



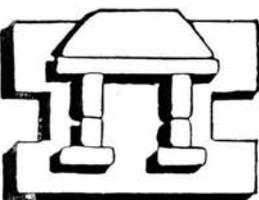
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

CARACTERIZACION Y EVALUACION DE UN MODULO
RIBOSIMICO DIRIGIDO CONTRA EL GEN E6 DEL VIRUS
DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
J O R G E F E R N A N D E Z R E T A N A

DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. RAMON V. MORENO TORRES



IZTACALA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MEXICO

ENERO, 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN MÓDULO
RIBOSÓMICO DIRIGIDO CONTRA EL GEN E6 DEL
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

P R E S E N T A

JORGE FERNÁNDEZ RETANA

DIRECTOR DE TESIS

M. en C. RAMÓN V. MORENO TORRES



IZTACALA

TLALNEPANTLA, EDO. DE MEX.

ENERO 2003

Quiero dedicar este trabajo a todas las personas que han estado a mi alrededor, y muy especialmente, a mis papás Rosita y Juan, porque su fuerza y ejemplo siempre han sido un reto para mí, espero algún día pueda ser como ustedes y nunca fallarles, a mis hermanos Héctor y Rosaluz, por todo lo que hemos vivido juntos, nuestros logros y fracasos y a mi abuelita Jovita, quien siempre ha luchado contra todo y aún así nos ha dado tanto cariño. Este trabajo no hubiera sido posible sin su apoyo, muchas gracias.

También quiero dedicarle este trabajo a las personas que hoy ya no están conmigo y sin embargo han dejado una profunda huella en mi vida. A ti en especial porque contigo aprendí que la vida no es tan fácil como yo creía... pero aún así es demasiado hermosa como para no disfrutarla.

A la memoria de mi Tío Ángel y mi primo Álvaro

Quiero agradecer a toda esa gente que ha contribuido de alguna manera en mi vida, como lo ha hecho mi familia, gracias a mis Tíos y sus familias Ale, Nacho, gracias viejo, por tu apoyo económico y sobretodo moral, espero no fallarte, a mi Tío Memo y a la familia del Tío Toño, en especial por su ternura, igualmente agradezco el apoyo que he recibido de mis padrinos Cristi y Jaime, gracias.

Deseo agradecer a mis profesores del CBTis 202 y de forma muy especial quiero reconocer la labor de las profesoras Mari Varela y Marta Tovar, porque Uds. fueron mis principales motivadoras para continuar estudiando. También agradezco el apoyo y amistad que me han dado; a Jimeno, Panchito, Tristán (Daniel), el "Buker" (Israel), José Luis, el "Lic" (Héctor) y Julio †, el mejor equipo, gracias.

A mis compañeros de mi querida ENEP-Iztacala (FES), Mauricio, el Chapulín (Horacio), el checo (Sergio), el Diablo (Isidro), La Moncha (Montserrat), Adrián Elier, a Mari, porque también fuiste mi compañera, el Buzo (Alejandro), Julius, Miguel el greñas, el Angustias (Agustín), Manolo, Josué, Rubén y Atzín (y un saludo especial para Edoey), Alejandro y Diana, a mi tocayo Jorge y pareja, a Oscar, al güero (Guillermo), Arnulfo, mi otro tocayo Jorge, a Ruth, a Ismael, a Sarita Lee (Sarita) y a todas las personas que conocí y por el momento no recuerdo sus nombres, (mil perdones) pero de todos modos gracias. también quiero reconocer la labor de los profesores de la carrera de Biología, en especial a la Biol. Marcela Ibarra, la Dra Gloria Garduño, al Biol. Peter Muller, el Biol. Gama, al Biol. Nicolás, la Maestra Irma Dueñas, la Dra, Ma. del Rosario Sánchez, el Dr. Martín Martínez y los que por el momento no recuerdo.

Asimismo quiero reconocer a las personas del Cinvestav, el conocerlos es un verdadero estímulo para seguir a pesar de los fracasos que tenga, gracias por su apoyo cuando más lo necesité; Sarita, Dorita, Julia Dolores, Sihomara, Claudia, Nelly, Karen, Bárbara, Memo, al muchacho (José), Richi, Alejandro, el "doc" (Diego), Pablo, Gustavo, Cristian, a la gente del laboratorio de terapia génica, al doc Miguelón (Miguel), Mónica, Claudia, a Mario, Arturo, María Luisa y Héctor.

Gracias a Doña Raquel y Don Miguel por permitirme trabajar y estudiar, de igual forma a Doña Sofía, realmente me consintieron mucho, a Luis y Rafael gracias chicos por soportarme. A Camilo, a ti amigo "ane", que verdaderamente puedo decirte amigo en las buenas y en las malas te agradezco tu apoyo, gracias.

De manera muy especial te doy las gracias Ramón, porque no solo has sido mi tutor, sino que también has sido un verdadero amigo, de ti he aprendido muchas cosas, pero lo que más te admiro, es tu capacidad para disfrutar de la vida y ayudar a los demás, te prometo que seguiré tu ejemplo aunque es realmente difícil. Gracias amigo Ramón.

Quiero agradecerle al Dr. Luis Alvarez, por la oportunidad de trabajar en su laboratorio y permitirme vislumbrar la experiencia de hacer investigación, su persona para mí es un símbolo a seguir, ya que su dedicación y pasión por la ciencia, dejó en mí una experiencia muy grata.

Y por último te doy las gracias por todo lo bueno y malo que ha pasado en mi vida, porque sin ti no soy nada, gracias Dios.

Llegará una época en la que una investigación diligente y prolongada sacará a la luz cosas que hoy están ocultas. La vida de una sola persona, aunque estuviera toda ella dedicada, sería insuficiente para investigar una materia tan vasta... Por lo tanto este conocimiento sólo se podrá desarrollar a lo largo de sucesivas edades. Llegará una época en la que nuestros descendientes se asombrarán de que ignoramos cosas que para ellos son tan claras... Muchos son los descubrimientos reservados para las épocas futuras, cuando se haya borrado el recuerdo de nosotros. Nuestro universo sería una cosa tan limitada si no ofreciera a cada época algo que investigar... La naturaleza nos revela sus misterios de una vez para siempre.

Séneca. *Cuestiones naturales*.
Libro 7, siglo primero.
citado por Carl Sagan

IZT.

Índice

Resumen	1
Introducción	2
• Ribozima del tipo pasador	5
• Aplicaciones celulares y terapéuticas	7
• Virus del papiloma humano tipo 16	7
• Antecedentes	9
• Justificación	12
Objetivos	14
Materiales y métodos	15
Resultados	22
Análisis de resultados	36
Conclusiones	39
Apéndice	41
Referencias	46

RESUMEN

Las ribozimas son ARNs catalíticos capaces de reconocer con muy elevada especificidad ARNs blanco y cortarlos, por ello en la actualidad constituyen una poderosa herramienta para la terapia génica, utilizada contra una gran variedad de enfermedades. El cáncer cervicouterino causado por el virus del papiloma humano es un padecimiento que puede ser abordado por este tipo de terapia.

En el presente trabajo se caracterizó un módulo ribozimico que presenta una ribozima capaz de reconocer un dominio específico del virus del papiloma humano, dicho dominio corresponde al ARN que codifica para la proteína E6 responsable de la inmortalización de las células neoplásicas del cérvix. La caracterización consistió en determinar la secuencia de ribozimas que componen el módulo y evaluar el proceso de autocatálisis del mismo. Los resultados indicaron que es posible transcribir y liberar una ribozima terapéutica cuando se encuentra en un ARN de mayor tamaño. Este tipo de estudios constituye uno de los pasos hacia la construcción, mejoramiento y evaluación de moléculas que podrán ser utilizadas en terapia génica.

INTRODUCCIÓN

La terapia génica puede definirse como la introducción de material génico dentro de las células, con el propósito de alterar el curso de una condición médica o enfermedad. En general, con algunas excepciones, los ácidos nucleicos son moléculas de ADN que codifican para productos de la transcripción génica como ARNs o bien, proteínas. En varios estudios se ha demostrado la capacidad de estos productos como nuevos agentes farmacológicos para tratamiento de varios tipos de enfermedades (Kay *et al.*, 1997), algunas de condición hereditaria como la hemofilia, fibrosis quística, cáncer o bien infecciones adquiridas como la tuberculosis o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Jiménez, 1998).

Algunas de las estrategias que se han utilizado para la terapia génica consisten en principio de la utilización de oligonucleótidos antisentidos, los cuales son secuencias cortas de ácidos nucleicos que son complementarios de secuencias específicas de un determinado ARN mensajero (secuencia sentido). La formación de un heteroduplex bicatenario sentido-antisentido bloquea la traducción del mensaje genético a proteína, e induce la actividad de la ribonucleasa H (RNasa H) celular resultando en la degradación del ARN mensajero y por lo tanto la supresión de fenotipos particulares. Por esto, se pensaba que las estrategias antisentido mediante oligonucleótidos, tenían un gran potencial terapéutico para inhibir la expresión de genes en patologías tales como el cáncer, enfermedades autoinmunes y enfermedades infecciosas como el SIDA. No obstante, su aplicación clínica se vio limitada por su corta vida media en la circulación sistémica y la dificultad para acceder con actividad funcional al citoplasma y/o núcleo celular (Alvarez, 2001).

El descubrimiento de que ciertas moléculas de ARN propias de la naturaleza celular, presentan actividad catalítica, cambió el concepto de que este tipo de funciones, fueran necesariamente realizadas por enzimas (Cech y Herschlag, 1992; Voeks y Clawson, 1998), además que ha permitido que, en la última década, se haya desarrollado una nueva alternativa a la

terapia antisentido, la cual consiste en la degradación de un ARN sentido, denominado ARN blanco, debido a la capacidad de pequeñas moléculas de ARN catalítico con la habilidad de hibridar y procesar al ARN blanco, conocidas como ribozimas. Estas moléculas son liberadas intactas después de procesar el ARN blanco, conservando la capacidad de hibridar y atacar a otra molécula de ARN blanco, disminuyendo de esta forma la dosis necesaria para producir inhibición génica.

Las ribozimas, tienen núcleos catalíticos y sitios activos, que dan lugar a un conjunto de reacciones bioquímicas de corte y unión (Sullenger, 1995). La primera ribozima descrita se descubrió en la reacción de auto-procesamiento que interviene en la secuencia de un pre-ARNm de *Tetrahymena thermophila* que únicamente requiere para su actividad la presencia de un catión metal divalente (Cech y Herschlag, 1992; Voeks y Clawson, 1998). Actualmente se han descrito cinco tipos de ARNs catalíticos, que son: la RNasa P, la ribozima cabeza de martillo (Hammerhead), la ribozima del tipo pasador (Hairpin), la ribozima del virus de la hepatitis Δ y el intron I de *Tetrahymena thermophila* (Sullenger, 1995).

La mayor parte de las ribozimas recombinantes generadas con fines terapéuticos se basan en la estructura de la ribozima de tipo cabeza de martillo, la cual requiere de altas concentraciones de magnesio y temperaturas no fisiológicas para su máxima actividad catalítica. Estas características producen resultados inconsistentes dentro de diferentes tipos celulares y en consecuencia han frenado la aplicación de terapias ribozimicas en modelos animales (Alvarez, 2001).

Las ribozimas de tipo pasador fueron diseñadas con base en la porción catalítica del ARN satélite del virus que produce las manchas de anillo del tabaco (STRSV) responsable de las reacciones de corte y empalme necesarias para la replicación de su cadena negativa (Burke, 1996). Este tipo de ribozimas son altamente eficientes y no requieren de cationes divalentes para su actividad. Las ribozimas de tipo pasador han sido empleadas satisfactoriamente para inhibir la

expresión del virus de inmunodeficiencia humano (VIH-1) en linfocitos infectados en cultivo (Hampel *et al.*, 1997; Alvarez, 2001).

Para un corte eficiente del ARN blanco las ribozimas tipo pasador y del tipo cabeza de martillo requieren de un sitio de corte específico, representado por el motivo GUC.

Debido a las propiedades antes mencionadas, el uso de estas ribozimas tienen un gran potencial como herramienta terapéutica contra enfermedades infecciosas, que representan un problema serio en la salud de las poblaciones humanas. Dentro de éstas, la infección provocada por el virus del papiloma humano, es de gran importancia ya que estos virus pueden alterar el ciclo celular de las células que infectan, transforman y en un momento dado convertirlas en células cancerosas (Alvarez *com pers* 2001; Gutiérrez, 2000).

