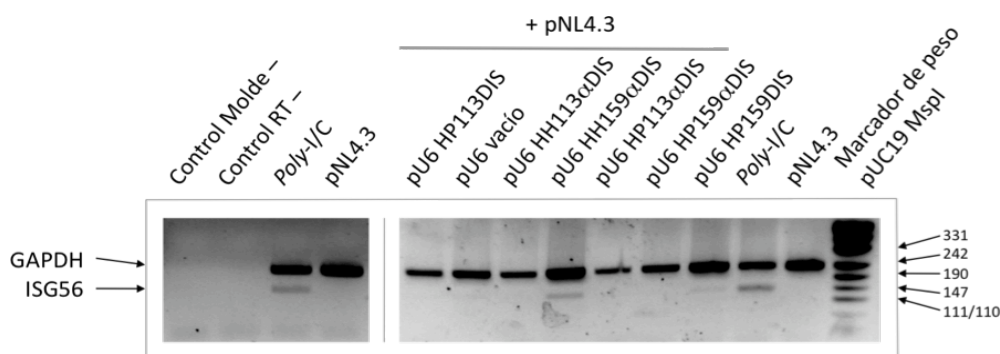


Figura 38. Análisis de la respuesta a interferón en las inhibiciones postintegrativas registradas por plásmidos pU6 de expresión de RNAs *antisense* catalíticos. RNA total de células en el momento del análisis de la inhibición fue extraído y retrotranscrito. Los geles muestran el resultado de PCRs semicuantitativas para detectar ISG56, indicador de la activación de la vía del interferón, así como un normalizador interno GAPDH.

También se analizó la inducción de la respuesta mediada por interferón en células transfectadas con los RNAs presintetizados. Esta medición se realizó igual que la anterior, 48 horas después de la transfección, pero en células únicamente transfectadas con los diferentes RNAs, sin acompañamiento de pNL4.3. En este caso, se carece de cualquier efecto que pueda producir el DNA plasmídico, y se analiza el efecto puro ocasionado por los RNAs sintetizados *in vitro*. En este caso se observó una inducción general de ISG56, incluyendo en la transfección con el RNA control negativo sin efecto inhibitor (Fig. 39). Esto sugiere que la inhibición obtenida por HH113 α DIS no puede deberse, al menos totalmente, al efecto interferón.

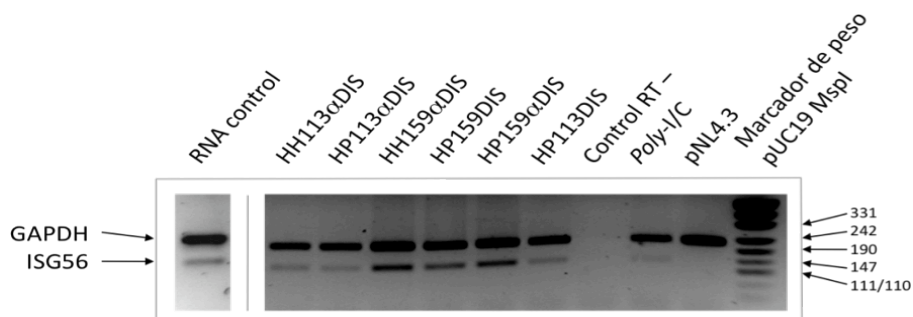


Figura 39. Análisis de la inducción de la señalización por interferón inducida por los RNAs *antisense* catalíticos presintetizados. Cultivos celulares HEK293T fueron transfectados exclusivamente con diferentes RNAs desnudos y 48 horas tras la transfección se extrajo RNA total de células, se retrotranscribió y se realizó PCR con cebadores específicos para detectar cDNA de ISG56, indicador de la señalización por interferón, así como de GAPDH, usada como normalizador interno.

R.1.7. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA DIMERIZACIÓN DEL GENOMA DE VIH-1 Y LA CONFORMACIÓN ESTRUCTURAL DE LA 5'UTR.

Siguiendo la línea experimental de inhibición de la dimerización de la región 5'UTR, nos propusimos indagar acerca del complejo supuestamente heterodimérico que se forma cuando se incuba el RNA 5'UTR₃₀₈ con las quimeras. La existencia de sólo dos isoformas en la reacción normal de dimerización (supuestas monómero y dímero) en lugar de tres (monómero LDI, monómero BMH y dímero BMH:BMH), nos llevó a pensar que tal vez el heterodímero podría ser un heterodímero BMH:DIS de modo que el conformero BMH actuaría como efímero intermediario entre el LDI y el dímero, pudiendo ser secuestrado mediante un RNA DIS que actuase como *decoy*.

La desnaturalización y renaturalización en agua del RNA 5'UTR₃₀₈ y su posterior incubación con tampón de monomerización genera el conformero monomérico de una reacción de dimerización normal cuando se resuelve en un gel nativo al 4% de poliacrilamida en TBE 1X en el gel y en el tampón de electroforesis (Fig. 35, primer carril en ambos geles; Figura 40, tercer carril). A pesar de esto, el tampón de monomerización es capaz de posibilitar la dimerización de una pequeña fracción de la población de moléculas (Fig. 40, tercer carril). Cuando se reduce la fuerza iónica de la solución en que se encuentra la molécula no añadiendo tampón alguno tras la renaturalización, se elimina esta fracción dimérica (Fig. 40, primer carril) y, si además, se resuelve la muestra en un gel similar pero con TBE 0'25X en el gel y en el tampón de electroforesis, se obtiene un nuevo conformero que migra ligeramente más lento que el monómero detectado hasta ahora, también presente aunque minoritariamente (Fig. 65, primer carril). Resultan clave las condiciones de electroforesis utilizadas para resolver los productos de la reacción de dimerización, pues la misma molécula renaturalizada en agua solamente y resuelta en un gel con TBE 1X migra igual que el monómero previamente detectado (Fig. 40). Igualmente, se puede establecer un patrón de tendencia a la dimerización con el incremento de Mg²⁺ en el medio. Así, en ausencia del catión no se detecta dímero (Fig. 40, primer carril), con 0'1 mM de Mg²⁺ en el tampón de monomerización se aprecia dímero mínimamente (Fig. 40,

tercer carril) y con 5 mM de Mg^{2+} en el tampón de dimerización algo más de un 10% de las moléculas dimerizan (Fig. 35, segundo carril). La generación de dímero aumentó significativamente al duplicar esta última concentración de Mg^{2+} realizando la reacción de dimerización en TMN 1X (Fig. 40, segundo carril).

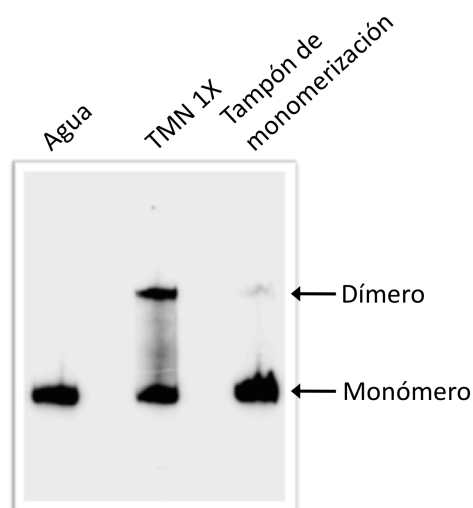


Figura 40. Análisis de conformeros del RNA 5'UTR₃₀₈ de VIH-1. La resolución en gel nativo de proliacrilamida de la renaturalización del RNA 5'UTR₃₀₈ común de VIH-1 en agua, TMN1X y tampón de monomerización revela que en TMN1X cerca de la mitad del RNA se encuentra dimerizado.

Se procedió entonces a hacer una cinética de dimerización en la que el RNA 5'UTR₃₀₈ es desnaturalizado y renaturalizado en agua, iniciándose la dimerización con la adición de tampón de dimerización (Fig. 41, carriles impares). El nuevo conformero detectado desaparece rápidamente entre los 10 y los 30 minutos al tiempo que se alcanza la máxima formación de dímero.

Si en la cinética de dimerización se añadía desde el principio un exceso molar de 60 veces de DIS *decoy* se eliminaba completamente la formación del dímero (Fig. 41, carriles pares). En este caso aparece un complejo, análogo al detectado con las quimeras (Fig. 35), que migra ligeramente más lento que el conformero mayoritario en ausencia de sal.

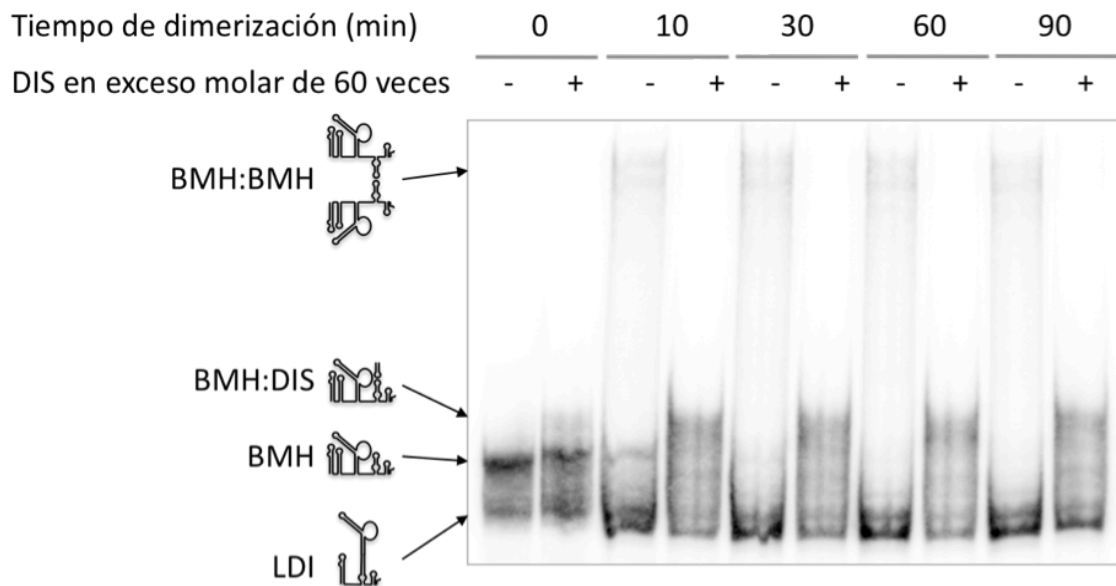


Figura 41. Identificación de los conformeros BMH y LDI mediante secuestro y estabilización del conformero BMH en heterodímero con RNA DIS *decoy*. Las reacciones de dimerización fueron resueltas en gel de electroforesis nativo con TBE 0.25X como tampón de electroforesis. Las reacciones fueron llevadas a cabo en presencia (+) y ausencia (-) de un exceso molar de 60 veces de molécula DIS *decoy* y en ambos casos a diferentes tiempos. Los diferentes conformeros detectados se indican a la izquierda del gel.

Cuando se realiza el ensayo inverso, marcando radiactivamente la molécula de DIS *decoy* y utilizando RNA 5'UTR₃₀₈ no marcado, el único complejo que aparece marcado en el gel es este último, confirmándose el hecho de que es un heterodímero (Fig. 42, línea 5). Así pues, las diferentes conformaciones detectadas y sus relaciones hasta ahora podrían ajustarse a un modelo de conformero BMH efímero como intermediario entre el conformero no dimerizante LDI y el dímero (que sería BMH:BMH). Este ajuste concordaría con el hecho de que el conformero monomérico detectado en los ensayos de dimerización se correspondería con la forma LDI mientras que el conformero mayoritario detectado en condiciones muy severas de ausencia de sal lo haría con la forma BMH. Así, la forma BMH, potencialmente dimerizable, sería mayoritaria en condiciones de baja fuerza iónica y, al aumentar ésta en las condiciones de dimerización, rápidamente se estabiliza como dímero BMH:BMH o se transforma en forma LDI. En cambio esta última, predicha como termodinámicamente más favorable, lo es sólo en condiciones de alta fuerza iónica.

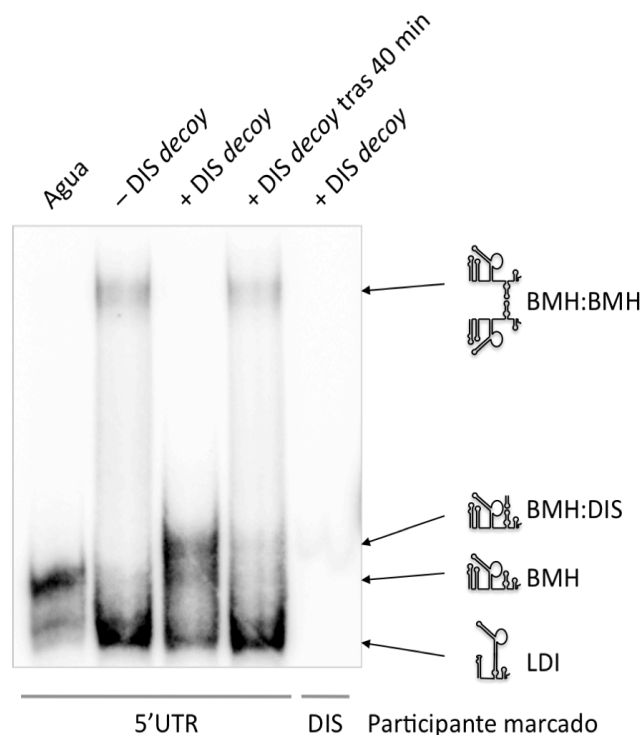


Figura 42. Determinación del equilibrio entre los conformeros BMH dimérico y LDI monomérico. En el gel de la autorradiografía se resolvieron diferentes reacciones de dimerización de RNA 5'UTR₃₀₈ radiactivamente marcada en presencia (+) o ausencia (-) de RNA DIS *decoy* no marcado. En la primera línea no se utilizó tampón de dimerización. En las demás líneas se usó tampón de dimerización. En el tercer carril se añadió molécula DIS *decoy* al inicio de la reacción y en la reacción resuelta en el cuarto carril se dejó transcurrir 40 minutos antes de la adición del RNA DIS *decoy* y luego se dejó transcurrir 30 minutos más. En el quinto carril se reprodujo al reacción del tercer carril marcando en este caso el RNA DIS *decoy* y se utilizó el RNA 5'UTR₃₀₈ no marcado. Los diferentes conformeros detectados se indican a la derecha del gel.

La adición del exceso molar de 60 veces RNA DIS *decoy* después de 40 minutos de dimerización resultó reducir mínimamente el dímero formado al tiempo que tímidamente aparecieron el heterodímero BMH:DIS y la forma BMH (Fig. 42, cuarto carril). El dímero formado es, pues, suficientemente estable como para registrar un mínimo retorno a forma monomérica. Este resultado ha sido publicado en (317).

R.2. APTÁMEROS CONTRA VIH-1.

En este segundo bloque de resultados se describe la identificación de aptámeros de RNA contra la región 5'UTR₃₀₈ de VIH-1. Como se avanzó en la

introducción, el RNA tiene tres habilidades fundamentales que constituyen la base de todas sus funciones biológicas: la codificación, la catálisis y la unión. La codificación de proteínas se podría catalogar como pasiva, inherente a la secuencia y dependiente de un “interpretador”, mientras que otro grado de codificación podría incluir señales de *splicing*, de *editing*, de interacción con otros RNAs (como microRNAs), etc. y tener un carácter activo. Las otras dos funciones, en cambio, son activas y resultan de la adecuada estructura y disposición de los grupos reactivos del propio RNA. Utilizamos un método de aislamiento de aptámeros por selección molecular *in vitro* para generar moléculas de RNA capaces de unirse a la 5'UTR₃₀₈ con el objetivo de aislar aptámeros de RNA capaces de interferir con la función de los diferentes dominios de RNA dispuestos en la misma.

R.2.1. DISEÑO DEL PROCESO DE SELECCIÓN MOLECULAR *IN VITRO*.

Como se ha dicho, se eligió el RNA como material para la constitución de los aptámeros. El proceso de selección molecular *in vitro* se detalla en el apartado de Materiales y Métodos (M.2.10), si bien a continuación se describen brevemente las nociones generales.

La población de partida se genera mediante transcripción *in vitro* desde un molde generado por hibridación y extensión de oligonucleótidos de DNA. Uno de los oligonucleótidos contiene una fracción de 25 nucleótidos de secuencia completamente aleatoria flanqueada de dos regiones de secuencia prefijada. Por su parte, el otro oligonucleótido contiene la secuencia del promotor de la T7 RNA polimerasa y una zona de secuencia complementaria con una de las regiones flanqueantes del oligonucleótido de secuencia aleatoria. Estos oligonucleótidos se denominan respectivamente 3'RANDOMK y 5'EcoRIK en la Figura 43.

El RNA diana utilizado fue el mismo que en el estudio para RNAs *antisense* catalíticos (R.1), esto es, la 5'UTR₃₀₈, y fue generada del mismo modo (véase R.1.2) con la salvedad de que se incorporó a la mezcla de transcripción UTP-biotina en una proporción estimada tal que se incorpora un residuo de uracilo-biotina por molécula. De este modo, la molécula pudo sostenerse a una mini-columna de cromatografía por estreptavidina. De este modo se espera que, dada la posición

aleatoria de los residuos de biotina en las moléculas, la perturbación estructural de la misma en la población queda diluida.

Las poblaciones de RNA fueron renaturalizadas en tampón TMN 1X e incubadas 30 minutos en la columna con RNA 5'UTR₃₀₈ prefijado. La partición de la población (I.4) se hizo eluyendo la fracción de población no adherida a la diana mediante un lavado con 10 volúmenes de tampón TMN 1X. Seguidamente, la obtención de la fracción adherida se realizó lavando con 10 volúmenes de tampón TMN 1X a 95°C para eluir mediante desnaturalización por calor. La población enriquecida en moléculas aptas para la unión se concentró y fue sucesivamente retrotranscrita y amplificada por PCR para generar un molde desde el que volver a generar una población de RNA por transcripción para una siguiente ronda de selección (Fig. 43).

Se practicó, previo al inicio del procedimiento de selección, una selección negativa consistente en el paso de la población de RNA por una columna de cromatografía similar a las utilizadas pero sin RNA 5'UTR₃₀₈ adherido a la estreptavidina. La selección se inició con la población saliente de la columna para eliminar aquellas capaces de unirse a la estreptavidina o al soporte. También, la astringencia de la presión selectiva se moduló a lo largo de la selección variando los parámetros de temperatura y relación población-diana. Las tres primeras rondas de selección se incubaron para la unión a temperatura ambiente, mientras que las sucesivas lo hicieron a 37°C. Finalmente, en todas las rondas de selección se introdujo un exceso de RNA diana respecto del número de integrantes de cada población mientras que en las rondas XI a XIV esta relación se ajustó a una molécula de RNA 5'UTR₃₀₈ por cada mil moléculas de RNA de la población.

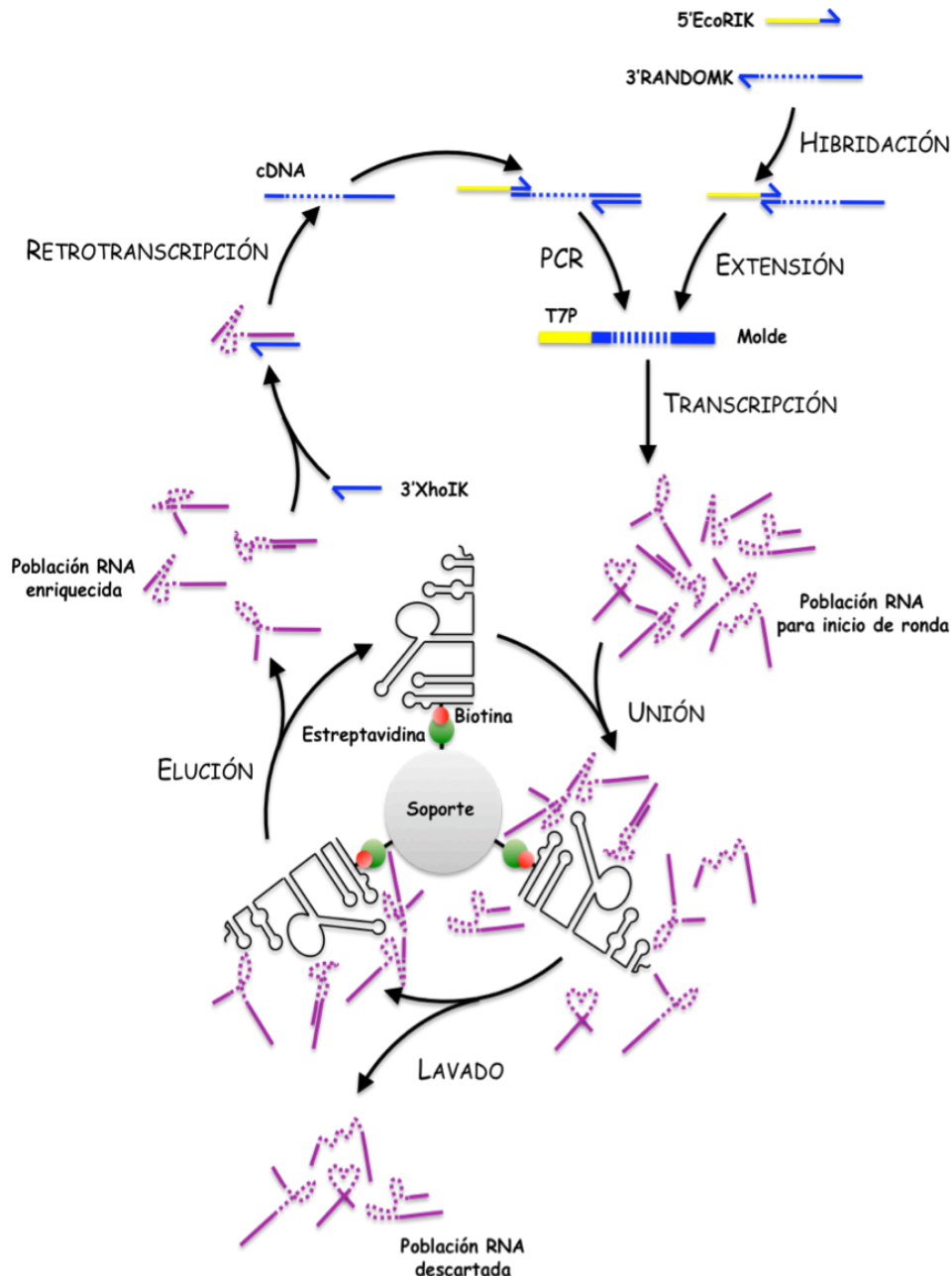


Figura 43. Esquema del procedimiento para selección molecular *in vitro*. En punteado se representa la región de 25 nt de secuencia aleatoria; en violeta se representan las moléculas de aptámeros de RNA y en azul las moléculas de DNA.

R.2.2. SEGUIMIENTO DEL PROCESO DE SELECCIÓN MOLECULAR *IN VITRO*.

R.2.2.1. LA CAPACIDAD DE UNIÓN.

El progreso de la capacidad de unión de cada población al RNA diana fue monitorizado a lo largo de todo el proceso. Los reamplificados de los cDNAs

producto de las rondas I, II, III, IV, V, VII, XI y XIV fueron transcritos y los RNAs generados fueron marcados internamente durante la transcripción (M.2.4.1). Trazas de estas poblaciones de RNA fueron sometidas a ensayos de unión (M2.8) frente a concentraciones crecientes de RNA 5'UTR₃₀₈ y el resultado de estas reacciones fue resuelto mediante electroforesis en geles de poliácridamida al 4% en condiciones nativas (M.2.5.3). Se observó un progresivo aumento en especies con migración electroforética retardada respecto del carril control sin RNA 5'UTR₃₀₈ conforme se avanzó en la selección. Estas especies se asociaron a complejos población-diana y tanto su intensidad como la de la población no asociada fueron cuantificadas (M.2.3.3) para el posterior cálculo de la fracción de población acomplejada con el RNA 5'UTR₃₀₈. La distribución de población acomplejada frente a concentración de RNA diana se ajustó a una curva hiperbólica (Fig. 44).

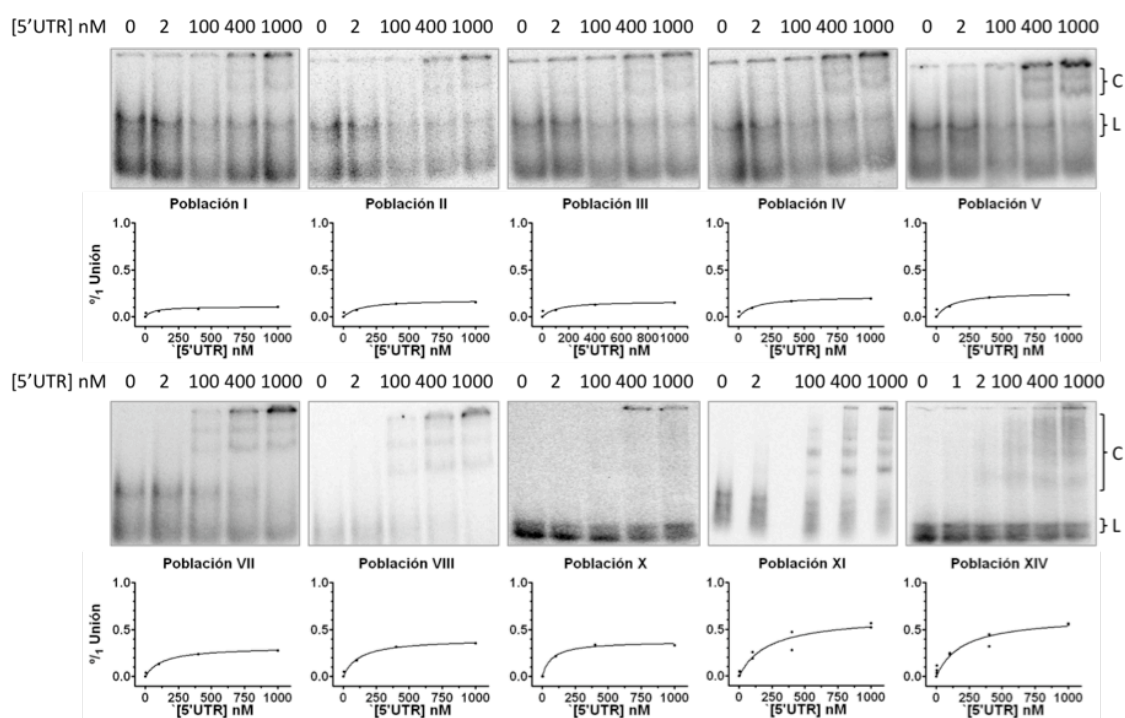


Figura 44. Ensayos de unión de las diferentes poblaciones monitorizadas a la molécula diana 5'UTR₃₀₈. Los ensayos de unión a concentraciones crecientes de RNA 5'UTR₃₀₈ se resolvieron por electroforesis en geles nativos y la cuantificación de los complejos (C) y la población libre (L) permitió ajustar la curva de unión al tipo hiperbólico que se representa bajo cada gel. Las poblaciones XI y XIV fueron analizadas por duplicado.

Se calcularon las constantes de disociación (K_d) y la unión máxima para cada población. Se pudo observar cómo la unión máxima aumenta

progresivamente a lo largo de la selección y experimenta un aumento súbito cuando se reduce drásticamente la relación RNA diana-población (M.2.10). No se observa, sin embargo, cambios significativos en la K_d a lo largo de la mayor parte del proceso, si bien ésta también aumenta en las rondas XI a XIV. No obstante, hay que destacar que es mucho mayor el aumento relativo de la unión máxima que el de la K_d (Tabla 6).

POBLACIÓN	K_d (NM OF 5'UTR ₃₀₈)	UNIÓN MÁXIMA (%)	R ²
I	56,2600 ± 68,73	10,68 ± 2,377	0,7990
II	125,6000 ± 106,20	18,03 ± 3,928	0,8711
III	109,1000 ± 124,50	16,61 ± 4,630	0,7549
IV	119,7000 ± 96,80	21,70 ± 4,441	0,8824
V	117,8000 ± 104,80	26,31 ± 5,891	0,8555
VII	125,1000 ± 48,64	31,21 ± 3,123	0,9757
VIII	118,0000 ± 42,81	39,77 ± 3,631	0,9793
X	68,3500 ± 18,61	37,22 ± 2,023	0,9919
XI	219,1000 ± 88,94	63,61 ± 8,219	0,9356
XIV	191,9000 ± 74,39	63,54 ± 7,457	0,9319

Tabla 6. Progresión de los parámetros K_d , máxima unión y R² de las diferentes poblaciones del ciclo de selección molecular *in vitro*.

R.2.2.2. LA COMPOSICIÓN NUCLEOTÍDICA.

La composición nucleotídica de las poblaciones también fue objeto de estudio. El DNA molde para la transcripción de la población de RNA inicial, obtenido por hibridación y extensión, también fue clonado en el vector universal pGEM®-T *easy* (M.1.7) y secuenciado (M.2.20). El resultado de la secuenciación de 31 clones de esta población de DNA molde permitió comprobar la distribución nucleotídica en cada una de las posiciones de los 25 nucleótidos aleatorios. El resultado de este chequeo previo informa que hay un sesgo a favor de la citosina en la población inicial si bien no hay ninguna posición en la que no se registre falta de ninguna de las bases (Fig. 45).

Al igual que con la población 0, se secuenciaron alrededor de 30 clones de cada una de las poblaciones I, III, V, VII, XI y XIV. Las diferentes moléculas obtenidas fueron analizadas en cuanto a su composición nucleotídica. En tanto que las secuencias flanqueantes tienen una secuencia fija, las diferencias en cuanto a la

composición nucleotídica de una molécula a otra se deben exclusivamente a la región variable (datos no mostrados).

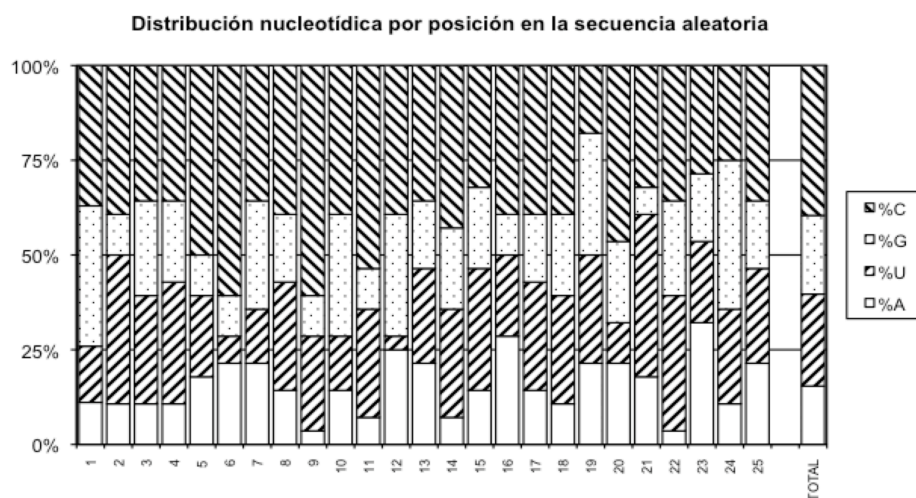


Figura 45. Distribución nucleotídica esperada en cada posición de la población inicial para la selección. Los datos se corresponden con las mediciones realizadas de la secuenciación de 31 representantes de la población de DNA molde.

Se estudió la abundancia de cada nucleótido en la población a lo largo de las diferentes rondas de selección, así como de los grupos lógicos purinas y pirimidinas, y G+C y A+U, resultado de la combinación de los primeros (Fig. 46). En líneas generales se puede observar cómo hay un moderado descenso en cuanto la abundancia de uracilo y un moderado ascenso de la abundancia de guanina. La adenina, en cambio, muestra un súbito ascenso en la población I y una tendencia a la estabilidad en ese nivel, al contrario que ocurre con la citosina, que experimenta un súbito descenso en la población I y se estabiliza en ese nivel. Al estudiar la distribución de nucleótidos por grupos lógicos AU y GC o purinas y pirimidinas, se comprueba lo que se deduce de lo descrito anteriormente, las purinas y pirimidinas experimentan súbitos aumento y descenso respectivamente para quedar estabilizadas, mientras que el %AU experimenta un súbito aumento debido a la adenina, que luego se reduce debido a la lenta reducción de la abundancia de uracilo. La progresión del %GC es exactamente inversa.

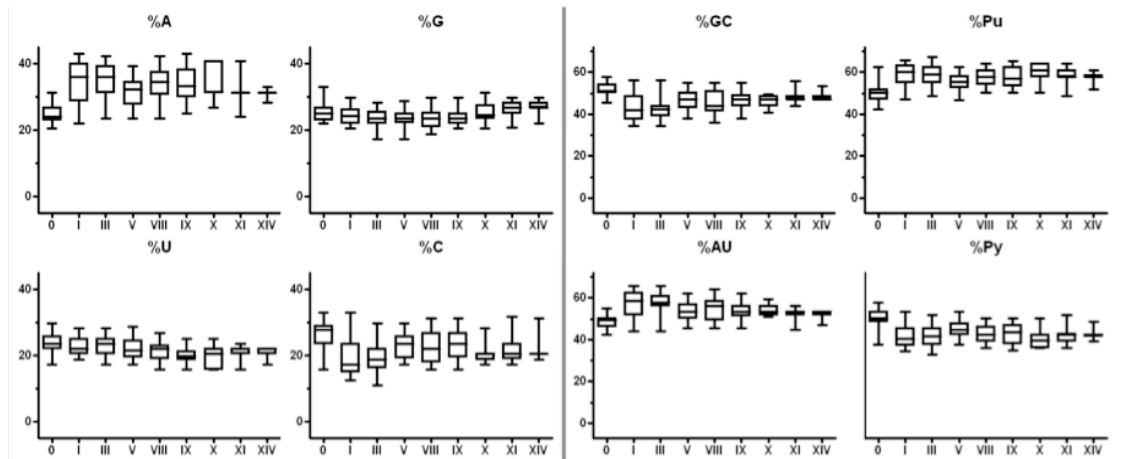


Figura 46. Distribución nucleotídica por molécula en las diferentes rondas de selección molecular *in vitro*. Los diagramas representan la distribución en cada población de la abundancia (%) de cada nucleótido o grupo en cada molécula. Así, cada caja representa la sección de la población comprendida entre los percentiles 25 y 75. La línea horizontal dentro de la caja representa la mediana, es decir, el valor que separa arriba y abajo el 50% de las moléculas. Las marcas superior e inferior indican el valor máximo y mínimo alcanzado.

R.2.2.3. LA COMPOSICIÓN ESPECÍFICA.

La secuenciación de clones de cDNA de las diferentes poblaciones mostró que en las poblaciones XI y XIV existen aptámeros especialmente abundantes dentro de las mismas. Esto indica que la diversidad poblacional está disminuyendo y hay secuencias que se están fijando. Concretamente, de 52 representantes secuenciados de la población XI, 17 corresponden a la secuencia llamada XI1; 7 a la XI21; 3 a la XI23; 3 a la XI73; y 2 a la XI141. Las 20 restantes están representadas por un único miembro. En la población XIV, la diversidad se ha reducido. Se secuenciaron 37 representantes, entre ellos se detectan las secuencias XI1 (aquí llamada XIV22) con 23 representantes; la XI21 (aquí XIV26) con 6; la XI141 (aquí XIV1) con 2; y el resto de secuencias con un único representante y no presentes en la población anterior. Esta tendencia a la reducción de la diversidad es uno de los puntos que aconsejan la detención del ciclo y el análisis de los clones finales (Fig. 47).

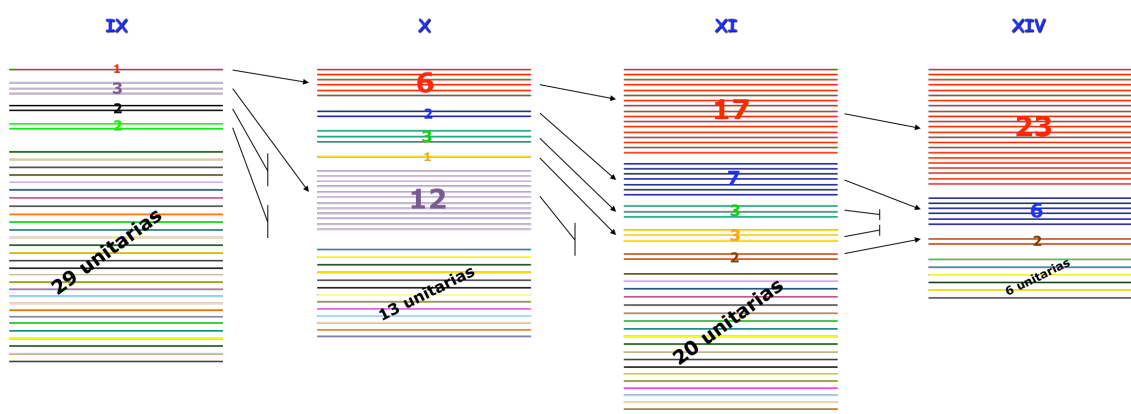


Figura 47. Esquema de la reducción de diversidad registrada del ciclo IX al XIV. Las flechas indican la continuidad de moléculas tras las rondas, mientras que las flechas decapitadas indican la extinción de la molécula en la siguiente población.

R.2.3. ESTRUCTURA *IN SILICO* DEL RNA 5'UTR₃₀₈ Y LOS APTÁMEROS: POSIBILIDADES DE UNIÓN.

El número de aptámeros aislados planteó la necesidad de seleccionar algunos entre ellos para proseguir los estudios de inhibición de VIH-1. Los antecedentes muestran que los aptámeros de RNA o DNA seleccionados frente a otros ácidos nucleicos suelen establecer interacciones por complementariedad de bases entre regiones de cadena sencilla de ambas moléculas tales como lazos apicales, lazos internos, burbujas o regiones desapareadas (239,245-246). Es por esto por lo que resulta interesante conocer a qué regiones de la 5'UTR₃₀₈ se une cada aptámero a la hora de seleccionar aquellos con los que se va a proseguir el estudio.

Se ha descrito la estructura *ex vivo* para la 5'UTR completa de la cepa viral HXB2 (413), así como dos posibles conforméromos *in silico* (343): BMH y LDI (Fig. 40). Al menos en solución *in vitro* ya hemos demostrado que ambos conforméromos están presentes a pesar de que el termodinámicamente más favorecido *in silico* (LDI) no se corresponde con el predominante *in vivo* (BMH) (R.1.7). La región de 308 nucleótidos utilizada en este trabajo no se corresponde con la analizada en estos estudios y, por tanto, fue preciso una evaluación bioinformática previa antes de proseguir. *A priori*, los plegamientos tipo BMH y LDI correspondientes a esta región de 308 nucleótidos son los que se muestran en la figura 48.

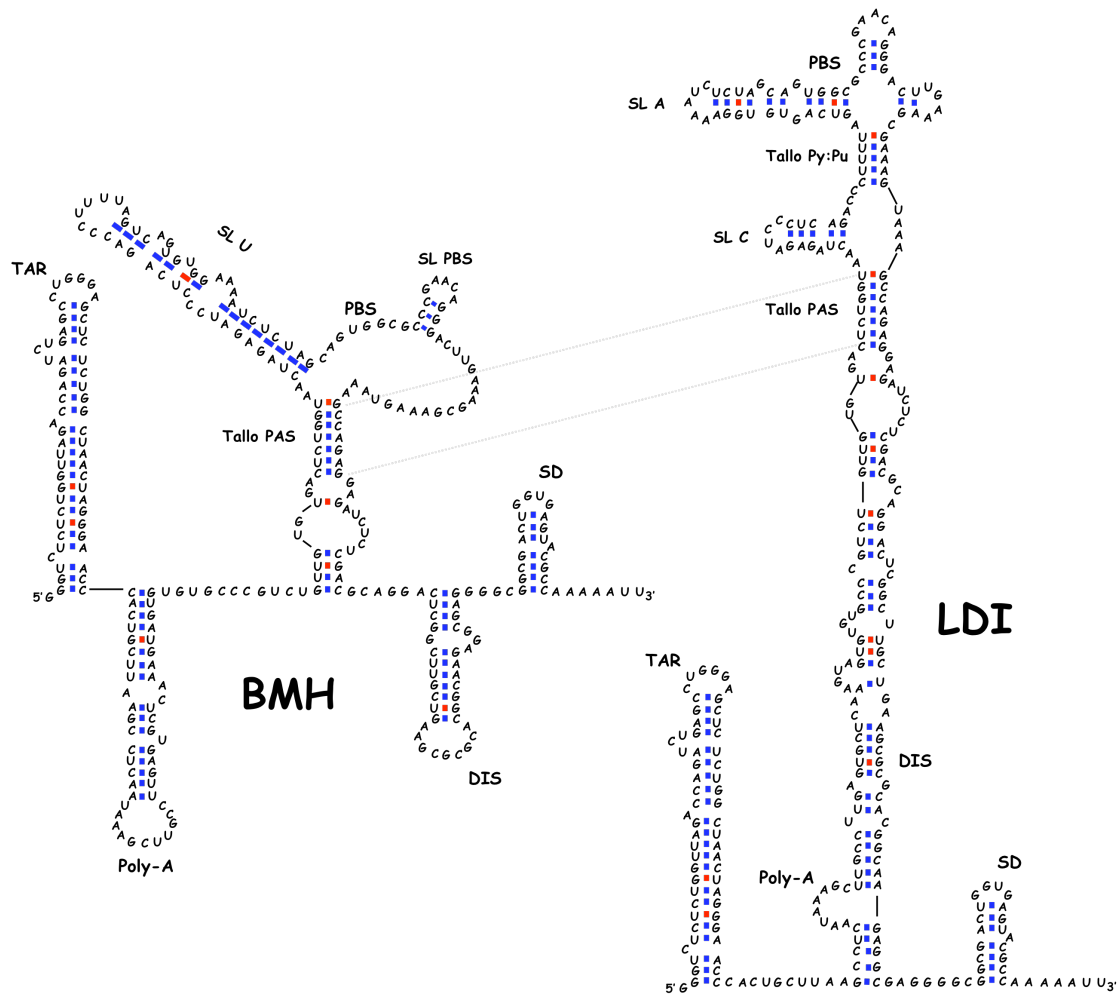


Figura 48. Estructuras secundarias propuestas para la región 5'UTR₃₀₈ basadas en los trabajos de Paillart *et al.*, 2004 (413) y Huthoff y Berkhout, 2001 (343). Nótese cómo la región por encima y por debajo del tallo PAS es intercambiable. El plegamiento de esta región que se muestra a la izquierda se le denominará PAS-PBS-SL U para diferenciarlo del derecho, PAS-SL C-SL A. Nomenclatura de los dominios: TAR (elemento de respuesta a la *trans*-activación), *Poli*-A (sitio de poliadenilación), PBS (sitio de unión del cebador), DIS (sitio de inicio de la dimerización), SD (donante principal de *splicing*), PAS (señal de activación del cebador), SL (tallos-lazo apical) y Py:Pu (pirimidina:purina).

Se usó, no obstante, el algoritmo bioinformático RNAfold (411) para el plegamiento de esta región 5'UTR₃₀₈ y se utilizó el mapa de puntos para estudiar la estructura conjunta y las múltiples posibilidades de plegamiento de la molécula. En este mapa se enfrenta la secuencia consigo misma en cada eje coordenado. En la mitad superior derecha se muestran todos los posibles apareamientos predichos por el algoritmo mediante puntos de grosor proporcional a la abundancia predicha dentro del espacio de plegamientos de la molécula. En la mitad inferior izquierda se muestra la estructura de mínima energía libre predicha. Como ya estaba

descrito, el algoritmo informático arrojó un plegamiento de mínima energía libre de tipo LDI (Fig. 49). Sin embargo, dentro del plegamiento termodinámico (parte superior derecha) pueden identificarse las diferentes horquillas propias del plegamiento BMH. De hecho, si se elimina la región DIS implicada en la dimerización y se la sustituye por un tetrámero indefinido (NNNN) induciendo al algoritmo a plegar el resto de la molécula en un contexto dimerizado, se obtienen las horquillas propias del plegamiento BMH (Fig. 49, molécula 5'UTR-DIS).

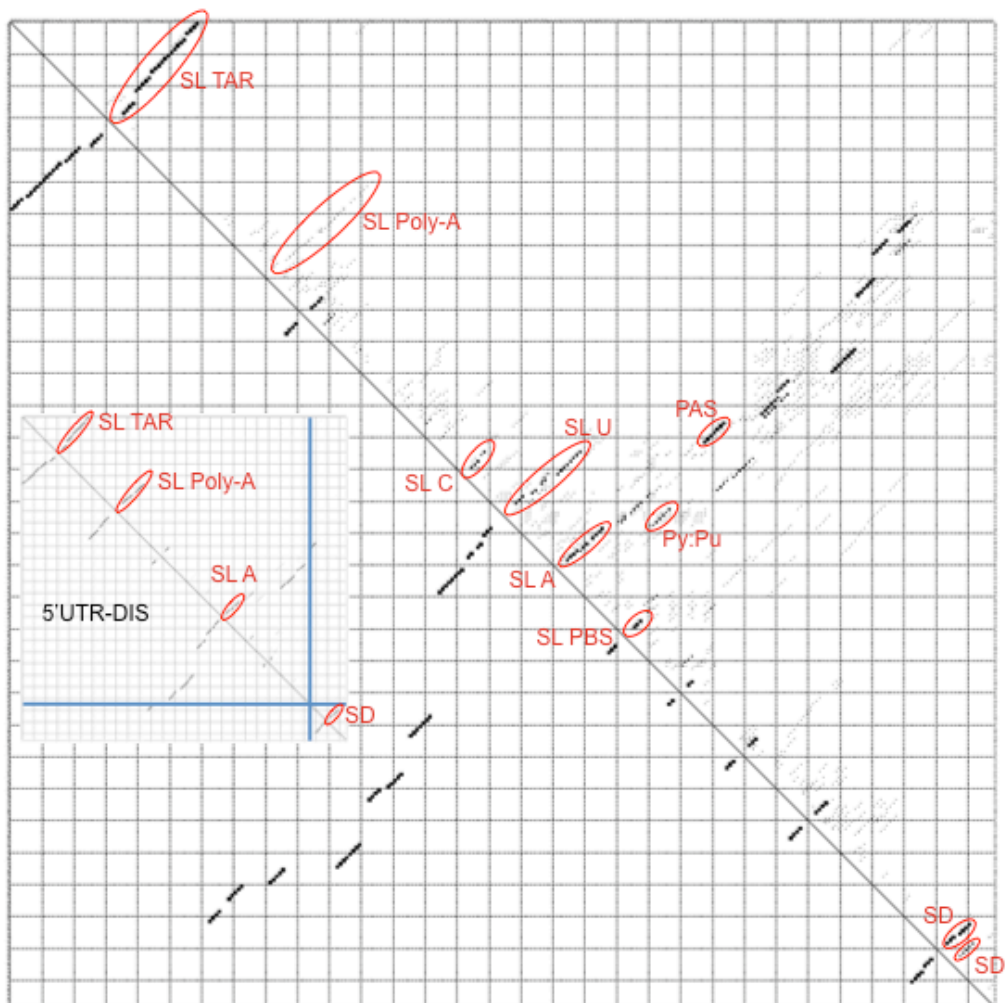


Figura 49. Mapa de puntos (dotplot) del plegamiento termodinámico de la 5'UTR₃₀₈ aquella sin la región DIS (5'UTR-DIS). En este esquema las secuencias están enfrentadas en sentido 5'→3' tanto de izquierda a derecha como de arriba a abajo. Cada punto en la cuadrícula representa un apareamiento entre sus nucleótidos de ordenadas y de abscisas. En la mitad superior derecha se representa la dispersión de puntos de todo el espacio de plegamientos, siendo el grosor del punto equivalente a su prevalencia en el mismo. En la mitad inferior izquierda se representa la estructura de mínima energía. Cada cuadrícula tiene una dimensión de 10 nt x 10 nt. Se han enmarcado las regiones representadas en la figura 48 usando su misma nomenclatura. Además, SD' representa una horquilla alternativa que expone en su lazo el punto de *splicing* alternativo al SD convencional (390). La representación principal muestra el estudio de la molécula de 5'UTR₃₀₈ y en el esquema reducido la de la molécula 5'UTR-DIS.

