



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y DESARROLLO DE UN SISTEMA
REPORTERO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD *IN VIVO* DE RIBOZIMAS
RECOMBINANTES DIRIGIDAS CONTRA EL PAPILOMA VIRUS
HUMANO TIPO 16 (HPV-16)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. María Luisa Benítez Hess

Director de Tesis: Dr. Luis Marat Alvarez Salas

México, D.F.

Agosto, 2004.



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
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de abril del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado del Doctorado en Ciencias del alumno(a) **María Luisa Benítez Hess**, con número de cuenta 89552973, con la tesis titulada: **"Diseño, Construcción y Desarrollo de un sistema reportero para evaluar la actividad in vivo de ribozimas recombinantes dirigidas contra el papiloma virus humano tipo 16 (HPV-16)"**, bajo la dirección del (la) **Dr. Luis Marat Álvarez Salas**.

Presidente:	Dra. Rosario Rodríguez Amaiz
Vocal:	Dr. Alejandro Manuel García Carrancá
Vocal:	Dra. Marcela Lizano Soberón
Vocal:	Dra. Emma Libertad Verástegui Avilés
Secretario:	Dr. Luis Marat Álvarez Salas
Suplente:	Dra. Marisol López López
Suplente:	Dr. Diego Julio Arenas Aranda

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 09 de julio de 2004

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Agradecimientos

Este trabajo se desarrolló bajo la dirección del Dr. Luis Marat Alvarez Salas en el laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV.

El proyecto fue parcialmente apoyado por CONACYT (proyectos 28396M y 37112B) y por la TWAS (RGA No. 98-303 RG/BIO/LA).

Asignación de Sinodales

Presidente	Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz
Primer Vocal	Dr. Alejandro Manuel García Carrancá
Segundo Vocal	Dra. Marcela Lizano Soberón
Tercer Vocal	Dra. Emma Libertad Verástegui Avilés
Secretario	Dr. Luis Marat Alvarez Salas
Suplente	Dra. Marisol López López
Suplente	Dr. Diego Julio Arenas Aranda

ÍNDICE

Resumen	v
Abstract	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
Antecedentes.....	1
Proteína verde fluorescente (GFP).....	2
Propiedades estructurales.....	2
Propiedades espectroscópicas.....	3
Doblamiento y generación del fluoróforo en GFP.....	3
Efectos del pH y temperatura	6
Mutantes de GFP	6
Variedades de la familia de GFP	7
Aplicaciones de la GFP.	8
1.- Marcadores de expresión.....	8
2.- <i>Interacción hospedero-parásito</i>	8
TRANSFERENCIA DE ENERGÍA FLUORESCENTE EN RESONANCIA (FRET).	9
Transferencia de energía en resonancia.	9
Condiciones del efecto FRET.....	10
Aplicaciones del efecto FRET entre variantes de la familia de GFP	11
1.- FRET para la detección de la proteasa Factor Xa.....	12
2.- Ingeniería de moléculas fluorescentes para mejorar la brillantez	12
3.- Indicadores fluorescentes de la concentración de calcio libre.	12
4.- FRET para la detección de apoptosis.....	13
MOLÉCULAS TERAPÉUTICAS	14
Oligodesoxirribonucleótidos Antisentidos (Anti-ODNs).....	15
Mecanismos de acción de los oligonucleótidos antisentido:.....	15
RIBOZIMAS	17
Características generales.....	18
Criterios de selección de moléculas antisentido.....	19
Aplicación terapéutica de moléculas antisentidos.....	20
Diseño, selección y evaluación de moléculas antisentido.....	21

JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS.	25
OBJETIVOS.....	28
Objetivo General:	28
Objetivo particulares:	28
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
<i>OLIGODEOXINUCLEÓTIDOS (ODN) y PLÁSMIDOS.....</i>	<i>33</i>
FRET2ds.....	33
pEFSCFP-kos	33
ODNs para el ensayo de extensión del cebador y ensayos de RNasaH	34
PLÁSMIDOS	35
EGFP	35
ECFP	35
EBFP	36
EYFP	36
Construcción de Vectores para Expresión en Procariontes.....	36
Construcción de Vectores para Expresión en Eucariontes.....	40
Vectores para evaluar actividad catalítica de las ribozimas	42
pE6-GFP.....	42
Vectores de Expresión in vitro y en Eucariontes	43
pCRU6Rz434, pCRU6Rz434i y pCRU6Rz434m.....	43
Vectores de Expresión en Procariontes.....	44
pACYCU6Rz434, pACYCU6Rz434i y pACYCU6Rzmut	44
Crecimiento de bacterias para Inducción con IPTG:	45
Fluorescencia en bacterias vivas.....	46
Purificación de las proteínas recombinantes ligadas a GST.....	46
Inmunoelectrotransferencia.	46
Ensayos de fluorescencia.	47

Barrido de excitación-emisión.....	47
Determinación de la eficiencia de FRET.....	47
Ensayos <i>in vitro</i> de Transcripción-Traducción.....	47
Transcripción <i>in vitro</i> (Run-off).....	48
Reacciones de corte con ribozimas.....	48
Ensayo de RNasaH.....	49
Extensión de cebador (Primer extension).....	49
Modelado matemático de la estructura del mensajero.....	50
<i>Ensayos con Antisentidos en bacterias vivas</i>	50
Selección de colonias fluorescentes y preparación para administración de antisentidos.....	50
Administración de antisentidos en bacterias.....	51
Línea celular.....	51
CULTIVO CELULAR:.....	51
Transfección.....	51
Cosecha de células.....	52
Administración de antisentidos en células que expresan el sistema fluorescente.....	52
Preparación de las muestras para citometría de flujo:.....	53
Análisis por citometría de flujo.....	53
RESULTADOS.....	54
Experimentos <i>in vitro</i>	54
Descripción de la Ribozima Rz434.....	54
Actividad catalítica de la Rz434.....	56
Desarrollo del sistema fluorescente <i>in vitro</i>	56
Accesibilidad del sitio.....	57
Transcripción-Ensayo de RNasaH- Traducción.....	59
Experimentos <i>in vivo</i> en Bacterias.....	60
Caracterización de las proteínas fluorescentes.....	60
Determinación de los picos máximos de excitación y emisión de los fluoróforos.....	61
Determinación de los espectros de la primera generación del sistema reportero GFP-BFP.....	65
Características de las proteínas quiméricas de la segunda generación del sistema GFP-CFP.....	65
Caracterización espectral de las proteínas quiméricas.....	66

Cursos temporales de inducción.....	69
Determinación del efecto FRET por citometría de flujo en bacterias.....	71
Caracterización de los promotores a utilizar en un sistema bacteriano.....	72
Inducción de la ribozima en bacterias.....	73
Inducción del sistema reportero expresando las ribozimas en <i>cis</i>	76
Doble inducción del sistema reportero en presencia de las tres diferentes ribozimas.....	76
Inducción del sistema de manera independiente.....	77
Inducción simultánea del sistema reportero y las ribozimas en <i>trans</i>	78
Inducción del sistema reportero expresando la segunda generación de ribozimas en <i>trans</i>	80
Inducción simultánea del sistema reportero en presencia de las ribozimas en <i>trans</i>	81
Comparación de la eficiencia de FRET entre generaciones de sistema reportero.....	83
<i>Administración de los Antisentidos</i>	84
Inhibición del efecto FRET por la administración del ODN AntiE6 en bacterias vivas.....	85
Expresión y caracterización del sistema reportero fluorescente en célula tumorales humanas.....	87
Administración de antisentidos fluorescentes en células C33-A.....	89
Efecto de AntiE6 y 419 en la línea celular C33-A transfectada con el sistema reportero FRET2 Cian.....	90
Comparación entre los antisentidos 419 y AntiE6.....	91
Evaluación de la actividad de ribozimas.....	92
DISCUSIÓN	94
Ensayos de traducción <i>in vitro</i> para evaluar la actividad de moléculas antisentido.....	98
Modelado de la estructura del RNA de FRET2.....	98
Especificidad terapéutica y Toxicidad.....	100
CONCLUSIONES	102
BIBLIOGRAFÍA	106
ARTÍCULOS PUBLICADOS	114

DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y DESARROLLO DE UN SISTEMA REPORTERO
PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD *IN VIVO* DE RIBOZIMAS RECOMBINANTES
DIRIGIDAS CONTRA EL PAPILOMA VIRUS HUMANO TIPO 16 (HPV-16).

Resumen

La utilización de moléculas de ácidos nucleicos terapéuticos (ANT) en la modulación de la expresión de genes particulares se ha convertido en una herramienta promisorio para el tratamiento del cáncer cervical. De manera entendible, la evaluación y desempeño *in vivo* de ANTs [oligodesoxiribonucleótidos (ODNs) antisentido y/o ribozimas (Rz)] guarda gran importancia. En este trabajo se reporta la utilización de un sistema reportero (FRET2) basado en la inhibición de la transferencia de energía fluorescente en resonancia (FRET) para medir la interacción de moléculas terapéuticas (ODNs y Rz) dirigidas contra la región nucleotídica 410-445 del virus de papiloma humano tipo 16 (HPV-16) el cual está asociado en un 50% de los casos de cáncer cervical a escala mundial.