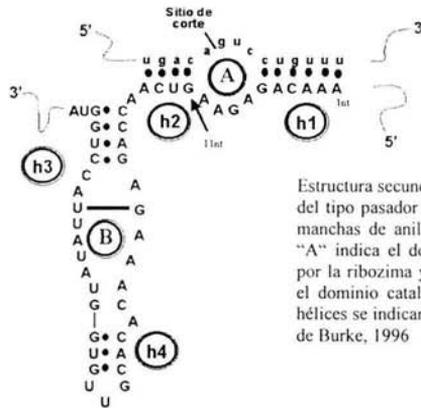
Los virus del papiloma humano infectan células epiteliales y mucosas. Dentro de estos, un grupo que incluye los tipos 16 y 18 (VPH-16 y VPH-18), está asociado con la aparición y progresión de lesiones preneoplásicas y neoplásicas en la mucosa genital. En la mujer, el virus del papiloma humano tipo 16 es el más correlacionado con infecciones genitales latentes, lesiones benignas y premalignas del cervix y con más de la mitad de carcinomas cervicales invasivos. De hecho, cualquier mujer que ha presentado una citología anormal por la prueba de Papanicolau, muy probablemente ha sido infectada por algún tipo de papiloma. Cada año a nivel mundial medio millón de mujeres muere como consecuencia de carcinomas cervicales y alrededor de 800,000 casos nuevos son diagnosticados. En México, se reportan anualmente más de 10,000 muertes por cáncer cervical y 30,000 casos nuevos. Además México tiene una de las tasas de mortalidad más altas a nivel mundial por este tipo de cáncer (14.0 de cada 100,000 habitantes) (OMS, 1996 en Alvarez, 2001)

Ribozima del tipo pasador

Esta ribozima se describió por primera vez en 1989, la ribozima y el sustrato son originados de ciertos ARNs satélites, asociados con viroides de plantas compuestos de ARN. La ribozima del tipo pasador que se ha empleado comúnmente se diseñó a partir de un ARN satélite asociado al virus que produce las manchas de anillo del tabaco (sTRSV). Esta formada por 50 nucleótidos de la cadena negativa del ARN del sTRSV, que contiene los elementos determinantes para la actividad catalítica y el sitio de reconocimiento al sustrato. *In vivo*, la reacción de corte es importante para el procesamiento de concatámeros multiméricos, producidos por la replicación de ARN de la cadena positiva del templado circular. La reacción de unión sirve para ciclar la cadena negativa monomérica, para generar el templado de la cadena positiva sintetizada.

La estructura secundaria de la ribozima del tipo pasador, consiste de cuatro elementos helicoidales internos y de dos asas internas (fig. 1). La ribozima se une al sustrato usando una secuencia de 14 nucleótidos, localizados al final del extremo 5' de la ribozima, en un proceso que involucra la formación de dos hélices cortas (h1 y h2) que flanquean al asa interna (asa A) la cual contiene el sitio de corte, por el otro lado tenemos dos hélices (h3 y h4) separadas por un asa interna (asa B) larga y asimétrica. La secuencia de las cuatro hélices puede variar libremente si la longitud y la complementariedad del apareamiento Watson-Crick se mantiene en todo momento, con una excepción clara: el requerimiento de una guanina en la posición 11 de la ribozima, que debe ser apareada con una pirimidina de la secuencia del sustrato.

Figura 1



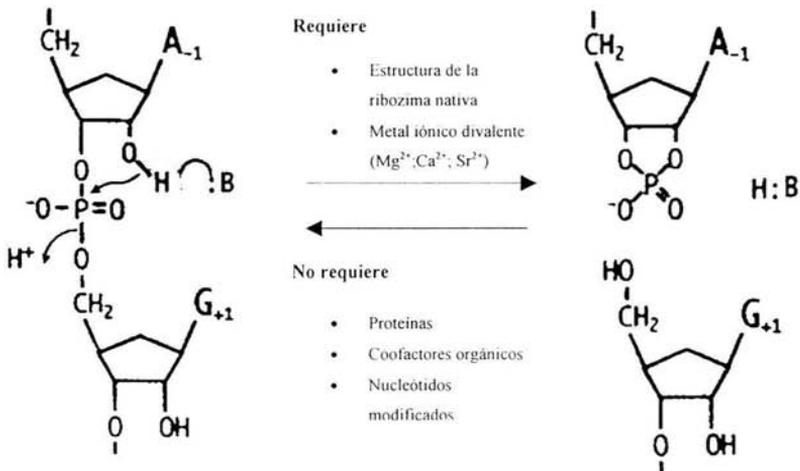
Estructura secundaria de la ribozima nativa del tipo pasador del virus que produce las manchas de anillo del tabaco (-) sTRSV. "A" indica el dominio catalítico formado por la ribozima y el sustrato, "B" muestra el dominio catalítico de la ribozima. Las hélices se indican con la letra "h". Tomado de Burke, 1996

Como las hélices 1 y 2 son responsables del reconocimiento del sustrato específico de la ribozima de tipo pasador, ésta puede ser modificada para cortar una gran variedad de secuencias con un alto grado de selectividad.

Figura 2

Reacción de corte y ligazón catalizada por la ribozima de tipo pasador

Tomado de Burke 1996



La ribozima del tipo pasador actúa como una endoribonucleasa reversible (fig. 2), para ello utiliza una cadena sencilla de ARN como sustrato y corta vía transesterificación, la reacción genera los productos de corte 2', 3'ciclofosfato terminal y un grupo 5'hidroxi.

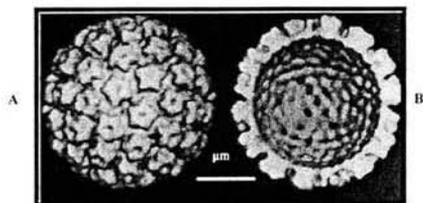
Aplicaciones celulares y terapéuticas

En la naturaleza, la ribozima de tipo pasador corta su propio ARN en *cis* (intramolecularmente), pero a través del diseño por ingeniería genética, se ha observado que puede cortar sustratos en *trans* (intermolecularmente). Esta actividad en *trans* provee un aprovechamiento alternativo para regular productos génicos específicos. De esta forma, las ribozimas pueden ser usadas para inhibir la expresión de genes endógenos o inhibir la replicación de virus patógenos, con base en estas funciones, pueden contribuir a nuestro conocimiento de la función genética (especialmente en vertebrados) en donde hasta la fecha no existen alternativas de tratamiento, además puede contribuir en otras áreas (por ejemplo en la agricultura y la biotecnología).

Virus del papiloma humano

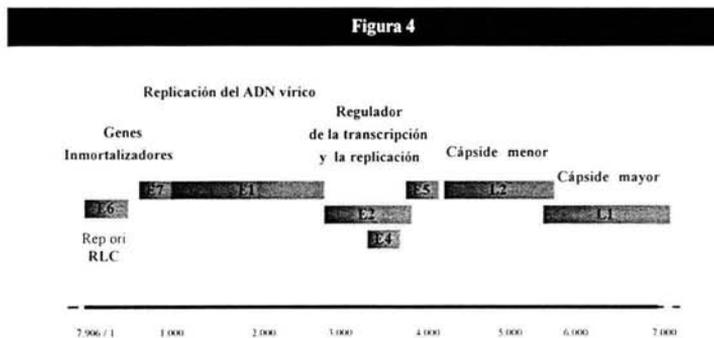
El virus del papiloma humano fue identificado como partícula viral en 1949, aun cuando la naturaleza infecciosa de las verrugas humanas y de animales había sido reconocida desde fines del siglo XIX. (fig. 3)

Figura 3



Fotografía computarizada de criomicrografías electrónicas A) muestra la presencia de 72 capsómeros dispuestos en icosaedro. Todos los capsómeros (pentonas y hexonas) parecen formar una cabeza en forma de estrella de cinco puntas regular. B) La sección computarizada de la cápside muestra la interacción de los capsómeros y los canales en la cápside. (Tomado de Murray 1997)

Los virus del papiloma humano son virus de ADN de doble cadena cerrada, pertenecientes a la familia de los Papoviridae, poseen un genoma de un tamaño aproximado a los 8,000 pb (fig. 4). Tienen seis genes de expresión temprana (E) (Early) y dos genes de expresión tardía (L) (later), así como una región reguladora no codificante (conocida como región larga de control o RLC). Todos los genes son codificados a partir de una sola cadena de ARN (sintetizada por la ARN pol II) y se utiliza un procesamiento diferencial de corte y empalme para la expresión individual de cada uno de estos genes (Howley, *et al*, 1986).



Mapa genómico del virus del papiloma humano tipo 16.
Tomado de Murray, 1997

La capacidad oncológica de los VPH reside en el producto de dos de los genes tempranos, E6 y E7. El mecanismo de transformación inducido por las proteínas E6 y E7 está regulado principalmente por la unión de éstas, a proteínas de gran importancia en el control del ciclo celular. La proteína E6 se une al producto del antioncogene p53, cuyo nivel aumenta en caso de daño genómico, provocando una interrupción temporal del ciclo celular para permitir la reparación y si ésta no es posible, causar apoptosis; la unión de E6 a p53 induce una rápida

degradación de esta última por la vía de la ubiquitina. De manera análoga, E7 se une a la proteína Rb la cual normalmente, durante la interfase, se une a los factores de transcripción de la familia E2F, impidiendo así la transcripción de genes que se expresan para la replicación del genoma. Sin estos frenos del crecimiento celular, la célula se muestra más susceptible a las mutaciones, las aberraciones cromosómicas o a la acción de algún cofactor, y por lo tanto puede convertirse en una célula cancerosa.

IZT.

ANTECEDENTES



En 1989 Hampel y Tritz describen la ribozima del tipo pasador, encontrada en ciertos viroides de plantas, la cual ha sido objeto de varias investigaciones por su uso potencial, como herramienta para la terapia génica (Burke, 1996).

Posteriormente en 1996 Shin y colaboradores, determinan que los dominios catalíticos de la ribozima del tipo pasador pueden ser separados físicamente y tener actividad similar a la ribozima original, determinando que la interacción entre las regiones de las asa del dominio A y del dominio B son los responsables del mecanismo de catálisis (Shin, *et al.* 1996).

Siguiendo la línea de investigación, en 1997 Walter y colaboradores proponen un mecanismo de corte para la ribozima del tipo pasador, en el cual se puede observar la interacción entre las asa del dominio A y B como se muestra en la fig. 5 (Walter, *et al.* 1997).

Figura 5

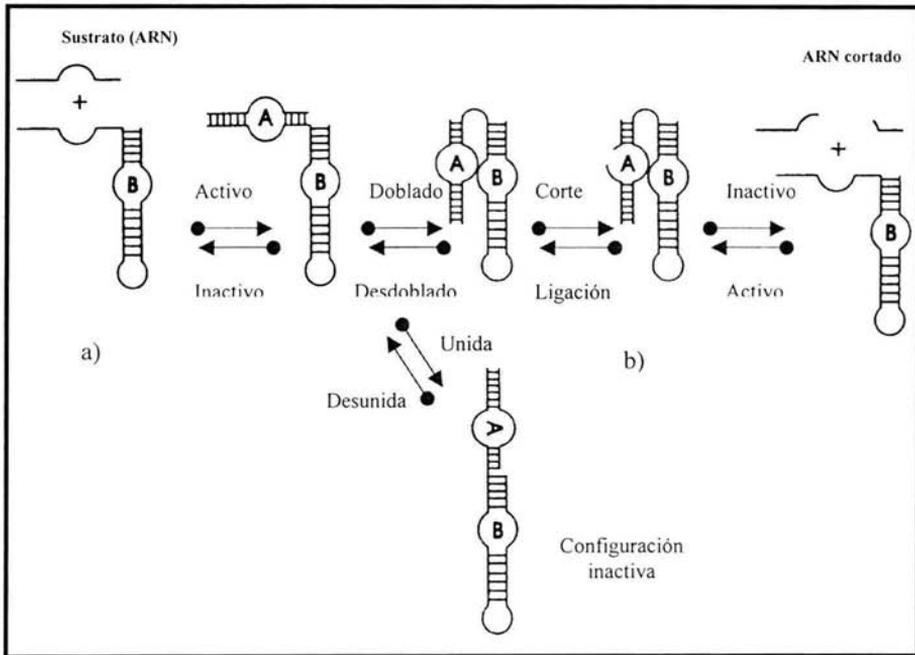


Fig. 5. Mecanismo propuesto por Walter, para la reacción de la ribozima del tipo pasador, a) la ribozima se une al sustrato para formar el bucle del dominio A b) el complejo ribozima-sustrato puede seguir dos rutas, una doblarse y producir la actividad catalítica o bien puede adoptar una configuración unida inactiva. Tomado de Walter 1997.