A la vista de todas estas posibles horquillas presentes en la 5'UTR de 308 nucleótidos de longitud, las 32 secuencias diferentes recopiladas de las rondas XI y XIV fueron plegadas *in silico* mediante el *software* informático RNAfold con el objetivo de buscar posibles coincidencias. Se detectaron estructuras en forma de horquilla en las que estaban implicadas las regiones de secuencia variable seleccionadas en las moléculas y se encontraron diversos motivos de secuencia en las moléculas complementarios a lazos apicales de horquillas presentes en el RNA 5'UTR₃₀₈. La disposición de algunos de estos motivos en los lazos apicales de horquillas obtenidas en los plegamientos *in silico* (Fig. 50) se utilizó como criterio para estimar un posible punto de interacción entre el aptámero y la diana.

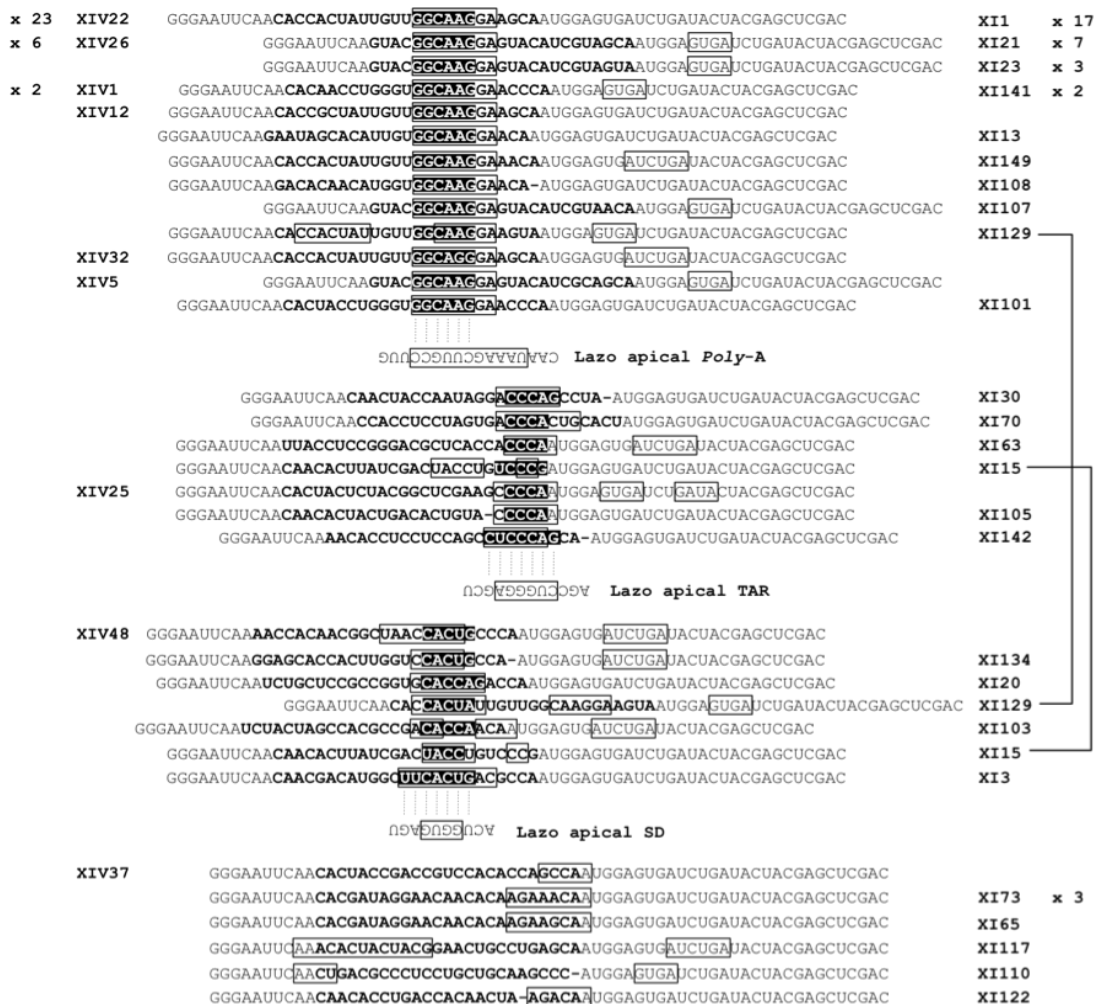


Figura 50. Predicciones estructurales y motivos putativos de unión de los aptámeros de las poblaciones XI y XIV. Las secuencias en texto normal representan las regiones constantes y en negrita las regiones seleccionadas. El texto enmarcado en cuadros representa las regiones expuestas en los lazos apicales según las predicciones de RNAfold. En texto blanco sobre fondo negro se muestran secuencias localizadas en lazos apicales de los aptámeros y complementarias a las expuestas en lazos apicales

en la molécula 5'UTR₃₀₈. En texto invertido se muestran las secuencias de dichos lazos apicales de la molécula diana. A izquierda y derecha de cada aptámero se muestra el nombre asignado en cada población (XI y XIV), así como su multiplicidad dentro de la misma (x #). En base al motivo complementario expuesto en el lazo apical de cada molécula, éstas se agruparon en aquellas con unión a *Poly-A*, a TAR y a SD. Se distinguió un cuarto grupo de aptámeros a los que no se les pudo estimar una zona de unión. Los aptámeros XI15 y XI129 pueden encuadrarse dentro de dos grupos diferentes.

Se eligieron los aptámeros XI1/XIV22, XI3, XI20, XI21/XIV26, XI30, XI63, XI70 y XI142 para cubrir todas las dianas posibles, que serían *Poly-A*, SD y TAR. Además, se decidió incluir en este estudio los aptámeros VII9 y VII24. Estos dos aptámeros se aislaron previamente mediante un experimento de selección similar contra la misma diana y parecen presentar motivos de secuencia en sus horquillas complementarios a la región PBS y a TAR. Es por esto por lo que se incluyeron en el estudio.

R.2.4. ENSAYOS DE UNIÓN DE LOS APTÁMEROS AL RNA 5'UTR₃₀₈.

Los aptámeros elegidos fueron evaluados en cuanto a su capacidad para unirse al RNA 5'UTR₃₀₈. Los aptámeros fueron marcados radioactivamente a lo largo de su longitud con ³²P durante su síntesis por transcripción (M.2.4.1) y fueron probados en reacciones de unión a concentraciones crecientes del RNA 5'UTR₃₀₈ en tampón TMN 1X a 37°C durante 30 minutos tal como se describió anteriormente para el paso de unión de las diferentes poblaciones durante el proceso de selección (R.2.2.1, M.2.8). Las reacciones de unión fueron resueltas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% en condiciones nativas (M.2.5.3).

Se observaron bandas de retardo en gel correspondientes a complejos aptámero-RNA diana que fueron cuantificadas para calcular la fracción de aptámero acomplejada en cada reacción de unión. El resultado de tres experimentos independientes fue utilizado para calcular una curva de unión a diferentes concentraciones de RNA diana que resultó ajustarse al tipo hiperbólico (Fig. 51).

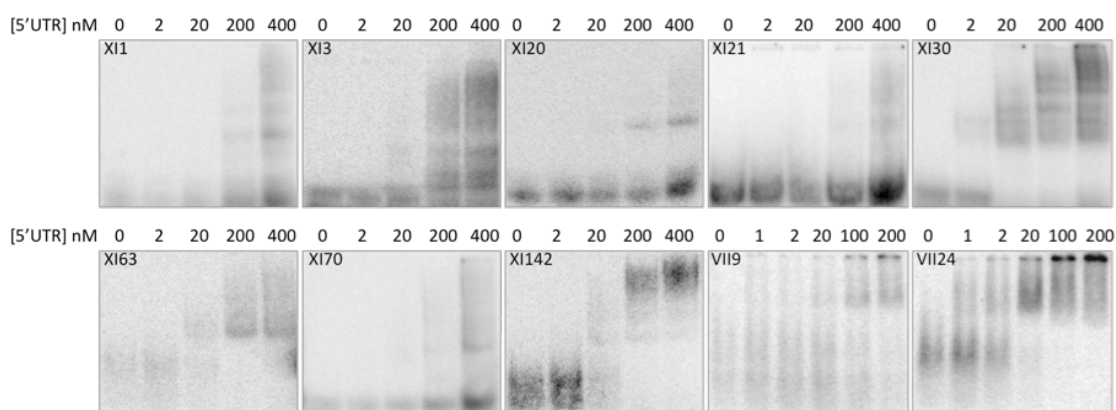


Figura 51. Panel de ensayos de unión de los aptámeros. Trazas de cada aptámero marcado radioactivamente durante su síntesis por transcripción fueron incubadas con concentraciones crecientes de RNA 5'UTR₃₀₈ frío en TMN1X. El resultado de la reacción de unión fue resuelto en geles nativos de poliacrilamida. Los ensayos se realizaron por triplicado, de los cuales se muestra una sola réplica. Las concentraciones de RNA 5'UTR₃₀₈ se muestran sobre cada gel.

R.2.5. MAPEO DE LA UNIÓN APTÁMERO-5'UTR₃₀₈.

Para la identificación del punto de unión de los diez aptámeros seleccionados se recurrió a la técnica de mapeo enzimático de estructura secundaria con RNasas T1 y A, y mapeo con Pb²⁺ (M.2.9.1). La RNasa T1 y la RNasa A catalizan el corte endonucleolítico en el esqueleto azúcar-fosfato del RNA, y en digestiones incompletas este corte puede restringirse a las regiones dispuestas en cadena sencilla en el plegamiento de la molécula. La RNasa T1 corta en 3' de residuos de guanina y la RNasa A corta en 3' de residuos pirimidínicos. El Pb²⁺ produce la hidrólisis del esqueleto azúcar-fosfato del RNA en 3' de cualquier residuo dejando, al igual que las dos RNasas, extremos 2',3'-fosfato cíclico y 5'-hidroxilo, siendo las regiones más sensibles las dispuestas en cadena sencilla. Esto resulta importante experimentalmente, pues gracias a ello no existe un patrón de migración diferente para moléculas del mismo tamaño generadas por los tres agentes ya que la distribución de grupos fosfato es la misma en todas ellas.

El mapeo de los sitios de unión mediante esta técnica se basa en que la unión del aptámero puede alterar la accesibilidad de los diferentes agentes a ciertos nucleótidos de la diana, bien por unión directa a los mismos o por inducción de alteraciones en el plegamiento de la diana, modificando en cualquier

caso el patrón de degradación. Las interacciones que impliquen apareamientos de bases, como el tipo *kissing complex*, son detectadas por estas técnicas como una protección frente a la degradación de los nucleótidos de los lazos apicales.

En primer lugar se procedió a realizar un mapeo de la estructura del RNA diana de 308 nucleótidos mediante digestión controlada con estos agentes (Fig. 52). En estos ensayos se incluyó un carril de digestión en condiciones desnaturizantes con RNasa T1 (M.2.9.2) para disponer de un carril marcador de todos los residuos de guanina de la molécula con el que identificar los puntos accesibles al corte por los diferentes agentes. En este perfil de degradación se pueden identificar perfectamente la horquilla TAR y SD, común a ambas estructuras LDI y BMH, obteniéndose un patrón indefinible hacia una u otra estructura para el resto de la molécula. Esto resulta esperable por el hecho de que en TMN 1X se dan ambas estructuras: BMH dimérico y LDI monomérico (Fig. 40).

A continuación se procedió a la digestión de la molécula RNA 5'UTR₃₀₈ en presencia de cada uno de los aptámeros y con cada uno de los tres agentes RNasa A, RNasa T1 y Pb²⁺. El RNA diana control con el que se comparan los diferentes cambios estructurales fue incubado con una cantidad de tRNA equivalente a la de los aptámeros en los demás carriles para evitar una posible desigual intensidad de degradación.

Del estudio de degradación con RNasa T1 (Fig. 53) se deduce que los aptámeros XI30, XI63, XI70, XI142 y VII24 protegen los tres residuos de guanina expuestos en el lazo apical de la horquilla TAR. Los aptámeros XI70 y VII9 protegen los residuos de guanina 182, 184, 185 y 187 correspondientes a la zona donde hibrida el extremo 3' terminal del tRNA^{lys3}. Finalmente, el aptámero XI63, además, parece proteger tenuemente el lazo apical de la horquilla SD.

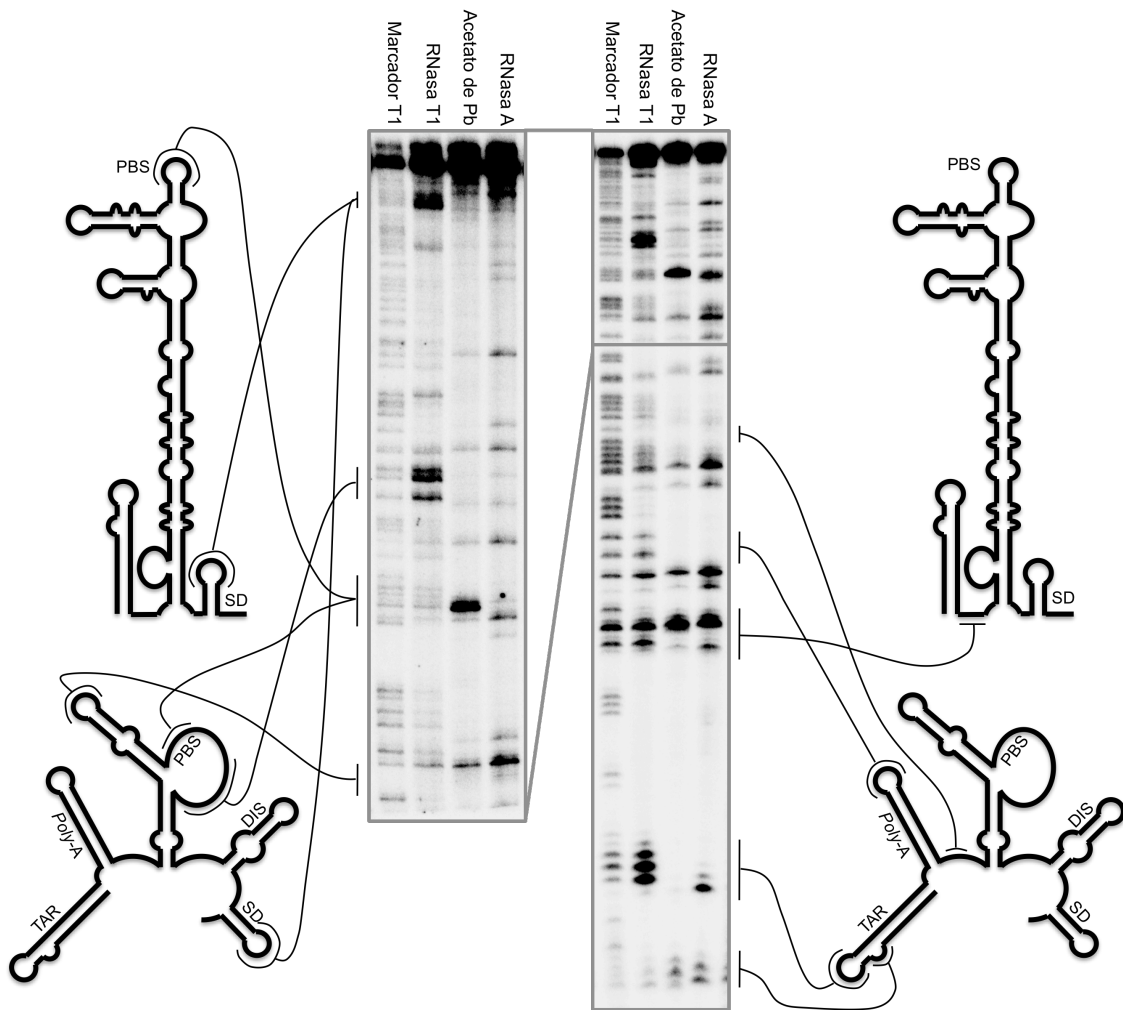


Figura 52. Perfil de degradación con RNasa T1, RNasa A y Pb^{2+} . Ambos geles muestran el perfil de degradación de la molécula 5'UTR₃₀₈ con RNasa T1 en condiciones desnaturalizantes, y con RNasa T1, acetato de plomo y RNasa A en condiciones nativas. Los diagramas muestran los plegamientos LDI y BMH predichos para la 5'UTR₃₀₈ y la localización de zonas destacadas en el gel.

El ensayo con RNasa A muestra que los aptámeros XI1 y XI30 protegen la burbuja ₂₃UCU₂₅ del dominio TAR. Además, el aptámero XI30, junto con los aptámeros XI70, XI142 y VII24, protege las pirimidinas C₃₀U₃₁ expuestas en el lazo apical TAR. El aptámero XI1, en cambio, protege además las C₆₁U₆₂ y varias de las pirimidinas del lazo-U (₁₅₂CCUUUU₁₅₇). Finalmente, los aptámeros XI30 y XI63, y más débilmente XI20 y VII24, protegen la U₂₉₂ del SD (Fig. 54).

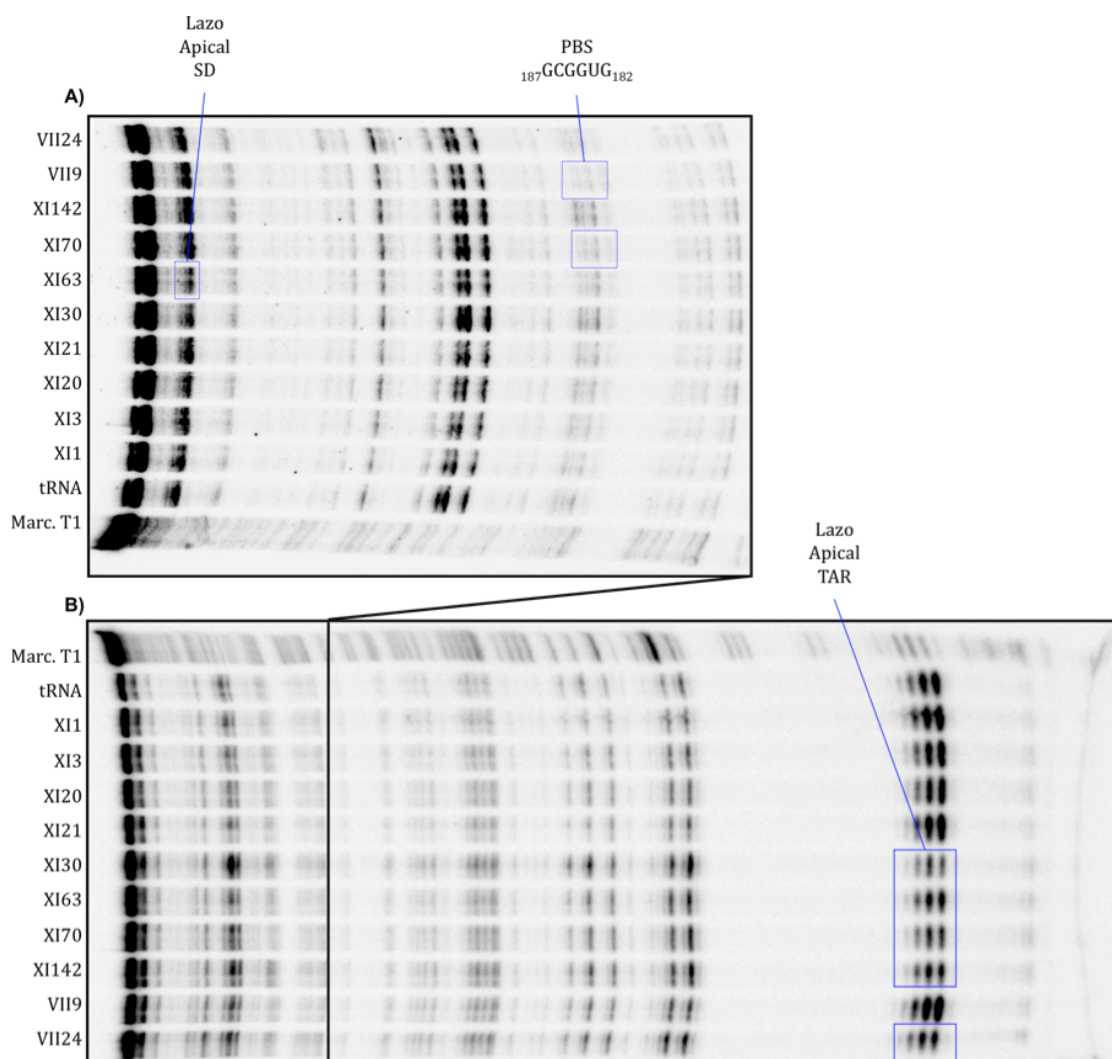


Figura 53. Ensayo de protección frente a RNasa T1. Las reacciones se dividieron en dos justo antes de la carga en gel, cargando la mitad de la reacción en cada gel. La electroforesis del gel (B) se detuvo antes de que el frente de la reacción se saliese del mismo, mientras que en el gel (A) se dejó salir para poder resolver la región 3' de la molécula. Con cuadros azules de línea continua se marcan las protecciones más intensas y con línea discontinua las protecciones más débiles.

En el ensayo con Pb^{2+} se observa cómo los aptámeros XI30, XI70 y XI142 protegen parte de la burbuja del dominio TAR. Al mismo tiempo XI20, XI30, XI63, XI142 y VII24 protegen parte de la región ${}_{64}CUUAA_{68}$ y XI70 y VII9 además protegen, al igual que ocurría en el ensayo de RNasa T1, la región donde hibrida el extremo 3' del $tRNA^{Lys3}$. Por último, los aptámeros XI30, XI63, VII24 y, más tenuemente, XI20, parecen proteger el lazo apical SD (Fig. 55).

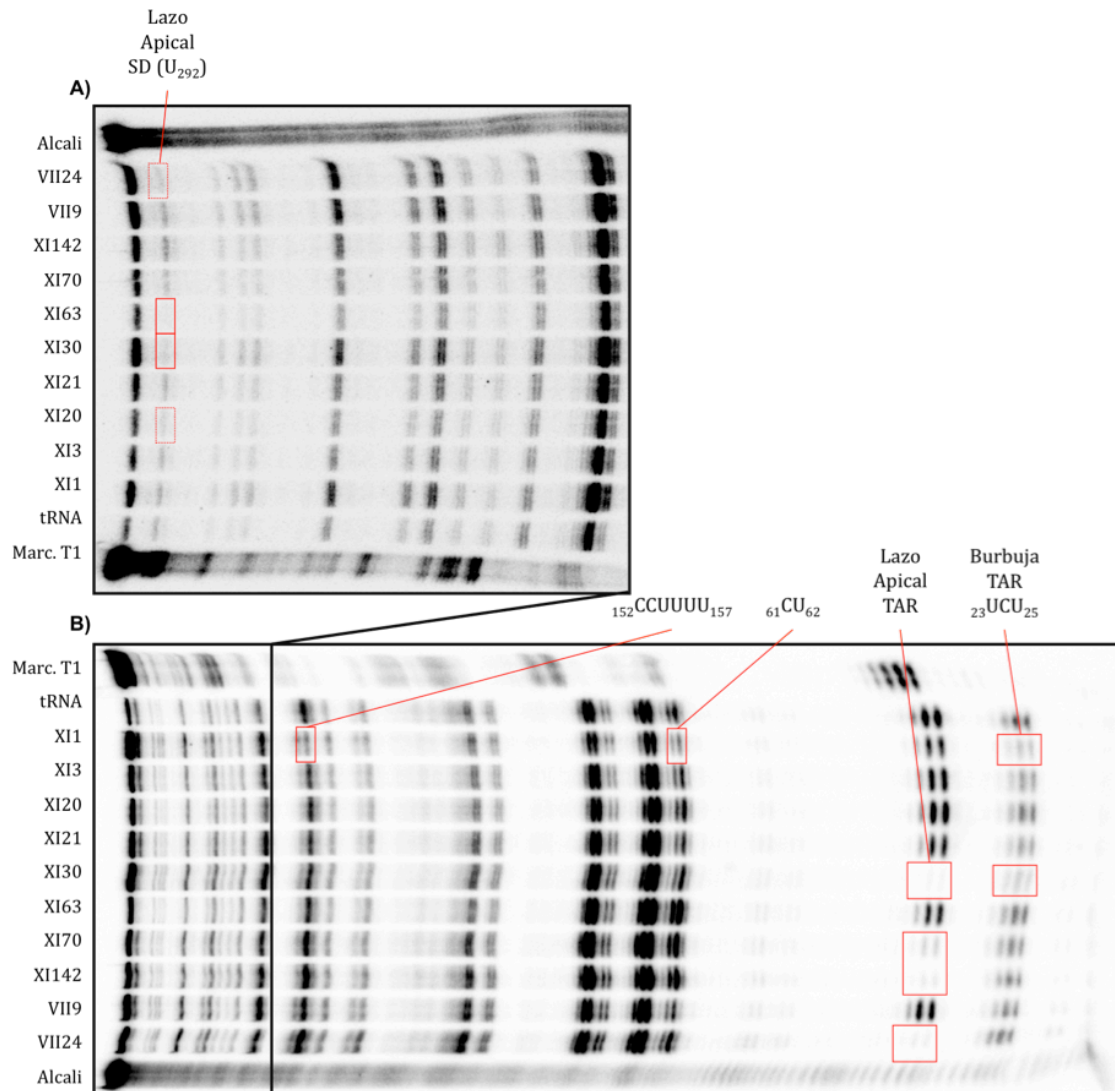


Figura 54. Ensayo de protección frente a RNasa A. Se realizan dos geles gemelos del mismo modo que en la Figura 50. El gel (A) resuelve la parte 3' de la molécula y en el (B) está contenida entera. Con cuadros rojos de línea continua se marcan las protecciones más intensas y con línea discontinua las protecciones más débiles.

Es de destacar, también, que XI70 y VII9 deben producir una alteración estructural adicional en la región PBS, pues además de proteger parte de la misma, se registra una mayor sensibilidad a la hidrólisis por Pb^{2+} del lazo apical de la horquilla-C ($_{143}CCCUC_{147}$), en el caso de XI70, y de la región ($_{205}AAGCGAA_{211}$), en el caso de VII9.

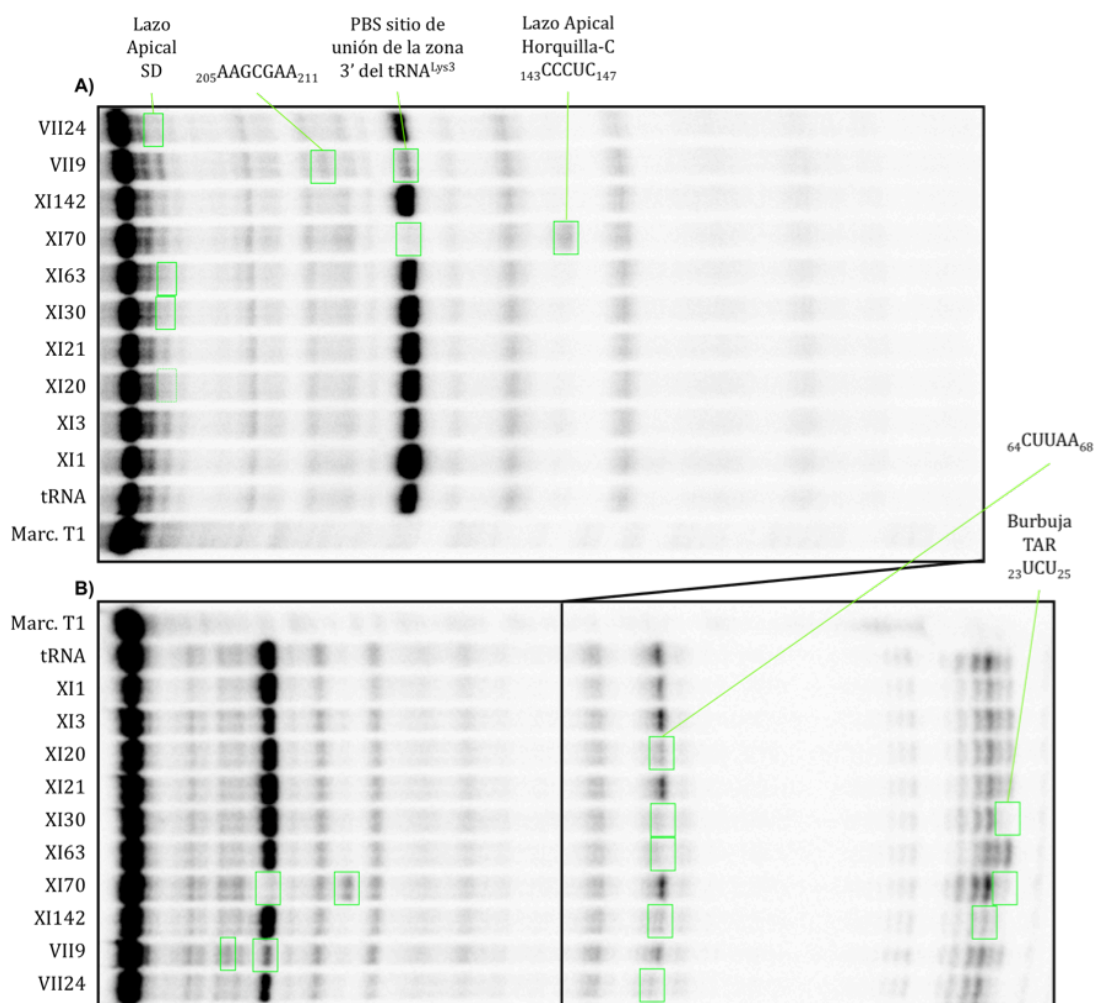


Figura 55. Ensayo de protección frente a Pb²⁺. Se realizaron dos gels gemelos del mismo modo que en la Figura 50. El gel (A) resuelve la parte 3' de la molécula y en el (B) está contenida la molécula entera. Con cuadros verdes de línea continua se marcan las alteraciones más intensas y con línea discontinua las más débiles.

R.2.6. DISEÑO DE VECTORES DE EXPRESIÓN EUCARIÓTICOS.

Para proceder con los estudios de inhibición *ex vivo* de la replicación viral por parte de los aptámeros, se recurrió a la transfección directa de células con RNAs presintetizados *in vitro* así como con un vector de expresión eucariótico portador de las secuencias ensayadas. Se utilizó el vector pU6 (M.1.7) y las secuencias fueron clonadas entre los sitios *KpnI* en 5' y *ApaI* en 3'. Se aprovecharon las regiones constantes a ambos lados de la secuencia seleccionada para hibridar cebadores de PCR que incorporasen ambos sitios de restricción. De este modo, la secuencia de estos cebadores fue: 5'*KpnI*C3 (5'-CGACTCGGTACCGGGAATTCAA-3') y 3'*KpnI*C3 (5'-TCTGGGCCCGTCGAGCTCGTAGTATC-3'). Para los aptámeros VII9 y

VII24 se utilizaron los cebadores: 5'KpnIC2 (5'CGACTCGGTACCGGGAATTCGAGG-3') y 3'KpnIC2 (5'-TCTGGGCCCTCGAGCTCGCTGAAAG-3').

R.2.7. INHIBICIÓN POST-INTEGRATIVA DE VIH-1 POR APTÁMEROS DE RNA.

Los RNAs presintetizados *in vitro* se diseñaron para contener la secuencia de los aptámeros flanqueadas por las horquillas del snRNA U6 (Fig. 32, R.1.1). Para su transcripción *in vitro* se generaron moldes de PCR desde las construcciones pU6 que contenían los aptámeros utilizando los cebadores 5'T7U6 y 3'ApIU6 ya descritos en R.1.1. Los RNAs fueron transcritos *in vitro* (M.2.1.4) y directamente purificados mediante extracción fenólica (M.2.2.3) sin purificar por gel, pues se comprobó que algún contaminante arrastrado de la purificación por gel resultaba tóxico para las células en cultivo. Es por esto por lo que la integridad de los RNAs transcritos *in vitro* se chequeó, una vez purificados, por gel de electroforesis.

La capacidad inhibidora de los RNAs presintetizados *in vitro* fue probada mediante ensayo de cotransfección de cultivos celulares de la línea HEK293T (M.2.16.1) con una mezcla de aptámero y plásmido pNL4.3 portador del DNA proviral (M.1.7). La figura 56 muestra el resultado de la cuantificación de antígeno p24 viral en el sobrenadante del cultivo tras 48 horas desde la transfección (M.2.18).

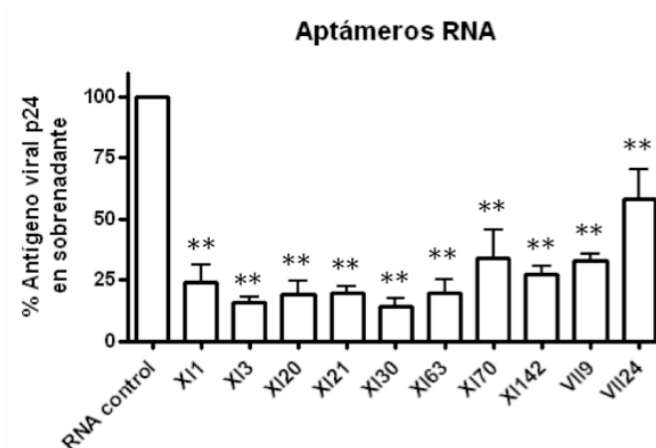


Figura 56. Inhibición post-integrativa de los aptámeros de RNA sintetizados *in vitro*. Cotransfección de cultivo de células HEK293T con pNL4.3 y diferentes aptámeros de RNA. Se indica el porcentaje de antígeno p24 viral en el sobrenadante celular 48 horas tras la transfección referido al efecto del RNA control. Se aplicó un test estadístico ANOVA de una cola con una confianza del 99% y una comparación

múltiple de Dunnett que revelan diferencias estadísticamente significativas (**) con un valor $p < 0.01$.

Se puede apreciar que el efecto inhibitor de la mayoría de los RNAs desnudos logra reducir la cantidad de antígeno viral p24 en el sobrenadante a menos del 25% del registrado para el RNA control, siendo los más efectivos los aptámeros XI3 y XI30 ($15.86 \pm 2.269\%$ y $14.01 \pm 3.567\%$ respectivamente). El aptámero menos efectivo en inhibición fue el VII24, con aproximadamente un $57.9 \pm 12.16\%$ de antígeno. Como RNA control se usó una construcción consistente en las horquillas flanqueantes del snRNA U6 sin ninguna secuencia seleccionada como aptámeros entre ellas.

R.2.8. INHIBICIÓN POST-INTEGRATIVA DE VIH-1 POR CONSTRUCCIONES DE EXPRESIÓN DE APTÁMEROS DE RNA.

Al igual que con RNAs presintetizados, el efecto inhibitor de los aptámeros también se probó mediante vectores de expresión eucarióticos. Cultivos celulares de la línea HEK293T fueron cotransfectados con el plásmido pNL4.3 y cada una de las construcciones pU6 (M.2.16.1) y tras 48 horas se cuantificó la cantidad de antígeno viral p24 en el sobrenadante (Fig. 57).

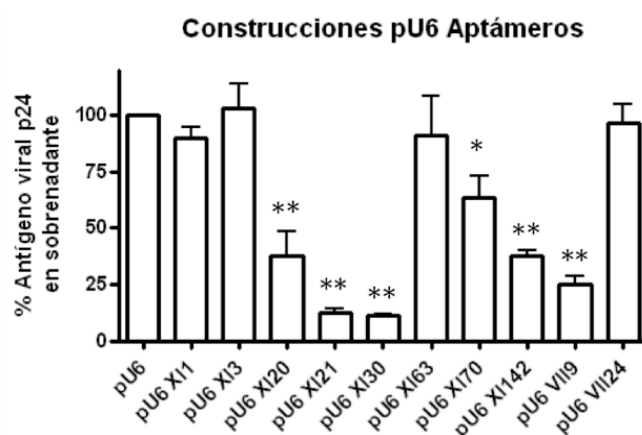


Figura 57. Inhibición post-integrativa de las construcciones pU6 de expresión de aptámeros de RNA. Se cotransfectan cultivos celulares de la línea HEK293T con pNL4.3 y las diferentes construcciones pU6. La gráfica indica el porcentaje de antígeno p24 viral en el sobrenadante celular 48 horas tras la transfección referido al registrado para el RNA control. Las diferencias estadísticas se determinan mediante un test ANOVA de una cola y con una confianza del 99%. La comparación múltiple de Dunnett determina aquellas columnas diferentes al control con un valor $p < 0.05$ (*) y $p < 0.01$ (**).

Los mayores efectos inhibidores fueron registrados por los aptámeros XI20 y XI21, que superaron el 80% de inhibición. El aptámero VII9 superó el 75% de inhibición y los aptámeros XI20 y XI142 superaron el 60% de inhibición. Los aptámeros XI1, XI3, XI63 y VII24 no registraron efecto inhibidor alguno.

R.2.9. ANÁLISIS DE INDUCCIÓN DE RESPUESTA MEDIADA POR INTERFERÓN DE LOS APTÁMEROS DE RNA PRESINTETIZADOS Y LAS CONSTRUCCIONES DE EXPRESIÓN.

Para descartar la posibilidad de la implicación de la respuesta mediada por interferón en las inhibiciones registradas sobre VIH-1, se midió la inducción de un gen indicador de dicha respuesta. Para ello se utilizó RNA total extraído de cultivos celulares de HEK293T cotransfectados con pNL4.3 y cada uno de las construcciones pU6 (M.2.2.2) tras 48 horas de la misma. Se utilizaron 100 ng de RNA total como molde para retrotranscripción con hexanucleótidos de secuencia aleatoria (M.2.1.5) y el cDNA generado fue utilizado, a su vez, como molde para una PCR semicuantitativa de los genes ISG56 (marcador de la respuesta a interferón) y GAPDH (control de normalización) (M.2.19.1). El control positivo de inducción de la respuesta a interferón consistió en una transfección del cultivo celular con *Poly-I:C*, inductor de la respuesta a interferón, mientras que el control negativo fue una transfección exclusivamente con pNL4.3, pues se describe que VIH-1 inhibe la respuesta a interferón. El resultado de la PCR semicuantitativa resuelta en gel de agarosa indica que los aptámeros XI1, XI3, XI21, XI63 y XI70 inducen muy ligeramente la respuesta a interferón, muy lejos de la respuesta dada por *Poly-I:C*. El resto de las construcciones pU6 probadas no indujeron la transcripción de mRNA de ISG56 detectable por esta técnica (Fig. 58).

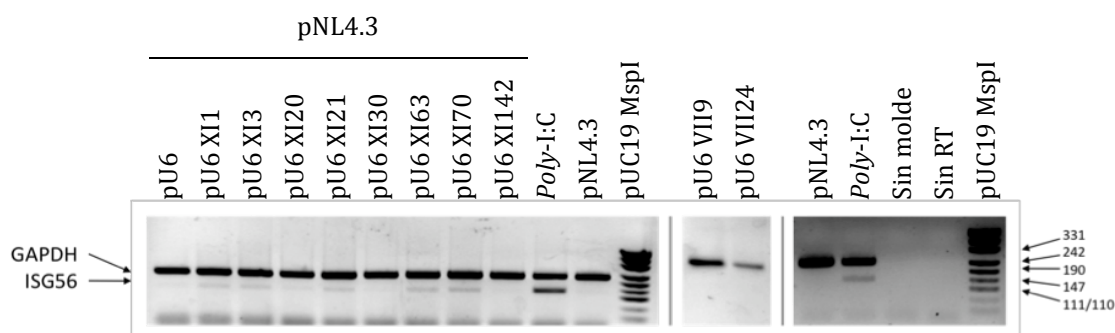


Figura 58. Inducción de la señalización por interferón durante la inhibición de VIH-1 por plásmidos pU6 de expresión de aptámeros RNA. En la figura se muestra la RT-PCR semicuantitativa realizada sobre RNA total extraído de células HEK293T cotransfectadas con pNL4.3 y los diferentes vectores de expresión de aptámeros pU6, así como células transfectadas con *poly-I:C* como control positivo de inducción de respuesta a interferón y solo con pNL4.3 como control negativo. Se amplificaron los genes ISG56, como indicador de los niveles de respuesta a interferón y GAPDH como normalizador interno. Las bandas de amplificación correspondientes a cada uno se indican a la izquierda de la figura.

Cultivos celulares de la línea HEK293T fueron transfectados con 500 ng de cada uno de los RNAs presintetizados. Tras 48 horas desde la transfección, se extrajo RNA total de células (M.2.2.2) y se utilizaron como molde para retrotranscripción (M.2.1.5) seguida de PCR semicuantitativa de las especies ISG56 y GAPDH (M.2.19.1). El resultado reveló que, si bien todos los RNAs presintetizados indujeron transcripción del ISG56, ninguno experimentó una inducción superior a la producida por el control positivo *Poly-I:C* cuando se compara con el control de normalización GAPDH. Además, todos tuvieron niveles similares a la inducción registrada por el RNA control que no produce inhibición de VIH-1 (Fig. 59).

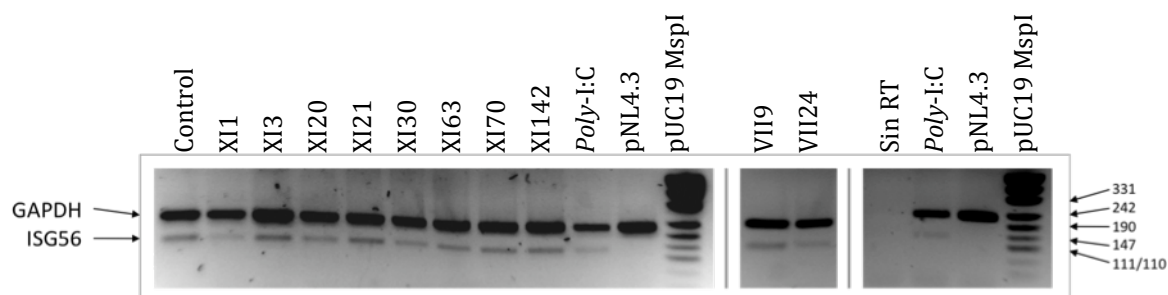


Figura 59. Inducción de la señalización mediada por interferón en células HEK293T transfectadas con aptámeros RNA. En la figura se muestra la RT-PCR semicuantitativa realizada sobre RNA total extraído de células HEK293T transfectadas con los diferentes aptámeros de RNA. Los genes amplificados y los controles utilizados son los mismos que los del experimento representado en la figura 58.

R.2.10. INHIBICIÓN PREINTEGRATIVA DE VIH-1 POR CONSTRUCCIONES DE EXPRESIÓN DE APTÁMEROS DE RNA.

La cotransfección de cultivos celulares con combinaciones de DNA proviral e inhibidores sitúa a estos en un contexto postintegrativo, pues el ciclo viral se inicia en el punto tras la integración en el genoma humano. Los efectos inhibidores registrados han de deberse, por tanto, a la intervención de los pasos posteriores a la integración.

Para determinar el posible efecto inhibidor preintegrativo de los aptámeros de RNA generados, se recurrió a la infección mediante partículas virales de cultivos de células linfoides Jurkat previamente transfectadas con los plásmidos de la serie pU6 (M2.1.7). Se pretende recrear de este modo un ambiente similar a la infección de una célula modificada por terapia génica.

La infección de células Jurkat fue realizada mediante incubación con sobrenadantes celulares de cultivos de la línea HEK293T tras 48 horas desde una transfección con pNL4.3. La carga viral fue titulada mediante cuantificación del antígeno p24 viral presente en cada sobrenadante y 250.000 células Jurkat previamente transfectadas fueron infectadas con una cantidad de virus equivalente correspondiente a 20 ng de antígeno viral p24.

Se ensayaron dos tiempos de infección, a las 24 y a las 48 horas de la transfección, y se dejó transcurrir la infección durante 5 días. En ese momento se midió la cantidad de antígeno p24 viral generado por los cultivos mediante enzima-inmunoensayo (M.2.18).

Puede observarse que en la infección tras 48 horas desde la transfección no se detectan cambios significativos en el título viral, mientras que en la infección tras 24 horas sí, con lo que se puede deducir que los cambios en el título viral se deben a una reducción de las primeras generaciones de viriones que afecta el subsiguiente transcurso de la infección. Esto resulta lógico debido a que la transfección es transitoria y es esperable una disminución de la presión del aptámero sobre los sucesivos ciclos virales que ocurren en el cultivo. Sin embargo, a pesar de esto, puede observarse que los aptámeros XI30 y XI142 ocasionan una reducción significativa de la carga viral en los cultivos de Jurkat transfectados 24

horas antes de la infección ($18'97 \pm 6'566\%$ y $34'66 \pm 5'436\%$ respectivamente) (Fig. 60).

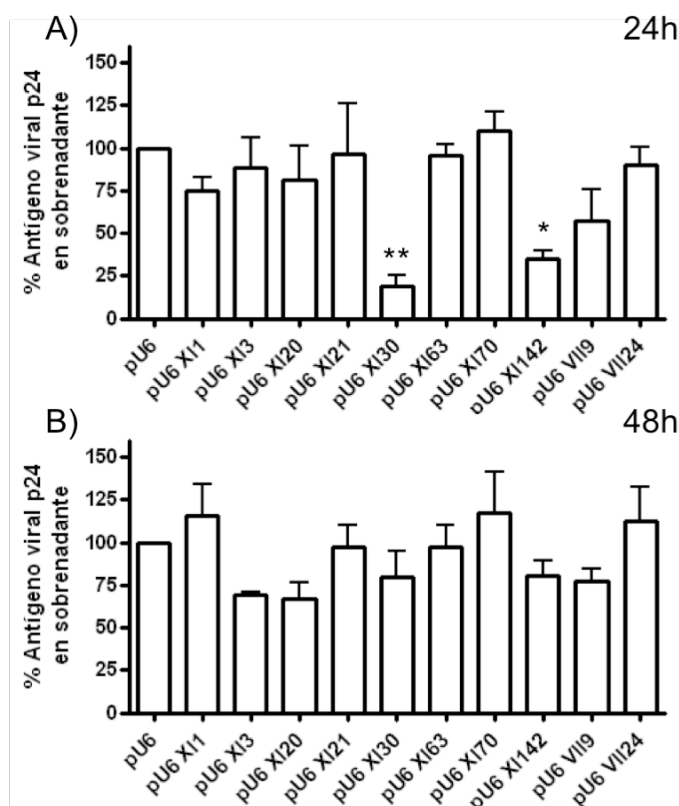


Figura 60. Inhibición preintegrativa producida *ex vivo* por las construcciones pU6 de expresión de aptámeros RNA. Cultivos celulares de la línea Jurkat se transfectaron con las diferentes construcciones y se infectaron posteriormente con viriones de VIH-1 24 horas (A) y 48 horas (B) después de la transfección. Las concentraciones de antígeno viral p24 en el sobrenadante celular se midieron 5 días después de la infección.

R.2.11. DISEÑO BIOINFORMÁTICO DE LA MOLÉCULA RNA16(+), INHIBIDORA DE VIH-1.

De los datos obtenidos de la secuenciación de las diferentes poblaciones (y que se encuentran reflejados en la figura 50), se observó que el 62'16% de los clones secuenciados de la población XIV resultaron portar la misma molécula: el aptámero XIV22. Este mismo aptámero fue también el más abundante en la población XI (llamado en ella XI1 y con un 32'69% de prevalencia) y presenta un lazo apical en su plegamiento *in silico* que expone el motivo de secuencia 5'-GGCAAGGA-3' seleccionado dentro de la región de 25 nucleótidos de secuencia

aleatoria. Este mismo motivo se encontró presente en otros aptámeros de ambas poblaciones (XIV1, XIV5, XIV12 y XIV26 en la población XIV; y XI13, XI21, XI23, XI101, XI107, XI108, XI129, XI141 y XI149 en la población XI). Contando con la especial abundancia también de los aptámeros XI21/XIV26, XI141/XIV1 y XI23, el resultado es que este motivo estaba presente en el 89'19% y en el 65'38% de los aptámeros de las poblaciones XIV y XI respectivamente. El aptámero XIV32 presenta un lazo apical similar de la misma secuencia con una alteración A5G dentro del motivo.

Se realizó un estudio combinando los resultados experimentales y un análisis bioinformático complejo en colaboración con el grupo de investigación del doctor Carlos Briones Llorente, del Centro de Astrobiología (CSIC-INTA, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Instituto Nacional de Tecnología Aeroespacial) para la identificación de motivos estructurales presentes en los diferentes aptámeros seleccionados que pudieran estar implicados en un mecanismo común de unión. Todas las secuencias completas (de 64 nt) se plegaron *in silico* en su estructura de mínima energía (MFE, *minimum free energy*) empleando el *Vienna RNA package* en versión 1.5 (414), con los parámetros energéticos descritos en (415), sin permitir la presencia de pares de bases aislados y definiendo como longitud mínima para un tallo 2 pares de bases. En todas las estructuras MFE de la ronda XIV, el motivo de secuencia referido anteriormente aparece formando un lazo de cadena sencilla de 8 nucleótidos en posición apical respecto a un tallo de al menos cuatro pares de bases. Es destacable, además, el hecho de que la mutación presente en el aptámero XIV32 no altera la estructura del motivo. Sin embargo, no se detecta una conservación clara de los nucleótidos que forman los apareamientos del tallo. El alineamiento de las secuencias que contienen este motivo muestra el siguiente consenso: NNDYGGCARGGARNNN (notación IUB para nt degenerados: D=A,G,U; Y=C,U; R=A,G; N=A,C,G,U), donde se muestra subrayada la secuencia de cadena sencilla.