El sistema consiste en la utilización de dos variantes de la proteína verde fluorescente (GFP) para generar una proteína quimérica con capacidad de transferencia de energía fluorescente en resonancia (FRET). Entre los fluoróforos se colocó la secuencia blanco que codifica a la porción 410-445 del gen E6 del HPV-16. Dicho sistema evalúa la dependencia de FRET a la producción de la proteína quimérica completa en función de la actividad de moléculas antisentido sobre su RNAm. El sistema FRET2 se optimizó para que la combinación de fluoróforos que dieran el mejor efecto FRET, el cual fue observado en el par formado por GFP (donador) y YFP (aceptor), la utilización de diferentes combinaciones de aminoácidos y la longitud de las secuencias blanco no mostró ninguna diferencia significativa en la eficiencia de FRET. La accesibilidad del mensajero se evaluó *in vitro* por ensayos de RNasaH. La hibridación de los ODNs antisentido con el RNA mensajero quimérico y el tratamiento con RNasaH resultó en el corte específico del RNAm quimérico y la subsecuente inhibición del efecto FRET en ensayos de transcripción y traducción acoplado *in vitro*. La administración en bacterias vivas de antisentidos fosforotioatos (PS-ODN) dirigidos contra el RNAm quimérico, resultaron en la inhibición específica del efecto FRET. La inhibición correlacionó con la presencia de productos protéicos truncados, confirmando el corte del mensajero quimérico por la hibridación de los ODNs antisentido. Por lo tanto, la inhibición del efecto FRET puede ser utilizada para la medición directa de la actividad de moléculas antisentido en células vivas.

DESIGN, CONSTRUCTION AND DEVELOPMENT OF AN *IN VIVO* REPORTER SYSTEM TO ASSAY RECOMBINANT RIBOZYMES ACTIVITIES TARGETING HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 (HPV-16).**Abstract**

The use of therapeutic nucleic acids (TNAs) to modulate expression of particular genes is a promising approach for the therapy of squamous cell carcinoma of the cervix. Understandably, evaluation of the *in vivo* performance of TNAs [antisense oligodeoxynucleotides (ODN) and/or ribozymes (Rz)], is of ultimate importance. Here we report the use of a reporter system (FRET2) based on the inhibition of fluorescence resonance energy transfer (FRET) to measure the interaction of therapeutic molecules (ODN and Rz) targeting nt 410-445 of the human papillomaviruses type 16 (HPV-16) which is associated with of 50% cervical cases world wide.

The FRET2 reporter system is based on the use of two variants of green fluorescent protein (GFP), which generated a chimeric protein with the capacity of fluorescent resonance energy transfer (FRET). Between the fluorophores we introduced a target sequence which code for the HPV-16 E6 gene. Such configuration evaluates the dependence of FRET efficiency of the whole chimeric protein, in response to TNA activity at the transcriptional level. The FRET2 system was optimized to achieve the highest FRET efficiency, which was best seen with the pair formed by GFP (donor) and YFP (acceptor). The use of different linkers between fluorophores suggested that the amino acid content of the linker have no significant effect on FRET effect. Antisense accessibility to the chimeric mRNA was *in vitro* tested by RNaseH assays with antisense ODNs (PS-ODN). ODN hybridization with the chimaeric mRNA and treatment with RNaseH resulted in specific cleavage of the messenger and subsequently in the inhibition of FRET assayed by *in vitro* transcription-translation. Administration of phosphorothioated antisense ODNs targeting the chimeric messenger in living bacteria resulted in the specific inhibition of the FRET effect. FRET inhibition measurements correlated with the presence of truncated proteins confirming true antisense activity over target. Therefore, FRET inhibition may be used for the direct measurement of ODN activity *in vivo*.

Introducción

Un problema de gran importancia para el estudio de las moléculas antisentido y ribozimas es la carencia de sistemas que reporten su actividad *in vitro* e *in vivo*. La mayor parte de los sistemas actuales evalúan la eficiencia de ribozimas con los niveles residuales del RNA sustrato y su proteína codificada, o bien la supresión de un fenotipo determinado. Actualmente existe la necesidad de optimizar el uso de ribozimas terapéuticas; sin embargo, la mayor parte de estas moléculas sólo se han utilizado en el ámbito de la investigación básica por lo que el uso de ribozimas en la clínica dista mucho de ser una realidad. La optimización de ribozimas por los medios tradicionales puede resultar larga y costosa lo que ocasiona una extrema lentitud en el desarrollo de nuevas ribozimas. Para acelerar el análisis de la actividad de ribozimas *in vivo* proponemos el desarrollo de un sistema reportero de la actividad basado en el uso de la fluorescencia producida por la proteína verde fluorescente (GFP) y sus variantes. Dicho sistema permitirá el monitoreo de la actividad de ribozimas de manera casi inmediata sin perturbar la integridad de la célula. Además se podrá cuantificar la eficiencia de las ribozimas en el ambiente intracelular permitiendo la comparación directa entre diferentes ribozimas, lo que convertirá al sistema reportero en una valiosa herramienta para el desarrollo de ribozimas terapéuticas.

Antecedentes.

En 1975, varios laboratorios aislaron la proteína productora de luz aequorina de la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria* (18;23;25;65;78). Este celenterado produce una luz verde, y se pensaba que la aequorina era la proteína productora de esta luz (lo cual es parcialmente cierto), pero al estudiar *in vitro* sus espectros de absorción y emisión de luz, se encontró que esta proteína producía luz azul, en vez de luz verde (18).

Posteriormente, al analizar los extractos provenientes del organismo marino, se descubrió que la medusa produce otra proteína, la ahora llamada proteína verde fluorescente (*Green fluorescent protein* [GFP], por sus siglas en inglés) que, mediante un proceso llamado Transferencia de energía fluorescente en resonancia [FRET] (*Fluorescence resonance energy transfer* [FRET], por sus siglas en inglés), acepta la energía que emite la aequorina excitada y después la reemite como luz verde, (18;25). Ambas proteínas son responsables de la bioluminiscencia de la medusa.

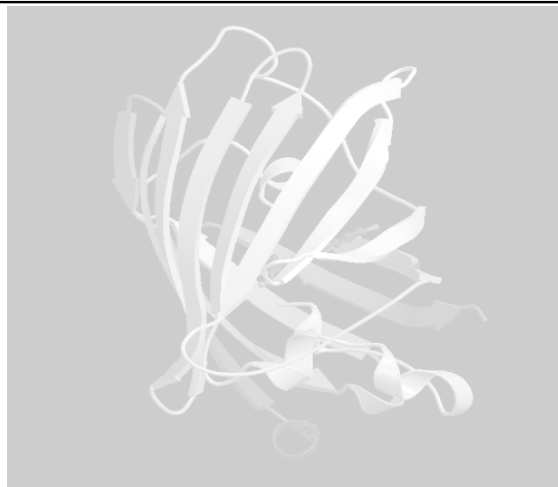


Figura 1. Estructura tridimensional de la GFP. Tomada de referencia 4.

La proteína GFP es una herramienta muy útil hoy en día porque no requiere de sistemas enzimáticos complejos para producirse, ni tampoco cofactores para fluorescer. Con las herramientas moleculares actuales se ha logrado su expresión en organismos tan alejados entre sí en la escala evolutiva como son bacterias, nemátodos, plantas, células de mamífero e incluso animales transgénicos (ANDi) (18;34;37;90). GFP y FRET son dos conceptos en los cuales se abundará en las siguientes páginas para una mejor comprensión de este trabajo.

Proteína verde fluorescente (GFP).

Las proteínas verdes fluorescentes existen en una variedad de celenterados (78); sin embargo, la única cuyo gen ha sido clonado es la de *A. victoria*, por lo que toda vez que se hable de GFP se referirá a la proteína aislada de este organismo.

Propiedades estructurales.

La GFP es una proteína de 238 aminoácidos, con un peso de entre 27 y 30kDa, determinado por SDS-PAGE. Su estructura tridimensional fue dilucidada por Ormö et.al. y Yang et al. (90) en 1996, siendo esta descrita como un "barril" formado por 11 hojas β -plegadas y una α -hélice en el eje de simetría (18;23;34;78;90). El fluoróforo se encuentra en el α -hélice, a resguardo del entorno ambiental (Figura 1 tomada de referencia).

La presencia de las hojas β -plegadas y el hecho de que el fluoróforo esté inmerso en ellas, hace que desde el punto de vista físico-químico, la proteína sea muy estable y resistente a la

acción de agentes desnaturalizantes: ésta permanece fluorescente aún cuando es sometida a 65°C, pH 11, SDS al 1%, o cloruro de guanidina 6M; y resiste durante varias horas a la acción de la mayoría de las proteasas conocidas (23;78).

La GFP tipo silvestre (^{wt}) puede formar dímeros a concentraciones mayores de 100µM y fuerzas iónicas bajas (78;90), lo que afecta las propiedades espectroscópicas de la proteína. Se han identificado los aminoácidos que participan en la interacción entre dímeros y se sabe que estos contactos son relativamente fuertes (90).

Propiedades espectroscópicas.

La GFP^{wt} tiene dos picos de excitación: uno a 395nm y otro a 475nm. El primer pico tiene 3 veces más amplitud que el segundo (18;23;34;38;78).

Cuando se excita a 395nm, se obtiene un pico de emisión a 508nm; mientras que si se excita a 475nm, el pico de emisión se obtiene a 503nm. A 475nm se excitan las moléculas de GFP que contienen fluoróforos aniónicos (el fenolato aniónico), mientras que a 395nm se excitan las moléculas que tienen fluoróforos neutros o protonados; por lo tanto, la amplitud de los picos de excitación depende del pH del medio (obviamente, considerando un pH extremo) (78).