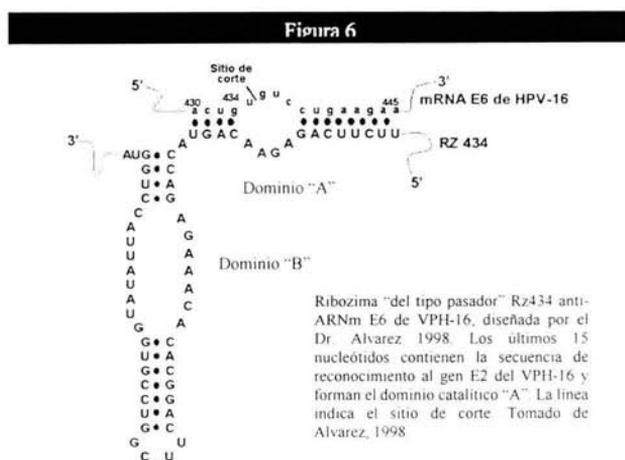
En 1998, Alvarez y colaboradores localizaron seis secuencias 5'-GUC-3' fundamentales para el corte (de la ribozima de tipo pasador), en los genes E6 y E7 del VPH-16. Se construyeron ribozimas del tipo pasador (basadas en la secuencia de las ribozimas encontradas en los virus del sTobRV) para cada sitio, dirigidas contra las secuencias delimitadas. Las ribozimas que presentaron una actividad catalítica de corte mayor al 60%, fueron, escogidas y denominadas ribozimas Rz419 y Rz434. Tabla 1

Tabla I. Secuencias blanco para la ribozima del tipo pasador (HPS) en el VPH-16 genes E6/E7, ensayadas a 37°C/60 min. Tomado de Alvarez, 1998

Nombre del sitio	Secuencia del sustrato	Sitio de corte	Actividad de la Ribozima
HPSE61	415-UAACU <u>GLC</u> AAAAGCC	419	****
HPSE62	430-ACUGU <u>GLC</u> CUGAAGAA	434	+++
HPSE63	487-AAGGG <u>GLC</u> GGUGGACC	491	+
HPSE64	499-GACCG <u>GLC</u> GAUGUAUG	503	+
HPSE65	510-UGUAU <u>GLC</u> UUGUUGCA	514	No probada
HPSE7	675-AGAUG <u>GLC</u> CAGCGGA	679	No detectable

Se determinó la efectividad de la ribozima Rz434, (fig. 6) para inhibir la acción proliferativa e inmortalizante del producto de los genes E6 y E7 de VPH-16 transfectados por separado en cultivos primarios de queratinocitos humanos. Sin embargo, aunque Rz434 produjo una reducción significativa de la proliferación y la inmortalización con respecto a las células control, una ribozima análoga inactiva, la Rz434i, tuvo un efecto similar, implicando así que la inhibición del efecto de los oncogenes virales fue mediada únicamente por un efecto antisentido pasivo más que por el efecto catalítico (Alvarez, *et al* 1998).

En 1999 Alvarez desarrollo un módulo ribozimico que contiene a la ribozima terapéutica Rz434 flanqueada por las ribozimas de autocorte en *cis*, TRL y TRR. El cual no ha sido caracterizado (Alvarez, 1999. Datos no publicados).



Schmidt y colaboradores, en el 2000 proponen variantes de la ribozima del tipo pasador denominada ribozimas gemelas las cuales presentan un doble corte dentro de una secuencia de ARN blanco, estas ribozimas realizan un corte en *trans* sobre un blanco específico, siendo su aportación más importante la construcción de una ribozima que tiene el dominio catalítico A del lado contrario a la ribozima silvestre (Schmidt *et al.* 2000).

JUSTIFICACIÓN

Aunque la ribozima de tipo pasador ha presentado una actividad catalítica positiva en contra de algunos ARNm, uno de los problemas que enfrenta la terapia con ribozimas se presenta cuando, las secuencias ribozímicas son degradadas dentro del sistema celular por nucleasas, o bien, éstas no pueden hibridar y acoplarse a la secuencia blanco, debido a que la estructura del ARNm adquiere una topología espacial que cubre o de alguna manera, protege el sitio de apareamiento, haciendo de este modo ineficiente la actividad ribozímica. Otro aspecto importante se presenta cuando la variabilidad genética del ARNm, puede impedir el apareamiento correcto ribozima-ARNm (como es el caso del VIH) (Schmidt, *et al.* 2000), provocando que la terapia no sea efectiva.

En función de que las ribozimas tipo pasador pueden tener acción catalítica tanto en *cis* como en *trans*, la finalidad de este trabajo fue construir un módulo ribozímico, el cual esta estructurado con dos ribozimas de tipo pasador (TRL y TRR), que flanquean y liberen a la ribozima terapéutica (Rz434), dentro de un mismo transcrito. Por su capacidad de corte en *cis* esta construcción presenta ciertas ventajas que esperamos incrementen la eficacia de corte. Una secuencia más larga permite desarrollar una estructura que le confiere estabilidad y resistencia a nucleasas que pueden degradarla. Sin embargo, su empleo más importante es desarrollar un

módulo multiblanco, es decir, poder diseñar una secuencia con varias ribozimas terapéuticas que reconozcan distintos lugares dentro del ARN blanco. De esta forma un módulo multiblanco que contenga sitios simultáneos de corte para un ARNm puede incrementar la actividad terapéutica siendo eficiente aún cuando exista mutación en alguno de los sitios de reconocimiento para la ribozima.

De esta forma, la finalidad del presente trabajo es generar avances para el diseño y construcción de ribozimas multiblancos.

OBJETIVOS

General:

Caracterizar y evaluar la actividad autocatalítica del módulo ribozímico; que contiene la ribozima terapéutica Rz434, flanqueada por dos ribozimas de autocorte, dirigida contra los genes E6 y E7 del VPH-16,

Particulares:

- a) Caracterizar el módulo ribozímico clonado dentro de los plásmidos pTRL, a través de mapeo por restricción
- b) Secuenciar manualmente el módulo ribozímico.
- c) Realizar la transcripción "*in vitro*", del módulo ribozímico
- d) Evaluar la actividad autocatalítica del producto obtenido.

METODOLOGÍA

Para la construcción del módulo ribozímico se requirió de ribozimas de autocorte y de la ribozima terapéutica Rz434. Estas ribozimas fueron diseñadas por el Dr. Alvarez (2001), a partir de la secuencia original encontrada en viroides que producen las manchas de anillo del tabaco (sTobrV). Para poder liberar el producto central del módulo las dos ribozimas de autocorte TRL y TRR, deben dirigir la actividad catalítica hacia los flancos de la ribozima Rz434, por ello la orientación espacial de la ribozima TRL fue desarrollada de forma contraria a la descrita originalmente en el ARN viral (Hampel, *et al* 1997).

Preparación de células competentes

Para la preparación de las bacterias competentes para transformación se colocaron en un tubo de ensayo 3 ml de medio LB (Luria) (ver apéndice), con una asada de las bacteria DH5 α (ver apéndice) y se incubaron con agitación de 250 rpm a 37°C durante toda la noche. Las bacterias crecidas fueron colocadas en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, en una dilución 1/100 en medio LB, se incubaron a 37°C con agitación de 250 rpm por 2.5 horas. Posteriormente se pasaron a tubos Falcon de polipropileno de 14 ml, y se colocaron en hielo por 10 minutos. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 2500 rpm y el botón celular fue resuspendido en ½ volumen de CaCl₂ 0.1 M colocándose en hielo durante 25 minutos. Después se centrifugaron 15 minutos a 2500 rpm, el sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron suavemente en 0.5 ml de CaCl₂ 0.1 M. Se prepararon alícuotas de 0.2 ml las cuales fueron mantenidas en hielo 30 minutos y después se adicionaron 20 μ l de glicerol, almacenándose a -70°C hasta su utilización.

Transformación de células competentes

Se tomaron 50 μ l de las bacterias competentes transfiriéndolas a un tubo Falcón de polipropileno 2059 para 14 ml, previamente enfriado, se adicionaron 2 μ l del ADN plasmídico, y se mantuvieron en hielo de 15 a 30 minutos. Posteriormente se incubaron por exactamente 40 segundos a 42°C, e inmediatamente se colocaron en hielo por 3 minutos. Al término de esto se agregó 1 ml de medio SOC (ver apéndice), y se incubaron por 1 hora a 37°C con agitación de 250 rpm. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 3000 rpm por 5 minutos y se eliminaron 900 μ l del sobrenadante, con el volumen restante se resuspendió la pastilla obtenida, y se espátularon en cajas petri con medio LB sólido más ampicilina 100 μ g/ml incubando a 37°C toda la noche.

Minipreps

Para extraer los plásmidos se utilizó el kit de **BIO-RAD Quantum Prep® Plasmid miniprep** num. de catálogo 732-6100. Para lo cual se hizo crecer una colonia de bacterias transformadas en un cultivo de 3 ml de medio LB-ampicilina 100 μ g/ml, el cultivo se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación de 250 rpm. Después, las bacterias se cosecharon; para ello se transfirieron 1.5 ml del cultivo en un tubo Eppendorf y se centrifuga a 14,000 rpm por 1 minuto, se eliminó el sobrenadante sin tirar la pastilla, a continuación se transfirieron los 1.5 ml de cultivo restantes y se repitió la operación, el tubo se dejó boca abajo en un papel absorbente. para eliminar todo el medio de cultivo. A continuación se adicionaron 200 μ l del buffer de resuspensión, solución 1 (glucosa y EDTA); la pastilla se resuspendió por agitación, después se adiciono 250 μ l de buffer de lisis, solución 2 (hidróxido de sodio); se vacio rápidamente y se agitó suavemente por inversión diez veces. En seguida se adicionaron 250 μ l del buffer de

neutralización, solución 3 (acetato de potasio, e hidrocloreto de guanidina). La mezcla se centrifugó 5 minutos a 14,000 rpm en la microcentrífuga, con esto se formó un botón blanco y compacto en la pared del fondo (ADN cromosomal), consecuentemente, se tomó el sobrenadante sin tocar la pastilla, este se colocó en un tubo nuevo y se agregaron 200 µl de la solución matriz, solución 4 (hidrocloreto de guanidina); se pipeteó para mezclar, está se colocó en columnas de DEAE celulosa puestas sobre un tubo Eppendorf nuevo y se centrifugó por 30 segundos a 14,000 rpm, el tubo se decantó y la columna se colocó de nuevo en el mismo tubo, se agregaron 500 µl de la solución de lavado, solución 5 (etanol al 95%); donde se encontraba la mayor parte de la matriz, con el propósito de lavarla, se centrifugó por 30 segundos a velocidad máxima, se eliminó el líquido y la columna se colocó nuevamente en el mismo tubo. Se repitió el lavado con la solución 5 y se centrifugó por dos minutos a velocidad máxima para eliminar todo el etanol.

Luego se cambió la columna a un tubo nuevo. En seguida se agregaron 100 µl de agua desionizada estéril sobre la matriz y se centrifugó por 30 segundos a velocidad máxima para eluir el ADN plasmídico, éste ADN se mantuvo almacenado a -20°C hasta su utilización.

Electroforesis en gel de agarosa

Una vez aislados los plásmidos se observaron en un gel para electroforesis, para ello se fundió agarosa al 1% en buffer TBE (ver apéndice) y se colocaron 6 ml en un carro de electroforesis sellada con diques de aluminio y con un peine suspendido para formar los pozos, dentro de una cámara de electroforesis horizontal. Una vez solidificada el agarosa, se retiró el peine y se cubrió con buffer de TBE, se cargaron 2 µl de las muestras en cada pozo, las cuales se mezclaron previamente con 2µl de buffer de carga 5X (ver apéndice). Cuando todas las muestras fueron cargadas en el gel, se hizo pasar una corriente eléctrica de 100 voltios por 30 minutos, luego el gel se extrajo de la cámara y se sumergió en una solución de bromuro de etidio 0.5µg/ml por 5 minutos y se volvió a pasar una corriente de 100 voltios por 15 minutos más. Terminada la

corrida, el gel se colocó en el transiluminador y se tomó la foto correspondiente con la ayuda del software **Kodak Digital Science**.