Se decidió entonces diseñar una molécula sintética de RNA de 16 nt que contuviera el motivo indicado en un lazo terminal definido por un tallo muy estable de 4 pares de bases para comprobar si este motivo, por sí solo, era capaz de inhibir la replicación viral al mismo nivel que lo hacen las moléculas testadas que lo portan (XI1 y XI21). Esta molécula fue llamada RNA16(+) y su secuencia fue 5'-

CCCCGCAAGGAGGG-3', en la que los cuatro pares C-G consecutivos garantizan la estructura descrita para este motivo y que se muestra en la figura 61.

Como control negativo para los experimentos de inhibición se pensó en una molécula también de 16 nt de longitud y la misma estructura, pero que fuese la menos favorecida para su unión a la molécula de RNA 5'UTR₃₀₈. Para ello, se plegaron extensivamente *in silico* todas las moléculas de tipo 5'-CCCCNNNNNNNNGGGG-3' ($4^8 = 65.536$ secuencias) utilizando el programa *RNAfold* y se seleccionaron aquellas con la estructura (((((.....)))) expresada en código de puntos y paréntesis (*dot-bracket*) como estructura de mínima energía (19.087 secuencias). Seguidamente se evaluó, mediante comparación sistemática de secuencias, cuáles de ellas tenían un menor número de nucleótidos complementarios a la molécula diana, tanto en sus regiones de cadena sencilla como en las de doble cadena, en cualquiera de las dos orientaciones y permitiendo pares de tipo Watson y Crick (GC, AU) y *wooble* (GU). Se obtuvo un grupo de 112 secuencias con la restricción de que formaran un máximo de 5 posibles pares de bases entre la molécula de 16 nt y la diana, siendo consecutivos un máximo de 4 de esos pares de bases. Utilizando el programa *RNAup*, se calculó la energía de interacción para todas estas moléculas, teniendo en cuenta la estructura de la diana. Los resultados mostraron energías libres de interacción entre -0'40 y -7'20 kcal/mol. Resultando la secuencia 5'-CCCCGAAAACAAGGGG-3', denominada como RNA16(-), la que tenía mayor energía de unión (-0'40 kcal/mol) y, por tanto, era la menos favorecida. La estructura predicha *in silico* para esta molécula se muestra también en la figura 61.

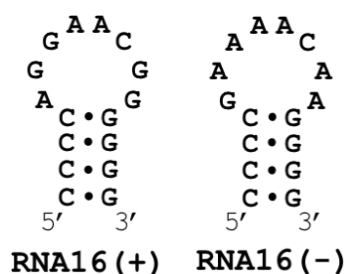


Figura 61. Aptámero diseñado *in silico* RNA16(+) y peor ligando diseñado *in silico* RNA16(-). La molécula RNA16(+) fue diseñada *in silico* para unirse a la 5'UTR₃₀₈ de HIV-1 por su elemento *Poly-A* en base a los estudios bioinformáticos de selección realizados sobre las diferentes poblaciones del ciclo de selección. La

molécula RNA16(-) fue diseñada como el peor ligando posible a la misma molécula diana.

R.2.12. INHIBICIÓN POST-INTEGRATIVA DE VIH-1 POR RNAs SINTÉTICOS DISEÑADOS *IN SILICO*.

La molécula RNA16(+) se diseñó expresamente para constituir el dominio de unión mínimo del grupo de aptámeros que se unen al elemento *Poly-A*. En cambio, la molécula RNA16(-) se diseñó para constituir el peor ligando posible contra la molécula diana 5'UTR₃₀₈. Estas dos moléculas se obtuvieron presintetizadas por IBA Nucleic Acids Synthesis (IBA GmbH) y se ensayaron como inhibidores del VIH-1 mediante cotransfección de cultivos celulares de la línea HEK 293T con los diferentes RNAs desnudos y el DNA proviral pNL4.3 (M.2.18).

La molécula RNA16(-) se refirió como control negativo de inhibición. El resultado de inhibición obtenida por la molécula de RNA16(+) fue del 63'34±2'136% respecto al control negativo (Fig. 62).

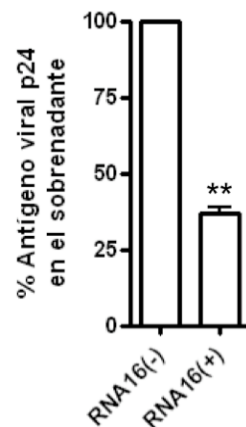


Figura 62. Inhibición mediada por RNA16(+). En la figura se muestra el resultado de inhibición de la actividad viral como reflejo de la cuantificación de antígeno p24 viral en el sobrenadante celular de cultivos celulares HEK293T 48 horas después de la transfección con 500 ng de RNA inhibidor y 100 ng de pNL4.3. El resultado mostrado es la media y desviación típica de triplicados independientes y la diferencia se estima significativa con valor $p < 0.01$ (ANOVA de una cola con intervalo de confianza del 99%).

R.2.13. ENSAYOS DE UNIÓN DE LAS MOLÉCULAS INHIBIDORAS RNA16(+) Y LOS APTÁMEROS XI1 Y XI21 FLANQUEADOS POR LAS HORQUILLAS DEL snRNA U6.

Los diferentes aptámeros utilizados en los ensayos de inhibición se unen putativamente a diferentes elementos funcionales dentro de la 5'UTR de VIH-1. El efecto inhibitor de todos ellos vendrá no solo determinado por la capacidad de unión del aptámero, sino por la importancia cualitativa de la funcionalidad del dominio del RNA de HIV-1 con el que interfiere. Sin embargo, los aptámeros XI1 y XI21 contienen ambos el motivo estructural determinado bioinformáticamente y, en base al cual, se ha diseñado la molécula RNA16(+). *A priori*, las tres moléculas se estarían uniendo a la misma región y cobra sentido hacer un estudio de su unión a la diana para establecer un patrón de inhibición.

Así pues, se realizaron ensayos de unión *in vitro* de las tres moléculas marcadas radiactivamente en su extremo 5' (M.2.4.2), a diferentes concentraciones de molécula diana no marcada. En el caso de los aptámeros XI1 y XI21, se utilizaron las moléculas fusionadas con las horquillas del snRNA U6 flanqueantes tal cual se utilizaron para los ensayos de inhibición (Fig. 32), pues se pretende incorporar el efecto de las mismas a la unión del aptámero. El resultado de dicha unión se resolvió por medio de electroforesis en geles nativos (Fig. 63), donde se detectaban complejos aptámero-molécula diana como bandas con migración retardada respecto al patrón de bandas obtenidas para la reacción en ausencia de molécula diana.

La molécula RNA16(-) diseñado para ser el peor ligando de la molécula de RNA de la 5'UTR₃₀₈ de HIV-1, y que ha sido utilizado como control negativo de inhibición, también fue ensayado para su unión a la diana. No se detectaron complejos de retardo significativos en las reacciones de unión con esta molécula (Fig. 63B, gel de la derecha).

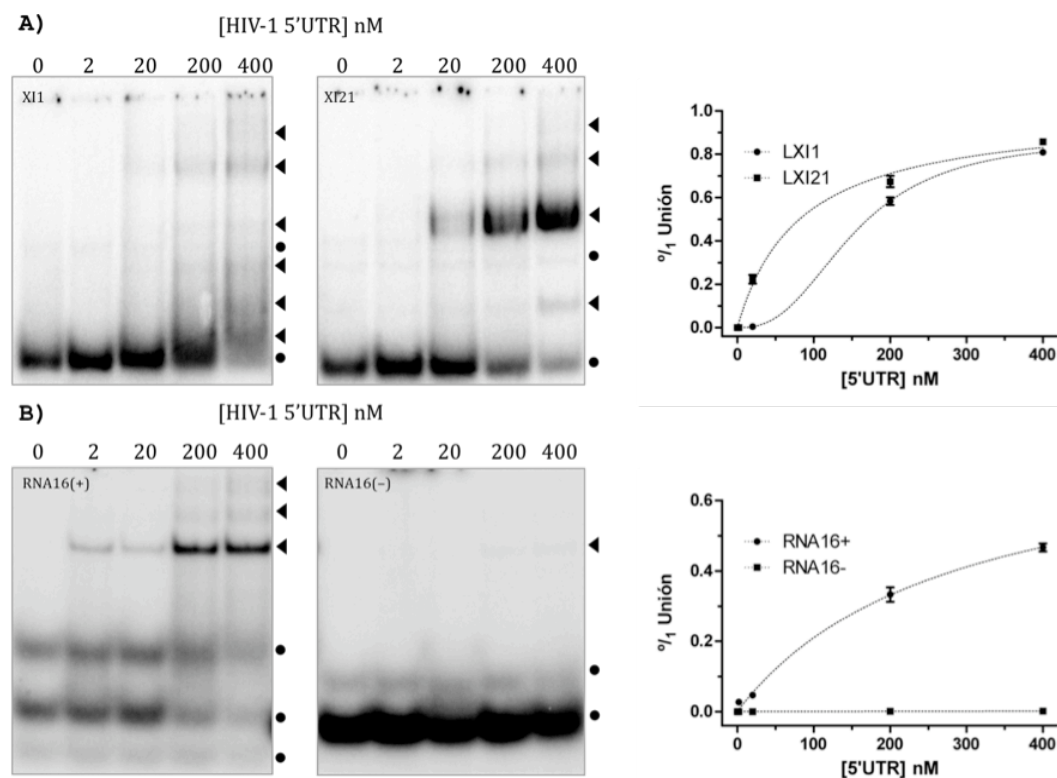


Figura 63. Unión de los RNAs inhibidores a la molécula de RNA 5'UTR₃₀₈ de HIV-1. En (A) se muestra la unión de los RNAs constituidos por los aptámeros XI1 y XI21 flanqueados por las horquillas terminales 5' y 3' del snRNA U6. En (B) se muestra la unión de las moléculas RNA16(+) y RNA16(-). Junto a cada gel, con un círculo negro se indican las bandas correspondientes a las moléculas no unidas, y con puntas de flecha, las correspondientes a complejos de unión. En las gráficas juntas se representa la cuantificación de la unión y las curvas a las que se han ajustado (hiperbólica para RNA16(+) y XI21, y cooperativa para XI1).

De la cuantificación de los complejos de unión y la fracción de aptámero libre para la molécula RNA16(+) y el aptámero XI21, se obtuvo un patrón de unión ajustable al modelo hiperbólico con un único sitio de unión, con un coeficiente R² superior en ambos casos a 0'99 (Fig. 63). La curva de unión del aptámero XI1, en cambio, se ajustaba al modelo de cooperatividad de Hill con un único sitio de unión, también con un coeficiente R² superior a 0'99 (Fig. 63). Los parámetros matemáticos de las diferentes curvas se muestran en la tabla 7.

MOLÉCULA	K _D (NM 5'UTR ₃₀₈)	B _{MÁX} (%)	R ² - TIPO DE CURVA	<i>h</i>
XI1	153.50±4.84	87.59±1.258	0'9987 - cooperativa	2'604±0'8588
XI21	81.67±12.81	≈100	0'9912 - hiperbólica	-
RNA16(+)	279.50±59.99	79.35±8.2	0'9908 - hiperbólica	-

Tabla 7. Parámetros de unión de las moléculas inhibidoras analizadas.

DISCUSIÓN

D.1. DISEÑO DE NUEVOS INHIBIDORES PARA VIH-1.

El VIH-1 fue descubierto a principios de la década de los 80 aunque se ha constatado su existencia en sueros congelados de pacientes infectados varias décadas antes (416), de modo que se postula que el virus habría saltado de diferentes especies de simios a la especie humana en el continente africano y no fue detectado hasta que comenzó a afectar a poblaciones humanas de países con sistemas de salud pública desarrollados.

Los medicamentos utilizados desde entonces han consistido en inhibidores químicos contra actividades enzimáticas específicas del virus como la proteasa, la integrasa o la reversotranscriptasa. Estos medicamentos presentan una alta pero no total eficacia para la eliminación del virus, de modo que la terapia combinada de varios de ellos consigue una reducción efectiva de la carga viral de los pacientes hasta niveles indetectables que les posibilitan una esperanza de vida similar a la de los individuos sanos. No obstante, la retirada del tratamiento ocasiona la reaparición del virus de modo que los pacientes se encuentran atados a la terapia de por vida. El virus parece subsistir gracias a que su alta tasa de mutación combinada con la organización poblacional en *quasi*-especies facilita la aparición de resistencias que, si bien en general no son igual de efectivas que la cepa estándar, resisten el tratamiento. Además, el virus dispone de reservorios tales como el sistema nervioso central o las células inmune de memoria. En el primero no es capaz de replicarse al nivel que en las células linfoides, si bien la barrera hematoencefálica protege la cepa estándar del efecto de los fármacos. En el segundo, en cambio, puede permanecer en un estado de latencia durante años que le permite igualmente conservar una representación de cepas de los diferentes estadios por los que han pasado las *quasi*-especies infectivas.

Por todo esto, se hace necesario el desarrollo de nuevos inhibidores más efectivos y capaces de atacar funciones esenciales del virus codificadas en regiones cuya secuencia requiera un grado de conservación tal que dificulte la aparición de resistencias. En esta área, los ácidos nucleicos tales como ribozimas, aptámeros, RNA interferente, etc. resultan de especial interés pues permiten intervenir directamente el genoma viral y son virtualmente dirigibles a las regiones, a sabiendas, más conservadas del mismo.

D.1.1. RNAs *ANTISENSE* CATALÍTICOS.

El fundamento del uso de RNAs *antisense* catalíticos como agentes inhibidores de VIH-1 se basa en trabajos previos realizados en esta línea de investigación. Las ribozimas *hammerhead* y *hairpin* diseñadas para cortar la molécula diana correspondiente a los primeros 308 nt del RNA de VIH-1 fueron ampliamente mejoradas por la adición de una secuencia *antisense* complementaria al elemento TAR contenido en dicha diana (271,314). Aptámeros contra el mismo elemento TAR (239) en lugar del dominio *antisense* provocaban mejoras similares en la capacidad de corte de las ribozimas. Este dato, junto con el hecho de que el elemento TAR y su RNA *antisense* comparten muchas similitudes con los RNAs *antisense* naturales y sus dianas, confirmó que la mejora en la actividad de las ribozimas estaba debida a una mayor eficiencia en el paso de unión ribozima diana mediada por la unión TAR *antisense*-TAR. Es posible que la similitud de TAR con los RNAs *antisense* naturales se deba a su implicación en el cambio de cadena que ocurre durante el complejo proceso de reverso transcripción mediante una interacción TAR RNA-TAR *antisense* DNA similar a la que ocurre entre los RNAs *antisense* naturales y sus dianas (358).

La región DIS, también presente dentro de la 5'UTR de VIH-1, está involucrada en la dimerización de las dos moléculas de RNA del virus. La región DIS se estructura en forma de horquilla disponiendo una región de cadena sencilla en el lazo apical con una secuencia palindrómica. La dimerización de las dos moléculas de RNA de VIH-1 se establece mediante varios contactos RNA-RNA, si bien parece comenzar mediante una interacción de tipo lazo-lazo entre sendos palíndromos apicales del elemento DIS de ambas moléculas. La región DIS no presenta características similares a los RNAs *antisense* naturales, aunque sí parece estar evolutivamente diseñada para interactuar con otras moléculas DIS similares, de manera que *a priori* podría utilizarse como región *antisense* para el diseño de los RNAs *antisense* catalíticos del presente estudio. La diferencia entre la interacción del dominio DIS y la de los RNAs *antisense* naturales reside en el tipo de función, esto es, la región DIS no precisa de una interacción rápida sino estable para mantener dos moléculas unidas, mientras que los RNAs *antisense* naturales

deben dar una respuesta rápida debido a la naturaleza de los procesos que regulan (380,417).

Existen dos regiones DIS principalmente extendidas entre las diferentes variantes virales y que son coincidentes con las secuencias de los subtipos MAL y LAI. La diferencia entre ambas se halla en la secuencia del palíndromo expuesto en el lazo apical de la misma. Este palíndromo puede ser 5'GCGCGC3' (LAI) o 5'GUGCAC3' (MAL), perteneciendo la cepa NL4.3 al subtipo LAI. Fue, por tanto, la secuencia DIS_{LAI} la utilizada para diseñar los dominios DIS y α DIS con que complementar las ribozimas en los RNAs *antisense* catalíticos.

D.1.2. APTÁMEROS.

Los aptámeros son una variedad de ácidos nucleicos pequeños y versátiles que se caracterizan por su especial habilidad para unirse específicamente a una molécula diana potencialmente de cualquier material (234). Se han diseñado aptámeros artificiales tanto de DNA como de RNA bien simples o con modificaciones químicas. Uno de los pasos clave en los procesos de diseño de aptámeros es la reamplificación, mediada por DNA polimerasas (y reverso transcriptasas en el caso del RNA), de modo que las modificaciones químicas encaminadas a mejorar la estabilidad, actividad o cualquier otra propiedad del aptámero deben ser compatibles con el proceso de polimerización (como la fluoro-uridina (270) o la metil-O-citosina (418)) o deben introducirse *a posteriori* de la obtención del aptámero (como el polietilén-glicol (419)). Además, la aplicación terapéutica de estas moléculas puede orientarse a la administración del aptámero presintetizado o a la terapia génica que promueva su síntesis por la propia célula. Los aptámeros de DNA sólo son apropiados para la primera, mientras que los de RNA, salvando la fragilidad de la propia molécula, son óptimos para ambas. Con la intención de dotar los posibles inhibidores de una mayor aplicabilidad, en nuestro trabajo utilizamos moléculas de este último tipo, si bien, hicimos una selección molecular sin utilizar ninguna modificación química de las mismas.

En cuanto al procedimiento de selección en sí, se decidió optar por un paso de partición de la población de aptámeros en el que la molécula diana se encontraba fijada a una minicolumna cromatográfica con estreptavidina mediante

un marcaje interno con biotina. Si bien existe la opción de modificar con biotina las moléculas diana en uno de sus extremos, de afectar a la estructura o plegamiento de la diana, todas las moléculas se verían igualmente alteradas. Sin embargo, el marcaje interno utilizando UTP-biotinilado en la mezcla de transcripción de la diana en una proporción tal que se estime finalmente una biotina por molécula, ocasiona que la posición marcada sea aleatoria dentro de la molécula, de modo que en el conjunto de la población la desestructuración no debe ser consistente ni uniforme y el plegamiento global debe ser el propio de moléculas no biotiniladas.

D.2. EFECTO ANTIVIRAL *IN VITRO* DE LOS RNAs INHIBIDORES.

Como ya se ha expuesto, los diferentes RNAs antivirales desarrollados en este estudio fueron diseñados para interferir con ciertas funciones y propiedades de la 5'UTR de VIH-1. Los RNAs *antisense* catalíticos fueron diseñados a partir de ribozimas previamente modificadas para cortar la molécula de RNA de la 5'UTR de HIV-1 y con el objetivo de mejorar su capacidad de corte. Además, el dominio *antisense* las dotaría *a priori* de cierta capacidad de dimerización del RNA de la 5'UTR. Finalmente, los aptámeros fueron diseñados para unirse a la región 5'UTR *in vitro*. Todas estas habilidades *in vitro* fueron ensayadas y analizadas, y los resultados obtenidos se discuten a continuación.

D.2.1. CAPACIDAD DE CORTE DE LOS RNAs *ANTISENSE* CATALÍTICOS.

En una primera aproximación encaminada al estudio de la capacidad inhibidora de los RNAs *antisense* catalíticos, analizamos su actividad catalítica cuantificando la progresión del corte del RNA 5'UTR₃₀₈ de VIH-1 (R.1.2). El resultado de este estudio muestra que, pese a las desviaciones en los consensos de corte, todas las ribozimas individualmente y en combinación con los dominios DIS *antisense* (α DIS) y DIS *decoy* (DIS) conservan actividad catalítica para procesar el sustrato (Tabla 5).

Sin embargo, el efecto de la adición de las regiones DIS o α DIS a cada una de las ribozimas para la construcción de los RNAs *antisense* catalíticos, tuvo una influencia mínima sobre la actividad catalítica al contrario de lo que se esperaba en base a las significativas mejoras obtenidas para las construcciones α TAR (314). Concretamente, no se obtuvo cambio significativo alguno para el caso de las ribozimas HH113 y HP159 (Figura 34, Tabla 8). La adición de la región DIS resultó en un detrimento significativo de la actividad catalítica de la ribozima HP113, que aumentó su parámetro $T_{1/2}$ hasta casi el doble, al tiempo que la ribozima HH159 experimentó una mejora en su actividad catalítica reduciendo su $T_{1/2}$ en torno a la mitad con la adición de ambos dominios DIS y α DIS (Figura 34, Tabla 5).

En un principio, el modelo que se propone para la reacción de corte en *trans* mediada por estas ribozimas depende de dos reacciones que han de darse consecutivamente: unión y corte; de manera que aquella que sea más lenta será la que marcará la velocidad total de la reacción. La unión del RNA *antisense* catalítico depende de la habilidad para unirse al RNA diana de ambas: la región *antisense* y los brazos de interacción con la diana de la ribozima; mientras que la reacción de corte depende exclusivamente de la ribozima. Así, si en el caso de la utilización de la región α TAR la mejora significativa de la capacidad catalítica debe atribuirse a que el dominio *antisense* mejora la capacidad de unión que se encontraría por debajo de las posibilidades para la catálisis. En este caso, sin embargo, los dominios *antisense* no mejoran la capacidad de corte salvo en el caso de la ribozima HH159. En principio, esto podría atribuirse a varios motivos: la reacción de unión de la región DIS, aunque estable, puede ser lenta; o, de algún modo, las regiones DIS o α DIS no consiguen unirse a la diana adecuadamente. Únicamente en el caso de las ribozimas *hairpin*, también podría darse el caso de que la unión de la región *antisense* y de los sitios de reconocimiento del punto de corte simultáneamente impidan la correcta interacción entre los lazos internos de los brazos A y B del dominio ribozima (ver I.2.2.2).

El procedimiento convencional para realizar estas reacciones de corte consistió en desnaturalizar y renaturalizar los RNAs *antisense* catalíticos y la diana por separado en tampón de reacción 10 minutos a 65°C y 10 minutos a 37°C para, seguidamente, mezclarlos e iniciar la reacción. La reacción de las diferentes alícuotas extraídas a diferentes tiempos se detenía mediante la adición de un

volumen de tampón de formamida desnaturizante 2X y se preservaban en hielo hasta el momento de cargarlas en gel. En un primer momento, justo antes de cargar las muestras en gel, éstas eran desnaturizadas a 95°C durante 2 minutos y luego rápidamente enfriadas en hielo durante otros 2 minutos. El resultado de la electroforesis en gel desnaturizante (7 M urea, 36 mA de intensidad de corriente) mostró la presencia de un retardo justo por encima de las bandas de substrato no cortado y de producto de corte 3', y no del producto de corte 5' (Figura 33). Estos retardos aparecieron en reacciones con RNAs *antisense* catalíticos portadores de la región α DIS. Coincidentemente, tanto el substrato completo como el producto de corte 3' presentan aún la región DIS de la diana, lo cual indujo a pensar que podría deberse a un hipotético complejo con el RNA *antisense* catalítico. Los retardos desaparecieron cuando las muestras fueron cargadas directamente sin enfriarlas tras los 2 minutos a 95°C y la electroforesis de los geles no se detuvo para la carga. De aquí se deduce que la interacción DIS- α DIS es suficientemente estable como para ocurrir en tampón de formamida (50%) y resistir una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante con 7M de urea y a una intensidad de corriente de 36 mA.

Del análisis posterior de los confórmeros de la 5'UTR₃₀₈ de VIH-1 es de donde podemos obtener una explicación para este fenómeno (R.1.7). De los dos confórmeros que se prevén para el RNA 5'UTR₃₀₈ únicamente uno, el BMH, dispondría de un domino DIS habilitado para la interacción con el domino *antisense* del RNA inhibidor. El otro confórmero, LDI, no sería, *a priori*, sujeto de interacción tipo DIS- α DIS tal como se prevé mediante *kissing complexes* al estilo de los RNAs *antisense* naturales. Según este estudio, tras la desnaturización y renaturalización del RNA diana, parte de la población de RNAs se pliega en forma LDI y parte en forma BMH, dándose la situación de que las moléculas BMH rápidamente dimerizan hacia un complejo suficientemente estable como para no ser desplazado significativamente por nuevas moléculas DIS. Por un lado, esta estabilidad es consistente con el hecho de que esta región DIS es capaz de establecer complejos suficientemente estables como para resistir tratamientos con formamida y electroforesis desnaturizantes. Por otro, esto mismo hace suponer que tras los 10 minutos a 37°C de la renaturalización del RNA 5'UTR₃₀₈, ninguna de las moléculas presentan dominios DIS susceptibles de unión a la región *antisense*

de los RNAs *antisense* catalíticos, bien porque se encuentren dimerizados en los complejos BMH-BMH o bien porque se encuentren en una conformación incapaz de la interacción en los confórmeros LDI.

La ribozima HH159 es la única que experimenta una mejora en la capacidad catalítica con la adición de los dominios *antisense*. Como se observa en la figura 34 y en la tabla 8, ésta es la ribozima menos eficiente catalíticamente y quizá, por eso, es la única en la que la poca mejora de unión que pueden suponer las regiones DIS o α DIS, puede ser apreciable. La capacidad catalítica de las ribozimas HH113 y HP159 sería suficientemente alta como para que la escasa o nula mejora de unión aportada por el dominio *antisense* fuese apreciable.

En el caso de la ribozima HP113, la combinación con los dominios DIS y α DIS, lejos de resultar indiferente o en una mejora, ocasiona una reducción de la eficiencia de reacción. La ribozima *hairpin* requiere de la interacción entre los lazos internos de dos hélices contiguas (hélices A y B, ver 1.2.2.2), en lo que se denomina *docking*, para que pueda ocurrir la catálisis. La hélice A es una estructura híbrida constituida por la diana de corte y los dominios de reconocimiento de la ribozima. La hélice B se encuentra entre ésta y la región *antisense*. El anclaje de la región *antisense* con su respectiva diana podría interferir con el apropiado *docking* de una forma dependiente de la propia disposición espacial y la distancia entre la región de corte y la diana del domino *antisense* en la molécula de RNA 5'UTR₃₀₈. Este efecto podría no estar ocurriendo en la molécula HP159 porque el punto de corte es distinto. No obstante, no se puede descartar que los propios dominios DIS y α DIS ocasionen un plegamiento no funcional de la región catalítica que impidan la unión o la catálisis normal de la ribozima.

D.2.2. INHIBICIÓN DE LA DIMERIZACIÓN DEL RNA DE VIH-1 *IN VITRO* POR LOS RNAs *ANTISENSE* CATALÍTICOS.

Sin embargo, y a pesar de que el corte de la molécula diana por el RNA *antisense* catalítico no se vea mejorado respecto de la ribozima individual, los RNAs *antisense* catalíticos pueden tener efectos inhibidores adicionales debido simplemente a la función *antisense*. La unión del RNA *antisense* catalítico *in vivo* al RNA diana partiendo de la premisa de que los dos fuesen sintetizados

simultáneamente en el núcleo celular o de que el inhibidor se encontrase presente previamente a la síntesis de RNAs virales, podría ejercer una inhibición del proceso de dimerización e interferir con el normal desarrollo del ciclo viral.

Se procedió entonces a evaluar la capacidad de inhibición *in vitro* de la dimerización del RNA 5'UTR₃₀₈ de VIH-1. Para ello y procurando simular un entorno en que ambos RNAs se encuentren en un momento de pre-dimerización, las dos moléculas fueron desnaturalizadas y renaturalizadas juntas y en agua, evitando así la dimerización. La reacción de dimerización se inició añadiendo el tampón de reacción apropiado.

Se ensayó un exceso de 20 veces de RNA *antisense* catalítico respecto de RNA 5'UTR₃₀₈ y pudo comprobarse que en este exceso, menor que el ensayado para el corte (100 veces), las ribozimas HH159, HP159 y HP113 son incapaces de eliminar el complejo dimérico, mientras que sus combinaciones tanto con la fracción DIS como con la α DIS lo eliminan total o parcialmente (Fig. 35). Concretamente, se obtiene una reducción muy acusada de complejo dimérico para las construcciones HH159 α DIS, HH159DIS, HH113DIS, HP159 α DIS, HP159DIS, HP113 α DIS Y HP113DIS. La construcción HH113 α DIS registró una caída parcial de la cantidad de dímero formado, pero no consiguió reducirlo por completo. La ribozima HH113 sin estar combinada con ninguna fracción *antisense* también elimina la fracción dimérica del RNA 5'UTR₃₀₈ (Fig. 35).

En el caso de las construcciones HH113 y HP113, junto con sus combinaciones DIS y α DIS, se observa cómo aparece una nueva especie de RNA marcado que migra por debajo de la fracción monomérica. Nosotros hemos asociado esta nueva especie a un producto del corte catalítico. Ninguna especie de este tipo se detecta en el caso de las construcciones contra la región 159, lo que nos lleva a pensar que, de alguna forma, las ribozimas contra la posición 113 son capaces de cortar el RNA 5'UTR₃₀₈ en las condiciones de dimerización mientras que las ribozimas contra la región 159 no. Puesto que no es una especificidad de ribozima sino de diana, ambas ribozimas, *hammerhead* y *hairpin* deben ser catalíticamente activas en el tampón de dimerización y debe ser una cuestión más relativa a la conformación o accesibilidad de la diana al corte lo que debe estar siendo afectado por las condiciones de dimerización. Este mismo efecto podría estar afectando concretamente la actividad catalítica de los RNAs basados en la

HP113, pues en estas condiciones sí que parece detectarse una capacidad de corte mayor en los RNAs *antisense* catalíticos que en el domino ribozima inicial (Fig. 35), al contrario de lo que ocurre con las reacciones de corte (R.1.2) que transcurren en un tampón diferente.

En el caso de los tratamientos con construcciones contra la región 159, se detecta una banda de retardo en los tratamientos con RNAs *antisense* catalíticos y que no está presente en los tratamientos con las respectivas ribozimas solas. Esta banda migra en una posición entre el complejo dimérico y el monomérico, y por eso, la hemos asociado a un hipotético complejo heterodimérico RNA *antisense* catalítico-5'UTR₃₀₈ de VIH-1. Este complejo es especialmente estable en el caso de las construcciones HH159DIS, HP159DIS Y HP159 α DIS. En el caso de la construcción HH159 α DIS, el complejo heterodimérico aparece pero en menor cantidad, de lo que se deduce que debe ser un complejo más lábil o dinámico como para no resistir la electroforesis.

También se aprecia un nuevo complejo que migra a una altura similar en el caso de las construcciones HP113DIS y HP113 α DIS, tampoco presente en el caso de la ribozima HP113. Sin embargo, en el caso de la ribozima HP113, aparece también un nuevo complejo, situado entre el dímero y el monómero del RNA 5'UTR₃₀₈, pero más próximo al dímero (al contrario que el heterodímero que migra más próximo al monómero). En este caso, y puesto que la ribozima es catalíticamente activa en las condiciones de reacción, suponemos que este nuevo complejo podría constituir una variante homodimérica de los fragmentos 3' producto del corte del RNA 5'UTR₃₀₈ por la ribozima. Así, *a priori*, este homodímero estaría formado por moléculas de mayor tamaño que el heterodímero, y migraría más lentamente, explicando su posición. Complejos similares, aunque en mucha menor intensidad, se observan en el caso de las construcciones HH113, lo que concordaría, pues también esta ribozima es activa en las condiciones de dimerización. Una actividad catalítica de alta eficiencia en las condiciones de dimerización por parte de la ribozima HH113 podría ser la causante de que no quede fracción dimérica apreciable.

D.2.3. UNIÓN DE LOS APTÁMEROS A LA MOLÉCULA DE RNA 5'UTR₃₀₈.

La 5'UTR presenta una elevada concentración de dominios de RNA funcionales de gran importancia para la replicación viral. La funcionalidad de dichos dominios está especialmente ligada a su estructura y ésta es la base de la hipótesis de que los aptámeros seleccionados, al unirse a sus dianas, las bloqueen, enmascaren o desestructuren inactivándolas. El efecto inhibitor del aptámero vendrá determinado por su capacidad de unión, por el trastorno estructural que ocasione a la diana y por la dependencia que tenga el virus del domino diana del aptámero dentro de la 5'UTR.

Cualquier tipo de las interacciones RNA-RNA descritas pueden intervenir en la unión de los aptámeros a sus dianas (I.4.2), si bien las interacciones tipo *kissing loop/kissing complex* son las más frecuentes (357). El plegamiento *in silico* de los diferentes aptámeros permite distinguir regiones monocatenarias expuestas en lazos internos o apicales y, subsiguientemente, se pueden localizar motivos de secuencia en estas regiones con complementariedad con lazos internos o apicales de la molécula de RNA 5'UTR₃₀₈ (Fig. 50). Así, se seleccionaron una serie de aptámeros para proseguir los estudios de unión e inhibición. Estos aptámeros fueron XI1, XI3, XI20, XI21, XI30, XI63, XI70 y XI142. *A priori*, los aptámeros XI1 y XI21 se dirigen contra la región *Poly-A*; los aptámeros XI3 y XI20 se dirigen contra la región SD; los aptámeros XI30, XI63, XI70 y XI142 lo hacen contra la región TAR. Adicionalmente, se incluyeron en el estudio dos aptámeros adicionales producto de un ciclo de selección anterior y cuyas dianas putativas eran la región TAR (aptámero VII24) y la región PBS (aptámero VII9).

Se demostró que todos estos aptámeros se unían *in vitro* en mayor o menor medida a la molécula diana de una manera dosis-dependiente (Fig. 51). Sin embargo, resulta muy interesante establecer cuál es el lugar de unión o qué consecuencias estructurales tiene la unión de los aptámeros para la molécula diana a la hora de deducir el efecto o el mecanismo por el que estos aptámeros puedan estar inhibiendo el virus. Los ensayos de mapeo de la molécula diana unida a cada aptámero mediante diferentes agentes endonucleolíticos sensibles de estructura arroja información al respecto.

Los resultados que se muestran en las figuras 77 a 80 se resumen en las figuras 93 a 96, donde se vinculan las protecciones detectadas frente a estos agentes con posibles interacciones tipo ALAL (del Inglés lazo apical-lazo apical) o ALIL (del inglés lazo apical-lazo interno) utilizando las estructuras predichas *in silico* para los diferentes aptámeros (Nótese que puesto que todas las interacciones representadas involucran los dominios TAR, PBS y SD, la representación de la 5'UTR₃₀₈ como confórmero LDI o BMH es intercambiable y se ha utilizado una u otra en función de requerimientos de maquetación de la figura). El aptámero XI1 protege el denominado lazo-U localizado en una región apical de la región PBS y esto podría explicarse por dos posibles interacciones ALAL, si bien la que consta de mayor número de apareamientos de bases implicaría una base desapareada en el lazo apical del aptámero (Fig. 64A).

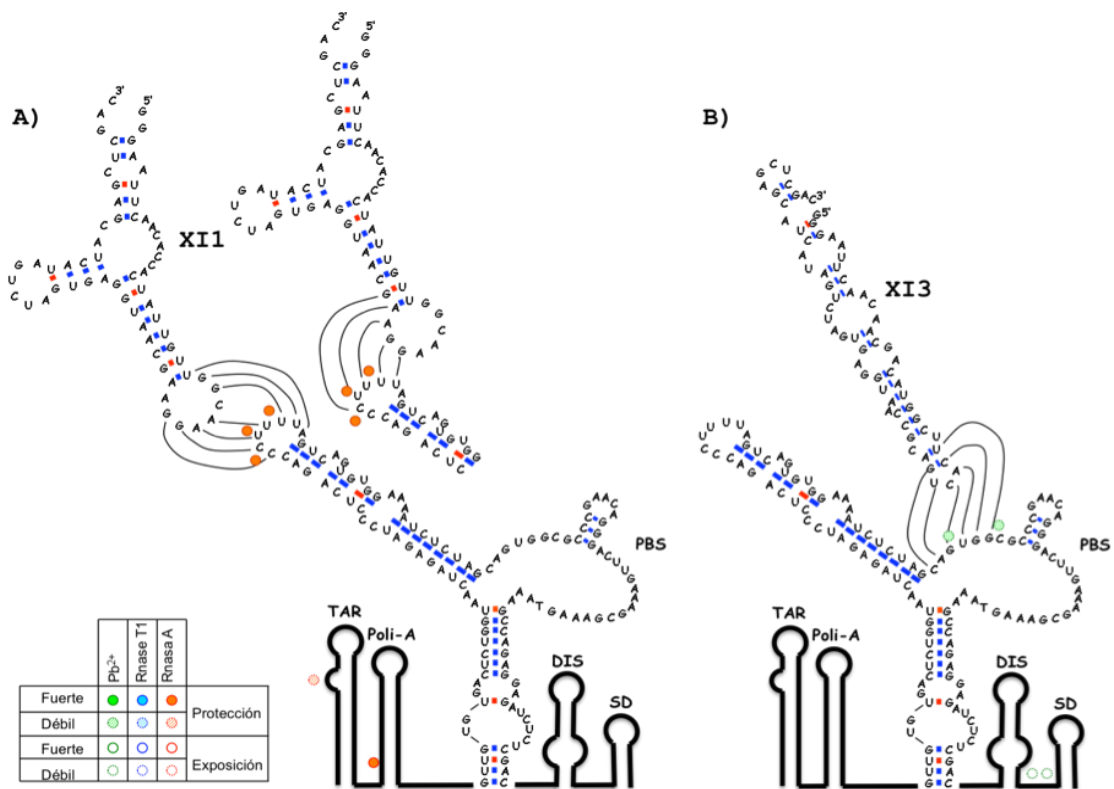


Figura 64. Predicción de interacción de los aptámeros XI1 y XI3. En la figura se representa el plegamiento *in silico* de los aptámeros XI1 y XI3 y su posible interacción con la molécula de RNA 5'UTR₃₀₈ (A y B respectivamente). El código de puntos resume los resultados de protección/exposición frente a agentes endonucleolíticos y su interpretación se muestra en la tabla incluida en la figura. Los apareamientos intramoleculares se representan en azul los de tipo Watson y Crick y rojo los de tipo *wooble*. Las interacciones intermoleculares predichas se marcan con líneas de color negro.

La unión del aptámero XI3 se predijo para la región SD pero no se registró ninguna protección significativa de la misma. Sin embargo, se detectó una protección débil del lazo interno de la región PBS donde se une la región 3' del tRNA^{lys3} y ésta podría explicarse por una interacción ALIL con el aptámero XI3 (Fig. 64B).

La unión del aptámero XI30 ocasiona una protección en el lazo apical y en la burbuja lateral contigua del elemento TAR, así como el lazo apical del elemento SD. La protección del lazo apical podría deberse a una interacción ALAL con un lazo apical del aptámero. Igualmente, se encuentran en el aptámero motivos de secuencia complementarios a ambas, la burbuja lateral de TAR y el lazo apical de SD, así como sus nucleótidos adyacentes. Estos motivos de secuencia, además, se encuentran formando una hélice el uno con el otro, de modo que la interacción de ambas con sus dianas podría resultar mutuamente favorecida (Fig. 65A).

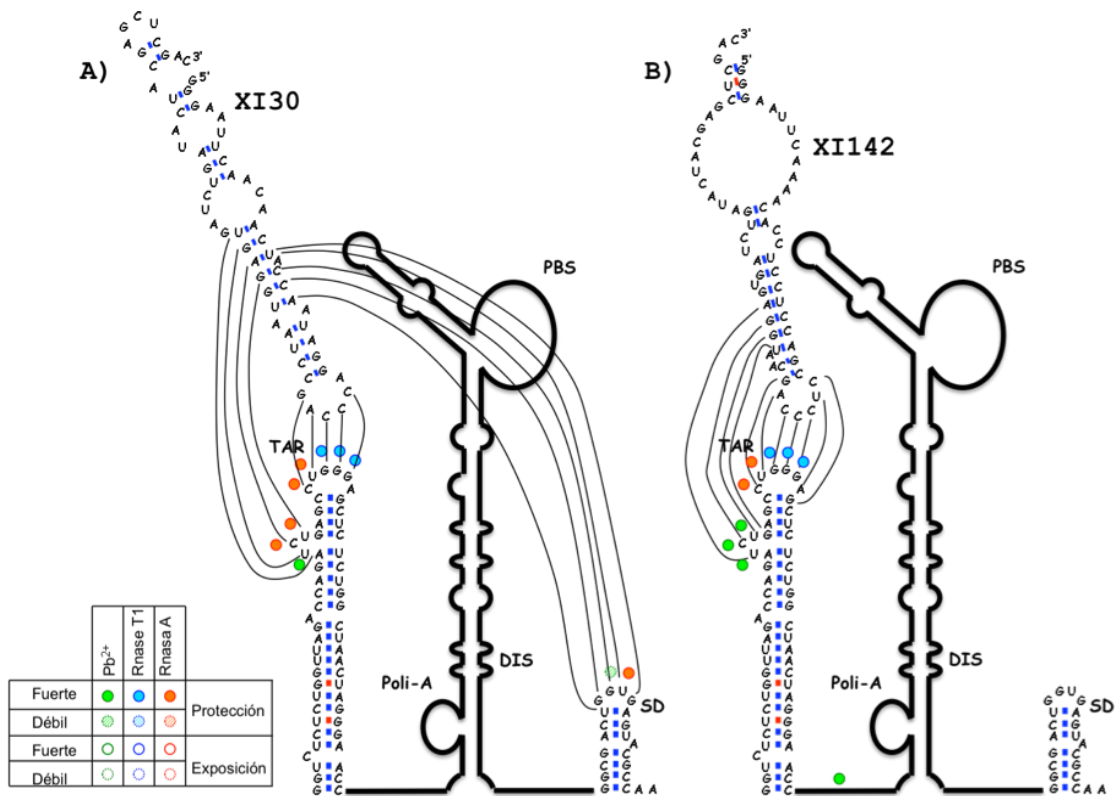


Figura 65. Predicción de interacción de los aptámeros XI30 y XI142. En la figura se representa el plegamiento *in silico* de los aptámeros XI30 y XI142 y su posible interacción con la molécula de RNA 5'UTR₃₀₈ (A y B respectivamente). La figura ha de interpretarse tal como se describe para la figura 64.

El aptámero XI142 también protege el lazo apical de TAR y su burbuja adyacente. Un lazo apical del aptámero podría unirse al primero por una interacción ALAL y un motivo de secuencia en la hebra 3' del tallo que cierra dicho lazo resulta complementaria con la burbuja lateral de TAR (Fig. 65B).

El aptámero XI63 protege los lazos apicales de TAR y SD, y es el mismo lazo apical de dicho aptámero quien podría estar estableciendo sendas interacciones ALAL con ambos (Fig. 66A). El aptámero XI70 también protege dos regiones distales, concretamente, el lazo interno del dominio PBS donde se une el extremo 3' del tRNA^{lys3} y el lazo apical de TAR. Al igual que en el caso del aptámero XI63, podría ser el mismo lazo apical del aptámero el que fuese capaz de unirse y proteger dichas regiones también por interacción ALIL (Fig. 66B).

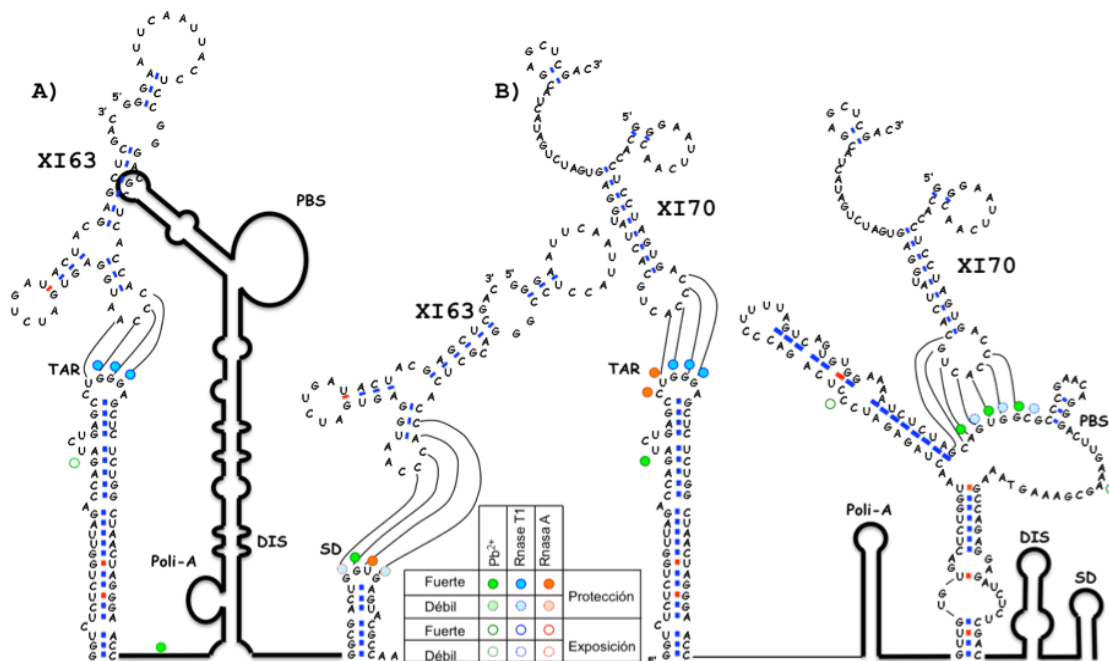


Figura 66. Predicción de interacción de los aptámeros XI63 y XI70. En la figura se representa el plegamiento *in silico* de los aptámeros XI63 y XI70 y su posible interacción con la molécula de RNA 5'UTR₃₀₈ (A y B respectivamente). La figura ha de interpretarse tal como se describe para la figura 64.

Los aptámeros VII9 y VII24 protegen, al unirse a la 5'UTR₃₀₈, el lazo interno de la región PBS y el lazo apical de TAR respectivamente. En ambos casos, dichas protecciones pueden explicarse mediante interacciones ALAL o ALIL con lazos apicales de los aptámeros (Fig. 67A y B respectivamente). Finalmente, la unión de los aptámeros XI20 y XI21 estaba predicha contra la región SD y Poli-(A)

respectivamente pero ninguno de ellos registró una protección significativa que nos permitiese confirmar el punto de unión. Quizá su unión proteja alguna región de cadena sencilla en la estructura BMH y de cadena doble en la estructura más abundante LDI, lo cual enmascararía el efecto protector. O bien, podría ocurrir que su unión no se debiera a interacciones basadas en complementariedad de bases, impidiendo su reconocimiento por este tipo de análisis.

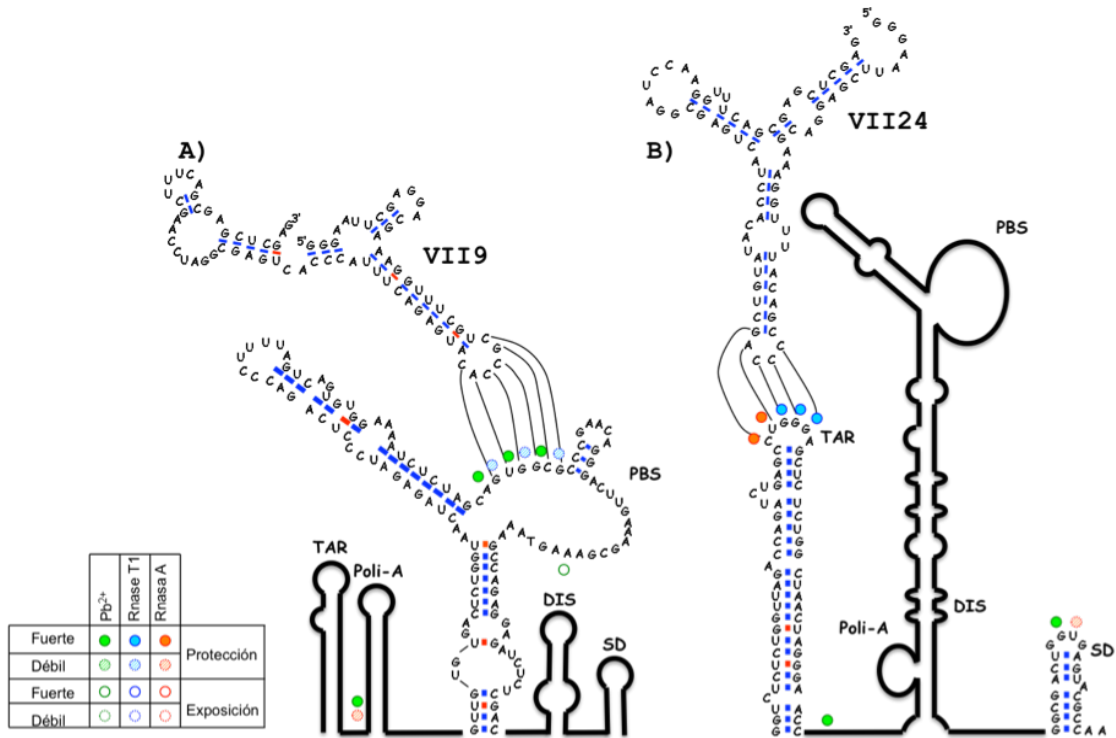


Figura 67. Predicción de interacción de los aptámeros VII9 y VII24. En la figura se representa el plegamiento *in silico* de los aptámeros VII9 y VII24 y su posible interacción con la molécula de RNA 5'UTR₃₀₈ (A y B respectivamente). La figura ha de interpretarse tal como se describe para la figura 64.