Doblamiento y generación del fluoróforo en GFP

Heim y colaboradores (38) describen un mecanismo químico de dos pasos para la formación intramolecular del fluoróforo maduro. Se propone que el primer paso involucra la ciclación, de manera que se requiere de una relación estérica que facilite el ataque del nucleófilo débil de la glicina 67 (nitrógeno amido) al carbonilo con débil electrofilicidad de la serina 65. La serina 65 o tirosina 66 pueden remplazarse por otros aminoácidos, que deberán mantener la habilidad de ciclarse, esto implica que las cadenas laterales alrededor del sitio de reacción no son críticas. Por el contrario, el segundo doblamiento es crítico y la evidencia disponible indica que la proteína naciente debe de completar al menos la estructura terciaria inicial antes de que la ciclación ocurra. Así, los cambios en la configuración relacionados con la formación del anillo imidazolidinona (Figura 2) requieren del acomodo de la estructura secundaria y terciaria; sin embargo, hasta el momento no existe evidencia experimental para apoyar esta especulación. Este argumento es factible debido al hecho de que otras proteínas con la secuencia aminoácida - Serina-Glicina-Tirosina (Ser-Gly-Tyr) no emiten fluorescencia en el espectro verde (Figura 3). A

priori no existe nada especial en la secuencia, que por ella misma pueda conferir una conformación única para promover la reacción de ciclación.

Existen consideraciones estructurales adicionales, por ejemplo la reacción de ciclización no procedería eficientemente en presencia de agua, como lo han discutido Ormö y colaboradores (53) quienes al analizar la estructura de la GFP por cristalografía de rayos X, encontraron que el cromóforo es inaccesible al agua. El agua formada como consecuencia de la condensación (ciclación) es expulsada o se convierte en moléculas de agua estructuralmente acomodadas adyacentes a la cavidad mayor. Hasta el momento no se sabe si la formación de la imidazolidinona requiere apoyo catalítico, de una cadena lateral de un aminoácido hasta ahora desconocido como agente activador del nucleófilo amido o del carbonilo electrofílico.

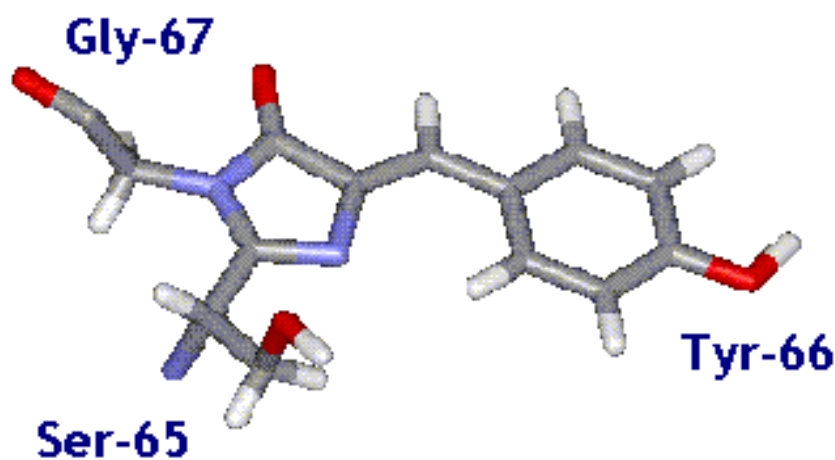


Figura 2. Motivo que forma el fluoróforo en la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria*, indicado por la serina 65 (Ser-65), Glicina 67 (Gly-67) y la tirosina 66 (Tyr-66). Tomada de referencia 3.

Las circunstancias conformacionales que promueven la primera reacción en la generación del fluoróforo en GFP son inusuales y posiblemente únicas. Y es difícil realizar ensayos espectroscópicos de esta reacción. Una posibilidad para estudiar éstas, sería el aislar la proteína previa a la formación de la imidazolinona o disminuir la velocidad de la reacción notablemente para analizar espectroscópicamente el transcurso de la ciclación. La fluorescencia de la GFP requiere de un paso de oxidación en el enlace -C2-C3 adyacente a la tirosina 66. La presencia de

oxígeno en esta reacción parece ser el paso limitante para la fluorescencia de la GFP *in vitro* e *in vivo*. Las reacciones *in vitro* comúnmente son incompletas por la existencia de moléculas GFP no oxidadas, obtenidas de una preparación de proteínas recombinantes.

Palm y colaboradores (54) sugieren que los aminoácidos 57 a 71 estén involucrados en la formación del barril β , que permiten la conformación adecuada entre la secuencia –Ser-Tyr-Gly– para la ciclación. Al desarrollar mutantes de la GFP observa que al substituir F65L y V163A, se facilita la formación del barril β . Con lo que se propone un modelo diferente para la formación del fluoróforo, indicando que es substancialmente más importante el plegamiento de la proteína, que no la presencia del oxígeno para la ciclación.

Es importante mencionar que varios celenterados emiten esencialmente fluorescencia idéntica a las derivadas de GFP. Hasta ahora sabemos que los fluoróforos de *Renilla* (proteína rojo fluorescente; RFP) y de *Aequorea* (GFP) son estructuralmente idénticos; por lo que se especula que todas las proteínas fluorescentes son altamente homólogas en la secuencia requerida para la producción del fluoróforo y para la emisión.

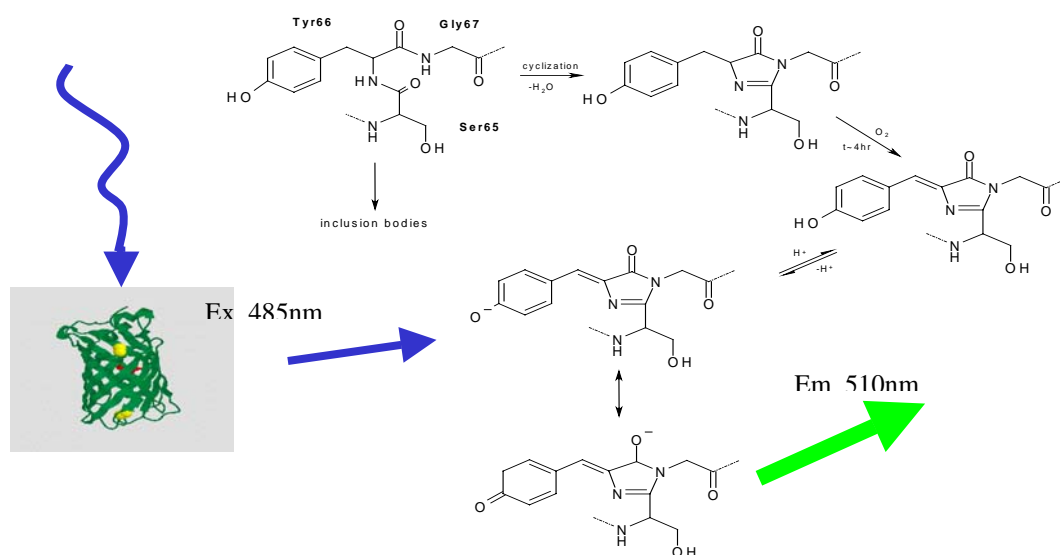


Figura 3. Esquema propuesto para la formación del fluoróforo (p-hydroxybenzilideneimidazolidinona) de *Aequorea* GFP. Modificada de referencia 71.

Efectos del pH y temperatura

La GFP^{wt} a pH's altos (36;54) pierde amplitud en el pico de excitación de 395nm y gana amplitud en el pico de 470nm.(78).

El incremento de temperatura de 15°C a 65°C disminuye ligeramente la amplitud del pico a 395nm y aumenta el pico a 470nm, esto en la GFP que ya está plegada o como se dice coloquialmente, que ya ha madurado. A mayores temperaturas se causa la desnaturalización de la proteína, perdiendo hasta un 50% de la fluorescencia a 78°C. A temperaturas muy elevadas se desnaturaliza en forma irreversible, en cambio, la desnaturalización lograda a pH's extremos sí es reversible.

Mutantes de GFP

A partir de la GFP^{wt} se obtuvieron variantes por mutación puntual con propiedades espectroscópicas diferentes (36;38) (Figura 4). Las variantes existentes se dividen en 5 grupos, de acuerdo con sus características espectroscópicas (Figura 4):

VERDES con el espectro de excitación movido hacia el rojo: EGFP, GFP mut1, GFPS65T y dEGFP (GFP desestabilizada). Se caracterizan por tener un espectro más brillante 4 a 35 veces mayor que la GFP^{wt} a excitarse con luz azul.

AZULES: EBFP (codones para uso en mamíferos) y EBFP2. Codones originales de la medusa, usada en expresión bacteriana). Poseen 4 mutaciones lo que mejora la solubilidad de la proteína.

AMARILLA: EYFP contiene 4 mutaciones que modifican la emisión a un espectro verde amarillento, sin embargo los niveles de fluorescencia son equivalentes a los de EGFP.

CIAN: ECFP posee 6 sustituciones aminoacídicas lo que modifica el espectro de verde a cian. Esta variante es más brillante que la EBFP, por lo que se considera un a molécula donadora efectiva para estudios de FRET.

GFP ^{wt} :	Phe 64 Ser Tyr Gly Val Gln 69 . . . Ser 72 . . . Tyr 145 Asn 146 . . . Met 153 . . . Val 163 . . . Thr 203
GFP-S65T:	Phe 64 Thr Tyr Gly Val Gln 69
EGFP:	Leu 64 Thr Tyr Gly Val Gln 69
EBFP/BFP2:	Leu 64 Thr His Gly Val Gln 69 Phe 145
EYFP:	Phe 64 Gly Tyr Gly Leu Gln 69 . . . Ala 72 Tyr 203
ECFP:	Leu 64 Thr Trp Gly Val Gln 69 Ile 146 . . . Thr 153 . . . Ala 163

Figura 4. Muestra las variantes de la GFP^{wt}. Las sustituciones en los aminoácidos y su posición se muestran subrayadas en negritas, tomada de referencia 6.