Restricción del ADN

A los plásmidos obtenidos se les realizaron pruebas con enzimas de restricción para asegurarse que la secuencia contenía las ribozimas clonadas y también se realizó con la finalidad de llevar a cabo la Transcripción "*in vitro*" (TIV) (que se describe más adelante), para ello se colocó en un tubo Eppendorf 5 μ l de plásmido, 12 μ l de agua desionizada estéril, 2 μ l del buffer REact 10X correspondiente, y 1 μ l de enzima de restricción. El volumen final obtenido fue de 20 μ l (para digerir el ADN con dos enzimas de restricción al mismo tiempo es necesario verificar que el buffer a utilizar es el mismo para ambos o permite un grado suficiente de actividad aún cuando no sea el más indicado). Las muestras se incubaron a 37°C por 1 hora y se observaron en geles de agarosa de la manera antes mencionada.

Purificación

Para la purificación del ADN se utilizó el método fenol-cloroformo, Las muestras digeridas se llevaron a un volumen final de 100 μ l con agua estéril, se agregaron 50 μ l de fenol saturado con agua y 50 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1, la mezcla se agitó con vórtex y se centrifugó 5 minutos a 14,000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregó ½ volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2.5 veces del volumen total restante de etanol absoluto frío, la mezcla se incubó a -20°C por media hora, después se centrifugó 30 minutos a 14,000 rpm, el líquido se decantó y se adicionó 200 μ l de alcohol al 70%. Se centrifugó 5 minutos a 14,000 rpm, se decantó y se dejó secar, por último la pastilla de ADN se resuspendió en 20 μ l de agua estéril.

Secuenciación

La secuenciación se realizó siguiendo el protocolo de **T7 Sequenase_{v2.0}**® **Amersham LIFE SCIENCE**. Los plásmidos se desnaturalizaron por el método alcalino, el cual consistió en colocar en un tubo Eppendorf 8 µl del ADN; 2 µl de NaOH 1.0M; 1 µl de cebadores y se ajustó con agua desionizada estéril para ajustar el volumen final a 20 µl. La mezcla se incubó 10 min a 37°C y se colocó en hielo, después se adicionó 2 µl de HCl 1.0M y 2 µl de buffer de reacción. Se incubó el templado/primer/buffer a 37°C por 10 minutos y se colocó en hielo. se marcaron cuatro tubos "A" "C" "G" y "T" y se colocaron en cada tubo 2.5 µl de la mezcla apropiada de terminación manteniéndose en hielo. También se diluyó la mezcla de marcaje utilizada más adelante, 2 µl de la mezcla de marcaje y 8 µl de H₂O. Posteriormente se llevó a cabo la reacción de marcaje de la siguiente manera, a la mezcla de ADN se adicionó 1 µl de DTT 0.1M; 2 µl de la mezcla de marcaje; 0.5µl de [α -³⁵S]dATP; 2 µl de T7 Sequenase™ plasmid sequencing formulation. La mezcla se incubó a temperatura ambiente de 2 a 5 minutos. Posteriormente se llevó a cabo la reacción de terminación, en este paso se transfirieron 4.5 µl de la reacción de marcaje a tubos marcados ("A" "C" "G" y "T") y se continuó la incubación a 37°C por 5 minutos. Se detuvo la reacción adicionando 4 µl de solución de paro después se calentaron las muestras a 75°C por 2 minutos. Las muestras se cargaron en un gel de acrilamida *bis* acrilamida 19:1, urea 7M 6%; 2-3 µl de muestras en cada pozo con el siguiente orden A, C, G, T. Se aplicó una corriente de 2000 voltios por 1.30 horas.

Gel analítico de acrilamida *bis* acrilamida 19:1; 6% urea 7 M

El gel se preparó, anterior al proceso para asegurar que cuando se vaya a cargar, éste esté bien polimerizado. Se colocaron en una botella con tapa de aspersión 70 ml de acrilamida-*bis* acrilamida 19:1; 6% Urea 7 M; 0.2 ml de persulfato de amonio (fresco); 50 µl de TEMED. La mezcla se agitó por 30 segundos y se vertió en una cámara sellada, formada por los vidrios que

fueron previamente limpiados de polvo y grasa, dejándose polimerizar por 30 minutos. Los vidrios se montaron con el gel en la cámara de electroforesis vertical, se adicionó buffer TBE y se recorrió a 2000 voltios, después se colocaron de 2 a 4 μ l de muestras de los plásmidos listos para secuenciar mezclados con buffer de carga y se corrió a 2000 Voltios por 1:30 horas. El gel se separó de los vidrios y se colocó sobre papel filtro whatman y se seco por 1 hora a 80°C en la secadora al vacío. El gel seco se colocó en un cassette blindado y se expuso a una placa radiográfica Kodak Scientific Imaging fila **BIOMAX^{MR} 35 x 43 cm**.

Transcripción "*in vitro*" (TIV)

La transcripción se realizó con los plásmidos linearizados y purificados. Se colocaron en un tubo Eppendorf estéril los siguientes reactivos 4 μ l de Buffer de transcripción 5X; 2 μ l de DTT 100 mM; 1 μ l de rRNasin 20 u/ μ l (inhibidor de ribonucleasas); 4 μ l de ribonucleótidos (previamente se preparó una mezcla con 2.5 μ l de c/u; rATP 10mM, rGTP 10mM; rCTP 10mM y 2.5 μ l de agua ultrapura estéril); 2.4 μ l rUTP 100 μ M; 1 μ l del DNA molde (0.2-1.0 mg/ml); 5 μ l de [α -³²] rUTP (50 μ Ci a 10 μ Ci/ μ l); 1 μ l de T3 polimerasa (15 a 20 u). De esta forma el volumen final fue de 20 μ l. La mezcla se incubó por 1 hora a 37°C. Posteriormente se agregó 1 μ l de DNAsa RQI para deshacer el molde original de ADN, y se volvió a incubar por 15 minutos a 37°C. Se agregaron 21 μ l de solución de paro, la muestra se hirvió a 65°C por 4 minutos. El volumen total se cargó en los pozos de un gel preparativo de acrilamida *bis* acrilamida 19:1; 6%, urea 7M y se corrió a un voltaje de 300 voltios por 1.30 horas. El gel se expuso 5 minutos a una placa radiográfica **Kodak** para diagnóstico 8 x10' para ver las bandas de ARN. La placa expuesta se reveló y se colocó bajo el vidrio con el gel, de esta manera se ubicaron las bandas de interés, con una navaja se cortó el gel y se colocó en una jeringa estéril para triturarlo, se pasó a un tubo nuevo y se agregaron 350 μ l de buffer de elusión, la muestra se incubó a 4°C por 24 horas y por

último se purificó por el método fenol:cloroformo. Las muestras se volvieron a incubar en buffer REact 1 a distintos tiempos y se cargaron en un gel analítico.

RESULTADOS

Las secuencias con el módulo se encuentran clonadas dentro del plásmido pBtV5, estos plásmidos se observaron en un gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio, corroborando el peso molecular de aproximadamente 3.2 Kpb para cada uno de ellos. Los plásmidos fueron denominados pTRL3, pTRL4 y pTRL5, estos plásmidos se pueden observar en los carriles 2, 3 y 4 de la figura 7.

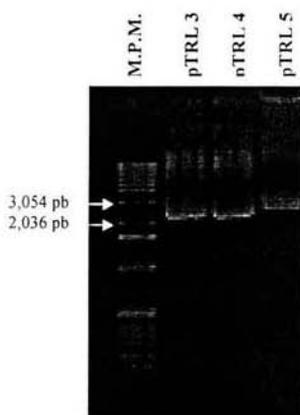
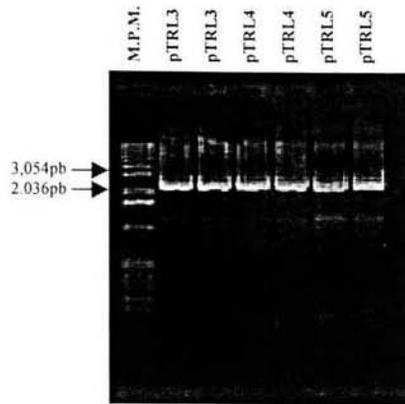


Fig. 7. Electroforesis de los plásmidos proporcionados. Donde se puede observar que los tres candidatos tienen en peso esperado de 3.2 kpb. Gel de agarosa al 1%, corrido a 100 V por 40 min y teñido con Bromuro de Etidio 0.5 mg/ml.

Después de que los plásmidos fueron observados se llevó a cabo la transformación de bacterias de *E. coli* DH5 α con el propósito de tener cantidades de ADN suficiente para poder operar. Las bacterias transformadas se incubaron toda la noche en medio sólido LB ampicilina 100 μ g/ml, las bacterias transformadas formaron colonias visibles, lo cual indicó la presencia de los plásmidos transfectedos. De las bacterias transformadas, se tomaron dos colonias para cada plásmido y se realizaron las minipreps. Los plásmidos extraídos se pueden observar en la figura 8 en la que la migración de las bandas de ADN corresponde con el peso molecular esperado para la forma circular relajada de 3.2 kpb, también se puede observar que la forma de los plásmidos superenrollados migran más abajo y algunos concatámeros producen un barrido en la parte superior de la banda

Fig. 8 Minipreps de bacterias transformadas con los plásmidos pTRL3, pTRL4 y pTRL5. Se tomaron dos colonias de cada plásmido de las bacterias transformadas. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio 0.5mg/ml y corrido a 100V.



Posteriormente se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción *Eco* RI y *Sst* I lo cual permitió liberar los fragmento de ADN en los que se encuentran clonadas las ribozimas. La figura 9 muestra los fragmentos correspondientes de esta digestión El carril 1 contiene el marcador de peso molecular, en el segundo carril se observa el plásmido pTRL3 en su forma circular, el cual también funciona como control de restricción Los plásmidos corridos en los carriles del 3 al 9, muestran el fragmento liberado de aproximadamente 300 pb.

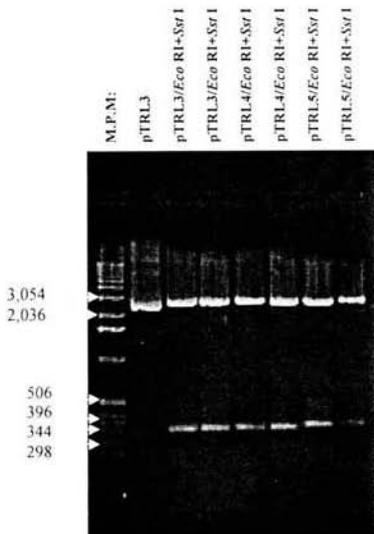
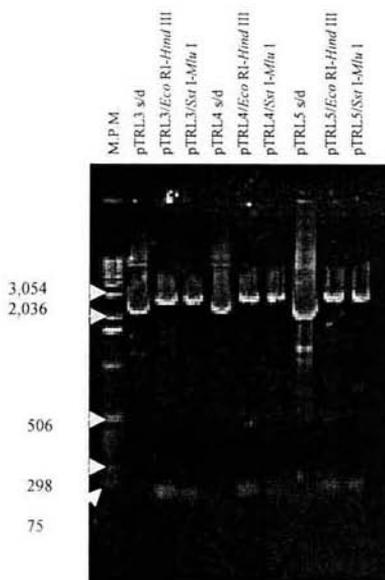


Fig. 9 Digestión de los plásmidos pTRL3, pTRL4 y pTRL5 con las enzimas de restricción *Eco* RI y *Sst* I. En la parte inferior del gel se puede observar el fragmento liberado de aproximadamente 300 pb. Gel de agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio 0.5 mg/ml, corrido a 100V por 45 min

Por último se realizó la digestión de los plásmidos con las enzimas *Eco* RI + *Hind* III, o bien *Sst* I + *Mlu* I, que nos indicaría la existencia de segmentos clonados en cada uno de los flancos de la ribozima 434.