Los elementos TAR, PBS y SD se encuentran en ambas conformaciones, LDI y BMH, de la 5'UTR del VIH-1 y la mayoría de los aptámeros se unen aparentemente a dichas regiones, esto es, XI1, XI3, XI30, XI73, XI70, XI142, VII9, VII24 (todos ellos con evidencias experimentales) y XI20, lo cual resulta coherente. Cabe destacar que el elemento DIS está especialmente seleccionado para una interacción ALAL, lo cual debería suponer una ventaja a la hora de reclamar la selección de aptámeros contra él. Sin embargo, el hecho de que esta interacción ALAL sea consigo mismo (I.5.2.4) y, tal como también hemos demostrado, la estructura DIS sólo está favorecida una vez dimerizada (D.3), en ningún momento

el dominio DIS estará accesible a algún aptámero con capacidad para unírsele, y esto explicaría que no haya aptámeros anti-DIS en las últimas rondas de selección.

Sin embargo, la estructura *Poly-A* sí que estaría presente en este confórmero BMH dimérico y, aunque no hay evidencias experimentales de que algún aptámero se una a ella, es cierto que la predicción realizada en la figura 50 así como los estudios bioinformáticos realizados por el grupo del doctor Carlos Briones apuntan a que, precisamente, el grupo de aptámeros más abundante (especialmente representado por los aptámeros XI1 y XI21) se unen al lazo apical del elemento *Poly-A*.

D.3. INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN VIRAL *EX VIVO* POR LOS RNAs INHIBIDORES.

Los ensayos de inhibición de la replicación viral se realizaron en cultivos celulares de la línea HEK293T. Esta línea celular es capaz de llevar a término la producción de viriones de VIH-1 una vez el DNA proviral se encuentra en su interior, pero no es sensible a la infección por VIH-1 por no disponer de los receptores adecuados en su superficie.

De este modo, la producción de viriones por un cultivo celular transfectado con DNA proviral se corresponderá con la producción de un solo ciclo viral y no será producto de la sucesiva reinfección de células por virus de segundas generaciones. Así, mediante la co-transfección de cultivos celulares con DNA proviral de VIH-1 y cualquier tipo de inhibidor podrá detectarse el efecto de dicho inhibidor sobre la producción de la primera generación de viriones, de modo que la pérdida de inhibición por la disipación del inhibidor debería reducirse o ser nula.

El ensayo de los diferentes inhibidores basados en RNAs inhibidores se enfocó desde dos aproximaciones diferentes. En una de las aproximaciones se procedió a sintetizar *in vitro* los RNAs inhibidores y transfectar con ellos directamente las células en una aproximación que sería equivalente a la aplicación terapéutica de moléculas presintetizadas. El segundo enfoque consistió en transfectar las células con vectores construidos para dirigir la transcripción del

RNA inhibidor dentro de la célula, de manera que ésta es la que genera el agente terapéutico. Este segundo enfoque va encaminado a una aproximación basada en terapia génica, en la que se modificarían las células para introducir los genes que dirijan la síntesis del inhibidor.

En ambos casos los RNAs, bien pre-sintetizados *in vitro* o bien sintetizados intracelularmente, se encuentran flanqueados por las horquillas 5' y 3' del snRNA U6. Sin estas horquillas no se consiguió registrar efecto inhibidor (datos no mostrados), pero con ellas, los aptámeros presintetizados XI1, XI3, XI20, XI21, XI30 y XI63 registraron inhibiciones de la producción de antígeno p24 viral en el sobrenadante de cultivos de HEK293T transfectados superiores al 75%. Los RNAs XI70, XI142 y VII9 registraron inhibiciones algo inferiores al 75% y el aptámero VII24 inhibió menos del 50%. Tan solo el RNA *antisense* catalítico RNA HH113 α DIS registró una inhibición significativa de hasta el 80%.

Los RNAs *antisense* catalíticos tuvieron más éxito cuando se utilizaron mediante construcciones de expresión, pues se obtuvieron inhibiciones significativamente altas (92'68 \pm 1'31% y 83'64 \pm 3'78% respectivamente) para los RNAs HH113 α DIS y el HP159DIS. También se obtuvieron inhibiciones moderadas, en torno al 50%, para las construcciones basadas en HP159 α DIS y HP113DIS. De los aptámeros, en cambio, sólo algunos mantuvieron parcial (XI20, XI70 y XI142) o totalmente (XI21, XI30 y VII9) su capacidad inhibidora en esta aproximación.

La diferencia genérica respecto a la presencia o no de las horquillas del snRNA U6 flanqueantes puede deberse a dos motivos: aumento de la estabilidad del RNA inhibidor o efecto en su localización. Se ha demostrado previamente que la incorporación de estas horquillas en RNAs sintetizados intracelularmente lleva consigo una localización nuclear del RNA portador (404), pero también disponemos en el laboratorio de evidencias de que estas horquillas aumentan la vida media intracelular del RNA portador (Reyes, JA. *et al.* resultados no publicados). Esta estabilidad podría venir dada por el hecho de que, a pesar de que las moléculas de RNA disponen los extremos 5' y 3' sin *cap* y poli-A respectivamente, éstos se encuentran en horquillas ricas en pares GC, lo que se ha descrito protege frente a la degradación por exonucleasas (420).

La inhibición registrada en los ensayos de transfección con RNA16(+), cuya obtención se detalla en R.2.11, carente de estas horquillas pero constituido en sí

mismo por una horquilla con un tallo de cuatro apareamientos de bases GC podría estar indicándonos que el efecto inhibitor registrado por los aptámeros dotados de horquillas flanqueantes podría deberse a la estabilidad que éstas les confieren. En el caso del RNA16(+), el RNA inhibitor no estaría sujeto a la localización nuclear mediada por las horquillas del snRNA U6, pero sí mantendría la resistencia a la degradación por exonucleasas gracias a su tallo rico en apareamientos GC.

El efecto de la localización intracelular sí que podría ser el responsable de las diferencias registradas entre la utilización de RNAs inhibidores presintetizados y vectores de expresión de los mismos. *A priori*, los RNAs inhibidores sintetizados intracelularmente estarían sujetos a la localización nuclear debido a la presencia de las horquillas del snRNA U6. En cambio, la distribución de los RNAs inhibidores pre-sintetizados tras la transfección sería predominante en el citoplasma puesto que, además, el mecanismo de localización nuclear de estos RNAs parece ser por retención más que por importe (421). Esto podría explicar el hecho de que todos los aptámeros sean funcionales como RNAs presintetizados y sólo algunas mantengan parcial (XI20, XI70 y XI142) o totalmente (XI21, XI30 y VII9) su capacidad al utilizarse vectores de expresión. Aquellas moléculas que hayan perdido su capacidad de inhibición al utilizarse mediante vectores de expresión nucleares podrían estar señalando que su papel inhibitor ocurre en el citoplasma. En cualquier caso no se puede descartar que la síntesis intracelular se esté viendo afectada por algún fenómeno inherente a la propia secuencia. Un efecto contrario parece observarse en los RNAs *antisense* catalíticos HP159DIS, HP159 α DIS y HP113DIS, que no registran actividad antiviral por transfección, pero sí que aumentan cuando ocurre una síntesis intracelular que, *a priori*, favorece la localización nuclear.

No obstante, a la hora de evaluar el efecto inhibitor de cualquier ácido nucleico hay que tener en cuenta que la transfección de células humanas con ácidos nucleicos sintéticos, como RNA estructurado o DNA no metilado en CpG, puede disparar la respuesta mediada por interferón de tipo I (422-424). Ésta consiste en una respuesta antiviral intracelular innata que reduce notablemente la progresión intracelular de muchos virus (425-426). Si bien muchos virus, entre ellos HIV-1 (427), han evolucionado para detener la respuesta mediada por interferón, se ha descrito que el tratamiento de pacientes de SIDA con

oligodeoxirribonucleótidos no modificados en CpG reduce su contagio en poblaciones de riesgo (428). Para descartar que el efecto inhibitor de nuestras moléculas se debiese al disparo de la respuesta a interferón, se comprobó que la transfección de los diferentes inhibidores (RNAs y plásmidos) no la disparasen. Se utilizó como indicador de ello la presencia de RNA mensajero del gen 56 estimulado por interferón (ISG56) en cultivos transfectados. El análisis del efecto de los RNAs inhibidores se midió en células transfectadas exclusivamente por ellos mismos y no junto con el DNA proviral pNL4.3, pues se pretendía evitar enmascarar la inducción de interferón por los RNAs con la posible inducción por el DNA no metilado del plásmido. En cambio, para las construcciones basadas en pU6, se utilizaron cultivos co-transfectados para recrear exactamente el ambiente en que ocurre la inhibición viral, pues el efecto del DNA no metilado será el mismo para el plásmido pU6 que para el pNL4.3.

Como control positivo de inducción se utilizó poli-I:C sintético, que debido a su estructura en doble cadena perfecta, es reconocido por receptores celulares y dispara la respuesta mediada por interferón. El resultado de estos experimentos confirmó que, si bien algunas construcciones pU6 disparaban ligeramente la respuesta a interferón, las que contenían los RNAs *antisense* catalíticos HH113 α DIS y HP159DIS (Fig. 38) o los aptámeros XI20, XI30 y XI142 (Fig. 58) no la disparaban, con lo que la inhibición registrada por éstas es debido al efecto inhibitor *per se* de la molécula RNA que codifican. En el caso de los RNAs presintetizados, todos incluyendo el RNA irrelevante, disparaban en alguna medida la expresión de ISG56. Sin embargo, el hecho de que ni el RNA HH113 α DIS (Fig. 39) ni ninguno de los aptámeros (Fig. 59) induzca más respuesta que el RNA control irrelevante, hace pensar que su actividad inhibitora es debida a su funcionalidad *per se*. El efecto inhibitor de la inducción de la respuesta mediada por interferón promovido por VIH-1 podría, en las células co-transfectadas, ser superior a la inducción ejercida por los propios RNAs presintetizados. Esto explicaría que el RNA irrelevante usado como control negativo no afecte a la progresión viral aun cuando transfectado en solitario induce respuesta mediada por interferón. Este efecto reforzaría nuestra hipótesis de la actividad antiviral del RNA HH113 α DIS presintetizado independiente de la actividad antiviral del interferón.

Finalmente, en un contexto de inhibición pre-integrativa en el que células infectables Jurkat fueron transfectadas con los RNAs inhibidores pre-sintetizados previamente a la infección, tan solo los aptámeros XI30 y XI142 registraron inhibición (Fig. 60). En este ensayo, la permanencia de los RNAs inhibidores en el interior celular es limitada por su vida media, mientras que la multiplicación del virus es permanente, pues las células son sensibles a múltiples infecciones. Esto hace que a las 24 horas puedan apreciarse inhibiciones mientras que a las 48 horas éstas desaparecen, posiblemente, porque el virus haya alcanzado su plató. Lo relevante de estas inhibiciones es que los aptámeros funcionales comparten la misma diana. Ambos aptámeros se unen al lazo apical del elemento TAR y, a diferencia del aptámero VII24, también unen la burbuja lateral contigua (Fig. 65). Nótese que los aptámeros XI63 y XI70 también protegen el lazo apical de TAR pero registra una escasa o débil protección de la burbuja lateral. Esta burbuja lateral es crucial para la unión de la proteína Tat, que es el trans-activador de la transcripción necesario para los primeros estadios del ciclo viral (345). Al contrario del lazo apical de TAR que presenta varias características que lo favorecen especialmente para el establecimiento de *kissing loops* (314), es posible que la burbuja no sea una diana óptima para la selección de aptámeros contra ella por sí sola pero quizá estos dos aptámeros utilicen el lazo apical como punto principal de unión y tengan la habilidad de interactuar secundariamente con la burbuja. Esta posible inhibición de la unión de Tat podría ser la responsable de la inhibición de la progresión de la infección durante las primeras horas de la misma.

D.4. ESTUDIOS DE INTERÉS DERIVADOS DE LA UTILIZACIÓN O DISEÑO DE LOS RNAs INHIBIDORES.

Aunque el planteamiento de este trabajo tiene una fuerte carga aplicada en el diseño de RNAs inhibidores, su realización permitió desarrollar tangencialmente estudios de los que se obtuvieron datos de interés acerca de la dimerización de la molécula de RNA de VIH-1 y de las propiedades evolutivas del RNA.

D.4.1. PAPEL DE LA DOBLE CONFORMACIÓN DE LA 5'UTR EN LA DIMERIZACIÓN DEL RNA DE VIH-1.

Del estudio de los efectos de inhibición de la dimerización mediada por los RNAs *antisense* catalíticos surge la posibilidad de estudiar la dinámica de dimerización de la 5'UTR de VIH-1, especialmente, en lo relativo a la existencia de las dos conformaciones globales de plegamiento: LDI y BMH.

Estudios previos han demostrado la diferente movilidad electroforética de los dos conformeros (343,429), siendo el BMH el único de los dos que dispone del elemento DIS adecuadamente plegado para que tenga lugar la interacción por la que se inicia el proceso de dimerización. Sin embargo, tal como se observa en la figura 40, en condiciones nativas en un tampón salino el RNA correspondiente a la 5'UTR₃₀₈ muestra un patrón de migración con únicamente dos isoformas. En cambio, a priori, cabría esperar tres, correspondientes al monómero con plegamiento LDI, al monómero con plegamiento BMH y al dímero BMH-BMH. Además, la estructura LDI incapaz de dimerizar está termodinámicamente más favorecida, lo cual restaría eficiencia al proceso de dimerización.

La hipótesis de partida que explicaría la dimerización a pesar del favorecimiento de la estructura LDI es que, a pesar de haber un equilibrio de interconversión desplazado hacia la estructura LDI, cuando dos moléculas BMH dimerizan, esta reacción de dimerización está mucho más desplazada hacia el dímero que la anterior hacia el LDI. Un esquema de este sistema se muestra en la figura 68. De esta manera, se explicarían los resultados obtenidos en electroforesis en gel nativo de la figura 40, pues se están observando el monómero LDI de migración más rápida y el dímero BMH-BMH, puesto que el conformero BMH es tan efímero que no es detectable.

En los ensayos de inhibición de la dimerización, todas las moléculas con un *decoy* DIS o un *antisense* DIS ocasionan la aparición de una banda intermedia entre el dímero y el monómero. Así, esta banda podría corresponder al monómero BMH secuestrado, que no podría dimerizar ni podría pasar a la forma LDI, en ambos casos, por tener el elemento DIS implicado en un *kissing complex* tal como el descrito en la figura 68.

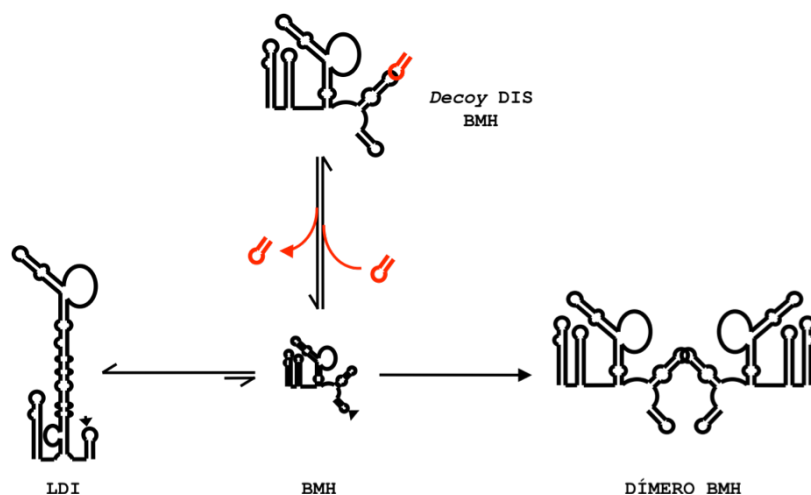


Figura 68. Equilibrio entre los conformeros LDI y BMH de la 5'UTR₃₀₈ del RNA de HIV-1. Los esquemas en negro representan la molécula de RNA de la 5'UTR₃₀₈ en sus diferentes plegamientos y conformeros. Las flechas dobles representan procesos reversibles y la más corta indica el sentido de la reacción menos favorecida. La molécula representada en rojo es el DIS *decoy*.

En un primer momento, se comprobó que tras desnaturalizar y renaturalizar el RNA 5'UTR₃₀₈ en agua, era necesario reducir la fuerza iónica del tampón de electroforesis y del gel hasta TBE 0.25X para evitar que ya en tales condiciones se favoreciese el conformero LDI (datos no mostrados). En dichas condiciones, casi todo el RNA se encuentra plegado en un conformero que migra retrasado respecto al monómero convencional, pero muy cerca de éste, y que se supone es BMH (Fig. 41, línea 1). De modo que se puede concluir que tras la renaturalización en agua, casi toda la población de moléculas se encuentran con plegamiento tipo BMH y monoméricas. Además, la adición de un exceso de *decoy* DIS no marcado radiactivamente no ocasiona cambios en la movilidad, con lo que en dichas condiciones no se produce dimerización (Fig. 41, línea 2). Cuando tras la renaturalización se añade tampón de dimerización se comprueba, que con este aumento de la fuerza iónica, la población inicial de molécula BMH se extingue rápidamente para generar moléculas con plegamiento LDI y dímeros, lo que concuerda con la hipótesis planteada (Fig. 41, línea 3, 5, 7 y 9). En cambio, en presencia del *decoy* DIS en exceso, el dímero normal no se forma y es sustituido por un nuevo complejo retardado muy cercano al asignado como monómero BMH. Este nuevo complejo de retardo es el supuesto heterodímero BMH-*decoy* DIS capturado. Haciendo el marcaje a la inversa, esto es, marcando el *decoy* DIS y añadiendo el RNA 5'UTR₃₀₈ de VIH-1 no marcado, se puede comprobar que el

decoy DIS se encuentra presente en este complejo, con lo que se confirma que es el heterodímero (Fig. 41, línea 4).

De este modo se comprueba que el confórmero BMH monomérico es predominante al principio, pero muy efímero una vez que la fuerza iónica del medio supera un umbral determinado, y se desplaza hacia dímero BMH y LDI. Finalmente, para comprobar si el equilibrio se encuentra muy desplazado hacia el dímero y, por tanto, no hay retorno de moléculas hacia el monómero, en lugar de añadir el exceso de *decoy* DIS antes de iniciar la dimerización, se esperó a que esta ocurriera (40 minutos) y se añadió *a posteriori*, dejando otros 40 minutos de incubación. El resultado fue que en estas circunstancias el *decoy* DIS no era capaz de eliminar la dimerización ya ocurrida, lo cual confirma que hay poco retorno de moléculas desde el dímero hacia la situación monomérica (Fig. 41, línea 3).

De esta forma podemos concluir que aunque la estructura BMH no es favorecida termodinámicamente, existe un flujo constante de moléculas BMH monoméricas hacia diméricas que sería capaz de desplazar la restante población de moléculas LDI hacia dímeros a través de una forma BMH monomérica efímera. Además, cuando está presente el *decoy* DIS, además del heterodímero, también se detecta la forma BMH monomérica, lo que muestra que la interacción heterodimérica no es tan estable como la homodimérica BMH, y esto hace que la forma BMH monomérica no sea tan efímera (Fig. 41, línea 3). Esto podría deberse a que, si bien la interacción primaria entre dos moléculas BMH es mediante el elemento DIS, se han descrito otras interacciones secundarias entre ambas moléculas (361,385,398,430-431), no presentes en el caso del *decoy* DIS, que podrían ser las responsables de que no exista un retorno patente desde el estado dimérico al monomérico.

D.4.2. PROGRESIÓN DE LAS POBLACIONES DE APTÁMEROS DURANTE EL PROCESO SELECTIVO.

El proceso selectivo no sólo nos permite aislar e identificar aptámeros que se unan a una diana concreta, sino comprobar la respuesta de poblaciones de RNAs en evolución cuando son sometidas a presiones selectivas concretas, como en este caso es la unión a una diana. Analizando las diferentes poblaciones en su conjunto

o sus moléculas, podemos determinar cuáles son los parámetros clave en la reacción de las poblaciones de RNA a la selección.

A lo largo de la selección molecular se midieron parámetros de naturaleza bioinformática así como de naturaleza bioquímica. Cada población fue sometida a ensayos de unión a la molécula de RNA 5'UTR₃₀₈ de los cuales se pudo calcular la Unión Máxima y la Constante de Disociación. Igualmente, se secuenciaron al menos 30 clones producto de la ligación de las poblaciones 0, I, III, V, VIII, IX, XI y XIV en el vector pGEM®-T easy. A todas estas secuencias se les calculó la frecuencia nucleotídica de cada uno de los cuatro ribonucleótidos, así como todas fueron analizadas mediante el software bioinformático *RNAfold* y se obtuvieron parámetros tales como la diversidad de ensamblaje, la energía libre de la estructura de mínima energía, del ensamblaje termodinámico y del centrómero, y la frecuencia de dicha estructura de mínima energía en el ensamblaje termodinámico.

Si se observan los datos experimentales en una gráfica, puede observarse que existe un progresivo aumento de la unión máxima alcanzada por cada población, si bien se registra un súbito aumento tras la ronda XI, justo cuando se aplica una reducción drástica de la cantidad de diana en la columna (Fig. 69, ver M.2.10). Desde la ronda IV en adelante (cuando se aumenta la temperatura de unión de 25°C a 37°C), en cambio, no ocurre ningún cambio fuera de la aparente tendencia.

La secuenciación de las poblaciones permitió el estudio de las frecuencias nucleotídicas de las moléculas, así como el plegamiento termodinámico de las mismas. Se observó que los cuatro nucleótidos estaban presentes en todas las posiciones en la población 0, si bien con cierto desequilibrio frente a la distribución equitativa esperada. El cómputo global por molécula para cada nucleótido tampoco era equitativo en el momento de partida, registrándose sin embargo un aumento en la frecuencia de adenina y un descenso en la de citosina en la primera ronda hasta valores, ambos, que se mantienen a lo largo de la selección con pequeñas fluctuaciones (Fig. 46) como unos ligeros aumento y descenso respectivos en las frecuencias de guanosina y adenina a partir del ciclo X.

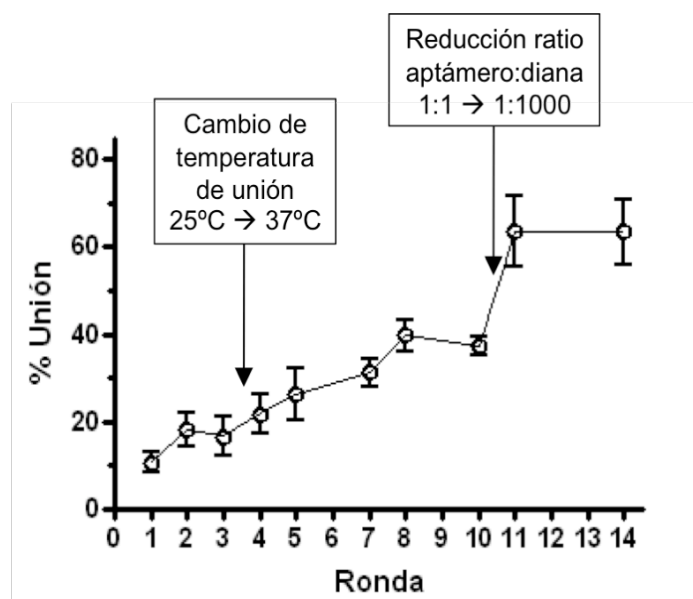


Figura 69. Evolución de la Unión Máxima a lo largo de la selección. En la figura se representa en el eje y el porcentaje de unión máxima registrado para cada una de las poblaciones chequeadas en las diferentes rondas del proceso de selección molecular *in vitro*. La ronda correspondiente se representa en el eje x.

Estos cambios pueden atribuirse a una presión selectiva subyacente a la de unión a la diana, como puede ser la presión por adoptar un plegamiento adecuado requerido para la actividad de unión entre aptámeros y dianas. La población 0 no solo no ha sufrido una presión selectiva de unión a una diana, sino que no ha sufrido siquiera una presión selectiva para formar ninguna estructura concreta. Sin embargo, los aptámeros deben tener estructuras concretas que involucran dobles hélices intracatenarias, con lo que esta presión selectiva subyace a la presión selectiva de unión a la diana. Posiblemente, debido al equilibrio que debe existir entre A y U; y G y C, se haya producido este reequilibrado para el aumento de adenina y la reducción de citosina. No obstante, en el caso del RNA, el par G-U también es igualmente aceptable, de modo que lo que verdaderamente se podría concluir es que el balance entre purinas y pirimidinas debe ser similar en lo que a hélices intracatenarias se refiere. El hecho de que el porcentaje de purinas sea superior al de pirimidinas, nos hace suponer que debe haber exceso de purinas en las zonas desapareadas. Lo cual es coincidente con que el lazo apical más predominante en las moléculas de las poblaciones de los últimos ciclos de selección (R.2.11) es 5'-GGCAAGGA-3', donde la relación purinas:pirimidinas es 7:1.

Finalmente, también se obtuvieron resultados interesantes de la predicción bioinformática de ciertos parámetros bioquímicos. Se analizó la distribución de las diferentes moléculas analizadas en las sucesivas poblaciones en cuanto a sus parámetros: diversidad de ensamblaje (ED, eje x), frecuencia de la estructura de mínima energía (FME, eje y) y abundancia de la molécula (número de repeticiones, eje z). La ED es un valor arbitrario que da una idea de la cantidad de plegamientos posibles que puede adoptar una molécula de ácido nucleico gracias a su secuencia. La estructura de mínima energía es aquel plegamiento que dispone de una menor energía libre de Gibbs y la frecuencia de esta estructura dentro del ensamblaje termodinámico de una población de moléculas iguales es lo que se conoce como FME. En la población 0 hay una distribución uniforme desde moléculas con alta ED y baja FME, hasta moléculas con baja ED y alta FME. Esta correlación parece lógica dado que moléculas con múltiples posibilidades de plegamiento tendrán una frecuencia baja para cualquiera de sus estructuras, incluyendo la de mínima energía. Sin embargo, moléculas con pocas posibilidades de plegamiento, tendrán frecuencias altas de sus estructuras, primando quizá la de mínima energía.

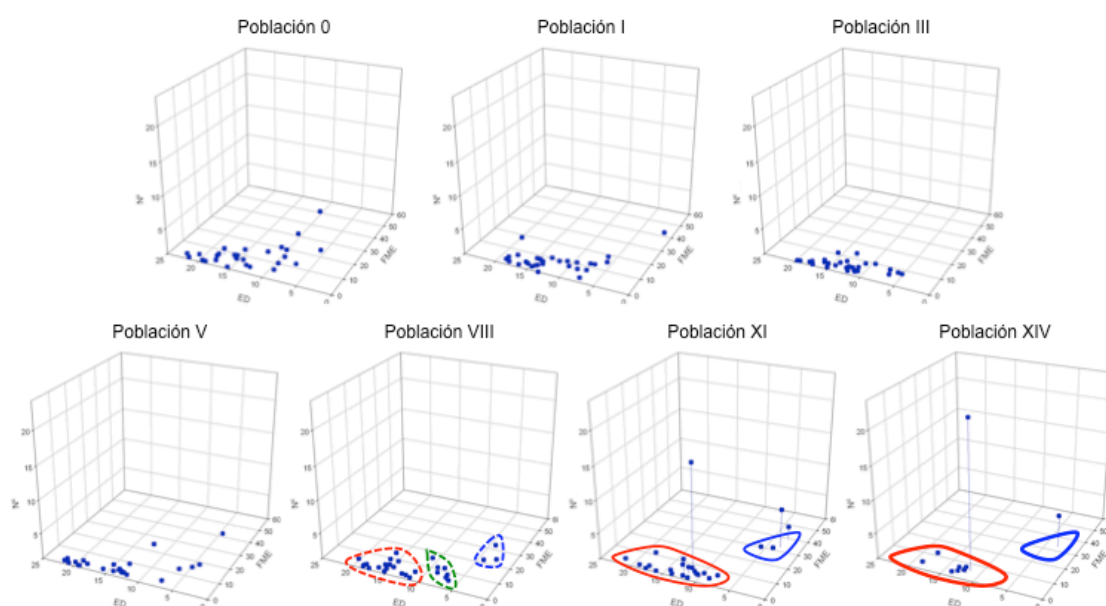


Figura 70. Distribución de los aptámeros a lo largo del ciclo de selección según su diversidad de ensamblaje (ED) y la frecuencia de su estructura de mínima energía (FME). En cada gráfica se representa la ED en el eje x , la FME en el eje y y el número de representantes de cada molécula en el eje z . En azul se enmarca la población de moléculas de alta FME y baja ED detectada en las rondas XI y XIV. En rojo se representa la población con baja FME y alta ED. En la ronda VIII se enmarcan con línea discontinua del mismo color poblaciones con similares características, así como una población con características intermedias en verde.

En cambio, a partir de la población VIII y más claramente en las poblaciones XI y XIV, se distinguen dos poblaciones discontinuas una con la otra y que se caracterizan por tener valores opuestos de estos dos parámetros. Una de ellas tiene baja diversidad de ensamblaje y alta frecuencia de la estructura de mínima energía (Fig. 70, azul) y la otra tiene alta diversidad de ensamblaje y baja frecuencia de la estructura de mínima energía (Fig. 70, rojo). Además, empiezan a acumularse moléculas de ambas poblaciones. Las dos moléculas más acumuladas en la ronda XIV pertenecen cada una a una de las poblaciones (XI1/XIV22 a la población roja y XI21/XIV26 a la población azul). Esta división clara en dos poblaciones tras la ronda XI podría ser consecuencia de la disminución del ratio diana:aptámero practicado en dicha ronda. La división en la población VIII puede no ser un efecto real o, en caso de serlo, quizá la división en dos poblaciones sea una consecuencia tardía del aumento de la temperatura de unión que se modificó en la ronda IV.

Podría decirse que una secuencia con capacidad para plegarse de diferente manera sin que ninguno de los conformeros predomine sobre los demás estaría dotada de pleiomorfismo. Este pleiomorfismo supondría que una misma secuencia constituye diferentes aptámeros y esto le valdría para unirse a diferentes puntos específicamente dentro de una diana de gran tamaño. Es posible que esto sea lo que está ocurriendo en los ciclos I al X, puesto que cada aptámero dispone teóricamente de, al menos, una molécula diana para poder unirse, así que no existe competición entre ellos. De esta manera, una forma de prevalecer para una secuencia sería conseguir introducir más representantes en la siguiente ronda diversificando sus puntos de unión a la diana.

En cambio, a partir de la ronda XI, los aptámeros han de competir entre ellos por unirse al RNA 5'UTR₃₀₈. Un estudio pormenorizado de los dos aptámeros más representados (XI1/XIV22 y XI21/XIV26) demuestra que, si bien el aptámero XI1/XIV22 tiene mayor diversidad de ensamblaje que el segundo, esta diversidad se restringe a una parte de la molécula, mientras que el motivo común descrito en el apartado R.2.11 se encuentra igualmente estructurado en todo el espectro de ensamblajes de la molécula (Fig. 71). En el caso del aptámero XI21/XIV26, su diversidad de ensamblaje es muy reducida y la consistencia del plegamiento de mínima energía es elevada, conteniendo también el motivo común estructurado.

Todo esto podría apuntar a que en el momento en que hay competición entre los aptámeros, la estrategia de un pleiomorfismo que permita unirse con relativa eficacia a diferentes puntos dentro de la 5'UTR₃₀₈ cambia hacia moléculas con alta afinidad por un único punto de unión que sean mejores competidores. Esto es, una secuencia que genere un conjunto de moléculas uniforme y focalizado en la unión a un punto concreto será más eficiente que una secuencia que genere un patrón de plegamiento diverso de manera que los diferentes aptámeros generados no hayan podido especializarse en la unión a sus respectivos dominios.

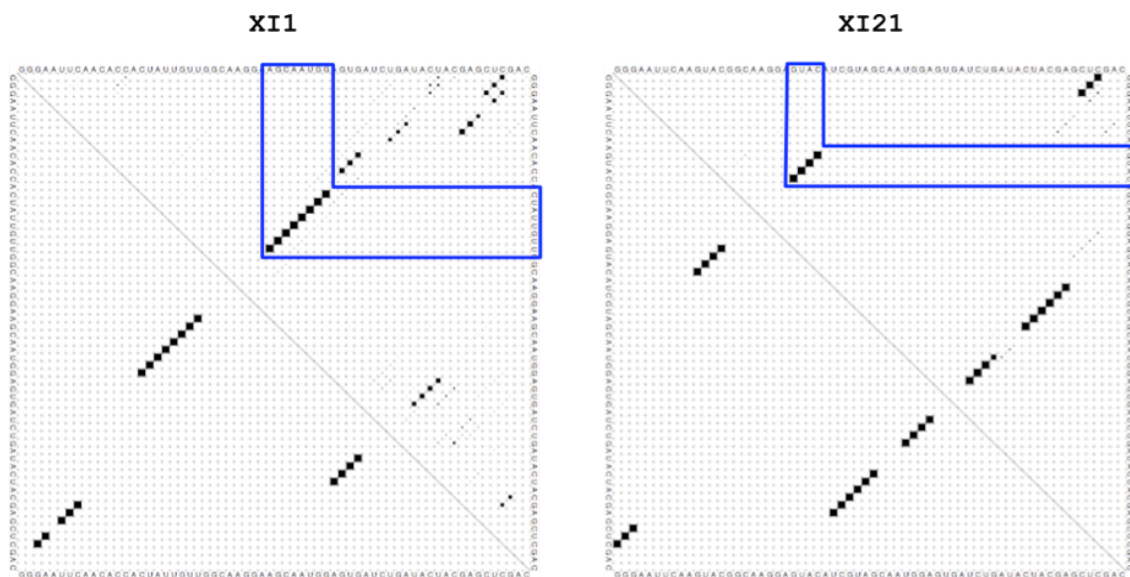


Figura 92. Diagrama *dot-plot* del plegamiento de los aptámeros XI1 y XI21. Este diagrama fue generado mediante el *software* RNAfold (411). En ambos ejes se representa la secuencia del aptámero, de modo que cada punto del diagrama supone un apareamiento entre los dos nucleótidos de la coordenada. En la mitad inferior-izquierda se representa la estructura de mínima energía, mientras que en la mitad superior derecha se representa el ensamblaje termodinámico total. En esta última, la intensidad del punto representa la frecuencia con que ocurre dicho apareamiento en la población. Enmarcado en azul se encuentra la horquilla que contiene el motivo de unión conservado en las moléculas de las últimas rondas de selección. Puede observarse que en el caso del aptámero XI1, cuya ED es elevada, el motivo de unión seleccionado se encuentra presente en todos los plegamientos posibles de la molécula, debiéndose esta alta ED a la diversidad de plegamiento del resto de la molécula.

D.5. EL MOTIVO DE UNIÓN 5'-GGCAAGGA-3': APTÁMEROS XI1, XI21 Y LA MOLÉCULA RNA16(+).

En el apartado R.2.11 se describe brevemente el estudio bioinformático realizado en colaboración con el grupo del Dr. Carlos Briones Llorente, del Centro de Astrobiología del CSIC-INTA. Este estudio permitió aislar un motivo de

secuencia y estructura conservado, cuya abundancia es claramente creciente en las rondas IX (3 de 32 secuencias, 9'4%), X (15 de 35 secuencias, 42'9%), XI (35 de 52 secuencias, 67'3%) y XIV (34 de 37 secuencias, 91'9%) y podría correlacionarse con el momento en que comenzó a aumentarse la presión selectiva por reducción de la cantidad de molécula diana inmovilizada en la columna. Además, la secuencia de lazo apical de cadena sencilla del motivo es de 8 nt ($\approx 1/3$ de la región variable de 25 nt) y, probabilísticamente, no podría haberse seleccionado al azar en tantas moléculas. Esto es, la probabilidad de que una secuencia de 25 nt escogida al azar contenga un motivo concreto de 8 nt es de $1/5.000$. Que el motivo se hallase en dos secuencias al azar supondría $1/25 \times 10^6$. Y el hecho de que tenga que estar en un lazo apical de una horquilla reduciría mucho más la probabilidad.

Precisamente, la estructura de las secuencias en que aparece este motivo sugiere que el lazo apical de 8 nt puede estar interaccionando con alguna región desapareada de la molécula de RNA 5'UTR₃₀₈. Se analizaron las posibles interacciones entre los aptámeros XI1, XI21 y XI141 portadores del motivo seleccionado y altamente representados, y la 5'UTR₃₀₈ mediante el *software* informático *RNAup* (del *Vienna RNA Package*, (432)). Las posibles interacciones se identifican por la energía libre total de la unión entre dos regiones de sendas moléculas. En la figura 98A se representa la secuencia de la 5'UTR₃₀₈ en el eje *x* y la energía libre de interacción en el eje *y*, de modo que los valles se corresponden con regiones de interacción altamente favorecidas. Se pueden distinguir seis valles marcados de la *a* a la *f* y que se corresponden con regiones de interacción que implican al motivo 5'GGCAAGGA3' en el estudio recíproco realizado con los aptámeros. Si bien las curvas para cada molécula se diferencian debido al contexto de secuencia en que se encuentra el motivo, todas estas regiones de interacción pueden identificarse en el plegamiento de la 5'UTR₃₀₈ que se muestra en la figura 72B.

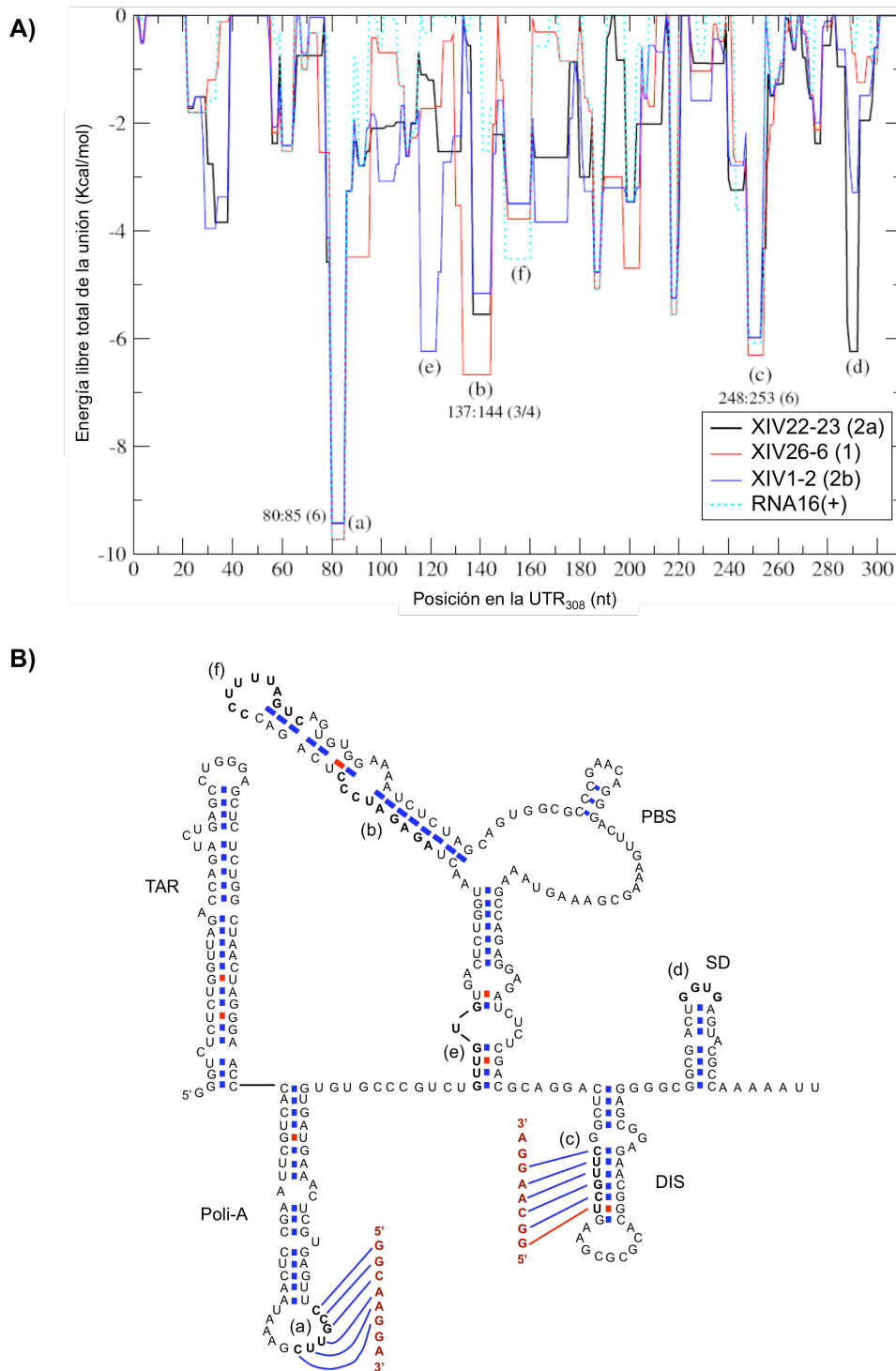


Figura 72. Predicción bioinformática de interacciones entre la molécula de RNA 5'UTR₃₀₈ y los aptámeros XI1, XI21, XI141 y la molécula RNA16(+). En (A) se muestra en la gráfica la energía libre total las posibles interacciones de regiones de la molécula 5'UTR₃₀₈ con las cuatro moléculas ligando estudiadas. En el eje X se representa las posiciones (nt) de las regiones de la 5'UTR₃₀₈ y en el eje Y el valor de energía libre total de la unión. Marcados desde *a* a *f* se encuentran los diferentes valles que se correlacionan con posibles zonas de unión a los aptámeros. En (B) se muestran marcadas con negrita las seis posibles regiones de interacción dentro de la molécula 5'UTR₃₀₈ plegada en forma BMH. Para las regiones *a* y *c*, se muestra además al apareamiento con el motivo 5'-GGCAAGGA-3' (en granate) identificado en las cuatro moléculas ligando tratadas. Los apareamientos de tipo Watson y Crick se muestran en azul, y los de tipo *wobble* en rojo.

A priori, las regiones *a* y *c* de interacción serían las más probables basándonos principalmente en tres criterios: i) el mismo valle coincide en la interacción de la molécula diana 5'UTR₃₀₈ de VIH-1 con los tres aptámeros así como con la molécula RNA16(+); ii) presentan una mayor estabilidad en la interacción dado que tienen la menor energía libre total de unión; y iii) en dichas interacciones intervienen 6 o más nucleótidos contiguos en ambas moléculas. Además, la mutación registrada en el motivo del aptámero XIV22 (Fig. 50) es compatible con ambas regiones de interacción, lo cual apoya la predicción de esta posible interacción.

La zona de unión en elementos *Poly-A* sólo se encuentra en cadena sencilla en el confórmero BMH, poco representado, y la zona de unión en el elemento DIS se encuentra en doble cadena en ambos confórmeros, BMH y LDI. El patrón de degradación del confórmero BMH estaría, además, poco representado en los ensayos de mapeo de unión y, por tanto, la protección por la unión a *Poly-A* sería difícilmente detectable. Para el caso de la unión a DIS, ésta quizá no se detectaría porque no supondría un cambio en la accesibilidad de la región pues no pasa de cadena sencilla a cadena doble. Esto podría explicar que no se detecte punto de unión alguno en los ensayos de mapeo de unión para el aptámero XI21. El aptámero XI1, en cambio, muestra una posible unión al lazo-U del PBS. Dado que la abundancia de moléculas susceptibles de ser unidas, esto es confórmeros BMH, es relativamente baja y que el aptámero en estos ensayos se encuentra en exceso, es posible que la unión al lazo-U registrada pueda ser una unión secundaria, aunque detectable, una vez que el lazo apical del elemento *Poly-A* de los confórmeros BMH se encuentra saturado.

El diseño de la molécula RNA16(+) se hizo para cumplir los requisitos de estructura y secuencia del motivo de unión seleccionado. El objetivo era diseñar una molécula de tamaño reducido que inhibiese la replicación viral y cumpliera los requisitos de facilidad de síntesis y coste reducido necesarios para una perspectiva farmacológica aplicable. Igualmente, como control negativo se diseñó la molécula RNA16(-) de tal modo que fuera la menos favorecida dentro de aquellas que mantuviesen un plegamiento similar al motivo conservado para unirse a la diana (R.2.11). La inhibición postintegrativa registrada por la molécula presintetizada

RNA16(+) fue de un $63'34 \pm 2'136\%$ con respecto a la producción viral registrada en ensayo de cotransfección de pNL4.3 con la molécula RNA16(-) en células HEK293T. Esta inhibición fue estadísticamente significativa, si bien era menor que la registrada por los dos aptámeros estudiados que portan el mismo dominio conservado (XI1, $76.77 \pm 7.481\%$, y XI21, $80.47 \pm 2.554\%$).

La suposición de que las tres moléculas se unen al mismo lugar en la molécula diana y comparten un mismo mecanismo de inhibición es consistente con que la inhibición que realizan está correlacionada con su capacidad de unión. Estudiamos la unión de las moléculas RNA16(-) y RNA16(+) a la molécula de RNA 5'UTR₃₀₈, así como los aptámeros XI1 y XI21, flanqueados estos últimos por las horquillas del snRNA U6, esto es, exactamente las mismas moléculas que se utilizan en inhibición *ex vivo*. De manera concluyente, la unión máxima calculada según las curvas de ajuste para los datos del aptámero XI21 es aproximadamente del 100%, la del aptámero XI1 es $87.59 \pm 1.258\%$ y la de la molécula RNA16(+) es $79.35 \pm 8.2\%$; y la inhibición *ex vivo* registrada como RNA inhibidor presintetizado es respectivamente de $80.47 \pm 2.554\%$, de $76.77 \pm 7.481\%$ y de $63.34 \pm 2.136\%$. Además, también se puede deducir de este estudio, mostrado en la figura 63, que el procedimiento bioinformático utilizado para el diseño del RNA16(-) como molécula menos favorecida para la unión ha sido exitoso.

Resulta llamativo que las curvas de unión se ajustan a diferentes ecuaciones matemáticas. La unión del RNA inhibidor XI1 se ajusta a un modelo de unión cooperativa con un único sitio de unión, mientras que tanto los RNAs inhibidores XI21 y RNA16(+) se ajustan a modelos hiperbólicos de unión que no manifiestan cooperatividad. Tanto las moléculas RNA16(+) como el aptámero XI21 se caracterizan por tener estructuras muy bien definidas y consistentes. Para el RNA16(+) la diversidad de ensamblaje es de 0'42 y la frecuencia de la estructura de mínima energía de 91'82%, mientras que para el aptámero XI21 es respectivamente de 3'12 y 7'09, y de 33'22 y 8'35% con y sin las horquillas del snRNA U6. La mejor unión del RNA inhibidor XI21 debe ser inherente al resto de la molécula que no constituye parte de motivo conservado y que es inexistente en la molécula de RNA16(+). Otra posibilidad es que quizá en esta última tenga algún efecto negativo la excesiva estabilidad de la hélice (con 4 pares GC, respecto a 2 en la molécula XI21 y uno en la XI1) que cierra el lazo apical.