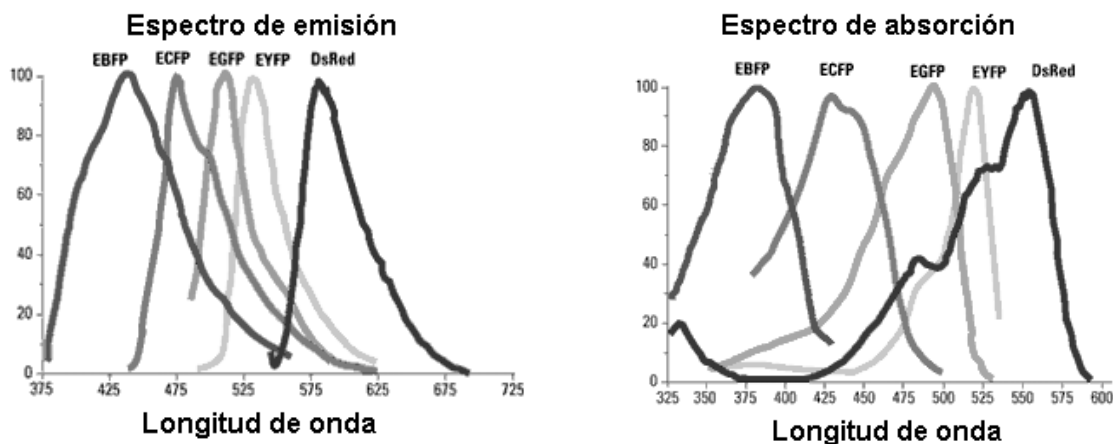


Figura 5. Espectros de excitación (absorción) y emisión de las variantes GFP. Modificado de referencia 3.

En el presente trabajo se utilizaron las variedades EGFP, EBFP y ECFP, por lo que únicamente se profundizará en las características fluoroespectroscópicas de éstas (Figura 5).

Variedades de la familia de GFP

La variedad EGFP posee una doble mutación, su espectro máximo de excitación es a 488nm y emite a 507nm(21;36).

La variante ECFP (21) contiene seis aminoácidos sustituidos y muestra dos picos de excitación (máxima a 433nm y mínima 453nm) y dos picos de emisión (máxima a 475nm y mínima a 501nm) similar a otras emisiones de variantes cían. Las otras cinco sustituciones le dan un marcado aumento en la brillantez y en la solubilidad de la proteína, principalmente debido a las características de plegamiento y a la eficiencia de la formación del cromóforo (7;21;37;38;90).

EBFP contiene cuatro aminoácidos sustituidos. EBFP muestra un pico de excitación (380nm) y un pico de emisión (440nm) similar a otras emisiones de variantes azules (21;37;38;90).

EYFP contiene cuatro sustituciones. El pico máximo de excitación es 513nm, y su espectro de emisión tiene un pico de 527nm (7).

Aplicaciones de la GFP.

Con la identificación y clonación de la GFP, la visualización de macromoléculas fluorescentes y el monitoreo de éstas en células vivas se ha convertido en un ejercicio experimental relativamente sencillo. Debido a que la GFP no requiere de sistemas enzimáticos especiales para expresarse, no es tóxica para las células, no es voluminosa y además, una vez que ha madurado, es bastante resistente a los cambios en el medio, se ha convertido en una herramienta muy útil para diversas actividades, entre ellas:

1.- Marcadores de expresión

Plautz y colaboradores (59) examinaron la producción de GFP bajo el control de un blanco multimérico del gen *glass* en moscas adultas (*Drosophila melanogaster*). La fluorescencia se observó en la pseudopupila de cada omatida, al igual que en los tres ocelos. La fluorescencia de GFP también se observó en preparaciones de tejido fijadas y teñidas. Al enfocar en los planos inferiores, se observó la fluorescencia de GFP en las 7 células fotorreceptoras localizadas en la parte superior de la omatida.

También se utilizó a la GFP como marcador en plantas, en donde se expresó a partir del promotor del virus del mosaico de la coliflor (35S). Este vector se introdujo en una solución de soya, por bombardeo de partículas de helio, en donde la fluorescencia verde se observó en células de soya vivas.

En células de mamífero la GFP se ligó al promotor de citomegalovirus (CMV) y se transfecaron de manera transitoria células tumorales de la pituitaria (GH3) por electroporación.

2.- Interacción hospedero-parásito

Bacterias patógenas como *Salmonella typhimurium* (*St*), *Yersenia pseudotuberculosis* (*Yp*) y *Mycobacterium marinum* (*Mm*), se transformaron por electroporación con vectores expresando la GFP. Macrófagos murinos (RAW 264.7) se infectaron con bacterias *St* o *Yp* expresando GFP, mientras macrófagos J774A.1 se infectaron con *Mm*. Los experimentos preliminares muestran que las bacterias fluorescentes invaden y se replican dentro de los macrófagos, y las bacterias

administradas oralmente a ratones, colonizan el bazo e hígado en niveles semejantes a las bacterias silvestres.

Cinco semanas después de infectar animales experimentales con las bacterias patógenas que expresan GFP, se observó que la proteína fluorescente se encontraba en cortes congelados de hígado y bazo de rana. La histopatología muestra las lesiones granulomatosas características de la infección por *Mm*. Para demostrar que los bacilos que fluorecían eran las bacterias expresando GFP, los cortes se destiñeron con alcohol ácido y las bacterias se tiñeron positivamente. Dicha visualización resulta de suma importancia para el estudio de la patogénesis, de manera que el usar a la GFP como marcador biológico, puede evaluar procedimientos de colonización, multiplicación, persistencia y transmisión de bacterias patógenas en animales vivos (81).

En cultivos celulares infectados con cepas patógenas fluorescentes, por citometría de flujo se puede detectar y cuantificar el número de células infectadas, y si es de interés recuperar las células resistentes a los diferentes patógenos.

También puede ser utilizada como un marcador, fusionándola con las proteínas de interés y de ésta manera refleja los niveles de expresión, la localización en la célula y el transporte de éstas (23;34). También puede utilizarse como un indicador activo: por ejemplo, algunas mutantes de la proteína son más sensibles a los cambios de pH, por lo que podrían ser utilizadas para registrar cambios de este tipo en organelos celulares(52;78).

Sin embargo, la forma más útil de medir cambios bioquímicos con GFP es hacer uso del efecto FRET entre las mutantes de esta proteína. Mediante este efecto puede medirse la actividad de proteasas, la asociación-disociación de moléculas, los niveles de calcio, etc. (78).

Transferencia de energía fluorescente en resonancia (FRET).

Transferencia de energía en resonancia.

Textualmente, la definición de este término es la siguiente: "Es la transmisión de un cuanto de energía desde su sitio de absorción a su sitio de utilización (en una molécula o sistema

de moléculas) por interacción resonante entre cromóforos a distancias mayores que las interatómicas, sin conversión a energía térmica y sin que el aceptor y el donador entren en colisión cinética" (29;35;87).

Una interacción de este tipo puede llevarse a cabo entre cromóforos (parte de una molécula que absorbe luz) de diversos tipos, no necesariamente fluorescentes. En el caso de que se involucren fluoróforos, se denomina efecto FRET. Esto es: un fluoróforo denominado donador absorbe energía, la cual excita a sus electrones y los lleva a un estado energético mayor. Cuando estos electrones regresan a su estado basal liberan la energía con una menor intensidad que la usada para excitar al donador, pero con una longitud de onda mayor. Si esta energía es suficiente para excitar a los electrones del fluoróforo denominado aceptor, entonces se lleva a cabo una transferencia de energía (Figura 6).

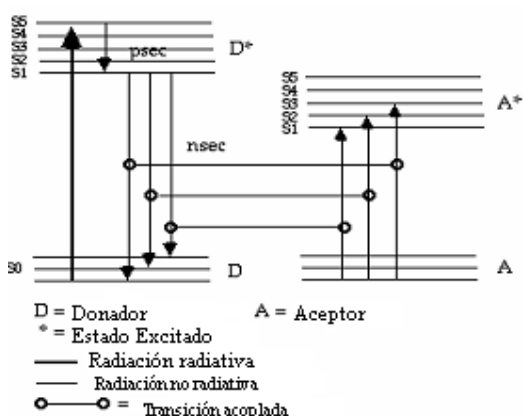


Figura 6. Descripción energética de la transferencia de energía de una molécula donadora a una molécula aceptora logrando un efecto FRET. Al excitar una molécula donadora (D), a una longitud de onda adecuada, los electrones pasan de un estado basal (S0) a un estado excitado (niveles S1, S2, S3, S4 y S5), quedando el donador energizado (D*), posteriormente el donador al regresar a su nivel energético basal, emite energía a una longitud de onda característica, la cual es aprovechada y absorbida por la molécula aceptora (A), cuyos electrones son excitados y pasan a un nivel energético mayor (S1, S2, S3, S4 o S5). Modificado de referencia 28.

De esta manera, si excitamos al fluoróforo donador y tenemos un aceptor en la vecindad observaremos dos efectos (Figura 7).

- (a) Una disminución en la emisión del donador.
- (b) La aparición o el aumento de la emisión del aceptor.

Condiciones del efecto FRET.

Para que pueda ocurrir un efecto FRET entre dos fluoróforos, es necesario que:

- 1.- El donador tenga un amplio rendimiento de emisión de energía.

2.- El espectro de emisión del donador se sobrelape considerablemente con el espectro de absorción del aceptor.

3.- Exista un alineamiento apropiado de los momentos dipolares del aceptor, y del donador.

4.- La distancia entre el donador y el aceptor sea $1 + 0.5 \times R_0$, donde R_0 es la distancia de Förster, o la distancia a la cual la transferencia de energía ocurre con un 50% de eficiencia. Esta distancia es entre 10 y 100 Å para la mayoría de los casos (64;82).