Fig. 10. Digestión de los plásmidos pTRL3, pTRL4 y pTRL5, con las restricciones; *Eco* RI-*Hind* III y *Sst* I-*Mlu* I. En la parte inferior se observan fragmentos de aprox. 75 pb, los cuales corresponden con el peso molecular de las secuencias ribozimicas. Agarosa 1% teñido con bromuro de etidio 0.5 mg/ml y corrido a 100 V, por 40 min



En la figura 10 se pueden observar los fragmentos liberados por las digestiones, los cuales corresponden al peso esperado de aproximadamente 75 pb. En los plásmidos pTRL3 y pTRL4, la digestión con *Eco* RI y *Hind* III libera a la secuencia correspondiente a la ribozima TRL, la digestión con *Sst* I y *Mlu* I liberó, una secuencia de aproximadamente 70 pb. En el plásmido pTRL5 podemos observar que la digestión con *Eco* RI y *Hind* III libera a la secuencia correspondiente a la ribozima TRL, la digestión con *Sst* I y *Mlu* I libera a la secuencia correspondiente a TRR. Estas ribozimas tienen un peso molecular de 75 pb y 78 pb respectivamente.

Después de observar mediante las digestiones, que los plásmidos poseen los sitios de corte esperados y liberan fragmentos del tamaño, la siguiente parte del trabajo consistió en la secuenciación de las bases de cada plásmido. La placa fotográfica que se presenta en la figura 11,

muestra la secuencia de los tres plásmidos a partir del promotor de T7, En la secuencia de los plásmidos pTRL3 y pTRL4, no encontramos la ribozima TRR entre los sitios de restricción *Sst* I y *Mlu* I; en tanto que en el plásmido pTRL5 sí pudimos leer la siguiente secuencia de la ribozima **TRR** de 78b 5'- CGC GTG ACA GTC CTG TTT CCT CCA AAC AGA GAA GTC AAC CAG AGA AAC ACA CGT TGT GGT ATA TTA CCT GGT AGA GCT -3'. Debido al tamaño del gel no se puede observar la secuencia completa del módulo ribozímico, por lo tanto se realizó otra secuenciación del plásmido pTRL5 para encontrar la secuencia de las ribozimas Rz434 y TRL, para ello el gel se dejó correr más tiempo de tal forma que la secuencia central fuera visible. En la figura 12 se observa la siguiente secuencia correspondiente a la ribozima terapéutica **Rz-434** de 62b 5'-TTC TTC AGA GAA CAG TAC CAG AGA AAC ACA CGG ACC TTC GGT CCG TGG TAT ATT ACC TGG TA -3'. Cabe notar que esta presenta una secuencia agregada que corresponde a una parte del ARN-t^{Val} que le confiere una protección contra RNasas.

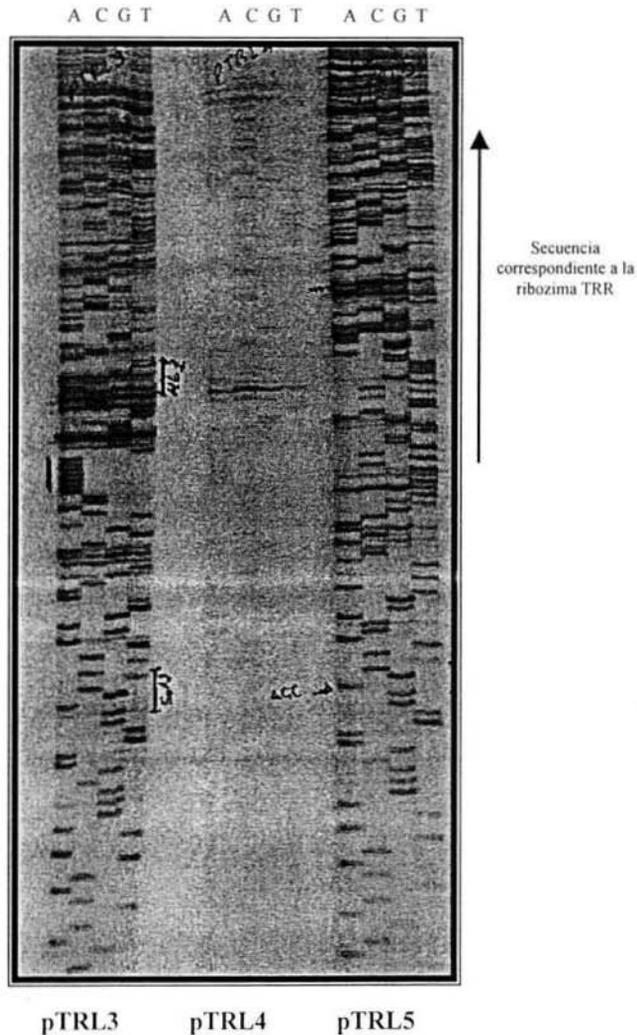


Fig. 11. Placa fotográfica de los plásmidos pTRL 3, pTRL 4 y pTRL 5, en un gel analítico de acrilamida bis acrilamida 19:1 6% urea 7M corrido a 2000 V por 90 min. la secuenciación se comenzó a partir del promotor de T7.

Con el propósito de ver la secuencia de la ribozima TRL, se permitió una migración del gel de mayor tiempo. La figura 13 muestra el fragmento correspondiente a la ribozima TRL, con la siguiente secuencia de 75b 5'- AAT TCA AAC AGA GAA GTC AAC CAG AGA AAC ACA CGT TGT GGT ATA TTA CCT GGT ACC TCC TGA CAG TCC TGT TTA -3', el sitio de

restricción para *Eco* RI y la secuencia de reconocimiento para el promotor de T3. De esta manera se comprobó que la secuencia del plásmido pTRL5 contiene el módulo ribozimico completo.

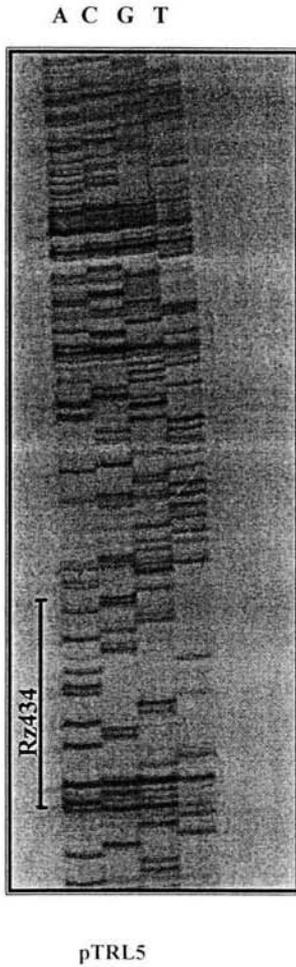


Figura 12. Placa fotográfica del plásmido pTRL5 en gel analítico acrilamida bis acrilamida 19:1, 6% urea 7M, corrido a 2000 V por 3 hrs. La línea indica la secuencia de la ribozima Rz434 la secuenciación se realizó a partir del promotor de T7.

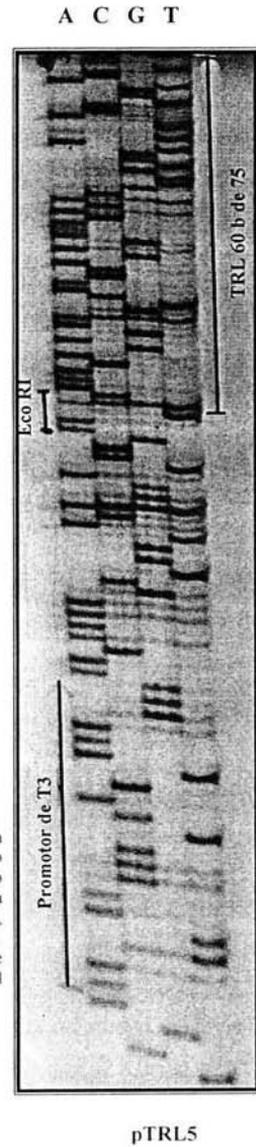
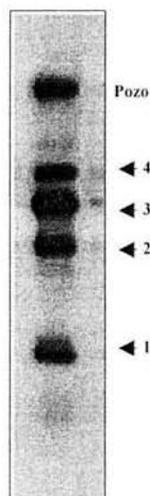


Figura 13. Placa fotográfica del plásmido pTRL5 en gel analítico acrilamida bis acrilamida 19:1, 6% urea 7M, corrido a 2000 V por 90. La secuenciación se realizó a partir del promotor de T3

Los siguientes experimentos que se realizaron fueron para conocer las propiedades catalíticas del módulo ribozímico. Para ello fue necesario realizar la transcripción *in vitro* del plásmido pTRL5 linearizado con la enzima de restricción *Sst* I y la utilización de marca radioactiva (α - 32 P) rUTP. Dando como resultado la placa radiográfica que se muestra en la figura 14 donde podemos observar que se originaron cuatro productos de la transcripción, esto podría sugerir que el módulo presentó una actividad autocatalítica. A estos productos se les enumeró del uno al cuatro. De acuerdo al peso molecular suponemos que la marca número 4 presenta el módulo ribozímico completo, después se observa que la marca 3 presenta una banda más ancha que la anterior, lo que permitió suponer que existen dos productos separados por una diferencia de peso molecular muy pequeña, las bandas 2 y 1 son los productos de corte autocatalítico.

Fig 14. Autorradiografía de los productos de transcripción *in vitro* del plásmido pTRL5 linealizado con *Sst* I. Se observan 4 productos de diferentes pesos moleculares. Gel de acrilamida bis acrilamida 19:1 6% urea 7M, corrido 90 min. a 350 V.



Cada uno de los fragmentos marcados se cortaron del gel y se obtuvieron en buffer de elución por 24 horas, se purificaron por el método fenol:cloroformo, para después ensayarse en

buffer de REact 1 a 37°C en distintos tiempos con la finalidad de observar su actividad autocatalítica.

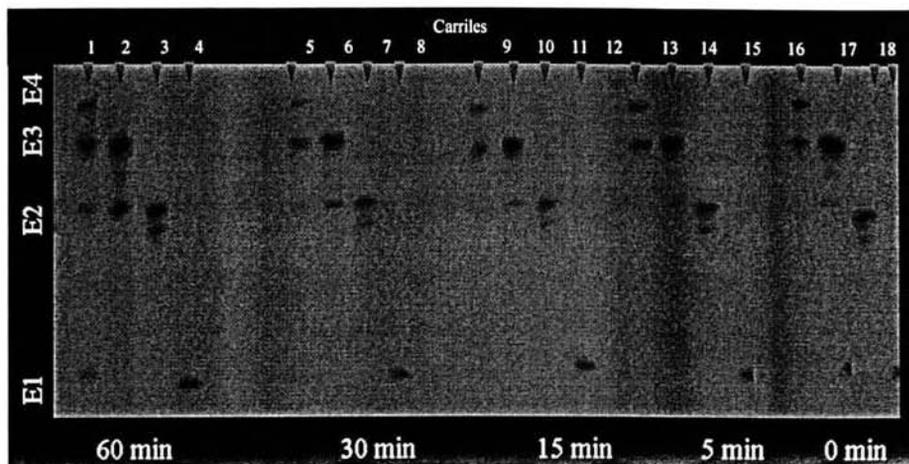


Fig. 15. Autorradiografía de los productos de la transcripción del plásmido pTRL5 eluidos de un gel preparativo. Las muestras fueron incubadas en buffer de reacción 1 a distintos tiempos y corridas en un gel analítico de acrilamida bis acrilamida, urea, corrido a 2000V. durante 1 hr. E1= eluido 1; E2 = eluido 2; E3 = eluido 3; E4 = eluido 4.

Cada una de las bandas se denominaron como E1, E2, E3 y E4. La figura 15 muestra que el eluido E4 (carriles 1, 5, 9, 13 y 17) se procesa generando a los demás productos, de esta forma E4 da lugar a E3, E2 y E1. A su vez E3 se procesa y da lugar a E2 y E1. No obstante, podemos observar que E2 (carriles 3, 7, 11, 15 y 19) presenta dos bandas con muy poca separación, y ya no produce otra banda inferior correspondiente a E1 que por su parte ya no genera ningún otro producto, lo que sugiere, que se trata de productos terminales y por lo tanto son las ribozimas libres. Respecto al tiempo de autocatálisis, podemos comentar de acuerdo a la figura que después de 24 horas de elución a temperatura ambiente no hubo diferencias significativas entre los productos del tiempo 0 hasta los 60 minutos.