El aptámero XI1 tiene, en cambio, una consistencia estructural más baja, si bien el motivo seleccionado es muy consistente en todo su plegamiento termodinámico (Fig. 71). Su diversidad de ensamblaje es de 11'65 y 15'90, y su frecuencia de la estructura de mínima energía de 6'07 y 6'03 respectivamente con y sin las horquillas del snRNA U6. El modelo de ajuste de esta última molécula implica un único sitio de unión (que sería el compartido con las otras dos moléculas) pero con un adicional efecto cooperativo que debe estar mediado por el resto de la molécula y que podría estar, de algún modo, relacionado con esta flexibilidad en el plegamiento o con la posibilidad de una segunda unión de otra molécula al lazo-U del PBS (tal como apuntan los datos experimentales).

En cualquier caso, la combinación de la aproximación bioinformática con las técnicas experimentales ha permitido aislar el dominio mínimo de unión compartido por una gran parte de las moléculas de las poblaciones seleccionadas. Las técnicas de selección *in vitro* imponen un tamaño mínimo y secuencias constantes flanqueantes que hacen que los aptámeros generados tengan un longitud que dificulta las perspectivas de una síntesis química a gran escala para su uso industrial, así como aumentan la posibilidad de efectos secundarios debido a interacciones de dichas regiones con dianas celulares no deseadas. Es por esto por lo que frecuentemente, una vez elegido un aptámero, es necesario un proceso de mejora por ensayo y error de diferentes deleciones de su secuencia hasta identificar un dominio de unión mínimo idóneo (como se hace en (239)).

La aproximación bioinformática ha permitido eludir este proceso empírico de deleciones sucesivas, evitando también focalizar el estudio en un único aptámero, sino estudiando la población de moléculas en su conjunto. De este modo, se evita que el motivo de unión aislado pueda presentar alguna particularidad deletérea consecuencia de algún requisito propio del aptámero del que proviene, pues en este caso solo la secuencia y la estructura ampliamente representada en la población es seleccionada. El éxito de la molécula RNA16(+), totalmente sintética y no existente en las poblaciones producto del experimento de selección, demuestra que la estrategia bioinformática utilizada constituye una herramienta innovadora que mejora las técnicas para el diseño de aptámeros funcionales y de mínimo tamaño.

CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas de esta tesis son:

- El elemento DIS es un substrato óptimo para utilizarse como diana de dominios *antisense* y *decoy* en combinación con las ribozimas *hammerhead* y *hairpin* dirigidas a las posiciones 113 y 159. La unión de la molécula quimérica o RNA *antisense* catalítico a la diana 5'UTR₃₀₈ es rápida y muy estable, pero no repercute sensiblemente en la actividad de las ribozimas.

- Las moléculas de RNA DIS *decoy* y DIS *antisense* individualmente o en combinación con las ribozimas *hammerhead* y *hairpin* (113 y 159) actúan eficazmente como inhibidores de la dimerización del RNA 5'UTR₃₀₈ de VIH-1.

- La molécula de RNA 5'UTR₃₀₈ de VIH-1 presenta tres confórmeros principales LDI, BMH y BMH-dimérico. El confórmero BMH es efímero y constituye el estado de transición entre los otros dos, manteniendo un equilibrio reversible con el confórmero LDI y fuertemente irreversible con el BMH dimérico, estando desplazado hacia éste último.

- La técnica de selección molecular *in vitro* utilizando una diana de gran longitud y altamente estructurada en diferentes dominios permite generar aptámeros contra dichos dominios y sujetos al entorno de RNA en que se encuentran. Así, el proceso selectivo también incluye las variables de accesibilidad de la diana y disponibilidad de dominios espacialmente próximos para la interacción específica.

- La inclusión de las horquillas terminales 5' y 3' del snRNA U6 en los RNAs *antisense* catalíticos y aptámeros posibilita la inhibición *ex vivo* y post-integrativa del VIH-1, siendo ésta más efectiva mediante la utilización de moléculas de RNA presintetizadas que mediante la utilización de vectores de expresión génica basados en el promotor del snRNA U6.

- La distorsión de la burbuja trinucleotídica del elemento TAR, esencial para el proceso de *trans*-activación de la transcripción durante los primeros estadios del

ciclo viral, mediante la utilización de aptámeros consigue una inhibición pre-integrativa de VIH-1.

- El abordaje bioinformático ha probado su utilidad para la depuración de las secuencias obtenidas durante el proceso selectivo y la identificación de un dominio mínimo de unión. Constituye, de este modo, una estrategia de refinamiento de la técnica experimental para la obtención de aptámeros:

- la selección molecular *in vitro* provee de una colección de secuencias empíricamente obtenidas para estudio y
- el abordaje bioinformático permite superar las limitaciones de la primera y obtener moléculas aptas y de pequeño tamaño.

La molécula artificial RNA16(+) diseñada bioinformáticamente a partir de secuencias obtenidas por selección molecular *in vitro* ha resultado ser funcional en ensayos experimentales *in vitro* de unión y ha resultado tener actividad como inhibidor post-integrativo de VIH-1 *ex vivo*. Esto valida la complementación de las técnicas experimentales y bioinformáticas.

REFERENCIAS

1. Schrödinger, E. (1992) *What is Life? With Mind and Matter with Autobiographical Sketches*. Cambridge University Press, Cambridge.
2. Miescher, F. (1871), *Medicinischem-chemische Untersuchungen*, Vol. 4, pp. 441–460.
3. Altman, R. (1889), *Physiologische Abteilung*, Leipzig, Vol. Archiv für Anatomie und Physiologie, pp. 524-536.
4. Levene, P.A. (1919) The Structure of Yeast Nucleic Acid. IV. Ammonia Hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, **40**, 415– 424.
5. Palade, G.E. and Siekevitz, P. (1956) Liver microsomes; an integrated morphological and biochemical study. *J Biophys Biochem Cytol*, **2**, 171-200.
6. Palade, G.E. and Siekevitz, P. (1956) Pancreatic microsomes; an integrated morphological and biochemical study. *J Biophys Biochem Cytol*, **2**, 671-690.
7. Claude, A. (1940) Particulate Components of Normal and Tumor Cells. *Science*, **91**, 77-78.
8. Griffith, F. and W.M., S. (1941) In Journal, B. M. (ed.), pp. 691.
9. Avery, O.T., Macleod, C.M. and McCarty, M. (1944) Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. *J Exp Med*, **79**, 137-158.
10. Brenner, S., Jacob, F. and Meselson, M. (1961) An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*, **190**, 576–581.
11. Zamecnik, P.C. and Stephenson, M.L. (1960) Partial purification of transfer RNA. *Ann N Y Acad Sci*, **88**, 708-717.
12. Crick, F.H.C. (1958). Symp. Soc. Exp. Biol. XII, pp. 139-163.
13. Stanley, W.M. and Lauffer, M.A. (1939) Disintegration of Tobacco Mosaic Virus in Urea Solutions. *Science*, **89**, 345-347.
14. Schramm, G., Schumacher, G. and Zillig, W. (1955) An infectious nucleoprotein from tobacco mosaic virus. *Nature*, **175**, 549-550.
15. Gierer, A. and Schramm, G. (1956) Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. *Nature*, **177**, 702-703.
16. Fraenkel-Conrat, H. (1957) Structure and infectivity of tobacco mosaic virus. *Harvey Lect*, **53**, 56-68.
17. Weissmann, C., Borst, P., Burdon, R.H., Billeter, M.A. and Ochoa, S. (1964) Replication of Viral RNA. Iv. Properties of RNA Synthetase and Enzymatic Synthesis of Ms2 Phage RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **51**, 890-897.
18. Haruna, I., Nozu, K., Ohtaka, Y. and Spiegelman, S. (1963) An RNA "Replicase" Induced by and Selective for a Viral RNA: Isolation and Properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **50**, 905-911.
19. Temin, H.M. (1964) Homology between RNA from Rous Sarcoma Virus and DNA from Rous Sarcoma Virus-Infected Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **52**, 323-329.
20. Temin, H.M. and Mizutani, S. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, **226**, 1211-1213.
21. Baltimore, D. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, **226**, 1209-1211.
22. Crick, F. (1970) Central dogma of molecular biology. *Nature*, **227**, 561-563.
23. Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E. and Cech, T.R. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell*, **31**, 147-157.
24. Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. and Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, **35**, 849-857.
25. Cech, T.R. (2009) Crawling out of the RNA world. *Cell*, **136**, 599-602.
26. Jeffares, D.C., Poole, A.M. and Penny, D. (1998) Relics from the RNA world. *Journal of molecular evolution*, **46**, 18-36.
27. Eckerle, L.D., Lu, X., Sperry, S.M., Choi, L. and Denison, M.R. (2007) High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exoribonuclease mutants. *J Virol*, **81**, 12135-12144.
28. Kikovska, E., Svard, S.G. and Kirsebom, L.A. (2007) Eukaryotic RNase P RNA mediates cleavage in the absence of protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 2062-2067.
29. Cech, T.R. (2000) Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science*, **289**, 878-879.

30. Keating, K.S., Toor, N., Perlman, P.S. and Pyle, A.M. (2010) A structural analysis of the group II intron active site and implications for the spliceosome. *RNA*, **16**, 1-9.
31. Toor, N., Keating, K.S. and Pyle, A.M. (2009) Structural insights into RNA splicing. *Curr Opin Struct Biol*, **19**, 260-266.
32. Hall, L.L. and Lawrence, J.B. (2003) The cell biology of a novel chromosomal RNA: chromosome painting by XIST/Xist RNA initiates a remodeling cascade. *Seminars in cell & developmental biology*, **14**, 369-378.
33. Clark, M.B. and Mattick, J.S. (2011) Long noncoding RNAs in cell biology. *Seminars in cell & developmental biology*, **22**, 366-376.
34. Brosius, J. and Tiedge, H. (2004) RNomenclature. *RNA Biol*, **1**, 81-83.
35. Strobel, S.A. and Cochrane, J.C. (2007) RNA catalysis: ribozymes, ribosomes, and riboswitches. *Curr Opin Chem Biol*, **11**, 636-643.
36. Fedor, M.J. and Williamson, J.R. (2005) The catalytic diversity of RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 399-412.
37. Nagaswamy, U., Larios-Sanz, M., Hury, J., Collins, S., Zhang, Z., Zhao, Q. and Fox, G.E. (2002) NCIR: a database of non-canonical interactions in known RNA structures. *Nucleic Acids Res*, **30**, 395-397.
38. Kirsch, J.F., Siekevitz, P. and Palade, G.E. (1960) Amino acid incorporation in vitro by ribonucleoprotein particles detached from guinea pig liver microsomes. *J Biol Chem*, **235**, 1419-1424.
39. Korostelev, A. and Noller, H.F. (2007) The ribosome in focus: new structures bring new insights. *Trends Biochem Sci*, **32**, 434-441.
40. Noller, H.F. (1991) Ribosomal RNA and translation. *Annu Rev Biochem*, **60**, 191-227.
41. Noller, H.F., Hoffarth, V. and Zimniak, L. (1992) Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science*, **256**, 1416-1419.
42. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, **289**, 905-920.
43. Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F. and Yonath, A. (2001) High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell*, **107**, 679-688.
44. Bashan, A., Zarivach, R., Schluenzen, F., Agmon, I., Harms, J., Auerbach, T., Baram, D., Berisio, R., Bartels, H., Hansen, H.A. *et al.* (2003) Ribosomal crystallography: peptide bond formation and its inhibition. *Biopolymers*, **70**, 19-41.
45. Schuwirth, B.S., Borovinskaya, M.A., Hau, C.W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J.M. and Cate, J.H. (2005) Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*, **310**, 827-834.
46. Muth, G.W., Ortoleva-Donnelly, L. and Strobel, S.A. (2000) A single adenosine with a neutral pKa in the ribosomal peptidyl transferase center. *Science*, **289**, 947-950.
47. Polacek, N., Gaynor, M., Yassin, A. and Mankin, A.S. (2001) Ribosomal peptidyl transferase can withstand mutations at the putative catalytic nucleotide. *Nature*, **411**, 498-501.
48. Thompson, J., Kim, D.F., O'Connor, M., Lieberman, K.R., Bayfield, M.A., Gregory, S.T., Green, R., Noller, H.F. and Dahlberg, A.E. (2001) Analysis of mutations at residues A2451 and G2447 of 23S rRNA in the peptidyltransferase active site of the 50S ribosomal subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9002-9007.
49. Youngman, E.M., Brunelle, J.L., Kochaniak, A.B. and Green, R. (2004) The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release. *Cell*, **117**, 589-599.
50. Schmeing, T.M., Huang, K.S., Kitchen, D.E., Strobel, S.A. and Steitz, T.A. (2005) Structural insights into the roles of water and the 2' hydroxyl of the P site tRNA in the peptidyl transferase reaction. *Mol Cell*, **20**, 437-448.
51. Schmeing, T.M., Huang, K.S., Strobel, S.A. and Steitz, T.A. (2005) An induced-fit mechanism to promote peptide bond formation and exclude hydrolysis of peptidyl-tRNA. *Nature*, **438**, 520-524.
52. Beringer, M. and Rodnina, M.V. (2007) The ribosomal peptidyl transferase. *Mol Cell*, **26**, 311-321.
53. Vioque, A. and Altman, S. (1986) Affinity chromatography with an immobilized RNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 5904-5908.

54. Kouzuma, Y., Mizoguchi, M., Takagi, H., Fukuhara, H., Tsukamoto, M., Numata, T. and Kimura, M. (2003) Reconstitution of archaeal ribonuclease P from RNA and four protein components. *Biochem Biophys Res Commun*, **306**, 666-673.
55. Eder, P.S., Kekuda, R., Stolc, V. and Altman, S. (1997) Characterization of two scleroderma autoimmune antigens that copurify with human ribonuclease P. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1101-1106.
56. Jarrous, N. and Altman, S. (2001) Human ribonuclease P. *Methods Enzymol*, **342**, 93-100.
57. Massire, C., Jaeger, L. and Westhof, E. (1998) Derivation of the three-dimensional architecture of bacterial ribonuclease P RNAs from comparative sequence analysis. *J Mol Biol*, **279**, 773-793.
58. Kirsebom, L.A. (2007) RNase P RNA mediated cleavage: substrate recognition and catalysis. *Biochimie*, **89**, 1183-1194.
59. Michel, F., Umesono, K. and Ozeki, H. (1989) Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns--a review. *Gene*, **82**, 5-30.
60. Ferat, J.L. and Michel, F. (1993) Group II self-splicing introns in bacteria. *Nature*, **364**, 358-361.
61. Toro, N. (2003) Bacteria and Archaea Group II introns: additional mobile genetic elements in the environment. *Environ Microbiol*, **5**, 143-151.
62. Pyle, A.M. (1996) Mobile genetic elements. Inside an intron invasion. *Nature*, **381**, 280-281.
63. Bonen, L. and Vogel, J. (2001) The ins and outs of group II introns. *Trends Genet*, **17**, 322-331.
64. Stahley, M.R. and Strobel, S.A. (2006) RNA splicing: group I intron crystal structures reveal the basis of splice site selection and metal ion catalysis. *Curr Opin Struct Biol*, **16**, 319-326.
65. Peebles, C.L., Benatan, E.J., Jarrell, K.A. and Perlman, P.S. (1987) Group II intron self-splicing: development of alternative reaction conditions and identification of a predicted intermediate. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **52**, 223-232.
66. Jarrell, K.A., Peebles, C.L., Dietrich, R.C., Romiti, S.L. and Perlman, P.S. (1988) Group II intron self-splicing. Alternative reaction conditions yield novel products. *J Biol Chem*, **263**, 3432-3439.
67. Steitz, T.A. and Steitz, J.A. (1993) A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6498-6502.
68. Lambowitz, A.M. and Zimmerly, S. (2004) Mobile group II introns. *Annu Rev Genet*, **38**, 1-35.
69. Wahl, M.C., Will, C.L. and Luhrmann, R. (2009) The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, **136**, 701-718.
70. Patel, A.A. and Steitz, J.A. (2003) Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 960-970.
71. Michel, F., Costa, M. and Westhof, E. (2009) The ribozyme core of group II introns: a structure in want of partners. *Trends Biochem Sci*, **34**, 189-199.
72. Sontheimer, E.J., Sun, S. and Piccirilli, J.A. (1997) Metal ion catalysis during splicing of premessenger RNA. *Nature*, **388**, 801-805.
73. Yean, S.L., Wuenschell, G., Termini, J. and Lin, R.J. (2000) Metal-ion coordination by U6 small nuclear RNA contributes to catalysis in the spliceosome. *Nature*, **408**, 881-884.
74. Valadkhan, S., Mohammadi, A., Jaladat, Y. and Geisler, S. (2009) Protein-free small nuclear RNAs catalyze a two-step splicing reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 11901-11906.
75. van Tol, H., Buzayan, J.M., Feldstein, P.A., Eckstein, F. and Bruening, G. (1990) Two autolytic processing reactions of a satellite RNA proceed with inversion of configuration. *Nucleic Acids Res*, **18**, 1971-1975.
76. Raines, R.T. (1998) Ribonuclease A. *Chem Rev*, **98**, 1045-1066.
77. Cochrane, J.C. and Strobel, S.A. (2008) Catalytic strategies of self-cleaving ribozymes. *Acc Chem Res*, **41**, 1027-1035.
78. Long, D.M. and Uhlenbeck, O.C. (1993) Self-cleaving catalytic RNA. *Faseb J*, **7**, 25-30.
79. Pyle, A.M. (1993) Ribozymes: a distinct class of metalloenzymes. *Science*, **261**, 709-714.

80. Murray, J.B., Seyhan, A.A., Walter, N.G., Burke, J.M. and Scott, W.G. (1998) The hammerhead, hairpin and VS ribozymes are catalytically proficient in monovalent cations alone. *Chem Biol*, **5**, 587-595.
81. Roth, A., Nahvi, A., Lee, M., Jona, I. and Breaker, R.R. (2006) Characteristics of the glmS ribozyme suggest only structural roles for divalent metal ions. *RNA*, **12**, 607-619.
82. Bevilacqua, P.C. and Yajima, R. (2006) Nucleobase catalysis in ribozyme mechanism. *Curr Opin Chem Biol*, **10**, 455-464.
83. Sharmeen, L., Kuo, M.Y., Dinter-Gottlieb, G. and Taylor, J. (1988) Antigenomic RNA of human hepatitis delta virus can undergo self-cleavage. *J Virol*, **62**, 2674-2679.
84. Kuo, M.Y., Sharmeen, L., Dinter-Gottlieb, G. and Taylor, J. (1988) Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus. *J Virol*, **62**, 4439-4444.
85. Salehi-Ashtiani, K., Luptak, A., Litovchick, A. and Szostak, J.W. (2006) A genomewide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene. *Science*, **313**, 1788-1792.
86. Eickbush, D.G. and Eickbush, T.H. R2 retrotransposons encode a self-cleaving ribozyme for processing from an rRNA cotranscript. *Mol Cell Biol*, **30**, 3142-3150.
87. Sanchez-Luque, F.J., Lopez, M.C., Macias, F., Alonso, C. and Thomas, M.C. (2011) Identification of an hepatitis delta virus-like ribozyme at the mRNA 5'-end of the L1Tc retrotransposon from *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res*, **39**, 8065-8077.
88. Winkler, W.C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J.A. and Breaker, R.R. (2004) Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature*, **428**, 281-286.
89. Hampel, K.J. and Tinsley, M.M. (2006) Evidence for preorganization of the glmS ribozyme ligand binding pocket. *Biochemistry*, **45**, 7861-7871.
90. Klein, D.J. and Ferre-D'Amare, A.R. (2006) Structural basis of glmS ribozyme activation by glucosamine-6-phosphate. *Science*, **313**, 1752-1756.
91. Cochrane, J.C., Lipchock, S.V. and Strobel, S.A. (2007) Structural investigation of the GlmS ribozyme bound to its catalytic cofactor. *Chem Biol*, **14**, 97-105.
92. Saville, B.J. and Collins, R.A. (1990) A site-specific self-cleavage reaction performed by a novel RNA in *Neurospora* mitochondria. *Cell*, **61**, 685-696.
93. Kennell, J.C., Saville, B.J., Mohr, S., Kuiper, M.T., Sabourin, J.R., Collins, R.A. and Lambowitz, A.M. (1995) The VS catalytic RNA replicates by reverse transcription as a satellite of a retroplasmid. *Genes Dev*, **9**, 294-303.
94. Wilson, T.J., Li, N.S., Lu, J., Frederiksen, J.K., Piccirilli, J.A. and Lilley, D.M. Nucleobase-mediated general acid-base catalysis in the Varkud satellite ribozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 11751-11756.
95. Desjardins, G., Bonneau, E., Girard, N., Boissouvier, J. and Legault, P. (2011) NMR structure of the A730 loop of the *Neurospora* VS ribozyme: insights into the formation of the active site. *Nucleic Acids Res*, **39**, 4427-4437.
96. Teixeira, A., Tahiri-Alaoui, A., West, S., Thomas, B., Ramadass, A., Martianov, I., Dye, M., James, W., Proudfoot, N.J. and Akoulitchev, A. (2004) Autocatalytic RNA cleavage in the human beta-globin pre-mRNA promotes transcription termination. *Nature*, **432**, 526-530.
97. Bird, G., Fong, N., Gatlin, J.C., Farabaugh, S. and Bentley, D.L. (2005) Ribozyme cleavage reveals connections between mRNA release from the site of transcription and pre-mRNA processing. *Mol Cell*, **20**, 747-758.
98. Buzayan, J.M., Gerlach, W.L. and Bruening, G. (1986) Satellite tobacco ringspot virus RNA: A subset of the RNA sequence is sufficient for autolytic processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 8859-8862.
99. Hutchins, C.J., Rathjen, P.D., Forster, A.C. and Symons, R.H. (1986) Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res*, **14**, 3627-3640.
100. Prody, G.A., Bakos, J.T., Buzayan, J.M., Schneider, I.R. and Bruening, G. (1986) Autolytic Processing of Dimeric Plant Virus Satellite RNA. *Science*, **231**, 1577-1580.
101. Hernandez, C. and 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.
102. Forster, A.C. and Symons, R.H. (1987) Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell*, **49**, 211-220.

103. Miller, W.A. and 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.
104. Navarro, B. and 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.
105. Symons, R.H. (1992) Small catalytic RNAs. *Annu Rev Biochem*, **61**, 641-671.
106. Symons, R.H. (1997) Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2683-2689.
107. Ferbeyre, G., Smith, J.M. and Cedergren, R. (1998) Schistosome satellite DNA encodes active hammerhead ribozymes. *Mol Cell Biol*, **18**, 3880-3888.
108. Rojas, A.A., Vazquez-Tello, A., Ferbeyre, G., Venanzetti, F., Bachmann, L., Paquin, B., Sbordoni, V. and Cedergren, R. (2000) Hammerhead-mediated processing of satellite pDo500 family transcripts from Dolichopoda cave crickets. *Nucleic Acids Res*, **28**, 4037-4043.
109. Martick, M., Horan, L.H., Noller, H.F. and Scott, W.G. (2008) A discontinuous hammerhead ribozyme embedded in a mammalian messenger RNA. *Nature*, **454**, 899-902.
110. Ferbeyre, G., Bourdeau, V., Pageau, M., Miramontes, P. and Cedergren, R. (2000) Distribution of hammerhead and hammerhead-like RNA motifs through the GenBank. *Genome Res*, **10**, 1011-1019.
111. de la Pena, M. and Garcia-Robles, I. (2010) Intronic hammerhead ribozymes are ultraconserved in the human genome. *EMBO reports*, **11**, 711-716.
112. de la Pena, M. and Garcia-Robles, I. (2010) Ubiquitous presence of the hammerhead ribozyme motif along the tree of life. *RNA*, **16**, 1943-1950.
113. Hammann, C., Luptak, A., Perreault, J. and de la Pena, M. (2012) The ubiquitous hammerhead ribozyme. *RNA*, **18**, 871-885.
114. Salehi-Ashtiani, K. and Szostak, J.W. (2001) In vitro evolution suggests multiple origins for the hammerhead ribozyme. *Nature*, **414**, 82-84.
115. Haseloff, J. and Gerlach, W.L. (1989) Sequences required for self-catalysed cleavage of the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Gene*, **82**, 43-52.
116. Ruffner, D.E., Stormo, G.D. and Uhlenbeck, O.C. (1990) Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction. *Biochemistry*, **29**, 10695-10702.
117. Uhlenbeck, O.C. (1987) A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature*, **328**, 596-600.
118. Tuschl, T. and Eckstein, F. (1993) Hammerhead ribozymes: importance of stem-loop II for activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6991-6994.
119. Nakamaye, K.L. and Eckstein, F. (1994) AUA-cleaving hammerhead ribozymes: attempted selection for improved cleavage. *Biochemistry*, **33**, 1271-1277.
120. Perriman, R., Delves, A. and Gerlach, W.L. (1992) Extended target-site specificity for a hammerhead ribozyme. *Gene*, **113**, 157-163.
121. Zoumadakis, M. and 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.
122. Kore, A.R., Vaish, N.K., Kutzke, U. and Eckstein, F. (1998) Sequence specificity of the hammerhead ribozyme revisited; the NHH rule. *Nucleic Acids Res*, **26**, 4116-4120.
123. Blount, K.F. and Uhlenbeck, O.C. (2005) The structure-function dilemma of the hammerhead ribozyme. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **34**, 415-440.
124. Suzumura, K., Warashina, M., Yoshinari, K., Tanaka, Y., Kuwabara, T., Orita, M. and Taira, K. (2000) Significant change in the structure of a ribozyme upon introduction of a phosphorothioate linkage at P9: NMR reveals a conformational fluctuation in the core region of a hammerhead ribozyme. *FEBS Lett*, **473**, 106-112.
125. Martick, M. and Scott, W.G. (2006) Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell*, **126**, 309-320.
126. Perreault, J., Weinberg, Z., Roth, A., Popescu, O., Chartrand, P., Ferbeyre, G. and Breaker, R.R. (2011) Identification of hammerhead ribozymes in all domains of life reveals novel structural variations. *PLoS computational biology*, **7**, e1002031.
127. Carbonell, A., Flores, R. and Gago, S. (2011) Trans-cleaving hammerhead ribozymes with tertiary stabilizing motifs: in vitro and in vivo activity against a structured viroid RNA. *Nucleic Acids Res*, **39**, 2432-2444.

128. McKay, D.B. (1996) Structure and function of the hammerhead ribozyme: an unfinished story. *RNA*, **2**, 395-403.
129. Han, J. and 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.
130. Wong, K.Y., Lee, T.S. and York, D.M. (2011) Active participation of Mg ion in the reaction coordinate of RNA self-cleavage catalyzed by the hammerhead ribozyme. *Journal of chemical theory and computation*, **7**, 1-3.
131. Gerlach, W.L., Buzayan, J.M., Schneider, I.R. and Bruening, G. (1986) Satellite tobacco ringspot virus RNA: biological activity of DNA clones and their in vitro transcripts. *Virology*, **151**, 172-185.
132. Feldstein, P.A., Buzayan, J.M. and Bruening, G. (1989) Two sequences participating in the autolytic processing of satellite tobacco ringspot virus complementary RNA. *Gene*, **82**, 53-61.
133. Hampel, A. and Tritz, R. (1989) RNA catalytic properties of the minimum (-)sTRSV sequence. *Biochemistry*, **28**, 4929-4933.
134. Rubino, L., Tousignant, M.E., Steger, G. and Kaper, J.M. (1990) Nucleotide sequence and structural analysis of two satellite RNAs associated with chicory yellow mottle virus. *J Gen Virol*, **71 (Pt 9)**, 1897-1903.
135. Buzayan, J.M., Hampel, A. and Bruening, G. (1986) Nucleotide sequence and newly formed phosphodiester bond of spontaneously ligated satellite tobacco ringspot virus RNA. *Nucleic Acids Res*, **14**, 9729-9743.
136. Berzal-Herranz, A., Joseph, S., Chowrira, B.M., Butcher, S.E. and Burke, J.M. (1993) Essential nucleotide sequences and secondary structure elements of the hairpin ribozyme. *EMBO J*, **12**, 2567-2573.
137. Joseph, S., Berzal-Herranz, A., Chowrira, B.M., Butcher, S.E. and 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.
138. Hampel, A. and Cowan, J.A. (1997) A unique mechanism for RNA catalysis: the role of metal cofactors in hairpin ribozyme cleavage. *Chem Biol*, **4**, 513-517.
139. Nesbitt, S., Hegg, L.A. and Fedor, M.J. (1997) An unusual pH-independent and metal-ion-independent mechanism for hairpin ribozyme catalysis. *Chem Biol*, **4**, 619-630.
140. Young, K.J., Gill, F. and Grasby, J.A. (1997) Metal ions play a passive role in the hairpin ribozyme catalysed reaction. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3760-3766.
141. Zhao, Z.Y., Wilson, T.J., Maxwell, K. and Lilley, D.M. (2000) The folding of the hairpin ribozyme: dependence on the loops and the junction. *RNA*, **6**, 1833-1846.
142. Wilson, T.J. and Lilley, D.M. (2002) Metal ion binding and the folding of the hairpin ribozyme. *RNA*, **8**, 587-600.
143. Hampel, A., Tritz, R., Hicks, M. and Cruz, P. (1990) 'Hairpin' catalytic RNA model: evidence for helices and sequence requirement for substrate RNA. *Nucleic Acids Res*, **18**, 299-304.
144. Anderson, P., Monforte, J., Tritz, R., Nesbitt, S., Hearst, J. and Hampel, A. (1994) Mutagenesis of the hairpin ribozyme. *Nucleic Acids Res*, **22**, 1096-1100.
145. Berzal-Herranz, A., Joseph, S. and Burke, J.M. (1992) In vitro selection of active hairpin ribozymes by sequential RNA-catalyzed cleavage and ligation reactions. *Genes Dev*, **6**, 129-134.
146. Chowrira, B.M., Berzal-Herranz, A. and Burke, J.M. (1991) Novel guanosine requirement for catalysis by the hairpin ribozyme. *Nature*, **354**, 320-322.
147. Perez-Ruiz, M., Barroso-DelJesus, A. and Berzal-Herranz, A. (1999) Specificity of the hairpin ribozyme. Sequence requirements surrounding the cleavage site. *J Biol Chem*, **274**, 29376-29380.
148. Pinard, R., Lambert, D., Walter, N.G., Heckman, J.E., Major, F. and Burke, J.M. (1999) Structural basis for the guanosine requirement of the hairpin ribozyme. *Biochemistry*, **38**, 16035-16039.
149. Joseph, S. and Burke, J.M. (1993) Optimization of an anti-HIV hairpin ribozyme by in vitro selection. *J Biol Chem*, **268**, 24515-24518.
150. Sargueil, B., Pecchia, D.B. and Burke, J.M. (1995) An improved version of the hairpin ribozyme functions as a ribonucleoprotein complex. *Biochemistry*, **34**, 7739-7748.

151. Barroso-delJesus, A., Tabler, M. and 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.
152. Rupert, P.B. and Ferre-D'Amare, A.R. (2001) Crystal structure of a hairpin ribozyme-inhibitor complex with implications for catalysis. *Nature*, **410**, 780-786.
153. Walter, F., Murchie, A.I. and Lilley, D.M. (1998) Folding of the four-way RNA junction of the hairpin ribozyme. *Biochemistry*, **37**, 17629-17636.
154. Chowrira, B.M., Berzal-Herranz, A., Keller, C.F. and Burke, J.M. (1993) Four ribose 2'-hydroxyl groups essential for catalytic function of the hairpin ribozyme. *J Biol Chem*, **268**, 19458-19462.
155. Ryder, S.P. and Strobel, S.A. (1999) Nucleotide analog interference mapping of the hairpin ribozyme: implications for secondary and tertiary structure formation. *J Mol Biol*, **291**, 295-311.
156. Young, K.J., Vyle, J.S., Pickering, T.J., Cohen, M.A., Holmes, S.C., Merkel, O. and Grasby, J.A. (1999) The role of essential pyrimidines in the hairpin ribozyme-catalysed reaction. *J Mol Biol*, **288**, 853-866.
157. Pinard, R., Hampel, K.J., Heckman, J.E., Lambert, D., Chan, P.A., Major, F. and Burke, J.M. (2001) Functional involvement of G8 in the hairpin ribozyme cleavage mechanism. *EMBO J*, **20**, 6434-6442.
158. Kuzmin, Y.I., Da Costa, C.P., Cottrell, J.W. and Fedor, M.J. (2005) Role of an active site adenine in hairpin ribozyme catalysis. *J Mol Biol*, **349**, 989-1010.
159. Cottrell, J.W., Scott, L.G. and Fedor, M.J. (2011) The pH dependence of hairpin ribozyme catalysis reflects ionization of an active site adenine. *J Biol Chem*, **286**, 17658-17664.
160. Rupert, P.B., Massey, A.P., Sigurdsson, S.T. and Ferre-D'Amare, A.R. (2002) Transition state stabilization by a catalytic RNA. *Science*, **298**, 1421-1424.
161. Winkler, W.C. and Breaker, R.R. (2005) Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu Rev Microbiol*, **59**, 487-517.
162. Tucker, B.J. and Breaker, R.R. (2005) Riboswitches as versatile gene control elements. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 342-348.
163. Coppins, R.L., Hall, K.B. and Groisman, E.A. (2007) The intricate world of riboswitches. *Curr Opin Microbiol*, **10**, 176-181.
164. Fuchs, R.T., Grundy, F.J. and Henkin, T.M. (2006) The S(MK) box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 226-233.
165. Wickiser, J.K., Cheah, M.T., Breaker, R.R. and Crothers, D.M. (2005) The kinetics of ligand binding by an adenine-sensing riboswitch. *Biochemistry*, **44**, 13404-13414.
166. Lee, D.N., Phung, L., Stewart, J. and Landick, R. (1990) Transcription pausing by *Escherichia coli* RNA polymerase is modulated by downstream DNA sequences. *J Biol Chem*, **265**, 15145-15153.
167. Bastet, L., Dube, A., Masse, E. and Lafontaine, D.A. (2011) New insights into riboswitch regulation mechanisms. *Mol Microbiol*, **80**, 1148-1154.
168. Narberhaus, F., Waldminghaus, T. and Chowdhury, S. (2006) RNA thermometers. *FEMS Microbiol Rev*, **30**, 3-16.
169. Diaz-Toledano, R., Ariza-Mateos, A., Birk, A., Martinez-Garcia, B. and Gomez, J. (2009) In vitro characterization of a miR-122-sensitive double-helical switch element in the 5' region of hepatitis C virus RNA. *Nucleic Acids Res*, **37**, 5498-5510.
170. Fauzi, H., Agyeman, A. and Hines, J.V. (2009) T box transcription antitermination riboswitch: influence of nucleotide sequence and orientation on tRNA binding by the antiterminator element. *Biochim Biophys Acta*, **1789**, 185-191.
171. Vitreschak, A.G., Mironov, A.A., Lyubetsky, V.A. and Gelfand, M.S. (2008) Comparative genomic analysis of T-box regulatory systems in bacteria. *RNA*, **14**, 717-735.
172. Ooms, M., Huthoff, H., Russell, R., Liang, C. and Berkhout, B. (2004) A riboswitch regulates RNA dimerization and packaging in human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol*, **78**, 10814-10819.
173. Wagner, E.G., Altuvia, S. and Romby, P. (2002) Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv Genet*, **46**, 361-398.
174. Brantl, S. (2007) Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Curr Opin Microbiol*, **10**, 102-109.

175. Faghihi, M.A. and Wahlestedt, C. (2009) Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 637-643.
176. Werner, A. and Sayer, J.A. (2009) Naturally occurring antisense RNA: function and mechanisms of action. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **18**, 343-349.
177. Franch, T. and Gerdes, K. (2000) U-turns and regulatory RNAs. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 159-164.
178. Quigley, G.J. and Rich, A. (1976) Structural domains of transfer RNA molecules. *Science*, **194**, 796-806.
179. Puglisi, E.V. and Puglisi, J.D. (1998) HIV-1 A-rich RNA loop mimics the tRNA anticodon structure. *Nat Struct Biol*, **5**, 1033-1036.
180. Jucker, F.M. and Pardi, A. (1995) GNRA tetraloops make a U-turn. *RNA*, **1**, 219-222.
181. Tomizawa, J. (1984) Control of ColE1 plasmid replication: the process of binding of RNA I to the primer transcript. *Cell*, **38**, 861-870.
182. Persson, C., Wagner, E.G. and Nordstrom, K. (1988) Control of replication of plasmid R1: kinetics of in vitro interaction between the antisense RNA, CopA, and its target, CopT. *EMBO J*, **7**, 3279-3288.
183. Eguchi, Y. and Tomizawa, J. (1990) Complex formed by complementary RNA stem-loops and its stabilization by a protein: function of ColE1 Rom protein. *Cell*, **60**, 199-209.
184. Eguchi, Y. and 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.
185. Tomizawa, J. (1990) Control of ColE1 plasmid replication. Interaction of Rom protein with an unstable complex formed by RNA I and RNA II. *J Mol Biol*, **212**, 695-708.
186. Tomizawa, J. (1990) Control of ColE1 plasmid replication. Intermediates in the binding of RNA I and RNA II. *J Mol Biol*, **212**, 683-694.
187. Gerdes, K., Gultyaev, A.P., Franch, T., Pedersen, K. and Mikkelsen, N.D. (1997) Antisense RNA-regulated programmed cell death. *Annu Rev Genet*, **31**, 1-31.
188. Thisted, T., Sorensen, N.S., Wagner, E.G. and Gerdes, K. (1994) Mechanism of post-segregational killing: Sok antisense RNA interacts with Hok mRNA via its 5'-end single-stranded leader and competes with the 3'-end of Hok mRNA for binding to the mok translational initiation region. *EMBO J*, **13**, 1960-1968.
189. Kittle, J.D., Simons, R.W., Lee, J. and Kleckner, N. (1989) Insertion sequence IS10 anti-sense pairing initiates by an interaction between the 5' end of the target RNA and a loop in the anti-sense RNA. *J Mol Biol*, **210**, 561-572.
190. Kolb, F.A., Engdahl, H.M., Slagter-Jager, J.G., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Westhof, E., Wagner, E.G. and 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.
191. Tuerk, C. and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **249**, 505-510.
192. Jarosch, F., Buchner, K. and Klussmann, S. (2006) In vitro selection using a dual RNA library that allows primerless selection. *Nucleic Acids Res*, **34**, e86.
193. Vater, A., Jarosch, F., Buchner, K. and Klussmann, S. (2003) Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: tailored-SELEX. *Nucleic Acids Res*, **31**, e130.
194. Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J.A., Vermaas, E.H. and Toole, J.J. (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, **355**, 564-566.
195. Landweber, L.F. and Pokrovskaya, I.D. (1999) Emergence of a dual-catalytic RNA with metal-specific cleavage and ligase activities: the spandrels of RNA evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 173-178.
196. Marshall, K.A. and Ellington, A.D. (2000) In vitro selection of RNA aptamers. *Methods Enzymol*, **318**, 193-214.
197. Bartel, D.P. and Szostak, J.W. (1993) Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences [see comment]. *Science*, **261**, 1411-1418.
198. Davis, J.H. and Szostak, J.W. (2002) Isolation of high-affinity GTP aptamers from partially structured RNA libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11616-11621.

199. Lorsch, J.R. and Szostak, J.W. (1994) In vitro evolution of new ribozymes with polynucleotide kinase activity. *Nature*, **371**, 31-36.
200. Been, M.D. and Cech, T.R. (1988) RNA as an RNA polymerase: net elongation of an RNA primer catalyzed by the Tetrahymena ribozyme. *Science*, **239**, 1412-1416.
201. Lawrence, M.S. and Bartel, D.P. (2005) New ligase-derived RNA polymerase ribozymes. *RNA*, **11**, 1173-1180.
202. Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. (1998) Selection in vitro of novel ribozymes from a partially randomized U2 and U6 snRNA library. *EMBO J*, **17**, 2637-2650.
203. Nutiu, R. and Li, Y. (2005) In vitro selection of structure-switching signaling aptamers. *Angew Chem Int Ed Engl*, **44**, 1061-1065.
204. Stoltenburg, R., Reinemann, C. and Strehlitz, B. (2005) FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal Bioanal Chem*, **383**, 83-91.
205. Bianchini, M., Radrizzani, M., Brocardo, M.G., Reyes, G.B., Gonzalez Solveyra, C. and Santa-Coloma, T.A. (2001) Specific oligobodies against ERK-2 that recognize both the native and the denatured state of the protein. *J Immunol Methods*, **252**, 191-197.
206. Theis, M.G., Knorre, A., Kellersch, B., Moelleken, J., Wieland, F., Kolanus, W. and Famulok, M. (2004) Discriminatory aptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11221-11226.
207. Weiss, S., Proske, D., Neumann, M., Groschup, M.H., Kretzschmar, H.A., Famulok, M. and Winnacker, E.L. (1997) RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *J Virol*, **71**, 8790-8797.
208. Geiger, A., Burgstaller, P., von der Eltz, H., Roeder, A. and Famulok, M. (1996) RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res*, **24**, 1029-1036.
209. Bridonneau, P., Chang, Y.F., Buvoli, A.V., O'Connell, D. and Parma, D. (1999) Site-directed selection of oligonucleotide antagonists by competitive elution. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **9**, 1-11.
210. Saito, H., Kourouklis, D. and Suga, H. (2001) An in vitro evolved precursor tRNA with aminoacylation activity. *EMBO J*, **20**, 1797-1806.
211. Romero-Lopez, C., Barroso-delJesus, A., Puerta-Fernandez, E. and Berzal-Herranz, A. (2005) Interfering with hepatitis C virus IRES activity using RNA molecules identified by a novel in vitro selection method. *Biol Chem*, **386**, 183-190.
212. Bruno, J.G. (1997) In vitro selection of DNA to chloroaromatics using magnetic microbead-based affinity separation and fluorescence detection. *Biochem Biophys Res Commun*, **234**, 117-120.
213. Missailidis, S., Thomaidou, D., Borbas, K.E. and Price, M.R. (2005) Selection of aptamers with high affinity and high specificity against C595, an anti-MUC1 IgG3 monoclonal antibody, for antibody targeting. *J Immunol Methods*, **296**, 45-62.
214. Stoltenburg, R., Reinemann, C. and Strehlitz, B. (2007) SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng*, **24**, 381-403.
215. Liu, J. and Stormo, G.D. (2005) Combining SELEX with quantitative assays to rapidly obtain accurate models of protein-DNA interactions. *Nucleic Acids Res*, **33**, e141.
216. Tombelli, S., Minunni, M. and Mascini, M. (2005) Analytical applications of aptamers. *Biosens Bioelectron*, **20**, 2424-2434.
217. Kikuchi, K., Umehara, T., Fukuda, K., Hwang, J., Kuno, A., Hasegawa, T. and Nishikawa, S. (2003) RNA aptamers targeted to domain II of hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region. *J Biochem*, **133**, 263-270.
218. Lupold, S.E., Hicke, B.J., Lin, Y. and Coffey, D.S. (2002) Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res*, **62**, 4029-4033.
219. Murphy, M.B., Fuller, S.T., Richardson, P.M. and Doyle, S.A. (2003) An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification. *Nucleic Acids Res*, **31**, e110.
220. Schneider, D., Gold, L. and Platt, T. (1993) Selective enrichment of RNA species for tight binding to Escherichia coli rho factor. *Faseb J*, **7**, 201-207.
221. Mendonsa, S.D. and Bowser, M.T. (2004) In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Anal Chem*, **76**, 5387-5392.
222. Mosing, R.K., Mendonsa, S.D. and Bowser, M.T. (2005) Capillary electrophoresis-SELEX selection of aptamers with affinity for HIV-1 reverse transcriptase. *Anal Chem*, **77**, 6107-6112.

223. Tang, J., Xie, J., Shao, N. and Yan, Y. (2006) The DNA aptamers that specifically recognize ricin toxin are selected by two in vitro selection methods. *Electrophoresis*, **27**, 1303-1311.
224. Davis, K.A., Lin, Y., Abrams, B. and Jayasena, S.D. (1998) Staining of cell surface human CD4 with 2'-F-pyrimidine-containing RNA aptamers for flow cytometry. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3915-3924.
225. Yang, X., Li, X., Prow, T.W., Reece, L.M., Bassett, S.E., Luxon, B.A., Herzog, N.K., Aronson, J., Shope, R.E., Leary, J.F. *et al.* (2003) Immunofluorescence assay and flow-cytometry selection of bead-bound aptamers. *Nucleic Acids Res*, **31**, e54.
226. Tsai, R.Y. and Reed, R.R. (1998) Identification of DNA recognition sequences and protein interaction domains of the multiple-Zn-finger protein Roaz. *Mol Cell Biol*, **18**, 6447-6456.
227. Misono, T.S. and Kumar, P.K. (2005) Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance. *Anal Biochem*, **342**, 312-317.
228. Rhie, A., Kirby, L., Sayer, N., Wellesley, R., Disterer, P., Sylvester, I., Gill, A., Hope, J., James, W. and 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.
229. Homann, M. and Goring, H.U. (1999) Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. *Nucleic Acids Res*, **27**, 2006-2014.
230. Kim, S.J., Kim, M.Y., Lee, J.H., You, J.C. and Jeong, S. (2002) Selection and stabilization of the RNA aptamers against the human immunodeficiency virus type-1 nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **291**, 925-931.
231. Kimoto, M., Shirouzu, M., Mizutani, S., Koide, H., Kaziro, Y., Hirao, I. and Yokoyama, S. (2002) Anti-(Raf-1) RNA aptamers that inhibit Ras-induced Raf-1 activation. *Eur J Biochem*, **269**, 697-704.
232. Sampson, T. (2003).
233. Gopinath, S.C. (2007) Methods developed for SELEX. *Anal Bioanal Chem*, **387**, 171-182.
234. Ellington, A.D. and Szostak, J.W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, **346**, 818-822.
235. Ellington, A.D. and Szostak, J.W. (1992) Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature*, **355**, 850-852.
236. Green, A.P., Burzynski, J., Helveston, N.M., Prior, G.M., Wunner, W.H. and Thompson, J.A. (1995) HPLC purification of synthetic oligodeoxyribonucleotides containing base- and backbone-modified sequences. *Biotechniques*, **19**, 836-841.
237. Ciesiolka, J., Gorski, J. and Yarus, M. (1995) Selection of an RNA domain that binds Zn²⁺. *RNA*, **1**, 538-550.
238. Mann, D., Reinemann, C., Stoltenburg, R. and Strehlitz, B. (2005) In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine. *Biochem Biophys Res Commun*, **338**, 1928-1934.
239. Duconge, F. and 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.
240. Tuerk, C., MacDougall, S. and Gold, L. (1992) RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6988-6992.
241. Pan, W., Craven, R.C., Qiu, Q., Wilson, C.B., Wills, J.W., Golovine, S. and 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.
242. Patel, D.J. (1997) Structural analysis of nucleic acid aptamers. *Curr Opin Chem Biol*, **1**, 32-46.
243. Patel, D.J., Suri, A.K., Jiang, F., Jiang, L., Fan, P., Kumar, R.A. and Nonin, S. (1997) Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes. *J Mol Biol*, **272**, 645-664.
244. Hermann, T. and Patel, D.J. (2000) Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science*, **287**, 820-825.
245. Scarabino, D., Crisari, A., Lorenzini, S., Williams, K. and Tocchini-Valentini, G.P. (1999) tRNA prefers to kiss. *EMBO J*, **18**, 4571-4578.