Aplicaciones del efecto FRET entre variantes de la familia de GFP

La utilización de FRET ha abarcado campos de la bioquímica y de la biología celular. La medición de FRET ha sido utilizada para determinar el grado de asociación entre dos macromoléculas, de manera intracelular y en un sistema libre de células. Otras aplicaciones de FRET se han desarrollado para evaluar la actividad de diferentes proteasas, en donde el oligopéptido de unión entre las moléculas fluorescentes es el sitio activo de la proteasa, de manera que la actividad podrá medirse por la desaparición del efecto FRET (35;52;60;79).

A continuación se describen algunos de estos ejemplos.

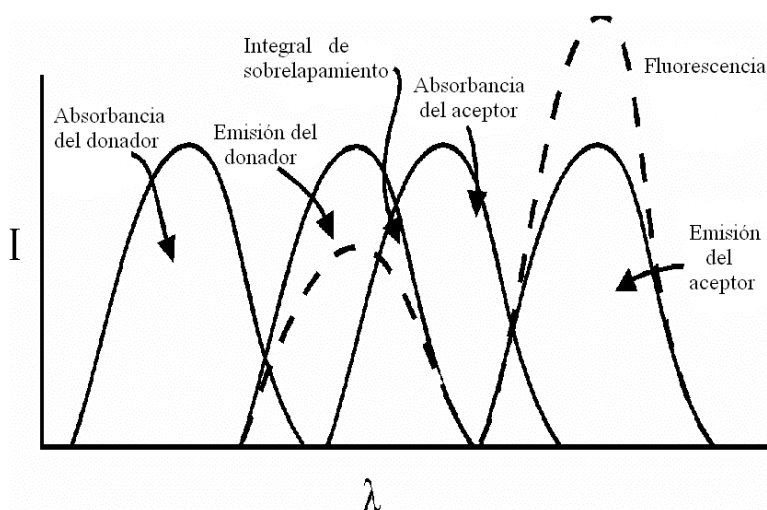


Figura 7. Características espectrales y cambio de la fluorescencia del donador y del aceptor durante una transferencia de energía (Efecto FRET). La intensidad de emisión del donador disminuye, mientras que la intensidad de emisión del aceptor se incrementa. La integral de sobrelapamiento de los espectros se indica en la figura. Modificado de referencia 2.

1.- FRET para la detección de la proteasa Factor Xa

Mitra y colaboradores (50) describen el primer sistema en el que se observa la eliminación de FRET por la actividad del Factor X_a. Utilizan una secuencia de 20 aminoácidos (SSSSGSSSSGIEGRSSSSGS) que contiene el sitio de corte para esta proteasa, flanqueada por la variante GFP cuyo espectro está recorrido al rojo y la BFP. Al excitar el híbrido a 385nm se observan dos emisiones una a 450nm y otra a 505nm (debidas a la transferencia de energía). En presencia de la proteasa, la banda de 505nm desaparece y se incrementa la fluorescencia a 450nm.

2.- Ingeniería de moléculas fluorescentes para mejorar la brillantez

Para evaluar el posible FRET Heim y Tsien (38) desarrollaron mutantes para incrementar la brillantez de la GFP^{wt} con una secuencia blanco para la tripsina con una longitud de 25 aminoácidos (SSMTGGQQMGRDLYDDDDDKDPPAEF) flanqueada por GFP y BFP, respectivamente. Después de la incubación con tripsina y el corte de la secuencia espaciadora, la emisión de la molécula verde casi se eliminó, mientras que el otro fluoróforo incrementó su fluorescencia.

3.- Indicadores fluorescentes de la concentración de calcio libre.

Miyawaki, A y colaboradores (51), desarrollaron un sistema al que llaman camaleones. Éste consiste en la fusión en *tandem* de BFP o CFP con GFP o YFP, ente las proteínas fluorescentes se encuentra el gen de calmodulina y el péptido M13 (péptido de 26 aminoácidos que se une a la calmodulina). La unión de calcio libre a la calmodulina provoca un plegamiento de ésta alrededor del dominio M13, de manera que se incrementa el FRET entre los fluoróforos que lo flanquean.

El primer camaleón (BFP-GFP), se reemplazó por CFP-YFP debido a su incremento en fluorescencia (camaleón amarillo). Al transfectar células HeLa con la segunda combinación, la fluorescencia se distribuía uniformemente en el citosol. Al introducir señales intracelulares, se utilizó este sistema para monitorear la concentración de calcio en el citosol, en el núcleo y en el retículo endoplásmico. De manera que este sistema reportero es un indicador del calcio intracelular libre y puede evaluar diferentes organelos.

En forma opuesta, las mutantes de GFP se acoplarían a dos dominios que se encuentren cercanos en un nivel basal y que se separen al aumentar el calcio.

4.- FRET para la detección de apoptosis

La activación de la caspasa-3 intracelular juega un papel importante en la apoptosis, de manera que para facilitar la detección de muerte celular programada, Xu, X y otros (89) han diseñado una quimera fluorescente que contiene la secuencia de aminoácidos DEVD (Asparagina-Glutámico-Valina-Asparagina) que reconoce y corta la caspasa-3 y estos aminoácidos están flanqueados por las proteínas GFP y BFP respectivamente. Para incrementar la solubilidad y accesibilidad para el corte introdujeron una secuencia de aminoácidos a los lados de la secuencia blanco (GSGSGSGDEVDDGGSGSGV), generando una secuencia de unión de 18 aminoácido. Células 293 se co-transfectaron con un vector que expresa la proteína cinasa Rip, (la cuál esta involucrada en la inducción de apoptosis siguiendo la ruta del factor de necrosis tumoral; TNF) y el vector fluorescente (pGDB). Después de la transfección (24-36hrs.) las células mostraban una morfología característica de las células apoptóticas (condensadas y redondas). En las células que expresaban el sistema fluorescente se observó un eficiente corte en la quimera generando los monómeros correspondientes a GFP y BFP. En células en que solo se transfectó el vector fluorescente, no se observó el corte del producto fluorescente. La eficiencia del corte en las células que expresaban el inductor correlaciona con la cantidad de vector utilizado para la co-transfección. Lo que demuestra que la secuencia de unión DEVD insertada entre GFP y BFP es reconocida por la caspasa-3.

Para demostrar la activación de la caspasa-3 por TNF utilizando como reportero pGDB, se transfectaron células HeLa. Después de la transfección (24hrs), se trataron con TNF y cicloheximida. Después del tratamiento (16hr.), se cosecharon las muestras para un electroinmunoensayo, y se observó que en las células que flotaban (apoptóticas) se había cortado el híbrido GFP-BFP, mientras que permaneció intacto en las células adheridas (no apoptóticas), por otro lado, la adición de un inhibidor de la caspasa-3 al cultivo celular inhibió el corte del híbrido GFP-BFP. Estos resultados muestran que la caspasa-3 activada reconoce y corta la secuencia DEVD entre las proteínas GFP y BFP.

Para demostrar la eliminación del efecto FRET entre las moléculas GFP y BFP, debida a la activación de la caspasa-3 durante la apoptosis, las células co-transfectadas se analizaron por citometría de flujo. En donde observan que al excitar el híbrido con luz UV (longitud de onda 351nm) se observa una emisión intensa de la GFP a una longitud de onda de 510nm. lo que demuestra que la secuencia de unión de 18 aminoácidos que contiene el blanco DEVD es suficiente para la transferencia de energía fluorescente entre GFP y BFP en la proteína híbrida.

La utilización de este reportero permite el monitoreo continuo durante el curso de la muerte celular programada.

Por otro lado Tyas, L. y otros (80) utilizando el mismo blanco (DEVD) y la caspasa-3 desarrollaron un sistema reportero utilizando las moléculas CFP-YFP. Aunque la secuencia de unión también es de 18 aminoácido, el contenido es diferente (SSELSGDEVDTSGSEF). Este grupo transfectó células COS-7 e inducen apoptosis con estaurosporina, y observaron que la apoptosis va acompañada de la activación de la caspasa-3. La actividad de la caspasa-3 se abolió totalmente al cambiar la secuencia blanco (DEVG). De manera que el grado de corte del híbrido correlaciona con la actividad de la caspasa-3, y el corte del híbrido se indica por un incremento en la relación de emisión de CFP/YFP.

Moléculas terapéuticas

Las moléculas con actividad terapéutica se dividen en activas y pasivas. Como moléculas activas tenemos a las ribozimas las cuales muestran actividad antisentido junto con una actividad catalítica, mientras que entre los antisentidos pasivos tenemos moléculas de DNA o de RNA.

En este trabajo se describirá la actividad de moléculas antisentido de DNA y las ribozimas.

Oligodesoxirribonucleótidos Antisentidos (Anti-ODNs)

Son moléculas de DNA sintéticos, cuya longitud es de 10 a 25nt. Estas moléculas se unen de manera complementaria mediante una hibridación tipo Watson-Crick que involucra la formación de puentes de hidrógeno (A = T y G ≡ C) entre regiones del RNAm blanco y el Anti-ODN lo que hace que dicha interacción sea altamente específica.

Los Anti-ODNs deben cumplir con las siguientes características para ser útiles en un sistema biológico: 1) Estabilidad en un ambiente intracelular, 2) Penetrar en un sistema celular y penetrar en varios órganos en el cuerpo en donde se ejerza su actividad, 3) Formar híbridos estables tipo Watson-Crick en condiciones fisiológicas, 4) La interacción con el blanco debe ser específica. De manera que para cumplir con estos requerimientos se han realizados diferentes modificaciones químicas, que involucran el azúcar (ribosa), la base y alteraciones en el esqueleto de fosfatos.

La modificación a nivel del esqueleto de fosfato es una de las más variadas y principalmente la química de los fosforotioatos es una de las más estudiadas y actualmente utilizada en estudios clínicos. Esta modificación consiste en la sustitución de un oxígeno no involucrado en la formación del enlace fosfodiéster por un sulfuro; dicha modificación da como resultado mayor estabilidad y resistencia a nucleasas. Esta es una modificación de tipo conservadora, de manera que la carga negativa se conserva y el tamaño del átomo sulfuro es marginalmente mayor al del oxígeno.