Con el propósito de continuar la caracterización del plásmido pTRL5 y saber si los fragmentos observados en la autorradiografía correspondían a las ribozimas liberadas por la autocatálisis se llevó a cabo una transcripción *in vitro* de pTRL5 linealizado en distintos sitios de

restricción; los cuales se especifican en la tabla 2, las reacciones se cargaron en un gel preparativo.

Tabla 2. Productos esperados del plásmido pTRL5 al ser cortado por las distintas enzimas de restricción

Enzima	Producto
<i>Sst</i> I	Ribozimas TRL; Rz434; TRR
<i>Mlu</i> I	Ribozimas TRL; Rz434
<i>Hind</i> III	Ribozima TRL

De esta forma la radiografía que se obtuvo después de realizar la transcripción nos permitió ubicar realmente las ribozimas de acuerdo a su peso molecular.

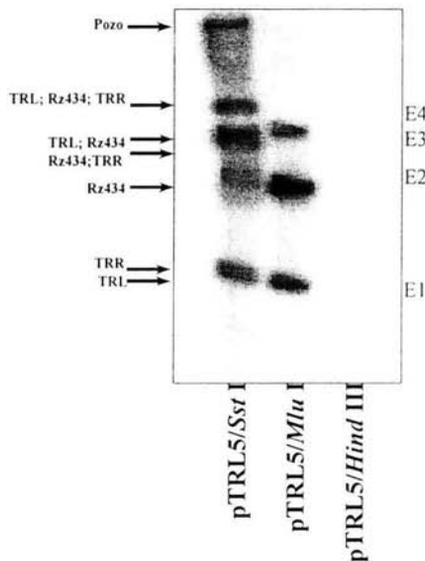


Fig 16. Transcripción en gel preparativo de acrilamida bis acrilamida pTRL5/*Sst* I, pTRL5/*Mlu* I y pTRL5/*Hind* III, el gel corrió 90 min. a 350V. Las marcas radioactivas se cortaron y se eluyeron por 24 hr.

La figura 16 muestra que el plásmido pTRL5/*Sst* I genera al módulo completo el cual se autoprocresa, dando lugar a los productos de menor tamaño, mientras, pTRL5/*Mlu* I da a lugar a

las dos ribozimas TRL-Rz434 como el producto de mayor tamaño, y también se observa como producto procesado en el plásmido anterior, éstas se autoprocenan liberando a cada ribozima como productos de menor tamaño, por último el plásmido pTRL/*Hind* III únicamente genera el transcrito correspondiente a la ribozima TRL, la cual es el producto más pequeño y se puede observar en todos los casos como punto final de la autocatálisis.

Las bandas fueron eluidas y purificadas por el método fenol:cloroformo, y se cargaron en un gel de acrilamida *bis* acrilamida 19:1 6% urea 7M, y se corrieron por 90 min. a 350 V. La radiografía permitió ver con claridad cada una de las ribozimas.

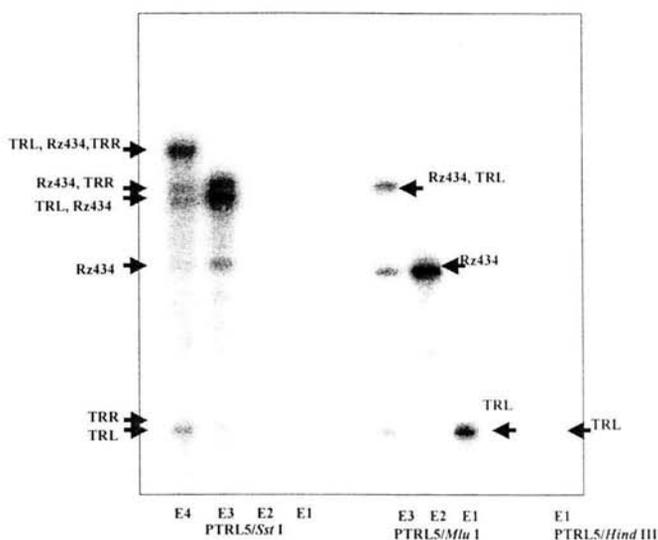


Fig. 17. La radiografía de los eluidos muestra la ubicación de las ribozimas en un gel de acrilamida *bis* acrilamida tras una corrida de 90 min a 350 V. El eluido E4 de pTRL5/*Sst* I muestra el cassette completo, el eluido E3 demuestra dos fragmentos del cassette conformado por sólo dos ribozimas, E2 presenta la ribozima terapéutica 434 con una protección a nucleasas RNA-¹ y como producto final las ribozimas de autocorte se pueden ver en la parte inferior del gel 78 b y 75 b.

La figura 17 muestra el gel analítico con los productos eluidos de la transcripción. Como se puede observar el plásmido pTRL5 cortado por *Sst* I (E4, E3, E2 y E1), presentó el siguiente patrón de migración; las tres ribozimas sin procesar TRL-Rz434-TRR tienen un peso molecular

de 330 bases, por lo que su migración se observa en la parte superior del gel, después se observaron dos marcas correspondientes a las ribozimas TRR-Rz434, seguida de Rz434-TRL, las cuales difieren en su peso molecular por 3 bases, posteriormente se observó una marca central, que corresponde a la ribozima Rz434, como se ha mencionado anteriormente tiene una protección de ARN-t^{Val}, por último se puede observar en la parte inferior del gel dos marcas éstas corresponden a la ribozima TRR y TRL que tienen un peso molecular de 78 y 75 bases respectivamente. Mientras tanto en los productos eluidos del pTRL5/*Mlu* I, (E3, E2 y E1) se se nota claramente la ausencia del módulo completo, por lo tanto las ribozimas Rz434 y TRL corresponden a la marca más pesada de ese carril, mientras que la ribozima terapéutica se ubica en la parte central y en la parte inferior únicamente se aprecia una banda que corresponde a TRL, que es recíproca a la banda del eluido de pTRL5/*Hind* III (E1).

Para corroborar que el módulo ribozimico se procesa liberando por etapas sus productos, y continuar con el análisis de los productos que se transcriben a partir de él, se preparó una variante de pTRL5, de tal manera que primero se cortó el plásmido con las enzimas de restricción *Eco* RI y *Hind* III, ya que estas enzimas flanquean a la ribozima TRL.

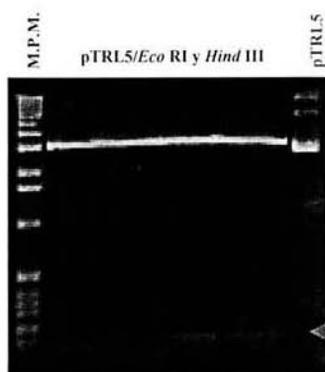


Figura 18. Electroforesis de una doble digestión del plásmido pTRL5/*Eco* RI/*Hind* III. Gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio 0.5mg/ml y corrido a 100 V por 30 min.

Fragmento liberado de aproximadamente 100 pb

En la figura 18 se observa el fragmento liberado el cual corresponde a la ribozima TRL. Una vez cortada la banda que corresponde al plásmido se extrajo del gel y posteriormente se incubó con Klenow DNA polimerasa para rellenar con deoxinucleótidos los extremos libres generados por las enzimas de restricción. Por último se agregó la enzima, ligasa de T4 con el fin de obtener nuevamente la forma circular y transformar células competentes. Para garantizar que la variante buscada no fuera una pTRL5 religada y con el antecedente de que la variante carece del sitio *Eco* RI, hizo una miniprep con células transformadas con el plásmido variante y el ADN obtenido fue incubado con *Eco* RI, el ADN resultante fue utilizado para transformar nuevamente células competentes, en virtud de que el ADN linearizado no es útil para transformación, las bacterias obtenidas por esta metodología fueron las que se denominaron pTRR, la figura 19 muestra los plásmidos ensayados con enzimas para obtener forma lineal y para corroborar que la variante pTRR carece del sitio *Eco* RI. La imagen muestra que pTRR sí fue linearizado por la enzima *Sst* I, en tanto que la enzima *Eco* RI no pudo restringirlo.

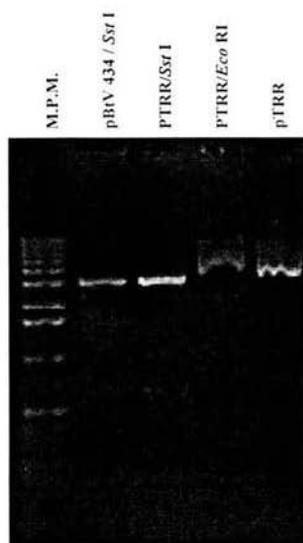
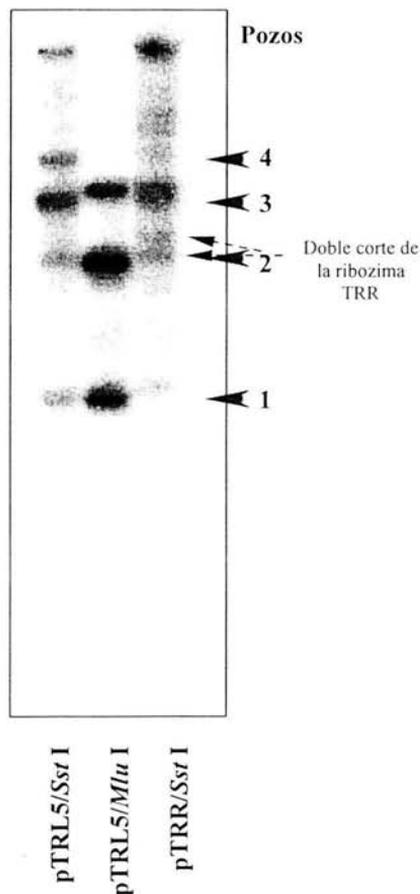


Figura 19. Electroforesis de las digestiones del plásmido pTRR. Se observa la pérdida del sitio *Eco* RI ya que la migración del pTRR es igual a la que presenta el plásmido sin restringir. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio 0.5mg/ml y corrido a 100 V por 30 min.

Ya que se contaba con la variante pTRR, se procedió a realizar la transcripción *in vitro* con el plásmido pTRL5 linealizado con *Sst* I, el cual contiene el módulo ribozímico TRL-Rz434-TRR, el plásmido pTRL5 linealizado con *Mlu* I, el cual, en función del corte excluye a la ribozima TRR, de tal forma que sólo se transcribieran la ribozima Rz434 y TRL y genera transcritos de menor tamaño, y por último el plásmido pTRR linealizado con *Sst* I, donde sólo se transcribe TRR y Rz434.

Fig. 20. Autorradiografía del gel preparativo de los plásmidos pTRL5/*Sst* I, pTRL5/*Mlu* I y pTRR/*Sst* I. Se puede observar que el plásmido pTRR sigue el mismo patrón que pTRL5/*Mlu* I. También se observa que pTRL5/*Mlu* I y pTRR no presentan la banda 4 que se observa en pTRL5/*Sst* I. Gel de acrilamida bis acrilamida 19:1 6% urea 7M corrido por 90 minutos a 350 V.



En la figura 20 se observan los productos transcritos de cada plásmido, como se puede ver pTRL5/*Sst* I presenta una banda de mayor peso molecular (banda 4) que no aparece en el plásmido linealizado con *Mlu* I, y en el plásmido pTRR/*Sst* I, lo cual sugiere que corresponde al módulo

completo, por su parte pTRL5/*Mlu* I y pTRR/*Sst* I generan un transcrito (banda 3) que corresponde a las ribozimas TRL;Rz434 y TRR; Rz434 respectivamente, las cuales se procesan y dan lugar a las ribozimas liberadas Rz434 (banda 2) y las ribozimas de autocorte TRL y TRR (banda 1) correspondientes para cada plásmido.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para el desarrollo de este trabajo, se probó el estado de los plásmidos pTRL3, pTRL4 y pTRL5 proporcionados por el Dr. Alvarez, los cuales, tienen clonadas las secuencias de las ribozimas TRL, TRR y Rz434. Estos plásmidos no se habían caracterizado, por lo que no se conocía la secuencia en que se encontraban y si éstas podían ser transcritas a partir del promotor de T3. Los plásmidos se observaron en un gel de agarosa, con lo que se determinó que el peso molecular de cada plásmido correspondía al esperado de 3.2 kpb. Después de esto los plásmidos se utilizaron para transformación de células *E. coli* DH5 α , la cual resultó exitosa al observar que las células transformadas crecieron en un medio con ampicilina gracias a que el plásmido contiene el gen de resistencia a ampicilina. Por otra parte, era necesario comprobar que los plásmidos observados eran los correctos y no se trataba de una contaminación, para ello, se realizaron pruebas de restricción a cada plásmido, estas pruebas permitieron verificar el contenido de éstos. Se observó que todos los plásmidos contienen los sitios de restricción para *Eco* RI, *Hind* III, *Mlu* I y *Sst* I.