246. Aldaz-Carroll, L., Tallet, B., Dausse, E., Yurchenko, L. and 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.
247. Nissen, P., Ippolito, J.A., Ban, N., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2001) RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4899-4903.
248. Gagnon, M.G. and Steinberg, S.V. (2010) The adenosine wedge: a new structural motif in ribosomal RNA. *RNA*, **16**, 375-381.
249. Toulme, J.J., Darfeuille, F., Kolb, G., Chabas, S. and Staedel, C. (2003) Modulating viral gene expression by aptamers to RNA structures. *Biol Cell*, **95**, 229-238.
250. Jellinek, D., Green, L.S., Bell, C. and Janjic, N. (1994) Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor. *Biochemistry*, **33**, 10450-10456.
251. Ruckman, J., Green, L.S., Beeson, J., Waugh, S., Gillette, W.L., Henninger, D.D., Claesson-Welsh, L. and Janjic, N. (1998) 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J Biol Chem*, **273**, 20556-20567.
252. Proske, D., Gilch, S., Wopfner, F., Schatzl, H.M., Winnacker, E.L. and Famulok, M. (2002) Prion-protein-specific aptamer reduces PrPSc formation. *ChemBiochem*, **3**, 717-725.
253. Rhodes, A., Deakin, A., Spaul, J., Coomber, B., Aitken, A., Life, P. and Rees, S. (2000) The generation and characterization of antagonist RNA aptamers to human oncostatin M. *J Biol Chem*, **275**, 28555-28561.
254. Allen, P., Worland, S. and Gold, L. (1995) Isolation of high-affinity RNA ligands to HIV-1 integrase from a random pool. *Virology*, **209**, 327-336.
255. Kumar, P.K., Machida, K., Urvil, P.T., Kakiuchi, N., Vishnuvardhan, D., Shimotohno, K., Taira, K. and 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.
256. Cheng, C., Dong, J., Yao, L., Chen, A., Jia, R., Huan, L., Guo, J., Shu, Y. and Zhang, Z. (2008) Potent inhibition of human influenza H5N1 virus by oligonucleotides derived by SELEX. *Biochem Biophys Res Commun*, **366**, 670-674.
257. Chu, T.C., Twu, K.Y., Ellington, A.D. and Levy, M. (2006) Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic Acids Res*, **34**, e73.
258. Farokhzad, O.C., Jon, S., Khademhosseini, A., Tran, T.N., Lavan, D.A. and Langer, R. (2004) Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer Res*, **64**, 7668-7672.
259. Michaud, M., Jourdan, E., Villet, A., Ravel, A., Grosset, C. and Peyrin, E. (2003) A DNA aptamer as a new target-specific chiral selector for HPLC. *J Am Chem Soc*, **125**, 8672-8679.
260. Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A. and Polisky, B. (1994) High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*, **263**, 1425-1429.
261. Stojanovic, M.N. and Landry, D.W. (2002) Aptamer-based colorimetric probe for cocaine. *J Am Chem Soc*, **124**, 9678-9679.
262. Paige, J.S., Wu, K.Y. and Jaffrey, S.R. (2011) RNA mimics of green fluorescent protein. *Science*, **333**, 642-646.
263. Cunningham, E.T., Jr., Adamis, A.P., Altaweel, M., Aiello, L.P., Bressler, N.M., D'Amico, D.J., Goldbaum, M., Guyer, D.R., Katz, B., Patel, M. *et al.* (2005) A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema. *Ophthalmology*, **112**, 1747-1757.
264. Adamis, A.P., Altaweel, M., Bressler, N.M., Cunningham, E.T., Jr., Davis, M.D., Goldbaum, M., Gonzales, C., Guyer, D.R., Barrett, K. and Patel, M. (2006) Changes in retinal neovascularization after pegaptanib (Macugen) therapy in diabetic individuals. *Ophthalmology*, **113**, 23-28.
265. Rusconi, C.P., Scardino, E., Layzer, J., Pitoc, G.A., Ortel, T.L., Monroe, D. and Sullenger, B.A. (2002) RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. *Nature*, **419**, 90-94.

266. Rusconi, C.P., Roberts, J.D., Pitoc, G.A., Nimjee, S.M., White, R.R., Quick, G., Jr., Scardino, E., Fay, W.P. and Sullenger, B.A. (2004) Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo. *Nat Biotechnol*, **22**, 1423-1428.
267. Kang, K.N. and Lee, Y.S. (2012) RNA Aptamers: A Review of Recent Trends and Applications. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*.
268. Green, L.S., Jellinek, D., Bell, C., Beebe, L.A., Feistner, B.D., Gill, S.C., Jucker, F.M. and Janjic, N. (1995) Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Chem Biol*, **2**, 683-695.
269. Mayer, G. (2009) The chemical biology of aptamers. *Angew Chem Int Ed Engl*, **48**, 2672-2689.
270. Aurup, H., Williams, D.M. and Eckstein, F. (1992) 2'-Fluoro- and 2'-amino-2'-deoxynucleoside 5'-triphosphates as substrates for T7 RNA polymerase. *Biochemistry*, **31**, 9636-9641.
271. Puerta-Fernandez, E., Barroso-del Jesus, A., Romero-Lopez, C., Tapia, N., Martinez, M.A. and Berzal-Herranz, A. (2005) Inhibition of HIV-1 replication by RNA targeted against the LTR region. *Aids*, **19**, 863-870.
272. Taylor, N.R. and Rossi, J.J. (1991) Ribozyme-mediated cleavage of an HIV-1 gag RNA: the effects of nontargeted sequences and secondary structure on ribozyme cleavage activity. *Antisense Res Dev*, **1**, 173-186.
273. Reyes-Darias, J.A., Sanchez-Luque, F.J. and Berzal-Herranz, A. (2008) Inhibition of HIV-1 replication by RNA-based strategies. *Curr HIV Res*, **6**, 500-514.
274. Ellington, A.D., Chen, X., Robertson, M. and Syrett, A. (2009) Evolutionary origins and directed evolution of RNA. *Int J Biochem Cell Biol*, **41**, 254-265.
275. Breaker, R.R. (2001) Selection for catalytic function with nucleic acids. *Current protocols in nucleic acid chemistry / edited by Serge L. Beaucage ... [et al]*, **Chapter 9**, Unit 9 4.
276. Chen, X., Li, N. and Ellington, A.D. (2007) Ribozyme catalysis of metabolism in the RNA world. *Chem Biodivers*, **4**, 633-655.
277. Wochner, A., Attwater, J., Coulson, A. and Holliger, P. (2011) Ribozyme-catalyzed transcription of an active ribozyme. *Science*, **332**, 209-212.
278. Meli, M., Vergne, J. and Maurel, M.C. (2003) In vitro selection of adenine-dependent hairpin ribozymes. *J Biol Chem*, **278**, 9835-9842.
279. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
280. Forster, A.C. and Altman, S. (1990) External guide sequences for an RNA enzyme. *Science*, **249**, 783-786.
281. Yuan, Y., Hwang, E.S. and Altman, S. (1992) Targeted cleavage of mRNA by human RNase P. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8006-8010.
282. McClain, W.H., Guerrier-Takada, C. and Altman, S. (1987) Model substrates for an RNA enzyme. *Science*, **238**, 527-530.
283. Kawa, D., Wang, J., Yuan, Y. and Liu, F. (1998) Inhibition of viral gene expression by human ribonuclease P. *RNA*, **4**, 1397-1406.
284. Hnatyszyn, H., Spruill, G., Young, A., Seivright, R. and Kraus, G. (2001) Long-term RNase P-mediated inhibition of HIV-1 replication and pathogenesis. *Gene Ther*, **8**, 1863-1871.
285. Plehn-Dujowich, D. and Altman, S. (1998) Effective inhibition of influenza virus production in cultured cells by external guide sequences and ribonuclease P. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7327-7332.
286. Li, H., Trang, P., Kim, K., Zhou, T., Umamoto, S. and Liu, F. (2006) Effective inhibition of human cytomegalovirus gene expression and growth by intracellular expression of external guide sequence RNA. *RNA*, **12**, 63-72.
287. Jiang, X., Gong, H., Chen, Y.C., Vu, G.P., Trang, P., Zhang, C.Y., Lu, S. and Liu, F. (2012) Effective inhibition of cytomegalovirus infection by external guide sequences in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 13070-13075.
288. Bauman, J., Jearawiriyapaisarn, N. and Kole, R. (2009) Therapeutic potential of splice-switching oligonucleotides. *Oligonucleotides*, **19**, 1-14.
289. Aartsma-Rus, A. and van Ommen, G.J. (2007) Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA*, **13**, 1609-1624.

290. Liu, F. and Altman, S. (1995) Inhibition of viral gene expression by the catalytic RNA subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *Genes Dev*, **9**, 471-480.
291. Cobaleda, C. and Sanchez-Garcia, I. (2000) In vivo inhibition by a site-specific catalytic RNA subunit of RNase P designed against the BCR-ABL oncogenic products: a novel approach for cancer treatment. *Blood*, **95**, 731-737.
292. Trang, P., Kilani, A., Kim, J. and Liu, F. (2000) A ribozyme derived from the catalytic subunit of RNase P from *Escherichia coli* is highly effective in inhibiting replication of herpes simplex virus 1. *J Mol Biol*, **301**, 817-826.
293. Asparuhova, M.B., Marti, G., Liu, S., Serhan, F., Trono, D. and Schumperli, D. (2007) Inhibition of HIV-1 multiplication by a modified U7 snRNA inducing Tat and Rev exon skipping. *J Gene Med*, **9**, 323-334.
294. Vagner, S., Ruegsegger, U., Gunderson, S.I., Keller, W. and Mattaj, I.W. (2000) Position-dependent inhibition of the cleavage step of pre-mRNA 3'-end processing by U1 snRNP. *RNA*, **6**, 178-188.
295. Sajic, R., Lee, K., Asai, K., Sakac, D., Branch, D.R., Upton, C. and Cochrane, A. (2007) Use of modified U1 snRNAs to inhibit HIV-1 replication. *Nucleic Acids Res*, **35**, 247-255.
296. Kim, K. and Liu, F. (2007) Inhibition of gene expression in human cells using RNase P-derived ribozymes and external guide sequences. *Biochim Biophys Acta*, **1769**, 603-612.
297. Watanabe, T. and Sullenger, B.A. (2000) RNA repair: a novel approach to gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, **44**, 109-118.
298. Yang, Y. and Walsh, C.E. (2005) Spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Mol Ther*, **12**, 1006-1012.
299. Phylactou, L.A., Darrah, C. and Wood, M.J. (1998) Ribozyme-mediated trans-splicing of a trinucleotide repeat. *Nat Genet*, **18**, 378-381.
300. Rogers, C.S., Vanoye, C.G., Sullenger, B.A. and George, A.L., Jr. (2002) Functional repair of a mutant chloride channel using a trans-splicing ribozyme. *J Clin Invest*, **110**, 1783-1789.
301. Lan, N., Howrey, R.P., Lee, S.W., Smith, C.A. and Sullenger, B.A. (1998) Ribozyme-mediated repair of sickle beta-globin mRNAs in erythrocyte precursors. *Science*, **280**, 1593-1596.
302. Ayre, B.G., Kohler, U., Goodman, H.M. and Haseloff, J. (1999) Design of highly specific cytotoxins by using trans-splicing ribozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3507-3512.
303. Ryu, K.J., Kim, J.H. and Lee, S.W. (2003) Ribozyme-mediated selective induction of new gene activity in hepatitis C virus internal ribosome entry site-expressing cells by targeted trans-splicing. *Mol Ther*, **7**, 386-395.
304. Guo, H., Karberg, M., Long, M., Jones, J.P., 3rd, Sullenger, B. and Lambowitz, A.M. (2000) Group II introns designed to insert into therapeutically relevant DNA target sites in human cells. *Science*, **289**, 452-457.
305. Cousineau, B., Smith, D., Lawrence-Cavanagh, S., Mueller, J.E., Yang, J., Mills, D., Manias, D., Dunny, G., Lambowitz, A.M. and Belfort, M. (1998) Retrohoming of a bacterial group II intron: mobility via complete reverse splicing, independent of homologous DNA recombination. *Cell*, **94**, 451-462.
306. Glaus, E., Schmid, F., Da Costa, R., Berger, W. and Neidhardt, J. (2011) Gene therapeutic approach using mutation-adapted U1 snRNA to correct a RPGR splice defect in patient-derived cells. *Mol Ther*, **19**, 936-941.
307. Fernandez Alanis, E., Pinotti, M., Dal Mas, A., Balestra, D., Cavallari, N., Rogalska, M.E., Bernardi, F. and Pagani, F. (2012) An exon-specific U1 small nuclear RNA (snRNA) strategy to correct splicing defects. *Human molecular genetics*, **21**, 2389-2398.
308. Goyenvalle, A., Babbs, A., van Ommen, G.J., Garcia, L. and Davies, K.E. (2009) Enhanced exon-skipping induced by U7 snRNA carrying a splicing silencer sequence: Promising tool for DMD therapy. *Mol Ther*, **17**, 1234-1240.
309. Haseloff, J. and Gerlach, W.L. (1988) Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature*, **334**, 585-591.
310. Tafach, A., Bassett, T., Sparanese, D. and Lee, C.H. (2006) Destroying RNA as a therapeutic approach. *Curr Med Chem*, **13**, 863-881.
311. Weng, D.E. and Usman, N. (2001) Angiozyme: a novel angiogenesis inhibitor. *Curr Oncol Rep*, **3**, 141-146.

312. Kurreck, J. (2003) Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem*, **270**, 1628-1644.
313. Juhl, H., Downing, S.G., Wellstein, A. and Czubayko, F. (1997) HER-2/neu is rate-limiting for ovarian cancer growth. Conditional depletion of HER-2/neu by ribozyme targeting. *J Biol Chem*, **272**, 29482-29486.
314. Puerta-Fernandez, E., Barroso-del Jesus, A., Romero-Lopez, C. and Berzal-Herranz, A. (2003) HIV-1 TAR as anchoring site for optimized catalytic RNAs. *Biol Chem*, **384**, 343-350.
315. Barroso-DelJesus, A., Puerta-Fernandez, E., Tapia, N., Romero-Lopez, C., Sanchez-Luque, F.J., Martinez, M.A. and Berzal-Herranz, A. (2005) Inhibition of HIV-1 replication by an improved hairpin ribozyme that includes an RNA decoy. *RNA Biol*, **2**, 75-79.
316. Muller-Kuller, T., Capalbo, G., Klebba, C., Engels, J.W. and Klein, S.A. (2009) Identification and characterization of a highly efficient anti-HIV pol hammerhead ribozyme. *Oligonucleotides*, **19**, 265-272.
317. Sanchez-Luque, F.J., Reyes-Darias, J.A., Puerta-Fernandez, E. and Berzal-Herranz, A. (2010) Inhibition of HIV-1 replication and dimerization interference by dual inhibitory RNAs. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **15**, 4757-4772.
318. Perez-Ruiz, M., Sievers, D., Garcia-Lopez, P.A. and Berzal-Herranz, A. (1999) The antisense sequence of the HIV-1 TAR stem-loop structure covalently linked to the hairpin ribozyme enhances its catalytic activity against two artificial substrates. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **9**, 33-42.
319. Robertson, M.P. and Ellington, A.D. (1999) In vitro selection of an allosteric ribozyme that transduces analytes to amplicons. *Nat Biotechnol*, **17**, 62-66.
320. Soukup, G.A. and Breaker, R.R. (1999) Design of allosteric hammerhead ribozymes activated by ligand-induced structure stabilization. *Structure*, **7**, 783-791.
321. Piganeau, N., Jenne, A., Thuillier, V. and Famulok, M. (2001) An Allosteric Ribozyme Regulated by Doxycycline This work was supported by Aventis Gencell and by a grant from the Volkswagen Foundation (Priority program "conformational control") to M.F. We thank M. Blind, G. Mayer, D. Proske, and G. Sengle (Universitat Bonn) for helpful discussions as well as J. Crouzet, J. F. Mayaux, and M. Finer (Aventis Gencell) for support. *Angew Chem Int Ed Engl*, **40**, 3503.
322. Piganeau, N., Thuillier, V. and Famulok, M. (2001) In vitro selection of allosteric ribozymes: theory and experimental validation. *J Mol Biol*, **312**, 1177-1190.
323. Famulok, M. and Mayer, G. (1999) Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Curr Top Microbiol Immunol*, **243**, 123-136.
324. Famulok, M., Mayer, G. and Blind, M. (2000) Nucleic acid aptamers-from selection in vitro to applications in vivo. *Acc Chem Res*, **33**, 591-599.
325. Kurz, M. and Breaker, R.R. (1999) In vitro selection of nucleic acid enzymes. *Curr Top Microbiol Immunol*, **243**, 137-158.
326. Gu, H., Furukawa, K. and Breaker, R.R. (2012) Engineered allosteric ribozymes that sense the bacterial second messenger cyclic diguanosyl 5'-monophosphate. *Anal Chem*, **84**, 4935-4941.
327. Auslander, S., Ketzer, P. and Hartig, J.S. (2010) A ligand-dependent hammerhead ribozyme switch for controlling mammalian gene expression. *Molecular bioSystems*, **6**, 807-814.
328. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C. et al. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 868-871.
329. Chermann, J.C., Barre-Sinoussi, F., Dauguet, C., Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L. (1983) Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiot Chemother*, **32**, 48-53.
330. Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., Mann, D., Sidhu, G.D., Stahl, R.E., Zolla-Pazner, S. et al. (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 865-867.
331. Schupbach, J., Popovic, M., Gilden, R.V., Gonda, M.A., Sarngadharan, M.G. and Gallo, R.C. (1984) Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science*, **224**, 503-505.

332. Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuro, J.M. and Oshiro, L.S. (1984) Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*, **225**, 840-842.
333. Coffin, J.M. (1986) Genetic variation in AIDS viruses. *Cell*, **46**, 1-4.
334. Reeves, J.D. and Doms, R.W. (2002) Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol*, **83**, 1253-1265.
335. Kallings, L.O. (2008) The first postmodern pandemic: 25 years of HIV/ AIDS. *J Intern Med*, **263**, 218-243.
336. Kuiken, C., Thakallapalli, R., Esklid, A. and de Ronde, A. (2000) Genetic analysis reveals epidemiologic patterns in the spread of human immunodeficiency virus. *Am J Epidemiol*, **152**, 814-822.
337. Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M. *et al.* (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, **397**, 436-441.
338. Miller, S.K. (2000) Managing HIV. Understanding the pharmacodynamics. *Adv Nurse Pract*, **8**, 58-60, 65-56.
339. Levy, J.A. (2006) HIV pathogenesis: knowledge gained after two decades of research. *Adv Dent Res*, **19**, 10-16.
340. Rabson, A.B. and Martin, M.A. (1985) Molecular organization of the AIDS retrovirus. *Cell*, **40**, 477-480.
341. Lewinski, M.K., Bisgrove, D., Shinn, P., Chen, H., Hoffmann, C., Hannehalli, S., Verdin, E., Berry, C.C., Ecker, J.R. and Bushman, F.D. (2005) Genome-wide analysis of chromosomal features repressing human immunodeficiency virus transcription. *J Virol*, **79**, 6610-6619.
342. Basu, V.P., Song, M., Gao, L., Rigby, S.T., Hanson, M.N. and Bambara, R.A. (2008) Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. *Virus research*, **134**, 19-38.
343. Huthoff, H. and Berkhout, B. (2001) Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *RNA*, **7**, 143-157.
344. Ippolito, J.A. and Steitz, T.A. (1998) A 1.3-Å resolution crystal structure of the HIV-1 trans-activation response region RNA stem reveals a metal ion-dependent bulge conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9819-9824.
345. Puglisi, J.D., Tan, R., Calnan, B.J., Frankel, A.D. and Williamson, J.R. (1992) Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy. *Science*, **257**, 76-80.
346. Jaeger, J.A. and Tinoco, I., Jr. (1993) An NMR study of the HIV-1 TAR element hairpin. *Biochemistry*, **32**, 12522-12530.
347. Kulinski, T., Olejniczak, M., Huthoff, H., Bielecki, L., Pachulska-Wieczorek, K., Das, A.T., Berkhout, B. and Adamiak, R.W. (2003) The apical loop of the HIV-1 TAR RNA hairpin is stabilized by a cross-loop base pair. *J Biol Chem*, **278**, 38892-38901.
348. Roy, S., Delling, U., Chen, C.H., Rosen, C.A. and Sonenberg, N. (1990) A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation. *Genes Dev*, **4**, 1365-1373.
349. Weeks, K.M., Ampe, C., Schultz, S.C., Steitz, T.A. and Crothers, D.M. (1990) Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind TAR RNA. *Science*, **249**, 1281-1285.
350. Parada, C.A. and Roeder, R.G. (1996) Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. *Nature*, **384**, 375-378.
351. Herrmann, C.H. and Rice, A.P. (1995) Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor. *J Virol*, **69**, 1612-1620.
352. Charnay, N., Ivanyi-Nagy, R., Soto-Rifo, R., Ohlmann, T., Lopez-Lastra, M. and Darlix, J.L. (2009) Mechanism of HIV-1 Tat RNA translation and its activation by the Tat protein. *Retrovirology*, **6**, 74.
353. Bennasser, Y., Yeung, M.L. and Jeang, K.T. (2006) HIV-1 TAR RNA subverts RNA interference in transfected cells through sequestration of TAR RNA-binding protein, TRBP. *J Biol Chem*, **281**, 27674-27678.

354. Sanghvi, V.R. and Steel, L.F. (2011) The cellular TAR RNA binding protein, TRBP, promotes HIV-1 replication primarily by inhibiting the activation of double-stranded RNA-dependent kinase PKR. *J Virol*, **85**, 12614-12621.
355. Klase, Z., Kale, P., Winograd, R., Gupta, M.V., Heydarian, M., Berro, R., McCaffrey, T. and Kashanchi, F. (2007) HIV-1 TAR element is processed by Dicer to yield a viral micro-RNA involved in chromatin remodeling of the viral LTR. *BMC molecular biology*, **8**, 63.
356. Klase, Z., Winograd, R., Davis, J., Carpio, L., Hildreth, R., Heydarian, M., Fu, S., McCaffrey, T., Meiri, E., Ayash-Rashkovsky, M. *et al.* (2009) HIV-1 TAR miRNA protects against apoptosis by altering cellular gene expression. *Retrovirology*, **6**, 18.
357. Chang, K.Y. and 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.
358. Zargarian, L., Kanevsky, I., Bazzi, A., Boynard, J., Chaminade, F., Fosse, P. and Mauffret, O. (2009) Structural and dynamic characterization of the upper part of the HIV-1 cTAR DNA hairpin. *Nucleic Acids Res*, **37**, 4043-4054.
359. Berkhout, B., Vastenhouw, N.L., Klasens, B.I. and Huthoff, H. (2001) Structural features in the HIV-1 repeat region facilitate strand transfer during reverse transcription. *RNA*, **7**, 1097-1114.
360. Kanevsky, I., Chaminade, F., Chen, Y., Godet, J., Rene, B., Darlix, J.L., Mely, Y., Mauffret, O. and Fosse, P. (2011) Structural determinants of TAR RNA-DNA annealing in the absence and presence of HIV-1 nucleocapsid protein. *Nucleic Acids Res*, **39**, 8148-8162.
361. Andersen, E.S., Contera, S.A., Knudsen, B., Damgaard, C.K., Besenbacher, F. and Kjems, J. (2004) Role of the trans-activation response element in dimerization of HIV-1 RNA. *J Biol Chem*, **279**, 22243-22249.
362. Jalalirad, M., Saadatmand, J. and Laughrea, M. (2012) Dominant role of the 5' TAR bulge in dimerization of HIV-1 genomic RNA, but no evidence of TAR-TAR kissing during in vivo virus assembly. *Biochemistry*, **51**, 3744-3758.
363. Bohnlein, S., Hauber, J. and Cullen, B.R. (1989) Identification of a U5-specific sequence required for efficient polyadenylation within the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *J Virol*, **63**, 421-424.
364. Berkhout, B. (1996) Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **54**, 1-34.
365. Liang, C., Li, X., Rong, L., Inouye, P., Quan, Y., Kleiman, L. and Wainberg, M.A. (1997) The importance of the A-rich loop in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription and infectivity. *J Virol*, **71**, 5750-5757.
366. Isel, C., Ehresmann, C., Keith, G., Ehresmann, B. and Marquet, R. (1995) Initiation of reverse transcription of HIV-1: secondary structure of the HIV-1 RNA/tRNA(3Lys) (template/primer). *J Mol Biol*, **247**, 236-250.
367. Isel, C., Keith, G., Ehresmann, B., Ehresmann, C. and Marquet, R. (1998) Mutational analysis of the tRNA^{3Lys}/HIV-1 RNA (primer/template) complex. *Nucleic Acids Res*, **26**, 1198-1204.
368. Beerens, N. and Berkhout, B. (2002) Switching the in vitro tRNA usage of HIV-1 by simultaneous adaptation of the PBS and PAS. *RNA*, **8**, 357-369.
369. Ni, N., Xu, W. and Morrow, C.D. (2007) Importance of A-loop complementarity with tRNA^{His} anticodon for continued selection of tRNA^{His} as the HIV reverse transcription primer. *Virology*, **4**, 4.
370. Herschlag, D. (1995) RNA chaperones and the RNA folding problem. *J Biol Chem*, **270**, 20871-20874.
371. Rein, A., Henderson, L.E. and Levin, J.G. (1998) Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication. *Trends Biochem Sci*, **23**, 297-301.
372. Goldschmidt, V., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Marquet, R. (2003) Does the HIV-1 primer activation signal interact with tRNA^{3Lys} during the initiation of reverse transcription? *Nucleic Acids Res*, **31**, 850-859.
373. Sprinzl, M., Hartmann, T., Weber, J., Blank, J. and Zeidler, R. (1989) Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res*, **17 Suppl**, r1-172.
374. Høglund, S., Ohagen, A., Goncalves, J., Panganiban, A.T. and Gabuzda, D. (1997) Ultrastructure of HIV-1 genomic RNA. *Virology*, **233**, 271-279.

375. Clever, J.L. and Parslow, T.G. (1997) Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. *J Virol*, **71**, 3407-3414.
376. Muriaux, D., De Rocquigny, H., Roques, B.P. and Paoletti, J. (1996) NCp7 activates HIV-1 RNA dimerization by converting a transient loop-loop complex into a stable dimer. *J Biol Chem*, **271**, 33686-33692.
377. Takahashi, K., Baba, S., Hayashi, Y., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Takaku, H. and Kawai, G. (2000) NMR analysis of intra- and inter-molecular stems in the dimerization initiation site of the HIV-1 genome. *J Biochem*, **127**, 681-686.
378. Takahashi, K.I., Baba, S., Chattopadhyay, P., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Takaku, H. and Kawai, G. (2000) Structural requirement for the two-step dimerization of human immunodeficiency virus type 1 genome. *RNA*, **6**, 96-102.
379. Greatorex, J. (2004) The retroviral RNA dimer linkage: different structures may reflect different roles. *Retrovirology*, **1**, 22.
380. Lodmell, J.S., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Marquet, R. (2000) Convergence of natural and artificial evolution on an RNA loop-loop interaction: the HIV-1 dimerization initiation site. *RNA*, **6**, 1267-1276.
381. Lawrence, D.C., Stover, C.C., Noznitsky, J., Wu, Z. and Summers, M.F. (2003) Structure of the intact stem and bulge of HIV-1 Psi-RNA stem-loop SL1. *J Mol Biol*, **326**, 529-542.
382. Ennifar, E., Paillart, J.C., Bernacchi, S., Walter, P., Pale, P., Decout, J.L., Marquet, R. and Dumas, P. (2007) A structure-based approach for targeting the HIV-1 genomic RNA dimerization initiation site. *Biochimie*, **89**, 1195-1203.
383. Pallesen, J. (2011) Structure of the HIV-1 5' untranslated region dimer alone and in complex with gold nanocolloids: support of a TAR-TAR-containing 5' dimer linkage site (DLS) and a 3' DIS-DIS-containing DLS. *Biochemistry*, **50**, 6170-6177.
384. Song, R., Kafaie, J. and Laughrea, M. (2008) Role of the 5' TAR stem-loop and the U5-AUG duplex in dimerization of HIV-1 genomic RNA. *Biochemistry*, **47**, 3283-3293.
385. Reyes-Darias, J.A., Sanchez-Luque, F.J. and Berzal-Herranz, A. (2012) HIV RNA dimerisation interference by antisense oligonucleotides targeted to the 5' UTR structural elements. *Virus research*.
386. Heng, X., Kharytonchuk, S., Garcia, E.L., Lu, K., Divakaruni, S.S., LaCotti, C., Edme, K., Telesnitsky, A. and Summers, M.F. (2012) Identification of a minimal region of the HIV-1 5'-leader required for RNA dimerization, NC binding, and packaging. *J Mol Biol*, **417**, 224-239.
387. Weill, L., James, L., Ulryck, N., Chamond, N., Herbreteau, C.H., Ohlmann, T. and Sargueil, B. (2009) A new type of IRES within gag coding region recruits three initiation complexes on HIV-2 genomic RNA. *Nucleic Acids Res*.
388. Asang, C., Erkelenz, S. and Schaal, H. (2012) The HIV-1 major splice donor D1 is activated by splicing enhancer elements within the leader region and the p17-inhibitory sequence. *Virology*, **432**, 133-145.
389. Abbink, T.E. and Berkhout, B. (2008) RNA structure modulates splicing efficiency at the human immunodeficiency virus type 1 major splice donor. *J Virol*, **82**, 3090-3098.
390. Purcell, D.F. and Martin, M.A. (1993) Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol*, **67**, 6365-6378.
391. Harrison, G.P. and Lever, A.M. (1992) The human immunodeficiency virus type 1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure. *J Virol*, **66**, 4144-4153.
392. Sakaguchi, K., Zambrano, N., Baldwin, E.T., Shapiro, B.A., Erickson, J.W., Omichinski, J.G., Clore, G.M., Gronenborn, A.M. and Appella, E. (1993) Identification of a binding site for the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 5219-5223.
393. Zeffman, A., Hassard, S., Varani, G. and Lever, A. (2000) The major HIV-1 packaging signal is an extended bulged stem loop whose structure is altered on interaction with the Gag polyprotein. *J Mol Biol*, **297**, 877-893.
394. De Guzman, R.N., Wu, Z.R., Stalling, C.C., Pappalardo, L., Borer, P.N. and Summers, M.F. (1998) Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science*, **279**, 384-388.
395. Amarasinghe, G.K., De Guzman, R.N., Turner, R.B., Chancellor, K.J., Wu, Z.R. and Summers, M.F. (2000) NMR structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to stem-

- loop SL2 of the psi-RNA packaging signal. Implications for genome recognition. *J Mol Biol*, **301**, 491-511.
396. Lever, A.M. (2007) HIV-1 RNA packaging. *Adv Pharmacol*, **55**, 1-32.
397. Lu, K., Heng, X., Garyu, L., Monti, S., Garcia, E.L., Kharytonchik, S., Dorjsuren, B., Kulaandaivel, G., Jones, S., Hiremath, A. *et al.* (2011) NMR detection of structures in the HIV-1 5'-leader RNA that regulate genome packaging. *Science*, **334**, 242-245.
398. Darlix, J.L., Gabus, C., Nugeyre, M.T., Clavel, F. and Barre-Sinoussi, F. (1990) Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J Mol Biol*, **216**, 689-699.
399. Clever, J., Sassetti, C. and Parslow, T.G. (1995) RNA secondary structure and binding sites for gag gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **69**, 2101-2109.
400. Kerwood, D.J., Cavaluzzi, M.J. and Borer, P.N. (2001) Structure of SL4 RNA from the HIV-1 packaging signal. *Biochemistry*, **40**, 14518-14529.
401. Clever, J.L., Miranda, D., Jr. and Parslow, T.G. (2002) RNA structure and packaging signals in the 5' leader region of the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol*, **76**, 12381-12387.
402. Das, A.T., Vrolijk, M.M., Harwig, A. and Berkhout, B. (2012) Opening of the TAR hairpin in the HIV-1 genome causes aberrant RNA dimerization and packaging. *Retrovirology*, **9**, 59.
403. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-119.
404. Good, P.D., Krikos, A.J., Li, S.X., Bertrand, E., Lee, N.S., Giver, L., Ellington, A., Zaia, J.A., Rossi, J.J. and Engelke, D.R. (1997) Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei. *Gene Ther*, **4**, 45-54.
405. Adachi, A., Gendelman, H.E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A. and Martin, M.A. (1986) Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol*, **59**, 284-291.
406. Raleigh, E.A., Trimarchi, R. and Revel, H. (1989) Genetic and physical mapping of the mcrA (rgIA) and mcrB (rgIB) loci of Escherichia coli K-12. *Genetics*, **122**, 279-296.
407. Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. and 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.
408. Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59-74.
409. Schneider, U., Schwenk, H.U. and Bornkamm, G. (1977) Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, **19**, 621-626.
410. Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3406-3415.
411. Gruber, A.R., Lorenz, R., Bernhart, S.H., Neubock, R. and Hofacker, I.L. (2008) The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res*, **36**, W70-74.
412. Hanahan, D. and Meselson, M. (1983) Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol*, **100**, 333-342.
413. Paillart, J.C., Dettenhofer, M., Yu, X.F., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Marquet, R. (2004) First snapshots of the HIV-1 RNA structure in infected cells and in virions. *J Biol Chem*, **279**, 48397-48403.
414. Hofacker, I.L., Fontana, W., Stadler, P.F., Bonhoeffer, S., Tacker, M. and Schuster, P. (1994) Fast Folding and Comparison of RNA Secondary Structures. *Monatshefte F. Chemie*, **125**, 22.
415. Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M. and Turner, D.H. (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol*, **288**, 911-940.
416. Highleyman, L. (1999) First AIDS case in 1969. *Beta*, **12**, 5.
417. Lodmell, J.S., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Marquet, R. (2001) Structure and dimerization of HIV-1 kissing loop aptamers. *J Mol Biol*, **311**, 475-490.

418. Burmeister, P.E., Lewis, S.D., Silva, R.F., Preiss, J.R., Horwitz, L.R., Pendergrast, P.S., McCauley, T.G., Kurz, J.C., Epstein, D.M., Wilson, C. *et al.* (2005) Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF. *Chem Biol*, **12**, 25-33.
419. Healy, J.M., Lewis, S.D., Kurz, M., Boomer, R.M., Thompson, K.M., Wilson, C. and McCauley, T.G. (2004) Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions. *Pharmaceutical research*, **21**, 2234-2246.
420. Esteban, R., Vega, L. and Fujimura, T. (2008) 20S RNA narnavirus defies the antiviral activity of SKI1/XRN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **283**, 25812-25820.
421. Boelens, W.C., Palacios, I. and Mattaj, I.W. (1995) Nuclear retention of RNA as a mechanism for localization. *RNA*, **1**, 273-283.
422. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. *et al.* (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, **408**, 740-745.
423. Bohle, B., Jahn-Schmid, B., Maurer, D., Kraft, D. and Ebner, C. (1999) Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce IL-12, IL-18 and IFN-gamma production in cells from allergic individuals and inhibit IgE synthesis in vitro. *European journal of immunology*, **29**, 2344-2353.
424. Klinman, D.M., Yi, A.K., Beaucage, S.L., Conover, J. and Krieg, A.M. (1996) CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2879-2883.
425. Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. and Schreiber, R.D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**, 227-264.
426. Sen, G.C. and Ransohoff, R.M. (1993) Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Advances in virus research*, **42**, 57-102.
427. Mikovits, J.A., Young, H.A., Vertino, P., Issa, J.P., Pitha, P.M., Turcoski-Corrales, S., Taub, D.D., Petrow, C.L., Baylin, S.B. and Ruscetti, F.W. (1998) Infection with human immunodeficiency virus type 1 upregulates DNA methyltransferase, resulting in de novo methylation of the gamma interferon (IFN-gamma) promoter and subsequent downregulation of IFN-gamma production. *Mol Cell Biol*, **18**, 5166-5177.
428. Becker, Y. (2005) CpG ODNs treatments of HIV-1 infected patients may cause the decline of transmission in high risk populations - a review, hypothesis and implications. *Virus genes*, **30**, 251-266.
429. Berkhout, B. and van Wamel, J.L. (2000) The leader of the HIV-1 RNA genome forms a compactly folded tertiary structure. *RNA*, **6**, 282-295.
430. Laughrea, M. and Jette, L. (1994) A 19-nucleotide sequence upstream of the 5' major splice donor is part of the dimerization domain of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA. *Biochemistry*, **33**, 13464-13474.
431. Laughrea, M. and Jette, L. (1997) HIV-1 genome dimerization: kissing-loop hairpin dictates whether nucleotides downstream of the 5' splice junction contribute to loose and tight dimerization of human immunodeficiency virus RNA. *Biochemistry*, **36**, 9501-9508.
432. Lorenz, R., Bernhart, S.H., Honer Zu Siederdissen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P.F. and Hofacker, I.L. (2011) ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol Biol*, **6**, 26.

ANEXO

Los artículos científicos a continuación enumerados e incluidos en la tesis doctoral titulada...

RNAs Inhibidores frente al Virus de la Inmunodeficiencia Humana

... y presentada por D. Francisco José Sánchez Luque, Licenciado en Biología por la Universidad de Córdoba, no se usarán como material en posteriores tesis doctorales, ni han sido empleados con anterioridad.

Inhibition of HIV-1 Replication and Dimerization Interference by Dual Inhibitory RNAs. Sánchez-Luque, FJ., Reyes-Darias, JA., Puerta-Fernández, E. and Berzal-Herranz, A. *Molecules*, 15; 4757-4772. November 2010.

HIV RNA dimerisation interference by antisense oligonucleotides targeted to the 5'UTR structural elements. Reyes-Darias, JA., Sánchez-Luque, FJ. and Berzal-Herranz, A. *Virus Research*, 169; 63-71. 2012.

Granada, 26 de Noviembre 2012.

Director de los trabajos.

Fdo.: Alfredo Berzal Herranz

Article

Inhibition of HIV-1 Replication and Dimerization Interference by Dual Inhibitory RNAs

Francisco J. Sánchez-Luque¹, José A. Reyes-Darias¹, Elena Puerta-Fernández² and Alfredo Berzal-Herranz^{1,*}

¹ Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, CSIC, P.T. Ciencias de la Salud, Av. del Conocimiento s/n, Armilla, 18100 Granada, Spain; E-Mails: kiko@ipb.csic.es (F.J.S.-L.); joanreda@hotmail.com (J.A.R.-D.)

² Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla-CSIC. Américo Vesputio s/n, Isla de la Cartuja, 41092 Sevilla, Spain; E-Mail: elena.puerta@ibvf.csic.es (E.P.-F.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: aberzalh@ipb.csic.es; Tel.: +34 958 181 648; Fax: +34 958 181 632.

Received: 31 May 2010; in revised form: 28 June 2010 / Accepted: 1 July 2010 /

Published: 7 July 2010

Abstract: The 5'-untranslated region (5'UTR) of the HIV-1 RNA is an attractive target for engineered ribozymes due to its high sequence and structural conservation. This region encodes several conserved structural RNA domains essential in key processes of the viral replication and infection cycles. This paper reports the inhibitory effects of catalytic antisense RNAs composed of two inhibitory RNA domains: an engineered ribozyme targeting the 5' UTR and a decoy or antisense domain of the dimerization initiation site (DIS). These chimeric molecules are able to cleave the HIV-1 5'UTR efficiently and prevent viral genome dimerization *in vitro*. Furthermore, catalytic antisense RNAs inhibited viral production up to 90% measured as p24 antigen levels in *ex vivo* assays. The use of chimeric RNA molecules targeting different domains represents an attractive antiviral strategy to be explored for the prevention of side effects from current drugs and of the rapid emergence of escape variants of HIV-1.

Keywords: Ribozymes; antisense RNAs; HIV-1 RNA dimerization; anti-HIV RNAs

1. Introduction

The human immunodeficiency virus (HIV-1) is the etiological agent of AIDS [1]. It primarily targets CD4⁺ cells like T cells and macrophages, leading to the suppression of their immune function. The *quasi*-species structure of the viral population and its high mutation rate enable the virus to rapidly evade the immune response and promote the appearance of variants resistant to therapeutic drugs. Current therapies are based on a combination of different viral protein inhibitors that achieve a high reduction of the viral load, allowing a partial restoration of the immune function. Patients must maintain an aggressive lifelong treatment which produces serious side effects, so there is a real need to pursue the development of new therapies. Besides carrying the genetic information the HIV genomic RNA contains several conserved structural domains which play essential roles in viral replication and infection cycles. These functional RNA domains exhibit the highest sequence and structural conservations of the viral genome, making them very attractive therapeutic targets. The direct targeting of the viral RNA genome to interfere with the function of genomic RNA domains is a strategy to be explored, with nucleic acids being strong candidates as specific inhibitors for the development of this potential therapeutic technology.

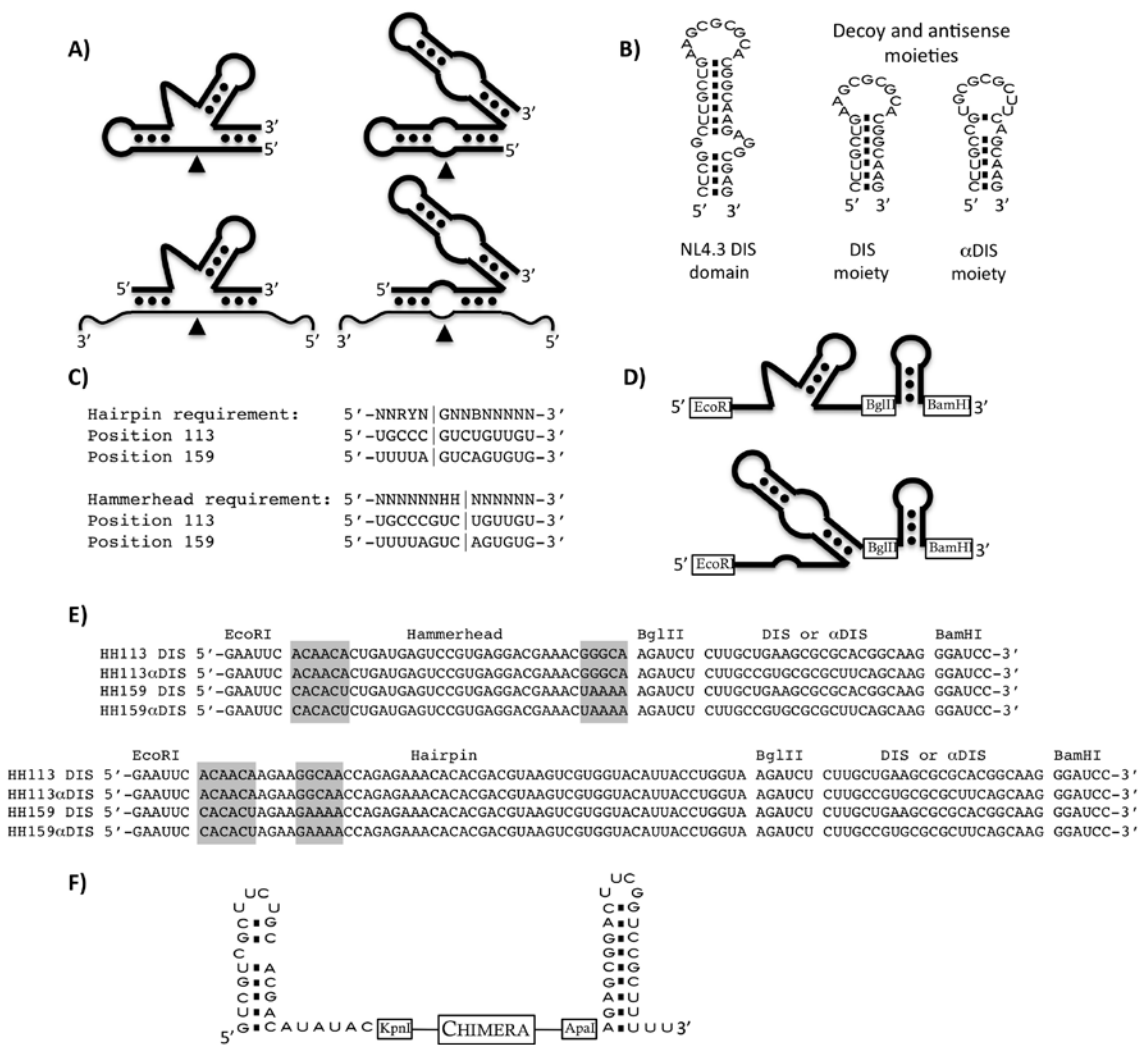
The HIV is a lentivirus which contains two long directly repeated regions at both ends of the genome. The 5'-untranslated region (5'UTR) of primary RNA transcripts comprises several functional RNA domains involved in key processes of the viral cycle like the trans-activation of transcription, polyadenylation, reverse transcription, dimerization, splicing and packaging [2]. The HIV infective particles contain two non-covalently linked genomic RNA copies that are bound through their 5' ends. The dimerization process is initiated at the dimerization initiation site (DIS) stem-loop domain. The DIS contains a palindrome sequence motif within the apical loop which is involved in the initial homodimerization interaction by a kissing-loop mechanism which is thought to progress to a more extended interaction [3]. It has been proposed that the availability of the DIS structure is controlled by a riboswitch which alternates between two main 5'UTR conformers termed branched multiple hairpins (BMH) and long distance interaction (LDI) forms [4]. The existence of one or other of the conformational structures may determine the switch between full-length viral RNA packaging and translation processes [5]. *In silico* studies based on biochemical data support the notion that the LDI is the most abundant conformer [6], while *ex vivo* structure probing assays indicate the prevalence of the BMH conformer, *i.e.* the dimerizing-competent form [7]. Both conformers have been visualized in native gel electrophoresis using mutants that disrupt the equilibrium between both conformers [4].

The minimal catalytic domains of the natural hammerhead and hairpin ribozymes have been engineered to generate trans-cleaving catalytic RNAs (Figure 1A) [8-10], and their substrate sequence requirements have been defined [11-14]. The therapeutic potential of the hammerhead and the hairpin catalytic motives has been widely proven [15]. We have previously shown efficient HIV-1 RNA inhibition by using inhibitor RNAs based on either hairpin or hammerhead ribozymes [16,17].

We report here the characterization of a series of chimeric molecules composed of a trans-cleaving ribozyme, either a hairpin or a hammerhead, targeting two different sites within the HIV-5'UTR and an anti-DIS specific molecule, either a DIS sense molecule that may act as a decoy element and an antisense DIS molecule (Figure 1B). *In vitro* analysis demonstrated that both sense and antisense-DIS domains interfere with viral dimerization. The antiviral activity was evaluated by transfecting cells

with either pre-synthesized RNA molecules or plasmid DNAs encoding the chimeric inhibitor RNAs.

Figure 1. (a) Schematic representation of the catalytic RNAs. Self-cleaving hammerhead (top left) and hairpin (top right) ribozymes are represented. Engineered trans-cleaving ribozymes are represented at the bottom. The thinner line represents substrate RNA and the arrows indicate the cleavage points. (b) The wild type complete DIS domain of NL4.3 HIV-1 strain is shown on the left while the two inhibitory moieties used in this study, DIS sense and antisense (α DIS), are shown on the right. (c) Ribozyme sequence requirements and target sites 113 and 159 are indicated. Vertical lines represent the cleavage site. Nucleotide code: N stands for A, U, G or C; B stands for C, G or U; H stands for A, C or U; Y stands for C or U; and R stands for A or G. (d) Schematic representation of the catalytic chimera RNA series used in the *in vitro* experiments. The ribozyme domain coding sequences were flanked by *EcoRI* and *BglII* sites, while the decoy or antisense DIS domain were flanked by *BglII* and *BamHI* sites. (e) Sequences of all combinations of chimeric RNAs used in this study. Grey boxes indicate the substrate recognition arms of the ribozyme domains. (f) Schematic representation of the chimeras used in the *ex vivo* inhibition assays, inhibitor RNAs are flanked by U6 snRNA end hairpin loops.



2. Results and Discussion

2.1. *In vitro* HIV-1 RNA cleavage by anti-HIV-1 catalytic RNAs

Hairpin (HP) and hammerhead (HH) ribozymes were designed to target sequences 107-120 and 153-166 of the NL4.3 HIV-1 strain, which we had previously shown as being sequences accessible to both kinds of ribozyme [18]. Engineered HH ribozymes cleave at the 3' side of nucleotides 114 and 160, while HP ribozymes cleave at the 3' side of nucleotides 111 and 157 (Figure 1C). The sequence of these ribozymes and their targets is represented in Figure 1 and we will refer to them as HH113 and HP113 for those targeting the 107-120 region (they cleave surrounding position 113) and HH159 and HP159 for those targeting the 153-166 region (they cleave surrounding position 159).

The DIS region is a 34 nt-long RNA domain folded into a stem-loop structure that expands from nucleotide position 244 to 278 in the NL4.3 HIV-1 strain. A molecule containing the 23 most apical nucleotides of the DIS stem-loop, positions 249 to 271, was used as the decoy domain (DIS). A molecule having the complementary sequence of the same 23 nt was used as the antisense domain (α DIS; Figure 1B). The decoy or the antisense molecules were covalently linked to the 3' end of HH113, HH159, HP113 and HP159 ribozymes to yield a series of potential HIV inhibitors named HH or HP-DIS or α DIS when carrying the sense or the antisense sequence, respectively (Figure 1C). In addition, the stem-loop flanking domains of the U6 snRNA were added to either end of the inhibitor RNA molecule to make them of the same structure as those to be assayed in the culture cells. For antiviral activity assays, RNA chimeras were cloned into a mammalian pcDNA3-derived plasmid containing a U6 snRNA promoter cassette which directs the synthesis of inhibitor RNAs [19]. Transcription from this promoter yields RNA products flanked by the first and the last stem-loops of the U6 snRNA (Figure 1E).