Mecanismos de acción de los oligonucleótidos antisentido:

Se han descrito dos tipos de mecanismos de acción:

1. - Bloqueo de la interacción del RNA con proteínas u otros ácidos nucleicos; que incluye:

A) Inhibición del proceso de corte y empalme; se da por la hibridación de los ODNs a secuencias específicas que evitan la unión de factores requeridos de manera que bloquea

físicamente el corte del intrón. Aunque inicialmente se había descubierto dicho mecanismo de inhibición, también se ha demostrado que los ODNs pueden restaurar el proceso de corte y empalme en transcritos con sitios aberrantes para dicho procedimiento (27).

B) Arresto traduccional; es el resultado de la unión de ODN al codon de inicio de la traducción, mecanismo demostrado *in vitro* (15).

C) Modificación de la estructura tridimensional del mensajero, la hibridación del ODN provoca cambios estructurales en el mensajero de manera que algunas secuencias de interacción con proteínas, ácidos nucleicos y ribonucleoproteínas quedan ocultas (85).

2. - Desestabilización del mensajero.

A) Bloqueo del encabezado (*capping*) en el extremo 5'; la hibridación de ODN en esta región evita la unión de proteínas requeridas para el proceso de maduración del RNA. Mecanismo no ampliamente demostrado, solo se ha demostrado la hibridación en esta región inhibe la unión de los factores de iniciación del procedimiento de traducción (27).

B) Inhibición de la poliadenilación; aunque se ha descrito la utilización de ODNs en el extremo 3' no traducido del mensajero (27), no se han descrito alteraciones en la poliadenilación por hibridación de ODN a esta región (22).

C) Activación de RNasaH; se considera que es el principal mecanismo por el que los ODNs interrumpen la producción de proteínas. El modo de acción es debido a la creación de sustrato para la RNasaH endógena. Esta enzima se estimula por la presencia de híbridos DNA-RNAm. La RNasaH se encarga del corte del mensajero, quedando intacta la molécula de DNA, lo que da como resultado el bloqueo de la biosíntesis de proteínas. Una vez que la RNasaH endógena ha cortado al mensajero, el antisentido-ODN queda intacto y con la capacidad de hibridarse nuevamente con otro transcrito (proceso de recambio). Esta capacidad de liberarse del transcrito cortado incrementa el efecto de una única molécula antisentido (24).

En vista de que el mecanismo principal de acción de los antisentidos-ODN está ligado a la formación de un sustrato para la RNasaH, las modificaciones en los ODNs deben de ser de cierto tipo y ser planeadas de manera adecuada. Se ha observado que ciertas modificaciones inhiben la habilidad de la enzima para cortar al RNA que ha formado el dúplex con un ODN. Hasta ahora los enlaces fosfodiéster o los enlaces con fosforotioatos permiten la activación de la RNasaH; sin embargo, otras modificaciones no pueden desencadenar dicha actividad (Tabla 1), en tales casos se recomienda que las moléculas antisentido se dirijan a la región 5' anterior al codon de inicio de la traducción.

Los fosforotioatos que pertenecen a la primera generación de moléculas modificadas en el esqueleto de fosfato, permiten la activación de la RNasaH, aunque posiblemente presenten una actividad menor que en el enlace fosfodiéster. Para lograr una actividad óptima se han diseñado ODNs utilizando una estructura química mezclada (MBOs; *mixed backbones*) ya que poseen una variedad de propiedades que permiten incrementar la estabilidad contra nucleasas o mostrar una alta afinidad al blanco del mensajero (8), por lo que las siguientes generaciones de ODN implican un diseño racional.

Tabla 1. Muestra algunos ejemplos de las generaciones de ODNs químicamente modificados, así como el nivel de modificación de referencia 46.

ODN Generación	Nivel de modificación	Activación de RNasaH
Primera Fosforotioatos	Esqueleto de fosfato (sustitución de un O por un S)	Sí
Segunda 2'-O-metil 2'-O-metoxi-etil	Posición 2' de la ribosa	No
Tercera PNAs	Esqueleto desoxirribosa cambiado por un enlace poliamida	No

Ribozimas

Descubiertas en los 80's, las ribozimas se definen como secuencias de RNA antisentido que tienen actividad catalítica, es decir, que pueden hibridarse con una secuencia de RNA

complementario y procesarlo sin perder la habilidad de hibridar y procesar otras secuencias de RNA blanco (11). La ribozima tipo pasador de cabello (*hairpin*) tienen la habilidad de cortar y ligar el RNA complementario del blanco (45).

Cech y su grupo (45) descubrieron que algunos intrones eran capaces de catalizar las reacciones de corte y empalme (*splicing*) para dar lugar al RNAm maduro y a estas moléculas de RNA se les denominó ribozimas.

Características generales.

Todas las ribozimas (con excepción de la RNasaP) catalizan reacciones en las que se modifican a sí mismas (actúan en *cis*); sin embargo, mediante ingeniería genética es posible modificar estas moléculas para que actúen sobre otros sustratos, sin alterarse sufrir alteraciones estructurales (actuar en *trans*), de ahí su potencial terapéutico.

Las ribozimas son consideradas como metaloenzimas porque requieren en mayor o menor medida de la presencia del ion Mg^{2+} para llevar a cabo la catálisis (26;74). Tienen una zona catalítica, y las secuencias alrededor hibridan con el RNA blanco. Estas son las secuencias que se modifican para dirigir a la ribozima contra un sustrato específico. Mientras más larga sea la secuencia complementaria mayor será la especificidad de unión con el sustrato. Sin embargo, si esta secuencia complementaria es mayor de 15 nucleótidos, la afinidad aumenta hasta el punto que la liberación del producto del sitio activo se vuelve muy lenta, lo que impide una catálisis eficiente(70).

La velocidad de catálisis, cuando el sustrato está en exceso respecto a la ribozima, se determina por la fórmula K_{cat}/K_m . Se pueden observar rendimientos de $10^8 M^{-1} min^{-1}$. Aunque la capacidad de recambio de las ribozimas es menor que la que poseen las enzimas protéicas, (por lo que es fácil que su sitio activo se sature) estas características pueden modificarse por ingeniería genética (10).

Criterios de selección de moléculas antisentido

La selección de moléculas antisentido efectivas ha sido compleja, ya que en muchos casos su diseño se realiza de manera empírica, por ensayo-error o considerando las propiedades estructurales y termodinámicas del RNAm blanco; para lo cual se han desarrollado programas computacionales que predicen la estructura de mensajeros con base en el criterio del vecino más cercano (92). Los ensayos empíricos requieren del análisis intracelular de 30 a 50 moléculas.

Por otro lado, el utilizar algoritmos que modelen la estructura secundaria o terciaria del RNAm blanco es una alternativa. Sin embargo, estos modelos son únicamente una aproximación y por lo general no es posible predecir la habilidad de los ODNs para formar heterodúplex con el mensajero partiendo únicamente de datos termodinámicos. En general, se considera que los métodos para predicción de estructura secundaria son poco veraces, para predecir conformaciones en modelos *in vitro*, por lo que, en células vivas es aun más difícil predecir el plegamiento del mensajero, ya que se está traduciendo activamente y su estructura está alterada por el paso de los ribosomas. La unión de proteínas que se une al RNAm también puede contribuir de manera negativa a la formación del heterodúplex (68).

Se ha planteado que es conveniente tomar dos tipos de criterio, el primero es mediante una simulación de la estructura para determinar las regiones accesibles y la segunda es corroborarlo mediante experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Por lo general, la utilización de modelos matemáticos (14) predice de manera certera la estructura de transcritos de hasta 600 bases; sin embargo, para transcritos mayores. Estos programas no han sido de mucha utilidad; por esta razón la alternativa es determinar la accesibilidad de la secuencia blanco mediante un mapeo enzimático o químico. Sin embargo, es importante considerar que dichos ensayos se realizan en condiciones optimizadas y controlados (en sistemas *in vitro*) y en muchos casos las condiciones en donde se demuestra accesibilidad son muy distintas a las condiciones intracelulares. De manera que una molécula antisentido puede ser efectiva *in vitro*, mientras que *in vivo* puede no serlo, por lo tanto la prueba más contundente sería en un ambiente intracelular en donde finalmente se utilizarán como agentes terapéuticos.

Los métodos desarrollados para evaluar la accesibilidad de las moléculas antisentido son:

- 1) Mapeo químico: generación de fragmentos de RNA por tratamiento alcalino, lo que da una biblioteca combinatorial de una secuencia conocida (84).
- 2) Mapeo enzimático: Utilización de nucleasa de frijol mung (utilizada para el reconocimiento de horquillas es decir, cadena sencilla de RNA o DNA) y RNasaH; con base en la capacidad de alineación de un ODN aleatorizado e incubado con el RNAm blanco se obtienen patrones de digestión (14).
- 3) Mapeo de arreglos: es un acercamiento empírico que consiste en la hibridación de RNAm contra un arreglo de ODNs de diferentes tamaños, los cuales se dirigen a diferentes o todas las regiones del mensajero; este análisis se puede realizar de manera simultánea y determinar cuales de las moléculas tiene capacidad para unirse al blanco. Anteriormente se postulaba que la hibridación de ODNs con moléculas de RNAm purificadas solo estimaría la eficiencia de hibridación *in vitro*. En un ambiente celular sería poco válido por las condiciones intracelulares, aunque existen reportes en los que se describe el mapeo de arreglos como un método efectivo para seleccionar antisentidos con alta potencia *in vivo* (68).
- 4) Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX); esta herramienta se ha utilizado tanto para el aislamiento de oligodesoxirribonucleótidos, para el mejoramiento de ribozimas (55).