De esta forma, se encontró que entre los sitios *Eco* RI y *Sst* I existe un fragmento que corresponde al tamaño del módulo ribozimico, lo que indica que el plásmido contenía el módulo ribozimico. Por su parte, digestiones con *Eco* RI y *Hind* III y otra con *Mlu* I y *Sst* I, revelaron que se hallan secuencias que flanquean a la ribozima terapéutica Rz434. Estas secuencias tienen un peso molecular de aproximadamente 80 pb. Esto coincide con el peso y la ubicación esperada para las ribozimas de autocorte, TRL entre los sitios *Eco* RI y *Hind* III y a su vez, TRR entre los sitios *Mlu* I y *Sst* I.

Sin embargo estos datos sólo nos daban una idea muy general de la disposición de las ribozimas en el plásmido, por lo que al realizar la secuenciación se corroboró el orden de los nucleótidos y la orientación al momento de la transcripción.

Como se demostró en los resultados, en los plásmidos pTRL3 y pTRL4 no se encontró la secuencia correspondiente a la ribozima TRR, mientras que el plásmido pTRL5 sí. Esto indicó que el plásmido a utilizar era el pTRL5. Sin embargo, para poder conocer toda la secuencia completa

del módulo ribozímico, fue necesario realizar varios ensayos, a causa, de que los procedimientos de secuenciación utilizados, sólo permiten observar aproximadamente 100 bases y el módulo ribozímico contiene 394 pb. Con estos experimentos se comprobó que la secuencia completa del módulo ribozímico esta compuesto de la siguiente manera; a partir del promotor de T3 se encuentra la ribozima TRL, entre los sitios de corte *Eco* RI y *Hind* III; seguida por la ribozima Rz434 y parte de la región codificadora del ARN-t^{Val}, entre los sitios *Hind* III y *Mlu* I; y por último la ribozima TRR entre *Mlu* I y *Sst* I. Una observación importante es que el módulo ribozímico contiene, clonada parte de la secuencia del ARN-t^{Val}, la cual, esta unida a la ribozima Rz434 y que además, confiere una estructura bidimensional que le protege de nucleasas.

Con base en estos resultados, la siguiente parte del trabajo consistió en evaluar la actividad autocatalítica del módulo completo, para ello se realizó la transcripción “*in vitro*”, marcando el ARN producido con fósforo radioactivo; [α -³²P] UTP. Para que el transcrito fuera correcto, se inicio la transcripción a partir del promotor de T3. Debido a la actividad autocatalítica del módulo, se esperaba que generara fragmentos de menor tamaño a partir de un solo transcrito. En los resultados se observó que el producto del ensayo transcripcional genera cuatro bandas de distintos tamaños. Esta evidencia sugirió la actividad autocatalítica del módulo, ya que, podemos decir que el fragmento de mayor tamaño se procesa y da lugar a las ribozimas libres. Después de eluir los productos por 24 horas e incubarlos a 37°C en distintos tiempos con el buffer de REact 1; el cual proporciona los cationes necesarios para la actividad catalítica; se determinó la forma en la que el módulo se procesa; la banda 4; con el módulo de TRL-Rz434-TRR, se procesó liberando una de las ribozimas de autocorte, dando lugar a la banda 3, esta banda fue más ancha, ya que en realidad se trataba, de dos bandas que se separan tan solo por 3 nucleótidos y el módulo tienen el siguiente arreglo dentro de la migración, Rz434-TRR seguido de TRL-Rz434, ambas secuencias continúan procesándose y de esta forma liberan por completo sus productos en la banda 2, que corresponde a la ribozima terapéutica Rz434, aunque se esperaría que su migración fuera similar a las ribozimas

de autocorte, porque que esta ribozima presenta parte del ARN-t^{val}, lo cual incrementa su peso molecular. Por su parte las dos ribozimas de autocorte, TRR y TRL correspondientes a la banda 1, migran a la parte inferior y están separadas por 3 bases (misma separación que se observa en la banda 3). De esta forma tenemos que las bandas 4 y 3 contienen al módulo procesándose, mientras que las bandas 2 y 1 son productos terminales. Partiendo de esto, se trato de evaluar su velocidad de catálisis, sin embargo como se observa en los resultados, la incubación a distintos tiempos presentó los mismos resultados para cada eluido, por lo que se determinó que el módulo se comienza a procesar desde el momento de la transcripción, hecho que hace difícil poder medir su velocidad de catálisis. A su vez la transcripción del plásmido pTRL5 digerido en los 3 sitios; *Hind* III, *Mlu* I y *Sst* I, permitió confirmar la migración de cada ribozima de acuerdo a lo dicho anteriormente.

La construcción de la variante de pTRR permitió obtener las ribozimas Rz434-pTRR, a partir del promotor de T3. Así, la transcripción de los plásmidos pTRL5/*Mlu* I y pTRR/*Sst* I permitió ubicar la posición correcta del conjunto de ribozimas TRL-Rz434 y Rz434-TRR respectivamente, y al compararlas con el módulo completo, se pudo observar que éste presenta una banda más pesada que no se encuentra en ninguna de las variantes, esto nos permite confirmar que la primer banda observada en el gel analítico de la figura 14 y 20 es el módulo completo y se procesa de la manera dicha anteriormente. Cabe mencionar que la transcripción con la variante pTRR, reveló que esta ribozima, corta en dos sitios dentro de la secuencia, como se puede observar en el eluido 2 de la figura 15 y la banda 2 de la figura 20. Debido a su ubicación dentro del módulo, esta ribozima encuentra dos sitios "GUC", los cuales están muy próximos entre ellos. Aunque en uno de estos sitios, la ribozima no hibrida, es posible que los dominios catalíticos "A" y "B" entren en contacto y se genere el corte ribozímico de la manera que han propuesto Shin y colaboradores. Aunque al parecer no tiene la misma eficiencia que cuando la ribozima sí hibrida al sitio blanco.

De esta forma nuestra investigación reveló que los fragmentos corresponden a los productos esperados y a la liberación de la ribozima terapéutica confirma que el módulo tiene una actividad autocatalítica positiva.

CONCLUSIONES



Los tres plásmidos proporcionados por el Dr. Alvarez contienen los sitios de restricción esperados. No obstante, después de secuenciarlos se determinó que solo el plásmido pTRL5 contiene la secuencia completa del módulo ribozimico.

Como se mencionó anteriormente la construcción de un módulo ribozimico, cuya actividad autocatalítica permite la liberación del fragmento correspondiente a la ribozima terapéutica Rz434, nos lleva a concluir que las ribozimas de autocorte TRL y TRR funcionaron exitosamente.

Por su parte, como ya se mencionó la ribozima TRL fue modificada de manera tal que el dominio catalítico formado por la ribozima-sustrato (dominio A) quedara del lado contrario, a manera de imagen en espejo. Con base en los resultados de esta investigación podemos afirmar que esta modificación en la orientación espacial de la ribozima, no genera ningún inconveniente para su actividad catalítica.

IZT.

Este resultado coincide con el obtenido por Schmidt y colaboradores para la “ribozima gemela”. En comparación a esta propuesta, la cual corta un sustrato en *trans*, diseñado sintéticamente para generar los dominios catalíticos del módulo, el módulo ribozimico pTRL5 presenta sitios dentro de la misma secuencia que generan los dominios catalíticos para cada una de las ribozimas. Otra diferencia significativa es la adición de la ribozima terapéutica Rz434 en el módulo, lo cual es un avance indicativo para el desarrollo de módulos multiblancos.

Esta investigación genera avances para la construcción de módulos multiblancos y para el desarrollo de nuevas variantes de ribozimas del tipo pasador. Los siguientes pasos en este proyecto estarán relacionados con la evaluación de la actividad catalítica del módulo pTRL5, realizando pruebas contra el gen E6 y E7 del VPH-16 y compararlo con el plásmido pBtV5-434. Si los resultados son positivos, se podría intentar incrementar el número de ribozimas terapéuticas Rz434, o bien mezclar las ribozimas para tener dos sitios de corte dentro de la secuencia blanco con la Rz419.

Tomando en cuenta, que la orientación espacial de la ribozima del tipo pasador puede ser modificada, surge la idea de una generación de ribozimas con tres dominios catalíticos, dos de autocorte que al fraccionar en *cis* su propio ARN liberan a las ribozima terapéutica. Si entre ribozimas de acción en *cis* colocamos ribozimas que reconozcan blancos específicos, podríamos elegir mas de una región codificante de proteínas no deseadas y atacarlas con esta estrategia de tal forma de que se genera un módulo que funcionaría como una escopeta capaz de atinar en varios blancos al mismo tiempo y con un solo disparo.

De esta manera la construcción de módulos multiblancos permitirá atacar de una manera más efectiva la infección provocada por virus y otras enfermedades de naturaleza infecciosa.

Apéndice

Material biológico

Bacterias

Se utilizaron bacterias de la cepa comercial DH5 α TM de *Escherichia coli* las cuales están libres de plásmidos y son sensibles a antibióticos. Estas bacterias tienen el siguiente genotipo:

F- \emptyset 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 *endA1 recA1 hsdR17*(r_k-m_k⁺) *deoR thi-1 phoA supE44* λ -*gyrA96 relA1gal-*

Lo que les confiere una alta eficiencia de transformación de $>1 \times 10^6$ a $>1 \times 10^9$ transformantes/mg, éstas bacterias presentan mutaciones *endA1*, que permiten incrementar la producción y calidad de plásmidos, además, la mutación *recA1*, que permite mantener la estabilidad del inserto.

Ribozimas

Para la construcción del módulo ribozímico se emplearon las ribozimas construidas por el Dr. Alvarez (2001), Rz434, TRL y TRR (datos no publicados).

Plásmidos

Los plásmidos utilizados se describen en la tabla 3. Los sitios de restricción se muestran en la figura 21.

Tabla 3. Características de los plásmidos utilizados, los cuales contienen clonada la secuencia del módulo ribozímico o parte de éste.

Plásmido	Peso molecular	Resistencia antibióticos	Sitios de restricción	Promotores	Ribozima
PBtV5-434	3.0 kpb	Ampicilina	<i>Sac I; Sau 3AI; Mlu I; Xho I; Hind III; Eco RI; Bam HI; Asp 7181</i>	T3 y T7	Rz-434
PTRL3	3.1 kpb	Ampicilina	<i>Sac I; Sau 3AI; Mlu I; Xho I; Hind III; Eco RI; Bam HI; Asp 7181</i>	T3 y T7	TRL; Rz-434
PTRL4	3.2 kpb	Ampicilina	<i>Sac I; Sau 3AI; Mlu I; Xho I; Hind III; Eco RI; Bam HI; Asp 7181</i>	T3 y T7	TRL; Rz-434
PTRL5	3.2 kpb	Ampicilina	<i>Sac I; Sau 3AI; Mlu I; Xho I; Hind III; Eco RI; Bam HI; Asp 7181</i>	T3 y T7	TRL; Rz-434; TRR
pTRR	3.1 kpb	Ampicilina	<i>Sac I; Sau 3AI; Mlu I; Xho I; Bam HI; Asp 7181</i>	T3 y T7	Rz-434; TRR

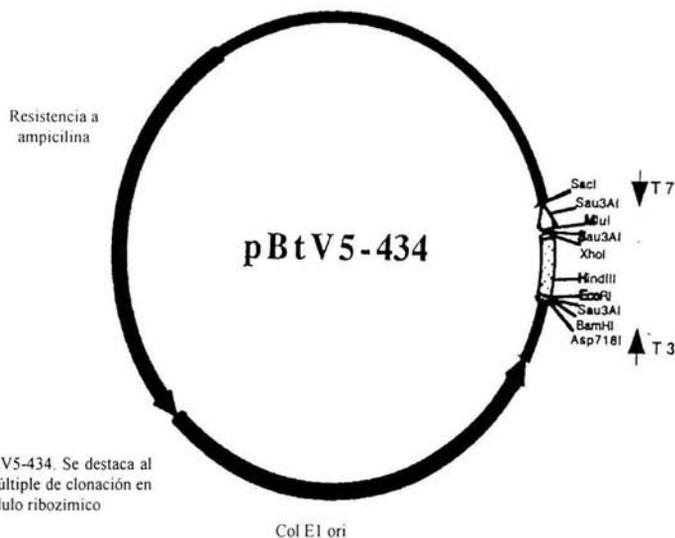


Fig. 21. Plasmido pBtV5-434. Se destaca al lado derecho el sitio múltiple de clonación en donde se insertó el módulo ribozimico

La figura 22 muestra la secuencia del módulo completo con las tres ribozimas TRL, Rz434 y TRR, los promotores, los sitios de restricción y las direcciones de la transcripción.