In vitro cleavage activity of each chimera RNA was assayed and compared to that of the corresponding trans-cleaving ribozyme lacking any additional domain (Figures 1D and E). An *in vitro* transcribed HIV-1 5'UTR molecule containing the first 308 nt was used as the substrate of the reaction. Cleavage reactions were performed at 37 °C in a cleavage buffer and the reaction progression was monitored at different times (Table 1 and Figure 2). All RNAs follow a hyperbolic pattern of cleavage percentage during the reaction time, with a 100% cleavage expected from all of them with a lowest r^2 coefficient of 0.8824. We defined the $T_{0.5}$ coefficient as the time, in minutes, that was necessary to reach 50% of the cleaved substrate. The hairpin ribozymes HP113 and HP159 had lower $T_{0.5}$ values, 16.25 ± 2.17 and 19.47 ± 6.05 min, respectively, compared to their hammerhead counterparts, HH113 and HH159 with 22.89 ± 9.89 and 118.9 ± 39.54 min, respectively (Table 1).

The addition of either sense or antisense DIS domains resulted in a slight modification of the $T_{0.5}$ value with respect to the one of the ribozyme alone (Table 1). The highest improvement was recorded for HH159 with the addition of the α DIS domain, which resulted in a nearly two-fold reduction of the $T_{0.5}$. On the opposite side, the addition of the DIS domain to the HP113 ribozyme produced a two-fold increase of the $T_{0.5}$.

Figure 2. Cleavage reactions of 5'UTR by ribozymes and chimeric RNA molecules. Each gel autoradiograph shows a representative cleavage reaction time course of a specific ribozyme and its respective DIS and α DIS derived chimeras: **(a)** HH113, **(b)** HH159, **(c)** HP113 and **(d)** HP159. Each experiment was performed in triplicate and the cleavage percentage was obtained by quantification of the cleavage products. Curves were fitted with maximum $\text{sqr}(R)$ coefficients.

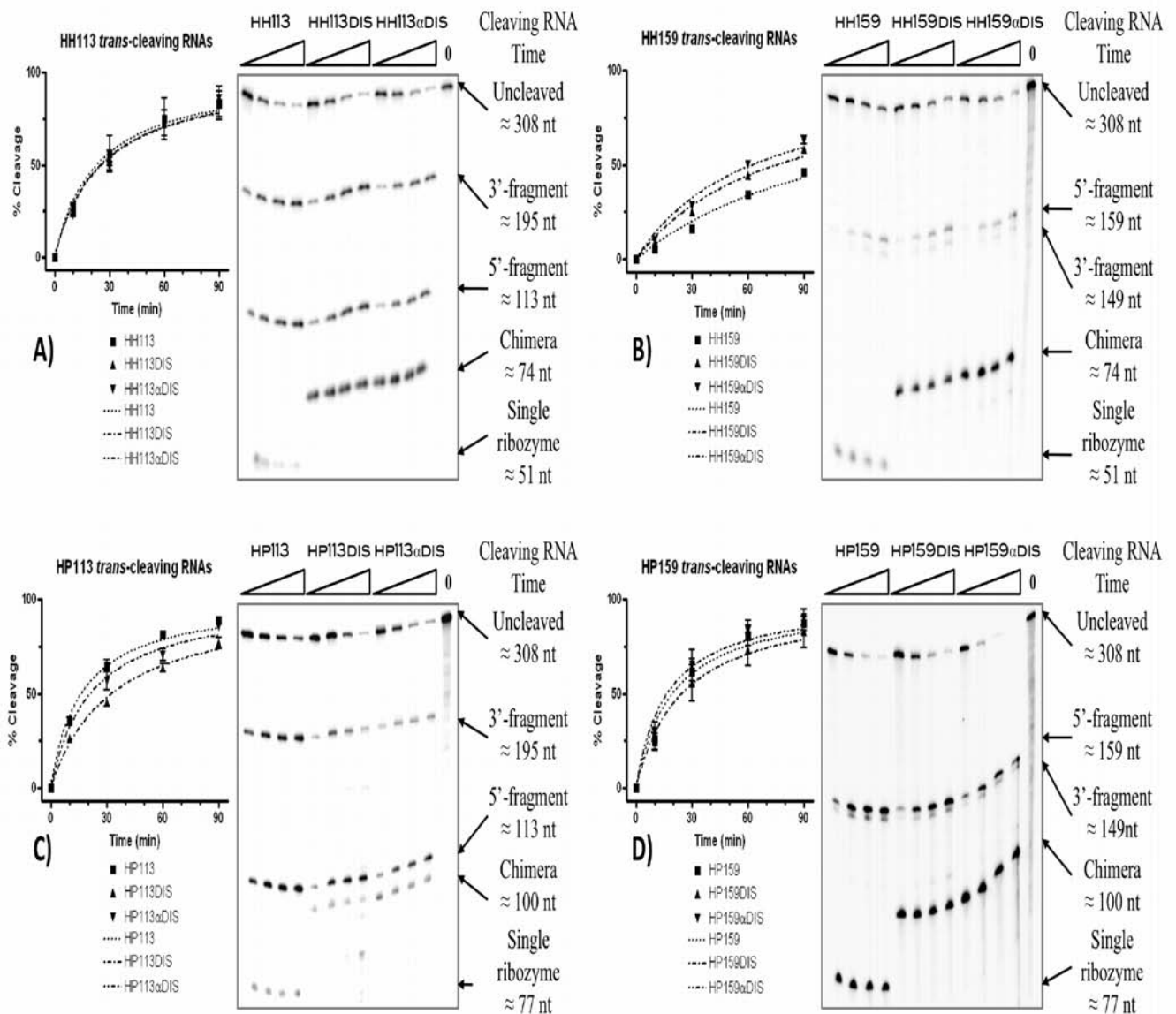


Table 1. *In vitro* cleavage reactions of the HIV-5' UTR by catalytic RNAs. ^(a) $T_{0.5}$ values were normalized to the one of the corresponding ribozyme. ^(b) Regression curves were fixed to a maximum cleavage value of 100%.

RNA	Maximum cleavage (%)	$T_{0.5}$ (min)	Relative $T_{0.5}$ ^(a)	sqr(R) ^(b)
HH113	100 ± 14.23	22.89 ± 9.88	1	0.8824
HH113DIS	100 ± 10.21	24.92 ± 7.43	1.08	0.9417
HH113 α DIS	100 ± 7.99	25.4 ± 5.88	1.11	0.9667
HP113	100 ± 3.78	16.25 ± 2.17	1	0.9863
HP113DIS	100 ± 6.15	32.34 ± 5.17	1.98	0.9823
HP113 α DIS	100 ± 5.67	20.99 ± 3.75	1.28	0.9746
HH159	100 ± 21.26	118.9 ± 39.54	1	0.9764
HH159DIS	100 ± 10.94	75.48 ± 15.15	0.63	0.986
HH159 α DIS	100 ± 11.84	62.25 ± 14.57	0.52	0.9783
HP159	100 ± 9.53	19.47 ± 6.05	1	0.9369
HP159DIS	100 ± 14	24.44 ± 10.08	1.25	0.8942
HP159 α DIS	100 ± 9.1	16.61 ± 5.28	0.85	0.9322

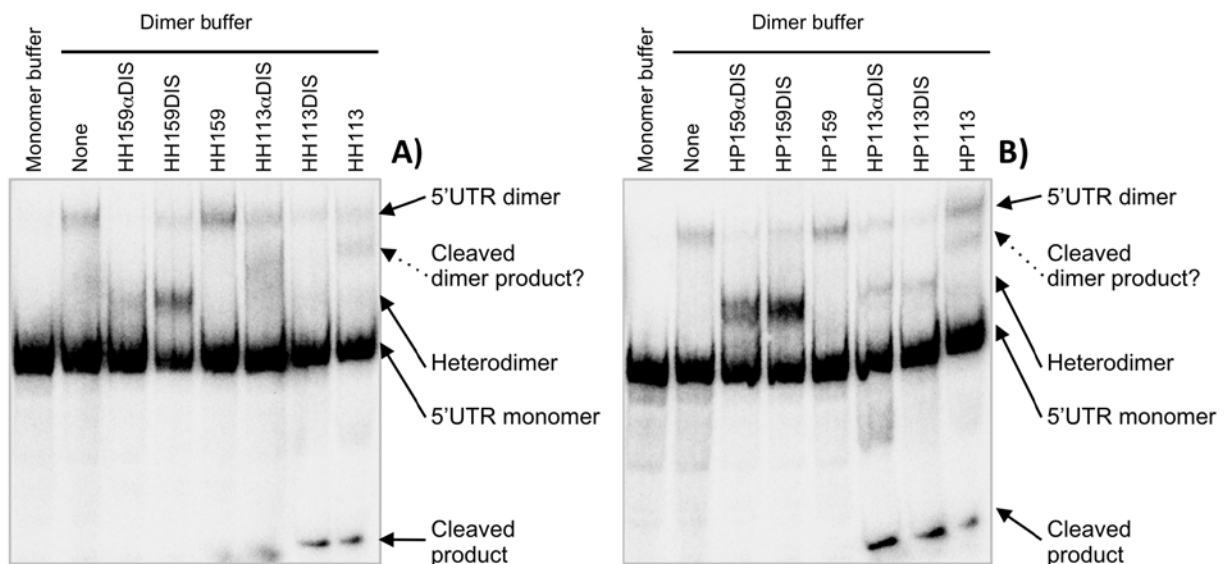
We previously reported that the addition of a TAR antisense domain (α TAR) to the same HP and HH ribozymes used in this work, resulted in an improvement of the cleavage activity [18]. The TAR RNA shares common features with natural antisense RNAs and this could explain why the α TAR-TAR interaction was able to mimic the fast and stable interactions of natural antisense RNAs and their targets, thus explaining the reported improvement in catalytic activity [18,20,21]. Neither DIS nor α DIS domains conserved the features of natural antisense, which may explain the lack of cleavage activity enhancement.

2.2. *In vitro* inhibition of the 5'UTR dimerization by catalytic RNAs

The HIV-1 virion particles contain two genome RNA copies. The process by which two genome copies get non-covalently bond is called dimerization and it is initiated at the DIS domain located at the 5'-end of the genomic RNA [22]. The dimerization process can be reproduced *in vitro* in a high salt concentration and can be resolved by native gel electrophoresis [23].

To check whether the inhibitory chimera RNAs might interfere with the dimerization process, both molecules (inhibitory RNA and 5'UTR) were mixed together in H₂O, using a 20-fold molar excess of non-radiolabelled inhibitory RNA. The dimerization reaction was started by the addition of a reaction buffer. The dimer fraction was detected as the molecular species showing a slower mobility in a native polyacrylamide gel electrophoresis. The RNA chimeras based on HH159 and HP159 clearly interfered with dimer formation whereas ribozymes HH159 and HP159 did not have any effect. These chimeras led to an almost complete suppression of the dimer in favour of the appearance of a new species which migrates between the dimer and the monomer. This new species might be a heterodimer formed between the inhibitory RNA and the 5'UTR, although we cannot rule out other possibilities (Figure 3).

Figure 3. Inhibition of 5'UTR dimerization *in vitro* by chimeric inhibitor RNAs derived from both hammerhead and hairpin ribozymes (A) and B), respectively). The 5'UTR dimerization was performed in the presence and absence of inhibitor RNAs. Dimerization reactions were carried out at 37 °C for 20 min with 157 nmol of internally radiolabelled 5'UTR RNA and a 20-fold excess of inhibitory RNA. The reactions were resolved in 4% polyacrylamide native gels. Line 1 in both gels represents non-dimer condition controls. Line 2 represents 5' UTR dimerization in the absence of any RNA inhibitor. The shifted band within line 2 with respect to line 1 is considered as the dimer.

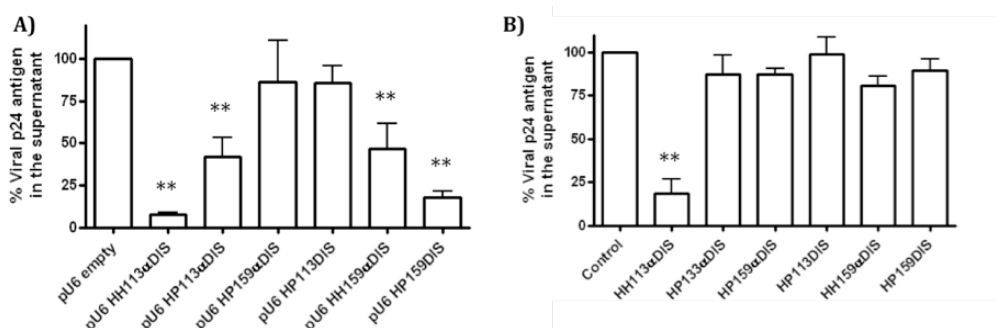


Similarly, the HH113 and HP113 chimeras also suppressed dimer formation almost completely and yielded a new species, supposedly a heterodimer, which was detected between the dimer and the monomer. Surprisingly, ribozymes HP113 and HH113 induced the appearance of a new molecular species that migrates between the heterodimer and the 5'UTR-5'UTR homodimer and a second species that migrated faster in the gel. Interestingly, catalytic RNAs targeting position 113 were the only inhibitors able to cleave the substrate under dimerization conditions (data not shown). It is feasible that the new species detected might correspond to a partially or completely cleaved dimer, which would explain the disappearance of the dimer species in the presence of HH113 (Figure 3). Likewise, 113 ribozymes interacting with 5'UTR cleavage region might switch the equilibrium towards the LDI conformer. It was previously reported that mutations in unrelated regions like TAR switch the 5'UTR isoform equilibrium towards one or the other of the conformers [24]. It is worth noting that the HH ribozymes used in this work maintained a perfect base pairing with the target sites within the 5' UTR sequences. These target sequences completely met the HH defined consensus requirements. However, one mismatch existed between the binding arms and the target site for HP113, and two for HP159, which could affect HP159 cleavage efficiency under dimerizing conditions (Figure 1C). Furthermore, position 159 was predicted to be involved in a stem-loop structure in both BMH and LDI conformers while position 113 only appeared as single stranded in the BMH form, which could explain why 113 ribozymes were able to cleave the target despite non-optimal conditions while 159 ribozymes were not.

2.3. Inhibition of HIV-1 *ex vivo* viral production by endogenously synthesized inhibitory RNAs

A HEK293T cell system was used for assaying the effect of inhibitor RNAs on HIV viral production. The HEK293T cells do not express the surface receptors required for HIV-1 infection; the virus can replicate in these cells but viral particles cannot infect them. Transfection with pro-viral DNA mimics the post-integration stage of the viral cycle and viral particles in the supernatant after transfection correspond to first generation virions.

Figure 4. *Ex vivo* inhibition of HIV-1 viral production. The HEK293T cells were transfected with the pNL4.3 plasmid and an inhibitory RNA expressing vector at a molar ratio of 1:10 **A**) or with an *in vitro* synthesized RNA **B**). The bar graph represents the percentage of viral protein p24 levels in the supernatant 48 hours after transfection relative to the control. The inhibitory RNA is indicated below each bar. The empty pU6 vector and an RNA molecule consisting of both U6 snRNA flanking hairpins without any sequence in between were used as negative controls in **A**) and **B**), respectively. The results are the means of three independent experiments (** $p < 0.01$).



Inhibitor RNAs were cloned in a pcDNA3-derived plasmid, pU6, in which both CMV promoter and BGH polyadenylation signals were substituted by those belonging to human U6 snRNA [16]. The pU6 plasmid constructs encoding HH113DIS and HH159DIS RNAs were not obtained. The HEK293T cells were co-transfected with pNL4.3 and a pU6-inhibitor RNA. Intracellular expression of the pro-viral DNA encoded in the pNL4-3 plasmid allowed the viral replication cycle. The pU6-construct series allowed endogenous production of the inhibitor RNAs to be tested. Viral production was determined as a measurement of the viral protein p24 in cellular supernatant two days after transfection. The HH113 α DIS and HP159DIS RNAs reached extracellular protein p24 inhibition rates of $92.68 \pm 1.31\%$ and $83.64 \pm 3.78\%$, respectively. The HP113 α DIS and HH159 α DIS RNAs reached inhibitions rates close to 50%, while HP159 α DIS and HP113DIS had no significant effect (Figure 4A). It was previously reported that the expression of single ribozymes does not interfere with HIV-1 viral production under these conditions [16].

2.4. Inhibition of HIV-1 viral production *ex vivo* by pre-synthesized inhibitory RNAs

To further characterize the inhibitory efficiency of these RNAs, a similar experiment to the one described above was performed, but this time *in vitro* synthesized inhibitory RNAs were transfected. These RNAs were transcribed *in vitro* by T7 RNA polymerase from PCR templates obtained by

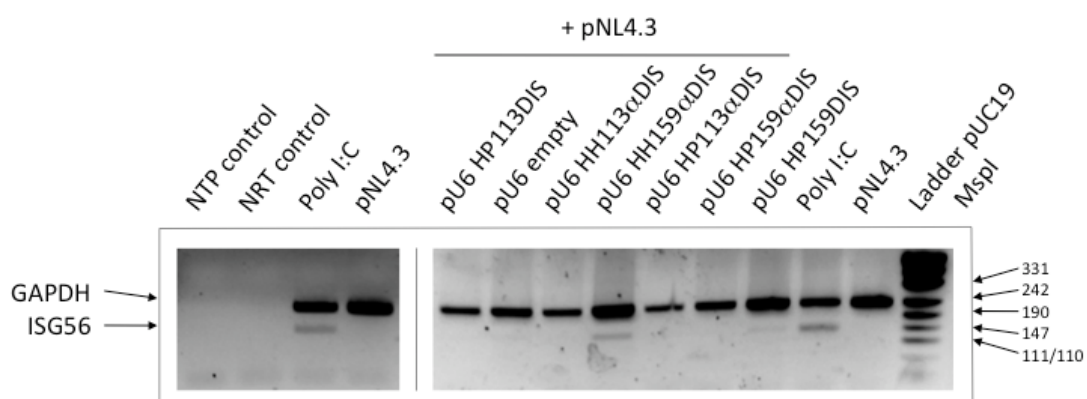
amplification from the pU6 constructs. The templates were designed to obtain RNAs containing both U6 snRNA flanking hairpins in order to be identical to those produced by the U6-driven expression cassettes (Figure 1F). As a control, an RNA consisting of the U6 snRNA flanking hairpins without any sequence in between was used.

The HEK293T cells were co-transfected with pNL4.3 and inhibitory RNAs. Viral protein p24 levels in supernatant were measured 48 hours after transfection. Up to 80% inhibition was obtained with HH113 α DIS RNA, a similar value to the one obtained when it was endogenously synthesized from the U6 construct derivative. However, no significant effect was observed for the other tested RNAs (Figure 4B).

2.5. HIV-1 inhibition by catalytic RNAs is not explained by the interferon response

Total RNA was extracted from HEK293T cells co-transfected with pU6 constructs and pNL4.3 at the moment of quantifying viral protein p24 in the supernatant. The RNA was reverse transcribed using random hexamers and cDNA as a template for PCR, using specific primer pairs for the GAPDH and ISG56 genes. The interferon stimulated gene 56 (ISG56) is a gene induced by double-stranded RNA and virus infection [25,26]. Basal expression levels are nearly undetectable. Semiquantitative RT-PCR was performed to detect ISG56 mRNA as reporter of interferon-signalling activation using the housekeeping GAPDH gene as the internal control (Figure 5). Poly I:C is a double-stranded RNA that quickly triggers the interferon response; it is used as a positive control of interferon response induction. Semi-quantitative RT-PCR from total RNA extracted from poly I:C transfected cells generated a detectable ISG56 amplification. On the contrary, RT-PCR from total RNA extracted from cells solely transfected with pNL4.3 did not yield any ISG56 amplification products (Figure 5).

Figure 5. Assay of the interferon response. A representative photograph of an agarose gel visualized by ethidium bromide transilluminescence is shown. Transfected DNAs are indicated on top of each lane. The NTP, control PCR reaction in the absence of any template. NRT, PCR reaction from total RNA without previous reverse transcription were checked for genomic DNA contamination. The poly I:C was a positive control of the interferon response. The amplicons are identified by the name of the gene on the left. Sizes of marker DNA fragments in bp are indicated on the right.

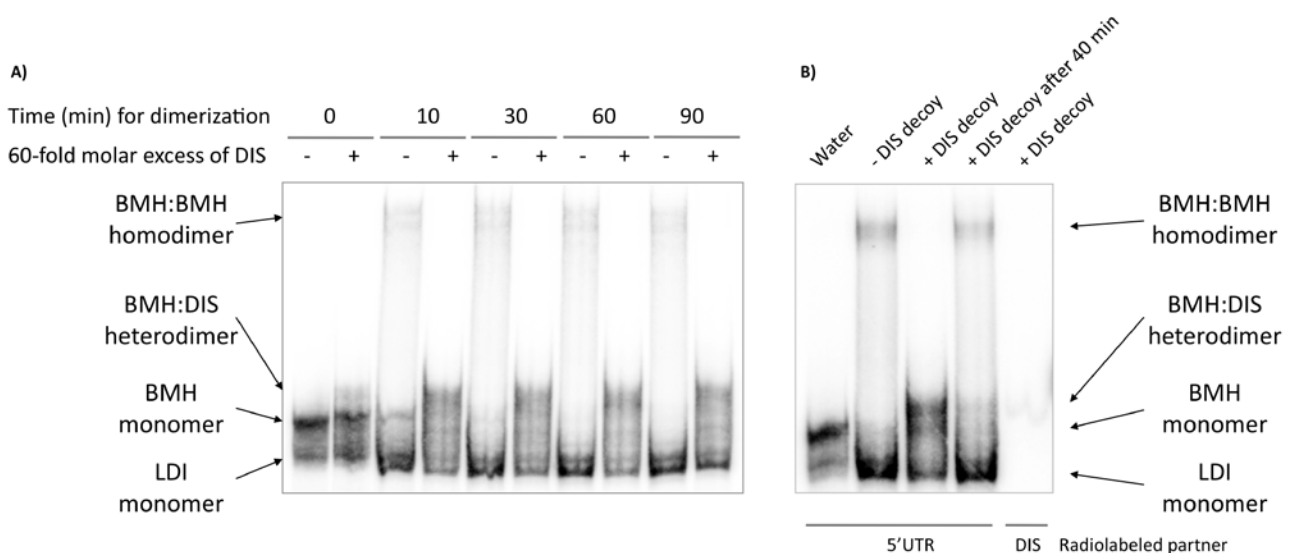


Amplification of the ISG56 gene was not observed in any RT-PCR from total RNA extracted from cells co-transfected with pNL4.3 and any of the following pU6 construct derivatives: empty vector, HP113DIS, HH113 α DIS, HP113 α DIS or HP159 α DIS (Figure 5). Only interferon signalling was slightly induced by the pU6 HH159 α DIS construct and to a lower extent by pU6 HP159DIS (Figure 5). These results indicate that the highest viral inhibition recorded by pU6 HH113 α DIS and pU6 HP159DIS cannot be explained by the induction of interferon-signalling, suggesting that the observed inhibition corresponded mainly to specific inhibition resulting from the direct action of the inhibitor RNAs on viral RNA. Nor was the viral inhibition produced by HP113 α DIS due to the induction of interferon signalling.

2.6. Relationship between the HIV-1 RNA dimerization process and the structural conformation of the 5'UTR

The monomeric conformers LDI and BMH could not be resolved under the dimerization conditions tested (Figure 6A, lines 1 and 2 from the left of each gel). However, the internally labelled 5' UTR in the absence of any reaction buffer was resolved in a native polyacrylamide gel using 0.25X TBE in the gel and the running buffer, and a new conformer showing a slightly retarded mobility was observed. (Figure 6A, first line). We associated the fast and slow migrating monomers to LDI and BMH forms, respectively. Ionic strength stabilized the highly imperfect LDI helices, while conserved BMH hairpins were favoured in their absence. The monomer detected under dimerization conditions might correspond to the LDI conformer (fast migration). A dimerization reaction time course was performed to study the progression of the reaction (Figure 6A, odd lines). The BMH form extinguished between 10 and 30 min after dimerization started, while maximum dimerization was reached at no later than 30 min (Figure 6A). Only a minor percentage of the 5'UTR RNA population formed a dimer. This suggests that once the salt is added to the mix, the 5'UTR BMH conformer quickly switches to the LDI conformer, and only a minor proportion of molecules progress to dimer formation. This might explain why these inhibitor chimera RNAs with DIS or α DIS did not behave like α TAR ones, increasing the percentage of cleaved molecules *in vitro*. The TAR is present within both LDI and BMH conformers, while the DIS structure is only present in a very limited percentage of the 5'UTR molecules.

Figure 6. Involvement of the different 5'UTR conformers in the RNA dimerization process. **(A)** Autoradiogram of a polyacrylamide gel electrophoresis of a 5' UTR dimerization reaction time course. Dimerization reactions were performed as described in the experimental section. Different molecular species are identified at the left side of the gel. **(B)** The thermodynamic relationship between 5'UTR RNA isoforms. Line 1 (water): 5'UTR was denatured and renatured in water. Line 2 (–DIS decoy): 5'UTR was denatured and renatured in water, and incubated for 40 min at 37 °C in 1X dimer buffer. Line 3 (+DIS decoy): the same procedure as line 2, but a 60-fold molar excess of unlabelled DIS decoy was added at time 0. Line 4 (+DIS decoy after 40 min): the same procedure as line 2 but a 60-fold molar excess of unlabelled DIS decoy was added after 40 min incubation in dimerization conditions; the reactions were followed for another additional 40 min at 37 °C. Line 5 (+DIS decoy): the same procedure as line 2, but the DIS decoy was internally radiolabelled and 5'UTR unlabelled. Different molecular species are identified by a schematic representation depicted on the right side of the gel.



To further characterize the anti-HIV dimerization effect of the inhibitory RNAs, a DIS decoy RNA was used as a competitor. The DIS decoy might stabilize BMH within a heterodimer and could be a tool for the identification of different isoforms and for understanding their equilibrium relationships. Dimerization reactions were performed in the presence of a 60-fold molar excess of a cold 23 nt-long DIS decoy, which was added to the mix just before the reaction began. The DIS decoy completely abolished dimer formation, while a new RNA complex appeared which migrated slightly slower than the BMH monomers (Figure 6A, even lines). The same experiment was performed using cold 5'UTR and a radiolabelled DIS RNA decoy, and revealed that the decoy is only present in the new slow migrating complex, so this new molecular species must be an 5'UTR-DIS heterodimer (Figure 6B, fourth line). These results suggest that the DIS decoy sequesters the dimerization-competent BMH conformer from natural dimerization. However, no competition was observed when the DIS decoy was added 40 min after the reaction started (Figure 6B). This indicates that the BMH homodimer is stable enough and a dynamic equilibrium does not exist between the dimer and the LDI monomer via the

ephemeral BMH. This phenomenon explains why the 5'UTR was able to dimerize by the BMH-dependent DIS domain, despite the large thermodynamic displacement toward the LDI form. In any case, the chaperone activity of the nucleocapsid protein could probably displace the equilibrium towards the dimer formation and explain the BMH conformer predominance obtained by *ex vivo* probing assays [3].

3. Experimental

3.1. RNA preparation and vector construction

Inhibitor RNAs were obtained by *in vitro* transcription from appropriate DNA templates using bacteriophage T7 RNA polymerase. The DNA templates were generated from pG3HH and pG3HP anti-LTR HIV-1 plasmid series as described by Puerta-Fernández and co-workers [18] by replacing the antisense TAR coding sequence by either a DIS or an antisense DIS (α DIS) coding sequence. Briefly, DIS and α DIS coding sequences were obtained by annealing DISf (5'GATCTCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGG3') and DISr (5'GATCCCTTGCCGTGCGCGCTTCAGCAAGA3') oligonucleotides or α DISf (5'GATCTCTTGCCGTGCGCGCTTCAGCAAGG3') and α DISr (5'GATCCCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGA3') oligonucleotides, respectively. The oligonucleotides were 5' end phosphorylated by T4 polynucleotide kinase (Roche, Switzerland) before annealing, following the manufacturer's instructions. Each pG3HH and pG3HP construct was digested with *Bgl*II and *Bam*HI restriction enzymes to eliminate the antisense TAR domain coding sequence and ligated with the DIS inserts, yielding the new pG3HH and pG3HP series encoding anti-DIS sequences. *In vitro* transcription was performed as previously described [18] from *Bgl*II or *Bam*HI linearized pG3HH and pG3HP plasmid templates to synthesize ribozymes or inhibitor chimera RNAs, respectively.

Ex vivo expressing plasmid constructs were generated from the pU6-Rzs plasmid series as described previously [16]. Inhibitor RNA coding sequences were obtained by PCR amplification using the constructs described above as templates, and the oligonucleotides 5'KpnIpK (5'GACTCGGTACCGGGCGAATT3') and 3'ApaIpK (5'TCTAGAGGGCCCCCTTGC3'). Amplicons were digested with *Kpn*I and *Apa*I and cloned in the *Kpn*I and *Apa*I unique restriction sites within the U6 promoter cassette of the pU6-Rzs plasmid series.

Pre-synthesized RNAs for *ex vivo* HIV-1 inhibition assays were generated by *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase from PCR amplicons. Templates were generated from the pU6 constructs using 5'T7U6 (5'TAATACGACTCACTATAGGGGTGCTCGCTTCGGCAGCACAT3') and 3'ApaIU6 (5'AGCGGGCCCAAAAAGCGGACCGAAGTCCGC3') oligonucleotides which contained the T7 RNA polymerase promoter at the 5' end. Transcription from these templates yielded chimera RNAs containing U6 snRNA flanking hairpins at both ends, as they would be generated by *ex vivo* transcription.

The 5'UTR RNA was transcribed *in vitro* by T7 RNA polymerase from a PCR template obtained from the pNL43 plasmid (GeneBank no. AF324493) with primers 5'T7NL43 (5'TAATACGACTCACTATAGGGTCTCTCTGGTTAC3') and 3'T7NL43 (5'AATTTTTGGCGTA CTCACCAGT3'). The

amplicon incorporated the T7 RNA polymerase promoter at the 5'-end of HIV-1 genomic region from the +1 to +308 nucleotide coding sequence.

3.2. *In vitro* cleavage assays

The cleavage reactions were performed in a 10 μ L final volume in the presence of 0.2 nmol of internally radiolabelled 5'UTR RNA and 20 nmol of non-radiolabelled catalytic inhibitor RNAs. The RNA mix was denatured (10 min 65 °C) and renatured (10 min 37 °C) in H₂O and the reaction was initiated by the addition of 2 μ L of 5X cleavage buffer (1X: Tris-HCl 50 mM pH 7.5; MgCl₂ 10 mM) and incubated at 37 °C. Aliquots were taken at different times (10, 30, 60 and 90 min) and the reaction stopped by adding an equal volume of 2X denaturing loading buffer (2X: deionized formamide 94% v/v; xylene cyanol 0.025% p/v; bromophenol blue 0.025% p/v; EDTA 17 mM). The results were resolved in 8% denaturing polyacrylamide gels in 1X TBE using 0.5X TBE as the running buffer.

3.3. *In vitro* dimerization assays

Dimerization competition reactions were performed in a final volume of 10 μ L. Internally radiolabelled 5'UTR RNA (157 nmol) was mixed with non-radiolabelled inhibitory RNA (3.14 pmol) in 8 μ L H₂O. The RNA mix was denatured (10 min 65 °C) and renatured (10 min 37 °C) and the reactions were initiated by the addition of 2 μ L of 5X dimerization buffer (1X: sodium cacodylate 50 mM pH 7.5; KCl 0.3 M; MgCl₂ 5 mM). The reactions were performed for 20 min at 37 °C and then stopped by the addition of a same volume of 2X native gel loading buffer (2X: Tris-acetate 20 mM; Mg acetate 10 mM; NaCl 0.1M; glycerol 30% v/v; xylene cyanol 0.4% p/v; bromophenol blue 0.4% p/v; tRNA 4% p/v). The reaction products were resolved by 4% native polyacrylamide gel electrophoresis in 1X TBE using 1X TBE as the running buffer. Electrophoresis was performed at 4 °C and no more than 15 mA per gel. Monomerization control was performed by the addition of 5X monomerization buffer (1X: sodium cacodylate 50 mM pH7.5; KCl 0.3 M; MgCl₂ 0.1 mM). For detection of the 5'UTR conformers BMH and LDI, the dimerization mix contained 0.1 μ mol of 5'UTR and 6 μ mol of DIS decoy, and the reactions were resolved in 4% native polyacrylamide gels in 0.25X TBE using 0.25X TBE as the running buffer.

3.4. *HIV-1 ex vivo* inhibition assays

For these assays 250,000 HEK293T cells per well were plated in a 24-well plate using 500 μ L/well of DMEM, 10% fetal bovine serum (FBS) and L-glutamine 2 mM the day before transfection. Then, 1 μ L of Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, CA, USA) was mixed with 25 μ L of Opti-MEM[®] (PAA Laboratories GmbH, Austria) and incubated for 5 min at room temperature. Following this, 100 ng of pNL4.3 were mixed with either 300 ng of a pU6 DNA plasmid construct coding for a specific RNA inhibitor or 500 ng of a pre-synthesized inhibitory RNA in 25 μ L of Opti-MEM[®], and incubated for 5 min. Lipofectamine and nucleic acid solutions were mixed and incubated at room temperature for 20 min. Then, 450 μ L of DMEM, 10% FBS and 2 mM L-glutamine were added. The supernatant was carefully removed from each well by aspiration and 500 μ L transfecting-mix was added. Two days after transfection, the supernatants were removed and processed using the Genscreen

HIV-1 Ag assay (BioRad, CA, USA) for viral protein p24 antigen quantification, following the manufacturer's instructions. The DNA for transfection was prepared using the Plasmid Mini Kit (Quiagen, The Netherlands), following manufacturer's instructions. Each treatment was assayed in triplicate and statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis non-parametric test followed by multiple Dunnet comparison tests to check differences against the control.

3.5. Detection of interferon-response activation by semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from the cells by the Trizol[®] reagent (Invitrogen), following manufacturer's recommendations but adding an extra incubation of the aqueous phase after chloroform extraction with 1 U of RQ1DNase (Promega, WI, USA) at 37 °C for 15 min to prevent genomic DNA contamination. This was followed by an additional chloroform extraction. Reverse transcription was performed using the Reverse-Transcriptase kit (Roche), where 100 ng of total RNA was incubated at 37 °C for 20 min with 0.5 U of RQ1 DNase (Promega) and 20 U of the RNase inhibitor (Promega). The RNA was incubated at 65 °C for 10 min, then the temperature was brought down quickly to 4 °C and 3.2 µg of random hexamer primers were added. The reaction mixes contained 1 mM dNTPs and 10 U of reverse transcriptase (RT) in reaction buffer in a final volume of 20 µL. Annealing was performed at 25 °C for 10 min and the reactions were run at 60 °C for one hour. Finally, the RT was inactivated at 85 °C for 5 min. Semi-quantitative PCR was performed by the Reddy Mix PCR Master Mix (Thermo Scientific). The reactions were performed in a total volume of 10 µL containing 2.5 µL of cDNA, 3 pmol of each GAPDH-specific primer and 10 pmol of ISG56-specific primers.

4. Conclusions

Nowadays, there are multiple RNA-based approaches with the therapeutic potential to interfere with viral functions. Functional RNA moieties have been involved in many regulatory processes. Understanding these functionalities, like RNA catalysis or HIV genomic RNA dimerization, may enable the design of therapeutic RNAs. Here we have proven that the combination of functional inhibitor RNA moieties directed against different HIV-1 5'UTR RNA targets in a single chimeric molecule results in bi-functional RNA molecules that fully conserve both inhibitory activities. Both hammerhead and hairpin ribozyme domains were explored as 5'UTR RNA trans-cleaving elements targeting two available cleavage sites surrounding the +113 and +159 positions. The DIS domain within the 5'UTR RNA, responsible for triggering the HIV-1 RNA dimerization, was used as target for a decoy and an antisense RNA.

The *ex vivo* HIV-1 inhibition assays demonstrated up to 90% effect measured as viral protein p24 levels in the supernatant of cells transfected with the HIV pro-viral DNA in a post-integrative model system. Inhibitory chimera RNAs achieved a complete *in vitro* inhibition of the essential viral dimerization process. A model of the implication of both 5'UTR folding isoforms LDI and BMH in the dimerization process is proposed. The results summarized here indicate that in the absence of ionic strength, the 5'UTR folds *in vitro* into the BMH monomeric conformer, which is competent for dimerization. This conformer quickly switches to the LDI form after the addition of ions. Under these conditions, a low proportion of folded BMH molecules can dimerize into a stable complex, ensuring

the existence of enough HIV genome dimers for packaging and the generation of infective viral particles.

Acknowledgements

We thank Jordi Gómez for helping during the development of the described experiments. We also thank Vicente Augustin-Vacas for excellent technical assistance. This work was supported by grant BFU2009-0837 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, grant FIPSE 36472/05 and by FEDER funds from the EU to A. B.-H.

References and Notes

1. Kallings, L.O. The first postmodern pandemic: 25 years of HIV/ AIDS. *J. Intern. Med.* **2008**, *263*, 218-243.
2. Berkhout, B. Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1996**, *54*, 1-34.
3. Muriaux, D.; De Rocquigny, H.; Roques, B.P.; Paoletti, J. NCp7 activates HIV-1Lai RNA dimerization by converting a transient loop-loop complex into a stable dimer. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 33686-33692.
4. Huthoff, H.; Berkhout, B. Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *RNA* **2001**, *7*, 143-157.
5. Ooms, M.; Huthoff, H.; Russell, R.; Liang, C.; Berkhout, B. A riboswitch regulates RNA dimerization and packaging in human immunodeficiency virus type 1 virions. *J. Virol.* **2004**, *78*, 10814-10819.
6. Kasprzak, W.; Bindewald, E.; Shapiro, B.A. Structural polymorphism of the HIV-1 leader region explored by computational methods. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 7151-7163.
7. Paillart, J.C.; Dettenhofer, M.; Yu, X.F.; Ehresmann, C.; Ehresmann, B.; Marquet, R. First snapshots of the HIV-1 RNA structure in infected cells and in virions. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 48397-48403.
8. Hampel, A.; Tritz, R.; Hicks, M.; Cruz, P. 'Hairpin' catalytic RNA model: evidence for helices and sequence requirement for substrate RNA. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 299-304.
9. Uhlenbeck, O.C. A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature* **1987**, *328*, 596-600.
10. Haseloff, J.; Gerlach, W.L. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* **1988**, *334*, 585-591.
11. Haseloff, J.; Gerlach, W.L. Sequences required for self-catalysed cleavage of the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Gene* **1989**, *82*, 43-52.
12. Ruffner, D.E.; Stormo, G.D.; Uhlenbeck, O.C. Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction. *Biochemistry* **1990**, *29*, 10695-10702.
13. Pérez-Ruiz, M.; Barroso-DelJesus, A.; Berzal-Herranz, A. Specificity of the hairpin ribozyme. Sequence requirements surrounding the cleavage site. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 29376-29380.
14. Berzal-Herranz, A.; Joseph, S.; Chowrira, B.M.; Butcher, S.E.; Burke, J.M. Essential nucleotide sequences and secondary structure elements of the hairpin ribozyme. *EMBO J.* **1993**, *12*, 2567-2573.

15. Khan, A.U. Ribozyme: a clinical tool. *Clin. Chim. Acta* **2006**, *367*, 20-27.
16. Puerta-Fernández, E.; Barroso-delJesus, A.; Romero-López, C.; Tapia, N.; Martínez, M.A.; Berzal-Herranz, A. Inhibition of HIV-1 replication by RNA targeted against the LTR region. *AIDS* **2005**, *19*, 863-870.
17. Barroso-DelJesus, A.; Puerta-Fernández, E.; Tapia, N.; Romero-López, C.; Sánchez-Luque, F.J.; Martínez, M.A.; Berzal-Herranz, A. Inhibition of HIV-1 replication by an improved hairpin ribozyme that includes an RNA decoy. *RNA Biol.* **2005**, *2*, 75-79.
18. Puerta-Fernández, E.; Barroso-delJesus, A.; Romero-López, C.; Berzal-Herranz, A. HIV-1 TAR as anchoring site for optimized catalytic RNAs. *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 343-350.
19. Good, P.D.; Krikos, A.J.; Li, S.X.; Bertrand, E.; Lee, N.S.; Giver, L.; Ellington, A.; Zaia, J.A.; Rossi, J.J.; Engelke, D.R. Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei. *Gene Ther.* **1997**, *4*, 45-54.
20. Chang, K.Y.; Tinoco, I., Jr. The structure of an RNA "kissing" hairpin complex of the HIV TAR hairpin loop and its complement. *J. Mol. Biol.* **1997**, *269*, 52-66.
21. Franch, T.; Gerdes, K. U-turns and regulatory RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* **2000**, *3*, 159-164.
22. Hoglund, S.; Ohagen, A.; Goncalves, J.; Panganiban, A.T.; Gabuzda, D. Ultrastructure of HIV-1 genomic RNA. *Virology* **1997**, *233*, 271-279.
23. Marquet, R.; Baudin, F.; Gabus, C.; Darlix, J.L.; Mougél, M.; Ehresmann, C.; Ehresmann, B. Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: stimulation by cations and possible mechanism. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 2349-2357.
24. Vrolijk, M.M.; Ooms, M.; Harwig, A.; Das, A.T.; Berkhout, B. Destabilization of the TAR hairpin affects the structure and function of the HIV-1 leader RNA. *Nucleic Acid Res.* **2008**, *36*, 4352-4363.
25. Wathelet, M.; Moutschen, S.; Defilippi, P.; Cravador, A.; Collet, M.; Huez, G.; Content, J. Molecular cloning, full-length sequence and preliminary characterization of a 56-kDa protein induced by human interferons. *Eur. J. Biochem.* **1986**, *155*, 11-17.
26. Guo, J.; Peters, K.L.; Sen, G.C. Induction of the human protein P56 by interferon, double-stranded RNA, or virus infection. *Virology* **2000**, *267*, 209-219.



HIV RNA dimerisation interference by antisense oligonucleotides targeted to the 5' UTR structural elements

José A. Reyes-Darias, Francisco J. Sánchez-Luque, Alfredo Berzal-Herranz*

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (IPBLN-CSIC), Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Av. del Conocimiento s/n, Armilla, 18100 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2012

Received in revised form 29 June 2012

Accepted 7 July 2012

Available online 20 July 2012

Keywords:

HIV-1

RNA dimerisation

Genomic RNA structural domains

Antiviral antisense ODNs

Anti-HIV targets

ABSTRACT

The HIV-1 genome consists of two identical RNA molecules non-covalently linked by their 5' untranslated regions (5' UTR). The high level of sequence and structural conservation of this region correlates with its important functional involvement in the viral cycle, making it an attractive target for antiviral treatments based on antisense technology. Ten unmodified DNA antisense oligonucleotides (ODNs) targeted against different conserved structural elements within the 5' UTR were assayed for their capacity to interfere with HIV-1 RNA dimerisation, inhibit gene expression, and prevent virus production in cell cultures. The results show that, in addition to the well-characterised dimerisation initiation site (DIS), targeting of the AUG-containing structural element may reflect its direct role in HIV-1 genomic RNA dimerisation *in vitro*. Similarly, blocking the 3' end sequences of the stem-loop domain containing the primer binding site interferes with RNA dimerisation. Targeting the apical portion of the TAR element, however, appears to promote dimerisation. ODNs targeted against the conserved polyadenylation signal [Poly(A)], the primer binding site (PBS), the major splicing donor (SD) or the major packaging signal (Psi), and AUG-containing structural elements led to a highly efficient inhibition of HIV-1 gene expression and virus production in cell culture. Together, these results support the idea that ODNs possess great potential as molecular tools for the functional characterisation of viral RNA structural domains. Moreover, the targeting of these domains leads to the potent inhibition of viral replication, underscoring the potential of conserved structural RNA elements as antiviral targets.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The genomes of RNA viruses are multifunctional molecules. In retroviruses, including human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), they function as both mRNA and genomic RNA (gRNA). Infective HIV-1 viral particles contain two identical, non-covalently linked gRNA molecules that bind in a process known as genomic RNA dimerisation (Paillart et al., 2004). It has been reported that RNA dimers are preferentially packaged over monomeric RNA genomes (Darlix et al., 1990; Fu and Rein, 1993). The dimeric state also facilitates template switching during reverse transcription, thus avoiding the problems that could be caused by any physical damage to one of the RNA monomers. It also favours recombination, increasing the genetic diversity and adaptability of retroviruses (Gotte et al., 1999). Electron microscopy studies of packaged retroviral gRNAs have revealed that the two RNA molecules attach to each other through the dimer linkage structure (DLS) in their 5' ends (Bender and Davidson, 1976; Hoglund et al., 1997). Using *in vitro*-transcribed short RNAs corresponding to various lengths

of HIV-1 gRNA, it has been shown that the DLS includes the first 311 nucleotides of the HIV-1 5' UTR (Marquet et al., 1994). This 5' UTR is predicted to fold into a highly ordered secondary structure that has been experimentally modelled by computational, phylogenetic, biochemical and mutational probing studies (Damgaard et al., 2004; Kasprzak et al., 2005). Although minor variations exist, the consensus structure involves seven structural stem-loop motifs that represent independent functional elements (Fig. 1): the trans-activation region (TAR), the polyadenylation signal [Poly(A)], the primer binding site (PBS), the dimerisation initiation site (DIS or SL1), the major splice donor site (SD or SL2), the genomic packing signal (Psi, ψ or SL3) and a stem-loop containing the AUG initiation codon of the Gag open reading frame (AUG or SL4) (Berkhout, 1996). Mutational analysis indicates that the DIS domain is the most important element involved in *in vitro* dimerisation (Laughrea and Jette, 1994; Muriaux et al., 1995; Paillart et al., 1994; Skripkin et al., 1994). Full-length leader RNA can adopt two alternative forms *in vitro*: the thermodynamically favoured leader RNA structure conformation, known as the long distance interaction (LDI) since it involves long distance base pairing between the Poly(A) and DIS (Huthoff and Berkhout, 2001); and the branched multiple hairpins (BMH) conformation. The folding of the BMH exposes the DIS-containing hairpin structure, which has a 6-mer palindromic

* Corresponding author. Tel.: +34 958 181 648; fax: +34 958 181 632.

E-mail address: aberzalh@ipb.csic.es (A. Berzal-Herranz).