Aplicación terapéutica de moléculas antisentidos.

En general, las moléculas antisentidos se han utilizado en padecimientos en los que está involucrada la sobreexpresión de un gen. El blanco de estas moléculas puede ser un gen externo al organismo (por ejemplo, un gen viral) o bien un gen endógeno con mutaciones (por ejemplo, un protooncogen activado).

Una de las ventajas de utilizar antisentidos sobre otros agentes terapéuticos es la alta especificidad de estos, y están dirigidas a un sustrato (RNA) característico, de manera que puede distinguir y encontrar su blanco en un ambiente intracelular. Además, tienen la capacidad de procesar más de una molécula de blanco sin perder su actividad catalítica, a lo cual se le llama "capacidad de recambio múltiple".

A continuación se mencionan algunos casos en que se han utilizado:

1. Infecciones virales agudas y crónicas; en HIV (61), en linfocitos B transformados por el virus de Epstein-Barr (40).
2. Neoplasia asociadas a virus como el cáncer cérvico-uterino (HPV-16) (11).
3. Neoplasia en las que se conoce el producto del oncogen, tal es el caso de la leucemia (73), o el carcinoma de células de la vejiga (43).
4. Otros padecimientos. Enfermedades cardiovasculares, rechazo de transplantes, osteoartritis, enfermedades de tipo inmunológico (73).

Diseño, selección y evaluación de moléculas antisentido.

Para diseñar nuevas moléculas ribozimas se requiere conocer la secuencia del gen que se sobre expresa y por lo tanto la de su RNAm. Se seleccionan los sitios de corte posibles y sus secuencias aledañas mediante un programa de computadora. Una vez hecho esto, pueden hacerse pruebas con oligonucleótidos antisentido dirigidos hacia la misma secuencia que las ribozimas, para probar que los sitios blanco son accesibles.

De esta forma, el uso de ribozimas se presenta como una alternativa efectiva, específica y no invasiva para el tratamiento de diferentes patologías. Aunque los resultados actuales son alentadores, se observa una necesidad notable en el desarrollo de investigaciones referentes a la creación de sistemas reporteros que permitan evaluar la actividad de moléculas antisentido *in vivo*. La optimización y utilización de moléculas antisentido como agentes terapéuticos han sido limitadas, debido a que los ensayos de caracterización se reducen a pruebas bioquímicas en condiciones óptimas y rara vez incluyen datos experimentales en cultivos celulares o modelos animales.

Hasta ahora, los sistemas reporteros para moléculas antisentido utilizados son los siguientes:

1. - Cinética de una reacción de corte de una ribozima *in vitro* utilizando un RNAm blanco marcado radiactivamente, en los que la actividad de ribozimas se determina mediante un análisis densitométrico de autoradiografías después de que los productos fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida sobre la base del tamaño del blanco digerido (11; 26; 30; 40; 43; 45; 48; 55; 58; 61; 73; 74). Este método también es utilizado *in vitro* para la evaluación de moléculas antisentido, solo con la variante de la adición de RNasaH.

2. - Ensayos RT-PCR: Una vez llevada a cabo la reacción de corte (ya sea por una ribozima o por un ODN), el RNA blanco se somete a un proceso de RT-PCR, (utilizando los "iniciadores" (oligonucleótidos sintetizados artificialmente) diseñados para la síntesis del cDNA) y posteriormente este molde es amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Finalmente para el análisis de los resultados se requiere de un gel de agarosa, en donde se visualizan los fragmentos producidos por el corte de la ribozima, este mismo procedimiento se utiliza para determinar el decaimiento de un RNAm blanco para una ribozima (40; 73).

3. - Método cromatográfico: Este sistema permite la evaluación de ribozimas *in vitro*, mediante un HPLC, la ventaja es que no es radioactivo (40; 61).

4. - Utilización de proteína reporteras para evaluar la actividad catalítica de ribozimas *in vitro*.

A) Métodos radioactivos: cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) (83).

B) Métodos no radioactivos: colorimétricos, luminiscentes y fluorescentes. Proteínas reporteras como la β -galactosidasa que pueden degradar un substrato cromogénico (75), luminiscentes como la luciferasa y fluorescentes como la proteína verde fluorescente (GFP) (86).

Todos estos sistemas de evaluación presentan desventajas, tales como:

1. - El uso de material radiactivo, lo que involucra el establecimiento de protocolos de seguridad, manejo y desecho de los productos radiactivos.

2. - La manipulación directa del RNA de las células, que siempre lleva cuidados especiales y además es inevitable la degradación, aunque sea en menor grado.
3. - La determinación de la actividad de β -galactosidasa, CAT o luciferasa se tiene que hacer con extractos celulares, lo que implica también muchos cuidados en la manipulación de las muestras.
4. - La mayoría de los ensayos son *in vitro*, y los resultados no necesariamente correlacionan con lo que se observa *in vivo*.
5. - El HPLC, aunque es específico, también es *in vitro* y además es muy costoso.

La mayor parte de los procedimientos y modelos mencionados evalúan la actividad catalítica de ribozimas mediante la destrucción de la célula. De esta forma, el efecto fisiológico producido por la inhibición de la expresión de un gen no puede llevarse a cabo en tiempo real, impidiendo la caracterización de ribozimas y limitando su mejoramiento. Por otra parte, la mayoría de las herramientas utilizadas *in vitro* difícilmente pueden reproducir las condiciones intracelulares y pasan por alto diferentes aspectos tales como: la co-localización de la ribozima y el sustrato, el sistema de liberación de la ribozima, la vida media del sustrato y de la ribozima a pH intracelular (estabilidad), entre otros.

Así en vista de la ausencia y necesidad del desarrollo de modelos para evaluar la actividad de moléculas terapéuticas, en el presente trabajo se presenta una propuesta para utilizar un sistema reportero desarrollado en el laboratorio utilizando variantes de la proteína GFP, lo que por su capacidad de fluorescencia nos permitirá utilizar este sistema como reportero intracelular de la actividad de moléculas antisentido y ribozimas.

JUSTIFICACIÓN

Un problema de gran importancia para el estudio de las ribozimas y ODN es la carencia de sistemas que reporten su actividad *in vitro* e *in vivo*. La mayor parte de los sistemas actuales evalúan la eficiencia de estas moléculas con los niveles residuales del RNA sustrato y su proteína codificada, o bien la supresión de un fenotipo determinado. Actualmente existe la necesidad de optimizar el uso de moléculas antisentido terapéuticas; sin embargo, la mayor parte de estas moléculas sólo se han utilizado en el ámbito de investigación básica por lo que el uso de ribozimas en la clínica dista mucho de ser una realidad. En vista de que la optimización de moléculas antisentido por los medios tradicionales resulta larga y costosa. Y para acelerar el análisis de la actividad de dichas moléculas *in vivo* proponemos el desarrollo de un sistema reportero de la actividad basado en el uso de la fluorescencia producida por GFP y sus variantes. Dicho sistema permitirá el monitoreo de la actividad de ribozimas y ODNs de manera casi inmediata sin perturbar la integridad de la célula. Además se podrá cuantificar la eficiencia de las ribozimas y ODNs en el ambiente intracelular permitiendo la comparación directa entre diferentes ribozimas y ODNs, lo que convertirá al sistema reportero en una valiosa herramienta para el desarrollo de moléculas antisentido enfocadas a su uso como moléculas terapéuticas (ribozimas y antisentidos).

Hipótesis.

Utilizando la tecnología FRET y entendiendo el posible comportamiento de la expresión de quimeras fluorescentes *in vivo* podemos observar dos tipos de efectos: el opacamiento o FRET. Si la secuencia de unión entre los fluoróforos de una proteína quimérica es de una longitud y orientación adecuadas, entonces el efecto fluorescente observado corresponderá a FRET, debido a que la estructura tridimensional de la quimera favorece la transferencia de energía de un fluoróforo al otro. Alternativamente, de no poseer las distancias y orientación adecuadas entre los fluoróforos la quimera producirá un opacamiento de los espectros fluorescentes. Dicho opacamiento puede deberse a la interferencia entre ambos fluoróforos.

El prototipo de sistema reportero fluorescente consta de una expresión en tándem de variantes de la proteína unidas por una secuencia puente que es el blanco que corresponde al gen E6 de HPV-16. Contra dicho blanco se han desarrollado moléculas antisentido y ribozimas tipo *hairpin*; de manera que si estas moléculas pueden hibridar con el blanco y activar a la RNasaH o llevar a cabo la catálisis por la ribozima entonces, el transcrito quimérico GFP-Sitio Blanco-YFP sufrirá un corte y únicamente se traducirá la GFP, lo que correlacionará con la pérdida del efecto FRET y permanencia de un espectro verde (Figura 8 A y B).