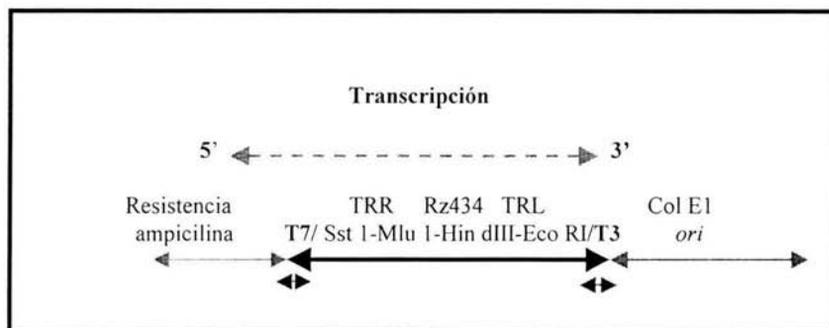


Fig. 22 Mapa general del módulo ribozimico. Sst I; Mlu I; Hin dIII; Eco RI, son los sitios de restricción para cada ribozima.

Enzimas

Enzimas adquiridas de los laboratorios GIBCO BRL® LIFE TECHNOLOGY: *Sst I* 1,000 U (10 u/μL); *Mlu I* 1,000 U (10 u/μL); *Hind III* 5,000 U (10 u/μL); *Eco RI* 5,000 U (10 u/μL); *Xho I*

2,500 U (10 u/μL). Laboratorios **Bio Labs** inc **NEW ENGLAND: Sac I** 2,000 U. (20 U/μl). Enzima productora de extremos romos: **Klenow enzyme BOEHRINGER MANNHEIM GMBH-Germany** 500 U 2 u/μl). Enzima de ligación: **T4 DNA ligase GIBCO BRL® LIFE TECHNOLOGY** 500 U (1 u/μL). Enzimas polimerasas: **T3 RNA polimerase PROMEGA** 1,000 U (10-20 u/μl). **T7 Sequenase™** versión 2.0 200 ul usbr.

Kits comercial para transcripción

Riboprobe® System-T3; T3 RNA polimerasa 500 u; Recombinant RNasin® (Inhibidor de ribonucleasas) 2500 u; agua libre de nucleasas 1.25 ml; DTT 100mM 100μl; buffer de transcripción 5X 500μl; ATP 50μl; CTP 50μl; GTP 50μl; UTP 50μl; RQI Dnase 110 u.

Reactivos

Agarosa **Boehringer Mannheim GmbH**, acrilamida *bis* acrilamida 19:1 **RESEARCH ORGANICAS, INC.**, Urea ultrapura **RESEARCH ORGANICAS, INC.**, TEMED **GIBCO BRL® LIFE TECHNOLOGY**, persulfato de amonio **GIBCO BRL® LIFE TECHNOLOGY**, marca radioactiva [$\alpha^{35}\text{S}$] dATP **amersasham pharmacia biotech**, marca radioactiva [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] UTP **amersasham pharmacia biotech**, glicerol.

Antibióticos

Ampicillin, Lyophilized-irradiated 20ml > 200 mg ampillin sodium/vial **GIBCO BRL® LIFE TECHNOLOGY**

Equipo técnico

La cristalería utilizada es marca **KIMAX® KIMBLE USA**, Tubos **Eppendorf** de 1.5 ml, Tubos **Falcón** de polipropileno de 14 ml del número 2059, Micropipetas **GILSON®** de 20 μl, 200 μl y

1000 µl, Cajas petri de plástico estériles de 100 X 150 mm **Corning® Incorporate**, filtros de membrana 0.20 µm **Screens, Corning® Incorporatred**, Centrifuga **IEC|CENTRA®CL2 International equipment company**, Microcentrifuga **Eppendorf Centrifuge 5415C**, Microcentrifuga **SORVALL® Biofuge PICO, Kendro Laboratory Products**, Nanofuga **Hoefer Scientific Instruments S. Fco., Agitador GYROTORY® SHAKER, NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, Co.. Inc. Edison N.J. USA., Vortex 2x³ Velp científica**, Baños maría **Isotemp® Waterbath Fisher Scientific**, Cámara de electroforesis horizontal, **Horizon 58 Gibco BRL LIFE TECHNOLOGIES™**, Cámara de secuenciación vertical, **Model S2 Gibco BRL Sequencing System LIFE TECHNOLOGIES™**, Cámara de electroforesis vertical, **Model V15-17 Gibco BRL Vertical Gel Electrophoresis Apparatus LIFE TECHNOLOGIES™**, Fuente de poder **BIO-RAD power/Pac 3000**, Fuente de poder **model 250EX Gibco BRL Electrophoresis power supply LIFE TECHNOLOGIES™**, Transiluminador **MacroVue UV is-20 Hoefer**, Espectrofotómetro **Gene Quant II, model 80-2105-98 Pharmacia Biotech**, Secadora **Model 583 Gel Dryer BIO-RAD**, Software **Kodak Digital Science, Scientific Imaging Systems, Eastman Kodak Company**, Película Kodak para diagnóstico **X-Omat^{MR} K XK-1 8x10**, Película Kodak Scientific Imaging fila **BIOMAX^{MR} 35 x 43 cm**, cassette blindado **Kodak X-Omatic; regular**, papel para cromatografía **Whatman® 3MM de 18X 34 cm**, contador Geiger **Model TBM-1S, Surface Monitor^T_A Technical associates**.

Medios nutritivos

Preparación

LB (medio Lennox) en 1litro de agua bidestilada disolver: Triptona 10g; extracto de levadura 5g; cloruro de sodio 5g, mezclar los ingredientes y esterilizar. **Medio SOB** en 100 ml de agua bidestilada disolver: Triptona 2g; extracto de levadura 0.5g; cloruro de sodio 0.05g; sulfato de magnesio 0.5g, mezclar y esterilizar. **Medio SOC; BIO 101, Inc.** (preparar al momento de su

utilización). En 1 litro de agua bidestilada disolver 31 g de la mezcla: Triptona 20g; extracto de levadura 5g; cloruro de sodio 0.5g; sulfato de magnesio 5g; glucosa 20 mM, mezclar y esterilizar.

Acrilamida *bis* acrilamida 19:1 6%, urea 7M

Para la preparación de acrilamida *bis* acrilamida se colocan en un vaso de precipitados de 1 litro los siguientes reactivos: Acrilamida *bis* acrilamida 19:1 30g; Urea 210g; TBE 10X 50 ml, disolver en el microondas, hasta que esta completamente diluida y después aforar con agua desionizada a 500 ml. La solución se guarda en un frasco ámbar a 4°C, hasta su uso.

Buffers

Buffer TBE (Tris-Borato EDTA). Tris [tris (hidroximetil aminoetano)] 100mM; Ácido bórico (H_3BO_3) 90mM; Na_2EDTA (etilendiaminotetraacetato de sodio) 1mM. pH 8.3/8.4. **buffer de carga 5X:** Tris-HCl pH 8.0 50mM; Glicerol 25%; Na_2EDTA 5mM; Azul de Bromofenol 0.2%; Xilencianol FF 0.2%. **Composición de Buffers REact, de Gibco, a concentración 1X.** Tabla 4.

Tabla 4. Composición de los buffers REact de los laboratorios Gibco.

Buffer REact	Tris*HCl (mM)	PH	MgCl ₂ (mM)	NaCl (mM)	KCl (mM)
1	50	8.0	10	0	0
2	50	8.0	10	50	0
3	50	8.0	10	100	0
4	50	7.4	5	0	50

Buffer de elución; SDS 0.5M 0.1%; EDTA 1mM; Acetato de amonio 0.5 M.

Referencias

Alvarez S. L. M. (2001). **Laboratorio de Terapia Génica, Introducción**

<http://cinvestav.mx/genetica/MyFiles/LTG/Introduccion.html#Top>

<http://cinvestav.mx/genetica/MyFiles/LTG/index.html>

Alvarez S. L., Cullinan A. E. and Siwkowski A. (1998). **Inhibition of VPH-16 E6/E7 immortalization of normal keratinocytes by de hairpine ribozymes**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Feb 3;95(3):1189-94

Burke M. J. (1996). **Hairpine ribozyme: current status and future prospects** Department of Microbiology And Molecular Genetics, University of Vermont, Burlington, USA. 25 Marzo: ARN interactions: Rybozimes and Antisense 24: 607-615

Cech R. T. and Herschlag D. (1992). **RNA Catalysis by a Group I Ribozyme**. Journal of Biological Chemistry. 267:25: 17479-17482.

Gutierrez X. M. Marzo (2000). **Caracterización bioquímica y funcional de la proteína E7 de virus del papiloma humano tipo 16 y su importancia en el desarrollo de cáncer cérvico uterino**. http://www.insp.mx/cisei/proy_7.html.

Hampel A., DeYoung M., Galasinski S. and Siwkowski A. (1997). **Design of Hairpin Ribozyme for Targeting Specific RNA Sequences**. Methods in Molecular Biology, vol 74, pp 171-176; ribozyme Protocols Ed. P. C. Turner Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Howley M. P., Yang Y., Spalholz A. B. and Rabson S. M. (1986). **Papillomavirus transforming functions**. Papillomaviruses. Wiley, Chicester (Ciba Foundation Symposium 120) p39-52.

Jiménez S. G. (1998). **Terapia génica: Retos, oportunidades y perspectivas para América Latina.** CIENCIA (49):2. 29-34.

Kay A. M., Liu D. and Hoogerbrugge M. P. (1997). **Gene therapy.** Proc Natl. Acad. Sci Usa: 24 pp 12744-12746.

Murray R. P., Kobayashi S. G. and Pfaller A. M. (1997). **Microbiología Médica.** 2ªed. Ed. Harcourt-Brace, pp 555-559.

Schmidt C., Welz R. and Müller S. (2000). **RNA double cleavage by a hairpine-derived twin ribozyme.** Nucleic Acids Research (28):4. 886-894.

Shin C., Choi J. N. and Song I. S. (1996). **The loop B domain is physically separable from the loop A domain in the hairpin ribozyme.** NucleicAcids Research, , (24):14 2685-2689

Sullenger A. B., (1995). **Colocalizing ribozymes with Substrate RNAs to Increase Their Efficacy as Gene Inhibitors.** Applied Biochemistry and Biotechnology: 54 pp57-61.

Voeks J. D. and Clawson N. S., (1998). **Tissue-specific triple ribozyme vectors for prostate cancer gene therapy.** Gene Ther Mol Biol: 1 pp 407-418.

Walter G. N., Albinson E. and Burke M. J. **Probing structure formation in the hairpin ribozyme using fluorescent substrate analogs.** Nucleic Acids Symposium Series No. 36 pp175-177.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN MÓDULO
RIBOSÓMICO DIRIGIDO CONTRA EL GEN E6 DEL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO TIPO 16**

Alumno: Jorge Fernández Retana

Núm. de cuenta: 9754090-8

Generación 1997-2000

Dirección Boulevard Coacalco 618 Villa de las Flores, Coacalco Edo. de
México

Tel: 5874-1084

ritep@msn.com

Tiempo de Realización 2001-2002

Asesor: M. en C. Ramón Víctor Moreno Torres