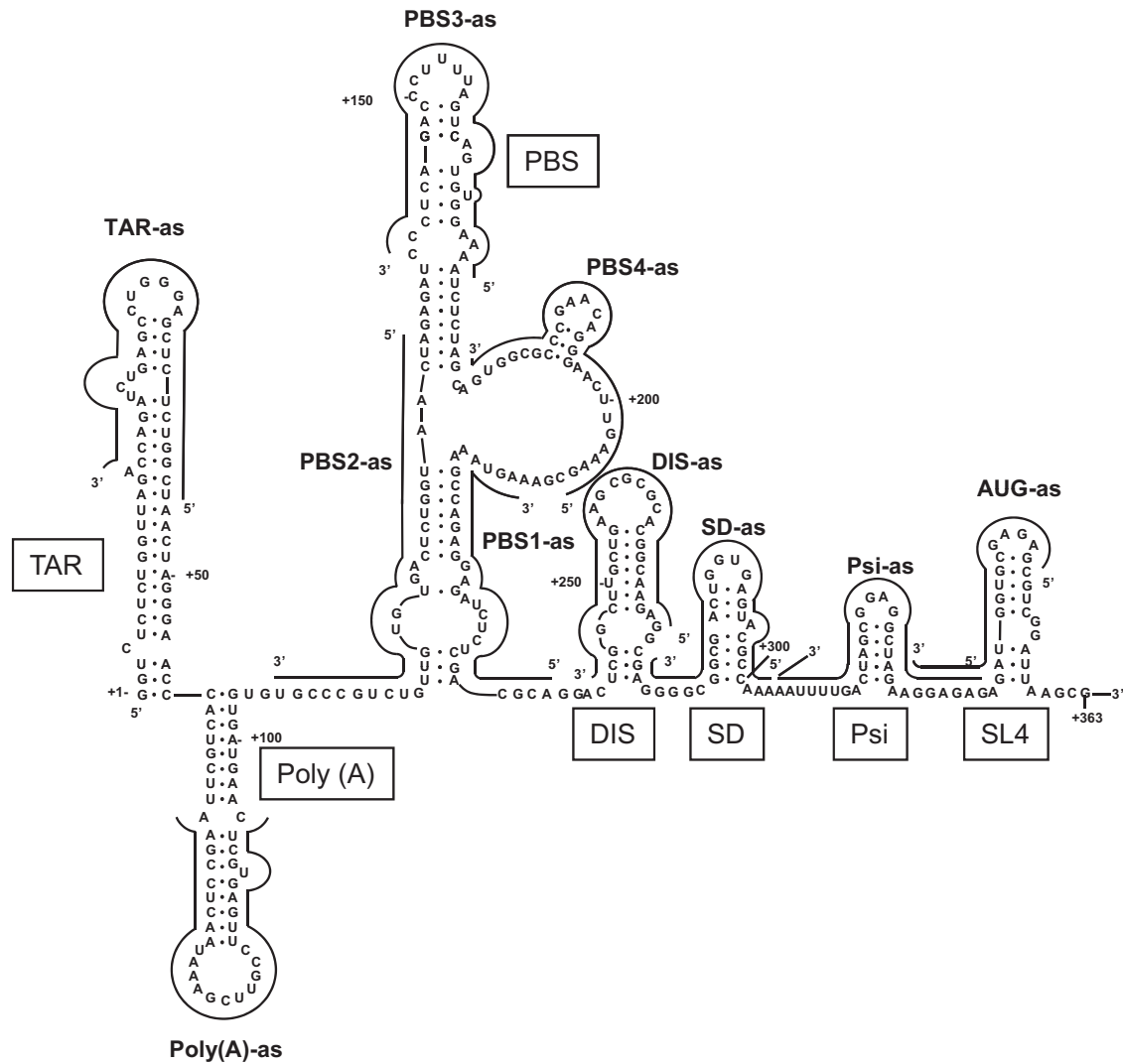


Fig. 1. Sequence and secondary structure of the 5' UTR of HIV-1. Sequence and secondary structural model of the 5' UTR of the HIV-1 gRNA adapted from Berkhout (1996). The main stem-loop structural domains associated with known functions are shown. Antisense ODNs are indicated by a solid line mapping their corresponding complementary target sequences within the HIV-1 5' UTR.

sequence closing loop (GCGCGC) important in RNA dimerisation. It has been described that only the BMH conformer can dimerise via an intermolecular interaction between the palindromes of two DIS elements (Clever et al., 1996; Haddrick et al., 1996; Laughrea and Jette, 1994; Muriaux et al., 1995; Paillart et al., 1994; Skripkin et al., 1994). This initial structure is termed the kissing loop dimer complex, which subsequently progresses to a more stable extended duplex involving other nucleotides (Laughrea and Jette, 1996a,b; Muriaux et al., 1996). Recent studies indicate that gRNA dimerisation can be achieved without a functional DIS (Clever and Parslow, 1997; Laughrea et al., 1997; Shen et al., 2000, 2001). This suggests that one or more DIS-independent dimerisation sites exist in HIV-1 gRNA, though their precise molecular location remains unclear. Moreover, the originally identified DLS-encompassing sequence, which included bases 1–311 of the HIV-1 5' UTR, has undergone some refinement. Sakuragi et al. (2007) traced the sequence requirements of the DLS to a non-contiguous 144 nt region, consisting of sequences from the junction between the Poly(A) and PBS elements to the end of the AUG-containing stem-loop (more specifically, nucleotide sequences 105–130, 217–281 and 301–352 of the HBX2 strain of HIV-1). The roles of these regions in RNA-RNA interactions are still to be properly defined.

Synthetic oligodeoxynucleotides (ODNs) complementary to HIV-1 RNA, and their derivatives, have great potential as tools for investigating the molecular biology of functional RNA elements. In their simplest form, these ODNs are introduced into the cell to block gene expression by interfering with translation of mRNA or by promoting the degradation of the target RNA via an RNase H-dependent pathway. Targeting with antisense ODNs can also provide information on the structure of a target RNA and can be used to block the access of other molecules to specific nucleic acid sequences. Traditionally, researchers attempting to inhibit gene expression with antisense ODNs avoid targeting regions with a stable secondary structure. However, since stable structural RNA domains coincide with important functional elements, they represent potential targets for efficient inhibition. The binding of oligonucleotides to regions in the RNA that are predominantly double-stranded has previously been reported to be associated with a strong antisense response *in vivo* (Laptev et al., 1994). The present study examines the potential of a set of unmodified antisense ODNs directed against the different stem-loop structural elements of functional importance within the 5' UTR of HIV-1 gRNA, in the analysis of RNA dimerisation *in vitro*. It also examines the capacity of these ODNs

to inhibit HIV-1 proliferation and gene expression in cell cultures.

2. Materials and methods

2.1. Antisense and control oligonucleotides

ODNs were synthesised using an automated Applied Biosystems 3400 DNA synthesiser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using standard phosphoramidite chemistry. All ODNs were designed as 30 nt-long molecules, except for the 25 nt-long AUG-as complementary to a specific target site within the HIV-1 5' UTR genomic RNA. All were named according to their target site (Table 1). Two control, non-specific oligonucleotides were designed: pLCX-30, which is complementary to no sequence motif of the HIV-1 genome, and a 30 nt-long random sequence (theoretically containing 7.2×10^{16} sequences).

2.2. DNA templates and RNA synthesis

The DNA template for the synthesis of the HIV-1 5' UTR genomic RNA fragment was obtained by PCR amplification of the pUC18-based pNL4-3 plasmid (Adachi et al., 1986). A T7 RNA-polymerase promoter sequence was incorporated by the sense PCR primer 5'-T7pNL4-3: 5'-**TAATACGACTCACTATAGGGTCTCT** CTGGTTAG-3' (the T7 promoter is indicated in bold). The 3'pNL4-3-gag GCTTAATACCGACGCTCTC was used as a reverse PCR primer. The HIV-1_{NL4-3} 5' UTR RNA fragment containing nucleotides 1–357 was obtained by *in vitro* transcription of the gel-purified PCR product, and purified as previously described (Barroso-delJesus et al., 1999). RNA was renatured by heating to 85 °C followed by slow cooling to room temperature prior to use.

2.3. In vitro RNase H cleavage assay

Before digestion with *Escherichia coli* RNase H, 0.5 nM of 5' end ³²P-labelled RNA transcript was renatured in 10× RNase H buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.8, 400 mM KCl, 80 mM MgCl₂, 10 mM DTT) by heating at 65 °C for 3 min followed by slow cooling to room temperature. The RNA transcript was incubated separately with each oligonucleotide (1 μM) for 30 min at 37 °C. Subsequently, 5 U of RNase H (Ambion, Austin, TX) was added to the mixtures and incubated at 37 °C for 20 min. The reactions were quenched with equal volumes of 2× formamide gel loading buffer and loaded onto a 7 M urea 6% polyacrylamide denaturing gel in 1× TBE buffer. After electrophoretic resolution of the digestion products at 20 mA for approximately 90 min, the gel was vacuum dried and analysed using a Typhoon 9400 scanner (GE Healthcare).

2.4. In vitro dimerisation assay

Four picomoles of unlabelled HIV-1_{NL4-3} 5' UTR transcript were added to 8 μl of Milli-Q (Millipore, Rockland, MA) water containing 0.05 pmol of radiolabelled HIV_{NL4-3}-5' UTR and 50 pmol of individual unlabelled antisense oligonucleotides or combinations of antisense oligonucleotides (50 pmol of each ODN included). Samples were denatured at 95 °C (2 min) and snap-cooled on ice. Dimerisation reactions were performed as described by Sánchez-Luque et al. (2010). Briefly, the dimerisation reaction was initiated by adding 2 μl of 5× dimer buffer (1×: 50 mM sodium cacodylate, pH 7.5, 300 mM KCl and 5 mM MgCl₂) at 37 °C for 45 min and then stopped by the addition of 2× gel loading buffer (Tris-acetate 20 mM, Mg acetate 10 mM, NaCl 0.1 M, glycerol 30%, v/v, xylene cyanol 0.4%, p/v, bromophenol blue 0.4%, p/v, tRNA 4%, p/v). In parallel, RNA 1–357 was incubated in monomerisation buffer (50 mM sodium cacodylate, pH 7.5, 40 mM KCl and 0.1 mM MgCl₂).

Samples were analysed on 1% agarose gels in 1× TBM buffer (0.5× Tris-borate, 0.1 mM MgCl₂). Electrophoresis (100 V) was performed in the same buffer at 4 °C for 2.5 h. Gels were fixed with 10% trichloroacetic acid for 10 min, dried for 1 h under vacuum at room temperature, and exposed to phosphorimager screens from 4 h to 'overnight'. The dimerisation efficiency was calculated as [dimer × 100/(dimer + monomer)]. Data are expressed at the mean ± standard deviation of three independent experiments.

2.5. Cell culture and transfection

The human embryonic kidney (HEK) cell-line 293T was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS; Gibco Invitrogen, San Diego, CA, USA), 100 μg/ml streptomycin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), 4 mM L-glutamine (Sigma) and 1 mM sodium pyruvate (Sigma). Human T lymphocyte Jurkat cells were maintained in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS (Gibco), 4 mM L-glutamine (Sigma) and 100 μg/ml Streptomycin (Sigma). All cells were incubated at 37 °C under humidified air containing 5% CO₂.

For the transfection of the HEK 293 T cells, 1×10^5 cells were seeded in 1 ml of DMEM in 24-well culture plates. For the transfection of the Jurkat cells, 5×10^5 cells were seeded in 1 ml of RPMI. Both cell lines were co-transfected with 100 pmol (0.2 μM) of the ODNs and 100 ng of pNL4-3 plasmid complexed with 1 μl Fugene HD (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). At 6 h post-transfection, the HEK 293T cells were provided with fresh growth medium (to remove the transfection mixture) and further incubated at 37 °C for 48 h. For the Jurkat cells, the transfection mixture was replaced by fresh growth medium after 4 h. Cells incubated with Fugene HD or medium alone were used as controls. The expression and replication of the HIV-1 proviral clones were then monitored by determining viral p24 antigen in culture supernatants using an enzyme immunoassay (EIA, Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA) and employing a Molecular Devices microplate reader. The results were expressed as the mean ± standard deviation of at least three independent determinations.

2.6. Quantitative real-time RT-PCR assays

Quantitative real time RT-PCR analysis was performed 48 h after co-transfection. Total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen, San Diego, CA) according to the manufacturer's protocol. To remove potentially contaminating genomic DNA, all RNA samples were digested with RNase-free RQ1 DNase (Promega, Madison, WI, USA) at 37 °C for 30 min followed by phenol-chloroform extraction. Total RNA (1 μg) was reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) and random hexamers, according to the manufacturer's instructions. The cDNA was used as a template for quantitative qRT-PCR analysis using iTaq Fast SYBR Green Supermix with ROX (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), following the manufacturer's recommended conditions. Gene expression was normalised to the GAPDH expression levels for data analysis of each sample. The calibrator sample in real-time PCR was the cDNA from HEK 293 T cells co-transfected with pLCX-30. Data was analysed using the comparative cycle threshold (Ct) method, as described (Livak and Schmittgen, 2001).

3. Results

3.1. Accessibility of structural HIV-1 5' UTR functional domains to specific antisense ODNs

Target accessibility is a critical limitation of antisense applications. A set of antisense ODNs targeting the different structural RNA elements within the 5' UTR of HIV-1 RNA was designed (Table 1;

Table 1
Antisense and control ODN sequences used in this study. The nt coordinates of the binding sites are based on Fig. 1. N = A, C, G, or T.

ODN	Sequence (5'–3')	HIV-1 _{NL4-3} 5' UTR binding site
pLCX-30 (control)	GACGTCGAGTGCCCGAAGGATAGCTATCAG	–
Random-30 (control)	N ₃₀	–
TAR-1-as	AGCCAGAGAGCTCCAGGCTCAGATCTGGT	16–45
Poly(A)-as	GAGCACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGGCTT	95–66
PBS1-as	TGCGTCGAGAGATCTCTCTGGCTTACTT	210–239
PBS2-as	TAGTTACCAGAGTACACAACAGACGGGCA	107–136
PBS3-as	TTT TCCACACTGACTAAAAGGGTCTGAGGG	142–171
PBS4-as	GCTTCAAGTCCCTGTTCGGGCGCCACTGC	178–207
DIS-as	CTCTTGCCGTGCGCGCTTACAGCAAGCCGAG	243–252
SD-as	TTTGCGCTACTACCAAGTCCGCCCTCTCG	274–303
Psi-as	CTC TCCTTCTAGCTCCGCTAGTCAAAT	304–333
AUG-as	CTCTCGACCATCTCTCTCTCT	325–348

Fig. 1). Access to the targeted genomic RNA domains by the ODNs was tested by RNase H digestion. For this, a 5' end ³²P-labelled HIV-1-RNA fragment containing the first 357 nucleotides of HIV-1 gRNA was *in vitro* synthesised and subjected to RNase H digestion in the absence or presence of a molar excess of unlabelled antisense ODNs (Fig. 2). Complete cleavage of the 5' UTR of HIV-1 gRNA was observed in the presence of the oligonucleotides TAR-as, PBS1-as, PBS2-as, PSB3-as, PSB4-as, SD-as, Psi-as and AUG-as, while cleavage efficiency was reduced to 71.4% and 86.8% in the presence of Poly(A)-as or DIS-as. These results indicate that the different targeted sequences within the HIV-1 5' UTR structural elements are accessible to their specific ODNs. No cleavage products were detected in the presence of the negative control ODNs pLCX-30 and Random-30.

3.2. Effect of the 5' UTR-antisense ODNs on the *in vitro* dimerisation of HIV-1 RNA

In vitro RNA dimerisation assays were performed in the presence of the specific antisense ODNs targeting each of the functional elements within the 5' UTR, in order to analyse their putative role in this essential viral process. Briefly, 50 pmol of each antisense

ODN was independently incubated with 4 pmol of unlabelled HIV-1 RNA 1–357, contaminated with traces of internally ³²P-labelled HIV-1 RNA 1–357 (see Section 2), which includes the entire 5' UTR and the first 22 nucleotides of *gag* ORF, under the dimerisation conditions described in Section 2 (Fig. 3). Under these high ionic strength conditions, ≥60% of the 1–357 transcripts entered into a dimer complex (under low ionic strength the monomer status is entirely predominant; no dimers are detected). As expected, nearly complete inhibition of dimer formation was observed in the presence of the DIS antisense ODN (DIS-as), confirming the DIS element to be the major dimerisation site and corroborating previous observations suggesting dimerisation to be essentially governed by the DIS element taking part in a reversible apical loop–apical loop interaction (Paillart et al., 1996). Strong dimerisation inhibition was also detected when blocking the SD domain with the corresponding antisense ODN (only 24% dimerisation was seen in the presence of SD-as). RNA dimerisation inhibition was also observed with ODNs complementary to the Psi and AUG regions (Fig. 3, lanes 13 and 14). These results indicate the potential involvement of the SD, Psi and AUG elements in RNA dimerisation. Surprisingly, a larger RNA dimerisation yield (93%) was obtained in the presence of the anti-TAR ODN (TAR-as). This suggests that the TAR element has a negative effect on RNA dimerisation. Similarly, an increase in the dimer yield was observed in the presence of Poly(A)-as, PBS1-as and PBS4-as. No effect was observed in the presence of PBS2-as or PBS3-as (Fig. 3, lanes 8 and 9), nor in the presence of the control ODNs pLCX-30-as and Random-30-as.

3.3. Interference of the RNA dimerisation by targeting the AUG-containing structural element

A number of authors have indicated that dimerisation can take place in the absence of a functional DIS element. This suggests that other elements act as secondary dimerisation initiation sites (Berkhout, 1996; Haddrick et al., 1996; Sakuragi and Panganiban, 1997; Shen et al., 2000) but whose contribution goes unnoticed in the presence of a functional DIS element. The role in dimerisation of the different structural elements within the 5' UTR was therefore examined in a DIS-depleted functional background. For this, *in vitro* dimerisation was assayed in the presence of a combination of specific ODNs and DIS-as (to obtain the required background) (Fig. 4). No inhibitory effect beyond that associated with DIS-as was observed with the addition of the ODNs SD-as or Psi-as (Fig. 4; compare lanes 5 and 6 to lane 4), suggesting that SD and Psi played no direct or DIS-independent role in RNA dimerisation. Interestingly, the subsequent addition of AUG-as abolished the formation of RNA dimers (Fig. 4, lane 7). This, together with the partial inhibitory effect observed when blocking only the AUG region (Fig. 3, lane 14), suggests that the AUG region may play a direct role in RNA dimerisation, though we cannot rule out the possibility of an indirect effect on dimerisation due to the induction of structural modifications in

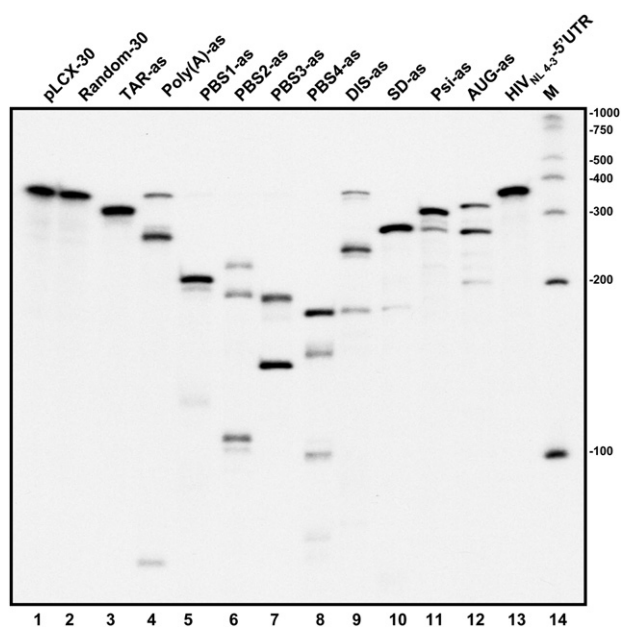


Fig. 2. Accessibility of target structural domains within the HIV-1 5' UTR. Representative autoradiograph of an electrophoretic gel resolving the RNase H-cleaved RNA fragments of the HIV-1 5' UTR in the presence of different antisense ODNs (indicated at the top of each lane). Lane 13: undigested full length ³²P-labelled HIV-1 5' UTR transcript. M: RNA size marker (Century marker, Ambion).

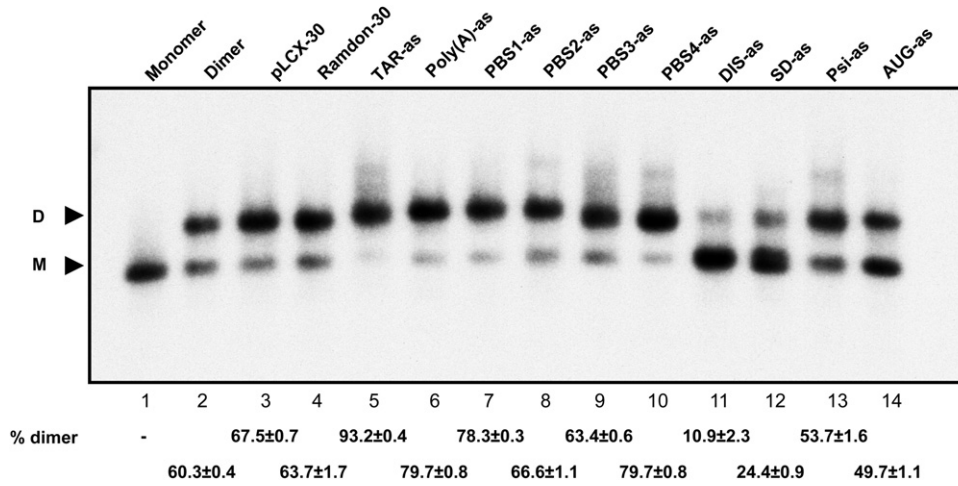


Fig. 3. *In vitro* effect of antisense oligonucleotides on the dimerisation of HIV-1 gRNA. Autoradiograph of a representative electrophoretic gel from an RNA dimerisation assay. HIV-1 5' UTR transcript (1–357 nt) was incubated under monomerisation (lane 1) and dimerisation conditions in the absence (lane 2) and presence of specific antisense ODNs (indicated at the top of the gel). The positions of dimer (D) and monomer (M) RNA species are indicated with arrowheads to the left of the gel. Dimerisation efficiency, indicated at the bottom, represents the average of three independent experiments ±SD.

the HIV RNA. Finally, the addition of TAR-as (Fig. 4, lane 8) partially restored the dimerisation capability of the gRNA, which is in good agreement with results shown in Fig. 3.

3.4. Involvement of the PBS element in RNA dimerisation

An analysis of the potential role in RNA dimerisation of the structural domain containing the PBS element was undertaken in a DIS-blocked background (Fig. 5). The addition of PBS1-as or PBS4-as resulted in no significant effect (compare lanes 3 and 6 with lane 2). However, a clear promotion of RNA dimerisation was observed in the presence of PBS2-as or PBS3-as or both. These results indicate that their nt 107–136 and 142–171 target regions might negatively affect dimerisation. Interestingly, when PBS2-as

and/or PBS3-as were combined with PBS1-as, but not with PBS4-as, the efficiency of dimerisation was inhibited. This suggests that the target sequence of the PBS1-as (nt 210–239) in the structural motif-containing the PBS element may play a direct role in promoting HIV-1 gRNA dimerisation.

3.5. Inhibition of HIV-1 production and gene expression by antisense oligonucleotides

All the targeted HIV-1 structural elements play essential roles in the viral cycle. Since the antisense ODNs bound efficiently to the different functional 5' UTR structural elements, their effect on viral particles production and HIV-1 gene expression in cell culture was also tested. For this, HEK 293 T and Jurkat cells were co-transfected

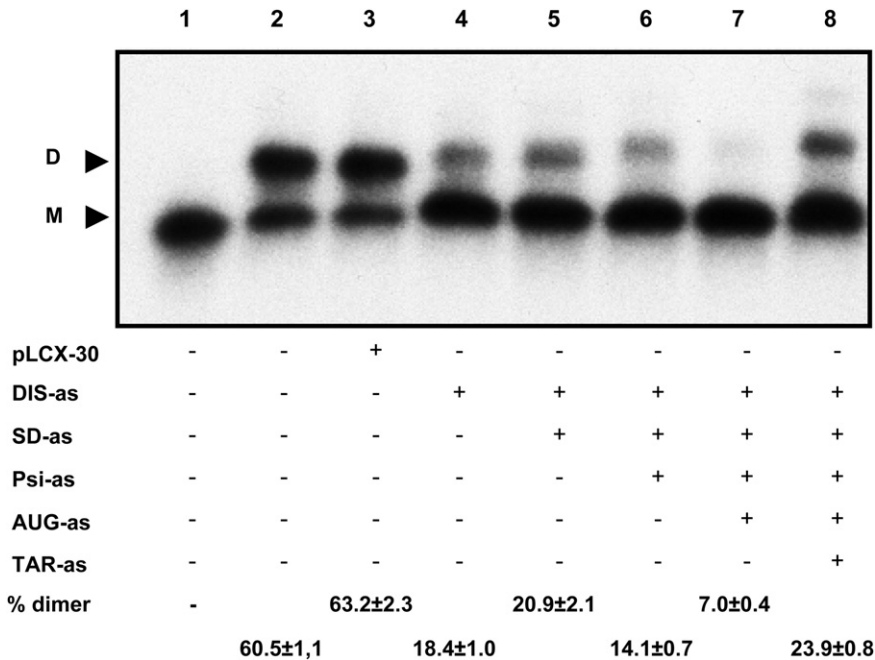


Fig. 4. The AUG-containing structural domain promotes HIV-1 RNA dimerisation. Autoradiograph of a representative electrophoretic gel from an RNA dimerisation assay. HIV-1 5' UTR transcript (1–357 nt) was incubated under dimerisation conditions in the presence (+) or absence (-) of different combinations of antisense ODNs (indicated at the bottom of the gel). The positions of monomer (M) and dimer (D) RNA species are indicated with arrowheads at the left. Lane 1, HIV-1 5' UTR transcript incubated under monomeric conditions. Dimerisation efficiency, indicated at the bottom, represents the average of three independent experiments ±SD.

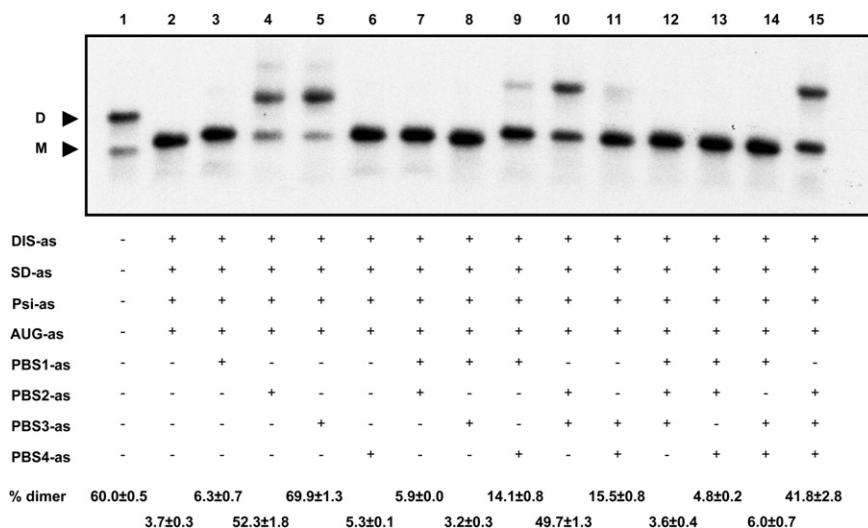


Fig. 5. The 3' end sequence of the PBS-containing structural domain promotes HIV-1 RNA dimerisation. Autoradiograph of a representative electrophoretic gel from an RNA dimerisation assay. HIV-1 5' UTR transcript (1–357 nt) was incubated under dimerisation conditions in the presence (+) or absence (–) of different combinations of antisense ODNs (indicated at the bottom of the gel). The positions of monomer (M) and dimer (D) RNA species are indicated with arrowheads at the left. Dimerisation efficiency, indicated at the bottom represents the average of at least three independent experiments \pm SD.

with the pNL4-3 plasmid and a set of specific ODNs. Transfection with pro-viral DNA mimics the post-integration stage of the viral cycle. The effect of the antisense ODNs measured as viral p24 antigen levels in the supernatant, in both cell lines was quantified at 48 h post-transfection, at which viral particles in the supernatant should correspond to first generation virions. A reduction in viral production was observed with Poly(A)-as, pBS1-as pBS2-as, pBS3-as, SD-as and Psi-as (Fig. 6), whereas no inhibitory effect was seen for TAR-as, PBS4-as or DIS-as. These results suggest that Poly(A)-as, pBS1-as pBS2-as, pBS3-as, SD-as and Psi-as are functional in cells of lymphoid origin, and highlight the potential of the motifs they seek out as antiviral targets in human T cell cultures.

Antisense activity might be achieved through RNase H-mediated degradation of the target RNA. To confirm that the ODNs reduced the steady-state levels of HIV-1 RNA in co-transfected HEK 293T cells, HIV-1 5' UTR RNA was quantified by real time RT-PCR at 48 h post-transfection. The results in Fig. 7 show a significant reduction in viral RNA after transient transfection with Poly(A)-as, pBS1-as pBS2-as, pBS3-as, SD-as, Psi-as and AUG-as; this correlates perfectly with the reduction seen in viral p24 antigen levels (Fig. 6).

4. Discussion

A major concern in the design of efficient antisense ODNs against highly structured viral RNA genomes is the accessibility of the target sequences. A correlation between *in vitro* accessibility and the intracellular activity of antisense ODNs has been reported for several target RNAs (Ho et al., 1996, 1998; Matveeva et al., 1997; Southern et al., 1997). Since the HIV-1 5' UTR is folded into a complex secondary and tertiary structure, it might be thought that many potential target sites become inaccessible. However, the present results indicate that the different structural elements of the 5' UTR remain accessible to antisense ODNs (Fig. 2). The partial discrepancies with the results of other authors (Ooms et al., 2004) in terms of 5' UTR accessibility may be due to differences in the experimental conditions, the length of the oligonucleotides used, or differences in the target sequences.

Deletions that affect the TAR element are thought to result in increased *in vitro* HIV-1-RNA dimerisation (Vrolijk et al., 2008). This would agree with the effects observed in the present work when TAR-as was introduced into the system (Fig. 3, lane 5; Fig. 4,

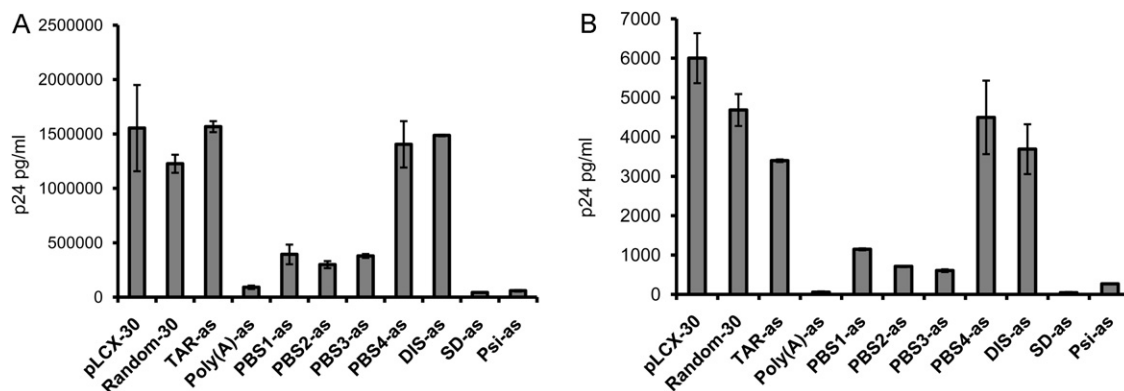


Fig. 6. Inhibition of HIV-1 replication in human cells. (A) HEK 293T and (B) Jurkat cells were co-transfected with 100 ng of pNL4-3 plasmid and 100 pmol of control or antisense ODNs. Viral production was determined by measuring viral p24 antigen in the supernatant 48 h after co-transfection. The data shown represent the average of at least three independent experiments; standard deviations are indicated by the error bars.

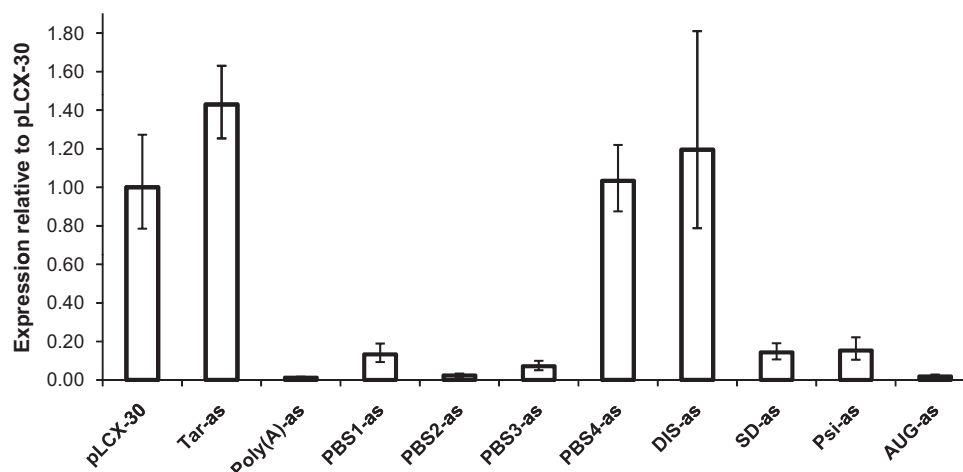


Fig. 7. Reduction of HIV-1 RNA levels in human cells by antisense ODNs. HEK 293T cells were co-transfected with 100 ng of pNL4-3 plasmid and 100 pmol of antisense ODNs. After 48 h of co-transfection, total RNA was extracted from the HEK 293T cells and the 5' UTR of the HIV-1 RNA content quantified. RNA amounts are represented as a percentage of the RNA level in the presence of the control pLCX-30 ODN. The results are the mean of three independent experiments.

lane 8). Although the TAR element itself is not directly involved in the switch from LDI to BMH conformers – since it is conserved in both conformations – the destabilisation of TAR may affect LDI-BMH equilibrium and thus indirectly influence other functional RNA elements. In contrast to that seen in the present work, evidence exists that the TAR element makes a positive contribution to RNA dimerisation *in vitro* (Andersen et al., 2004). However, the latter authors performed their dimerisation assays in the presence of the nucleocapsid protein, which may explain the lack of agreement with the present data. The validation of these *in vitro* interaction studies in a cellular system that permits viral replication is essential since different long-range RNA-RNA interactions, among other factors, might influence the ability of HIV-1 RNA to dimerise.

DIS-as essentially blocked dimerisation, probably sequestering the palindromic sequences in the DIS loop, and interfering in the kissing-loop interaction. The *in vitro* dimerisation inhibition exerted by SD-as might be a consequence of the close proximity of its 3' end binding site to the highly conserved AGG loop at the base of the DIS element stem (position 271–273), which has been implicated in dimerisation (Clever and Parslow, 1997; Greatorex et al., 2002; Takahashi et al., 2000). SD-as may have also an indirect effect on dimerisation *via* its altering the structure of the DIS element; this may affect the distal-loop sequence involved in the kissing-loop interaction. Blocking of the SD structural domain partially inhibited RNA dimerisation (Fig. 3), but no additional inhibitory effect was observed when it was combined with DIS-as (Fig. 4). Similar behaviour was recorded with respect to the modest inhibition achieved with Psi-as. These results suggest that SD and Psi play no DIS-independent role in RNA dimerisation. According with a previous work describing that destabilisation of the LDI conformer by targeting the 5' UTR with oligonucleotides induced the switch to the BMH dimerisation competent conformer (Berkhout et al., 2002), the ODN effects described here can be attributed to structure alterations challenging the DIS functionality.

Interestingly, the remaining RNA dimerisation activity observed in the presence of DIS-as, SD-as and Psi-as was abolished with the addition of AUG-as (Fig. 4). Since this effect was observed in a DIS-blocked background our data suggest that the sequence surrounding the AUG initiation codon might provide a dimerisation site. Nevertheless we cannot discard an indirect effect of the AUG-as by affecting the structure of the 5' UTR influencing the exposure of a hypothetically remaining functional DIS element responsible of the observed 10% of RNA dimers in the presence of the DIS-as. A long-distance base pairing between the linker sequences of poly(A) and

the PBS elements plus the nucleotides surrounding the AUG Gag initiation codon has been described (Abbink and Berkhout, 2003). The resulting interaction yields the so called U5-AUG duplex. This may explain the present results that suggest the AUG-containing domain might play a direct role in RNA dimerisation. Such a role is supported by the observation that the AUG effect is summatory to that associated with DIS rather than synergistic. DIS-as reduces dimerisation from 60% to 10%, AUG-as from 60% to 50% and both from 60% to 0%, suggesting that the effects of these two regions are independent of one another.

Evidence that the extended PBS-containing stem-loop motif contributes to gRNA dimerisation was first provided by the effect of deleting nt 200–226 or 236–242 in virions produced by Cos-7 cells (Shen et al., 2000). The present results show that while antisense ODNs targeting the 5' strand of the PBS-containing the stem-loop motif have little or no impact on gRNA dimerisation (PBS2-as and PBS3-as), blocking the 3' end nt positions 178–207 and 210–239 segments with PBS4-as and PBS1-as respectively promoted dimerisation in a functional DIS background (Fig. 3). However, in a non-functional DIS background, clear promotion of dimerisation was observed when the region comprised between nt 210 and 239 was accessible (Fig. 5). The negative effect of other regions of the PBS-containing structural motif may be due to the sequestering of the nt 210–239 sequences. Thus it seems necessary to block its complementary sequence with PBS2-as for the promotion of dimerisation by the sequences at the 3' end of the PBS-containing element to occur. It is noteworthy that this region contains an imperfect palindromic sequence (GAGAUCUCUC), and that this might be involved in this process. Further (Sakuragi et al., 2012) have recently found highly conserved complementary sequences located upstream of the DIS stem (GACGC) and at the 3' end of the DLS (GCGUC). Their data strongly suggest that both sequences interact and the duplex formation (GACGC–GCGUC) occurs within the virus playing an important role for DLS function. Interestingly, in our dimerisation assays the sequence GACGC is blocked by the PSB1-as. In a functional DIS background the opposite effect to that observed with PBS1-as and PBS4-as may be due to the stabilisation of the functional DIS structural motif.

In addition to their effect on dimerisation, the assayed antisense ODNs may interfere with other essential steps in the viral cycle. This would explain the significant antiviral activity of Poly(A)-as, PBS1-as, PBS2-as, PBS3-as, SD-as, Psi-as and AUG-as observed in cell culture. Antisense ODNs targeting the PBS1, PBS2 or PBS3 sequences may interfere with tRNA binding to the PBS motif and

the subsequent initiation of reverse transcription. SD-as covers the major splice donor site and may therefore interfere with splice site recognition, but also with RNA packaging since the SD region contributes to this process (Amarasinghe et al., 2000, 2001). Psi-as may interfere with genomic RNA encapsidation. Finally AUG-as may block the HIV translation initiation. Nevertheless we cannot discard an effect of the ODNs on the viral infectious DNA.

5. Conclusions

The present results show that antisense oligonucleotides are excellent tools for deciphering the functional implications of structural RNA domains, and provide evidence that may suggest a direct role of the AUG-containing RNA element and the 3' end sequence of the PBS-containing structural domain in the dimerisation of genomic HIV-1 RNA. In contrast, the apical portion of the TAR stem-loop element seems to play a negative role in RNA dimerisation. ODNs are also shown to be excellent tools for exploring the potential of conserved structural RNA elements as antiviral targets.

Acknowledgements

The authors thank Drs. Jordi Gómez and Cristina Romero-López for critically reading the manuscript and offering valuable suggestions and Dr. Francisco Muñoz for helping in the preparation of Fig. 1. We are also indebted to Vicente Augustin Vacas for excellent technical assistance. This work was supported by grants BFU2006-02508 and BFU2009-08137 from the Spanish *Ministerio de Ciencia e Innovación*, FIPSE 36472/05 to A. B-H. J.A.R-D. was funded by grant 36472/05 from the FIPSE. Work at our laboratory is partially supported by FEDER funds from the EU.

References

- Abbink, T.E., Berkhout, B., 2003. A novel long distance base-pairing interaction in human immunodeficiency virus type 1 RNA occludes the Gag start codon. *Journal of Biological Chemistry* 278 (13), 11601–11611.
- Adachi, A., Gendelman, H.E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A., Martin, M.A., 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *Journal of Virology* 59 (2), 284–291.
- Amarasinghe, G.K., De Guzman, R.N., Turner, R.B., Chancellor, K.J., Wu, Z.R., Summers, M.F., 2000. NMR structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to stem-loop SL2 of the psi-RNA packaging signal. Implications for genome recognition. *Journal of Molecular Biology* 301 (2), 491–511.
- Amarasinghe, G.K., Zhou, J., Miskimon, M., Chancellor, K.J., McDonald, J.A., Matthews, A.G., Miller, R.R., Rouse, M.D., Summers, M.F., 2001. Stem-loop SL4 of the HIV-1 psi RNA packaging signal exhibits weak affinity for the nucleocapsid protein. Structural studies and implications for genome recognition. *Journal of Molecular Biology* 314 (5), 961–970.
- Andersen, E.S., Contera, S.A., Knudsen, B., Damgaard, C.K., Besenbacher, F., Kjems, J., 2004. Role of the trans-activation response element in dimerization of HIV-1 RNA. *Journal of Biological Chemistry* 279 (21), 22243–22249.
- Barroso-delJesus, A., Tabler, M., Berzal-Herranz, A., 1999. Comparative kinetic analysis of structural variants of the hairpin ribozyme reveals further potential to optimize its catalytic performance. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 9 (5), 433–440.
- Bender, W., Davidson, N., 1976. Mapping of poly(A) sequences in the electron microscope reveals unusual structure of type C oncornavirus RNA molecules. *Cell* 7 (4), 595–607.
- Berkhout, B., 1996. Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 54, 1–34.
- Berkhout, B., Ooms, M., Beerens, N., Huthoff, H., Southern, E., Verhoef, K., 2002. In vitro evidence that the untranslated leader of the HIV-1 genome is an RNA checkpoint that regulates multiple functions through conformational changes. *Journal of Biological Chemistry* 277 (22), 19967–19975.
- Clever, J.L., Parslow, T.G., 1997. Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. *Journal of Virology* 71 (5), 3407–3414.
- Clever, J.L., Wong, M.L., Parslow, T.G., 1996. Requirements for kissing-loop-mediated dimerization of human immunodeficiency virus RNA. *Journal of Virology* 70 (9), 5902–5908.
- Damgaard, C.K., Andersen, E.S., Knudsen, B., Gorodkin, J., Kjems, J., 2004. RNA interactions in the 5' region of the HIV-1 genome. *Journal of Molecular Biology* 336 (2), 369–379.
- Darlix, J.L., Gabus, C., Nugeyre, M.T., Clavel, F., Barre-Sinoussi, F., 1990. Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *Journal of Molecular Biology* 216 (3), 689–699.
- Fu, W., Rein, A., 1993. Maturation of dimeric viral RNA of Moloney murine leukemia virus. *Journal of Virology* 67 (9), 5443–5449.
- Gotte, M., Li, X., Wainberg, M.A., 1999. HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure–function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 365 (2), 199–210.
- Greatorex, J., Gallego, J., Varani, G., Lever, A., 2002. Structure and stability of wild-type and mutant RNA internal loops from the SL-1 domain of the HIV-1 packaging signal. *Journal of Molecular Biology* 322 (3), 543–557.
- Haddrick, M., Lear, A.L., Cann, A.J., Heaphy, S., 1996. Evidence that a kissing loop structure facilitates genomic RNA dimerisation in HIV-1. *Journal of Molecular Biology* 259 (1), 58–68.
- Ho, S.P., Bao, Y., Leshner, T., Malhotra, R., Ma, L.Y., Fluharty, S.J., Sakai, R.R., 1998. Mapping of RNA accessible sites for antisense experiments with oligonucleotide libraries. *Nature Biotechnology* 16 (1), 59–63.
- Ho, S.P., Britton, D.H., Stone, B.A., Behrens, D.L., Leffet, L.M., Hobbs, F.W., Miller, J.A., Trainor, G.L., 1996. Potent antisense oligonucleotides to the human multidrug resistance-1 mRNA are rationally selected by mapping RNA-accessible sites with oligonucleotide libraries. *Nucleic Acids Research* 24 (10), 1901–1907.
- Hoglund, S., Ohagen, A., Goncalves, J., Panganiban, A.T., Gabuzda, D., 1997. Ultrastructure of HIV-1 genomic RNA. *Virology* 233 (2), 271–279.
- Huthoff, H., Berkhout, B., 2001. Two alternating structures of the HIV-1 leader RNA. *RNA* 7 (1), 143–157.
- Kasprzak, W., Bindewald, E., Shapiro, B.A., 2005. Structural polymorphism of the HIV-1 leader region explored by computational methods. *Nucleic Acids Research* 33 (22), 7151–7163.
- Laptev, A.V., Lu, Z., Colige, A., Prockop, D.J., 1994. Specific inhibition of expression of a human collagen gene (COL1A1) with modified antisense oligonucleotides. The most effective target sites are clustered in double-stranded regions of the predicted secondary structure for the mRNA. *Biochemistry* 33 (36), 11033–11039.
- Laughrea, M., Jette, L., 1994. A 19-nucleotide sequence upstream of the 5' major splice donor is part of the dimerization domain of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA. *Biochemistry* 33 (45), 13464–13474.
- Laughrea, M., Jette, L., 1996a. HIV-1 genome dimerization: formation kinetics and thermal stability of dimeric HIV-1Lai RNAs are not improved by the 1-232 and 296-790 regions flanking the kissing-loop domain. *Biochemistry* 35 (29), 9366–9374.
- Laughrea, M., Jette, L., 1996b. Kissing-loop model of HIV-1 genome dimerization: HIV-1 RNAs can assume alternative dimeric forms, and all sequences upstream or downstream of hairpin 248–271 are dispensable for dimer formation. *Biochemistry* 35 (5), 1589–1598.
- Laughrea, M., Jette, L., Mak, J., Kleiman, L., Liang, C., Wainberg, M.A., 1997. Mutations in the kissing-loop hairpin of human immunodeficiency virus type 1 reduce viral infectivity as well as genomic RNA packaging and dimerization. *Journal of Virology* 71 (5), 3397–3406.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25 (4), 402–408.
- Marquet, R., Paillart, J.C., Skripkin, E., Ehresmann, C., Ehresmann, B., 1994. Dimerization of human immunodeficiency virus type 1 RNA involves sequences located upstream of the splice donor site. *Nucleic Acids Research* 22 (2), 145–151.
- Matveeva, O., Felden, B., Audlin, S., Gesteland, R.F., Atkins, J.F., 1997. A rapid in vitro method for obtaining RNA accessibility patterns for complementary DNA probes: correlation with an intracellular pattern and known RNA structures. *Nucleic Acids Research* 25 (24), 5010–5016.
- Muriaux, D., Fosse, P., Paoletti, J., 1996. A kissing complex together with a stable dimer is involved in the HIV-1Lai RNA dimerization process in vitro. *Biochemistry* 35 (15), 5075–5082.
- Muriaux, D., Girard, P.M., Bonnet-Mathoniere, B., Paoletti, J., 1995. Dimerization of HIV-1Lai RNA at low ionic strength. An autocomplementary sequence in the 5' leader region is evidenced by an antisense oligonucleotide. *Journal of Biological Chemistry* 270 (14), 8209–8216.
- Ooms, M., Verhoef, K., Southern, E., Huthoff, H., Berkhout, B., 2004. Probing alternative foldings of the HIV-1 leader RNA by antisense oligonucleotide scanning arrays. *Nucleic Acids Research* 32 (2), 819–827.
- Paillart, J.C., Marquet, R., Skripkin, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C., 1994. Mutational analysis of the bipartite dimer linkage structure of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *Journal of Biological Chemistry* 269 (44), 27486–27493.
- Paillart, J.C., Shehu-Xhilaga, M., Marquet, R., Mak, J., 2004. Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nature Reviews Microbiology* 2 (6), 461–472.
- Paillart, J.C., Skripkin, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Marquet, R., 1996. A loop–loop kissing complex is the essential part of the dimer linkage of genomic HIV-1 RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (11), 5572–5577.
- Sakuragi, J., Sakuragi, S., Shioda, T., 2007. Minimal region sufficient for genome dimerization in the human immunodeficiency virus type 1 virion and its potential roles in the early stages of viral replication. *Journal of Virology* 81 (15), 7985–7992.
- Sakuragi, J.I., Ode, H., Sakuragi, S., Shioda, T., Sato, H., 2012. A proposal for a new HIV-1 DLS structural model. *Nucleic Acids Research* 40 (11), 5012–5022.

- Sakuragi, J.I., Panganiban, A.T., 1997. Human immunodeficiency virus type 1 RNA outside the primary encapsidation and dimer linkage region affects RNA dimer stability in vivo. *Journal of Virology* 71 (4), 3250–3254.
- Sánchez-Luque, F.J., Reyes-Darias, J.A., Puerta-Fernández, E., Berzal-Herranz, A., 2010. Inhibition of HIV-1 replication and dimerization interference by dual inhibitory RNAs. *Molecules* 15 (7), 4757–4772.
- Shen, N., Jette, L., Liang, C., Wainberg, M.A., Laughrea, M., 2000. Impact of human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization on viral infectivity and of stem-loop B on RNA dimerization and reverse transcription and dissociation of dimerization from packaging. *Journal of Virology* 74 (12), 5729–5735.
- Shen, N., Jette, L., Wainberg, M.A., Laughrea, M., 2001. Role of stem B, loop B, and nucleotides next to the primer binding site and the kissing-loop domain in human immunodeficiency virus type 1 replication and genomic-RNA dimerization. *Journal of Virology* 75 (21), 10543–10549.
- Skripkin, E., Paillart, J.C., Marquet, R., Ehresmann, B., Ehresmann, C., 1994. Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (11), 4945–4949.
- Southern, E.M., Milner, N., Mir, K.U., 1997. Discovering antisense reagents by hybridization of RNA to oligonucleotide arrays. *Ciba Foundation Symposia* 209, 38–44, discussion 44–6.
- Takahashi, K., Baba, S., Hayashi, Y., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Takaku, H., Kawai, G., 2000. NMR analysis of intra- and inter-molecular stems in the dimerization initiation site of the HIV-1 genome. *Journal of Biochemistry* 127 (4), 681–686.
- Vrolijk, M.M., Ooms, M., Harwig, A., Das, A.T., Berkhout, B., 2008. Destabilization of the TAR hairpin affects the structure and function of the HIV-1 leader RNA. *Nucleic Acids Research* 36 (13), 4352–4363.