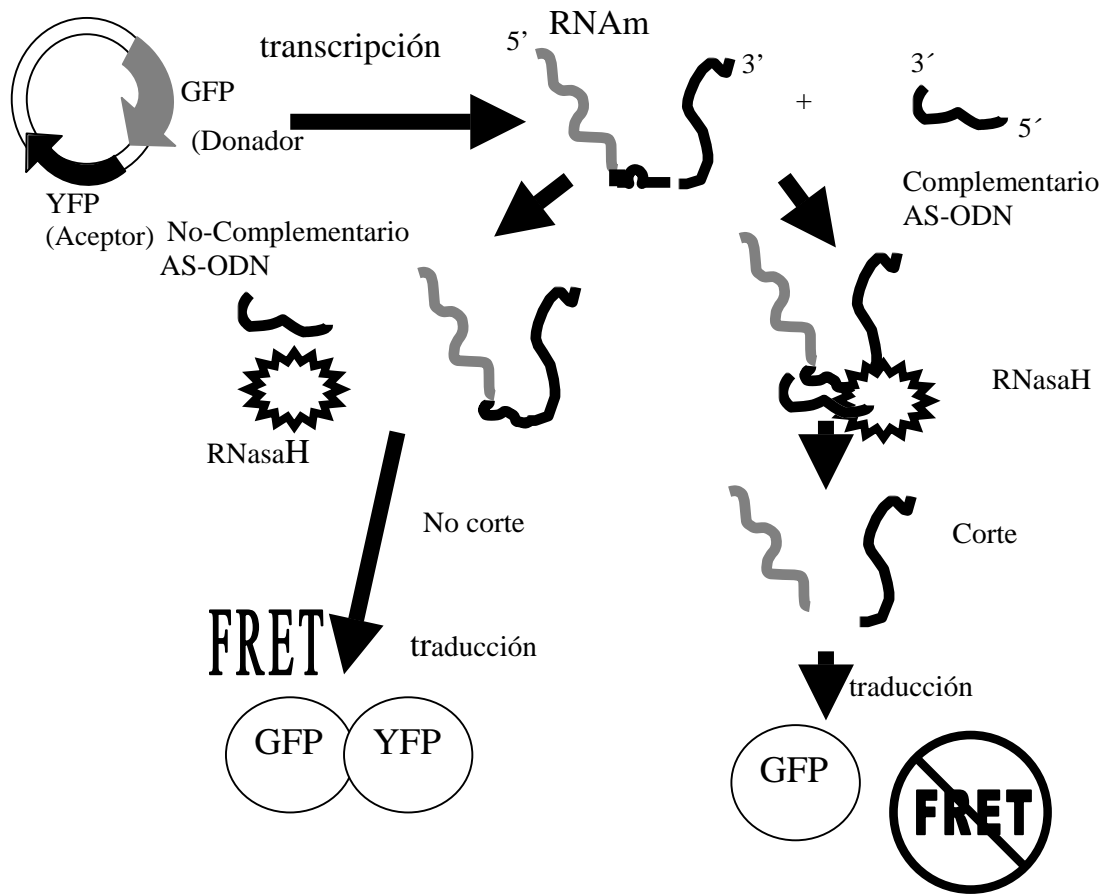
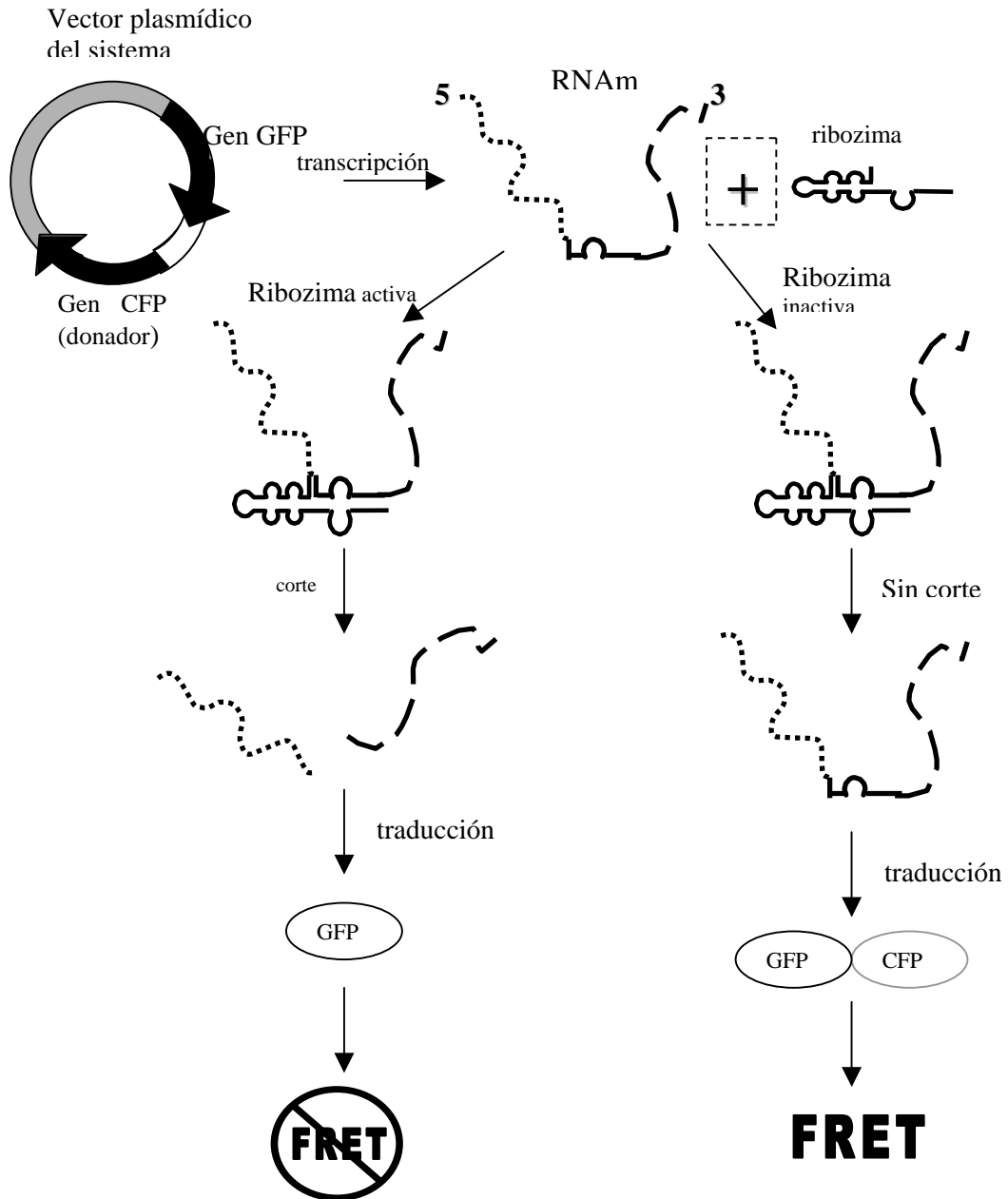


Figura 8A. Diagrama de la hipótesis para los antisentidos.

Figura 8B. Diagrama de la hipótesis para las ribozimas



Objetivos

Objetivo General:

Diseñar un sistema reportero basado en las variantes de la proteína verde fluorescente (GFP) que pueda ser evaluado *in vitro* e *in vivo* para determinar la eficiencia terapéutica de moléculas antisentido utilizando la tecnología FRET (Transferencia de Energía Fluorescente en Resonancia).

Objetivo particulares:

1. - Diseño y construcción de un prototipo de sistema reportero fluorescente con GFP y sus variantes.
2. - Análisis y evaluación fluoroespectroscópica de las proteínas quiméricas correspondientes al sistema reportero fluorescente en bacterias vivas.
3. - Evaluación y determinación fluoroespectroscópica de la transferencia de energía fluorescente en el sistema reportero.
4. - Determinar la eficiencia de FRET entre las variantes de la proteína GFP.
5. - Demostrar la accesibilidad de la secuencia blanco en el sistema reportero y la posible interacción de este con moléculas antisentido *in vitro*.
6. - Establecer las condiciones para administrar antisentidos a bacterias vivas.
7. -Evaluar la inhibición del efecto FRET al administrar antisentidos en bacterias vivas.
8. - Demostrar la expresión de las ribozimas en un sistema bacteriano.
9. -Expresar y evaluar el efecto de las diferentes ribozimas sobre el sistema reportero en bacterias vivas en una conformación *cis*-actuante.
10. - Co-expresar y evaluar el efecto de las diferentes ribozimas en una conformación *trans*-actuante sobre el sistema reportero expresado en bacterias vivas.
11. - Construcción de un prototipo las variantes de la proteína GFP que permita expresar el sistema reportero en líneas celulares tumorales de humanas.
- 12.- Análisis y evaluación fluoroespectroscópica del sistema reportero fluorescente GFP en células tumorales humanas.
13. - Establecer las condiciones adecuadas para la administración a líneas tumorales en cultivo celular.
14. - Evaluar la inhibición del efecto FRET al administrar antisentidos en células tumorales en cultivo.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El presente proyecto se fundamenta en la utilización de GFP y sus variantes, basándose en las múltiples bondades que nos brinda esta familia de proteínas. Los sistemas reporteros que utilizan las variantes de GFP se han utilizado para visualizar eventos intracelulares en células vivas de una manera no invasiva. El desarrollo de variantes fluorescentes también ha permitido la medición *in vivo* de la interacción entre proteínas utilizando el principio de FRET como sistema de detección y evaluación. Se desarrolló el proyecto en dos partes: 1) Se construyó un prototipo de sistema reportero fluorescente para evaluar la actividad de moléculas antisentido y ribozimas en bacterias vivas. Este prototipo contiene la secuencia blanco de la ribozima Rz434 flanqueado por dos variantes de GFP; y 2) Se implementó un sistema en células de mamífero para ensayar la actividad de antisentidos dirigidas contra el gen E6 de HPV-16. (Figura 9).

La primera parte consistió en desarrollar un sistema reportero fluorescente que permita evaluar la actividad antisentido y catalítica de ribozimas *in vivo* en bacterias. La ventaja de este sistema es que al utilizar un prototipo bacteriano, podemos inducir de manera controlada tanto la expresión de la proteína quimérica como la de la ribozima, lo que nos permite evaluar cualitativamente y cuantitativamente el sistema reportero. Para lograr esto, se construyó un plásmido de expresión integrado por un promotor lac en el extremo 5' (inducible con IPTG), seguido por un gen quimérico integrado por la glutatión S-transferasa (GST) que permitió la purificación de la proteína codificada en la construcción, y seguido por las proteínas fluorescentes GFP y CFP en el mismo marco de lectura.

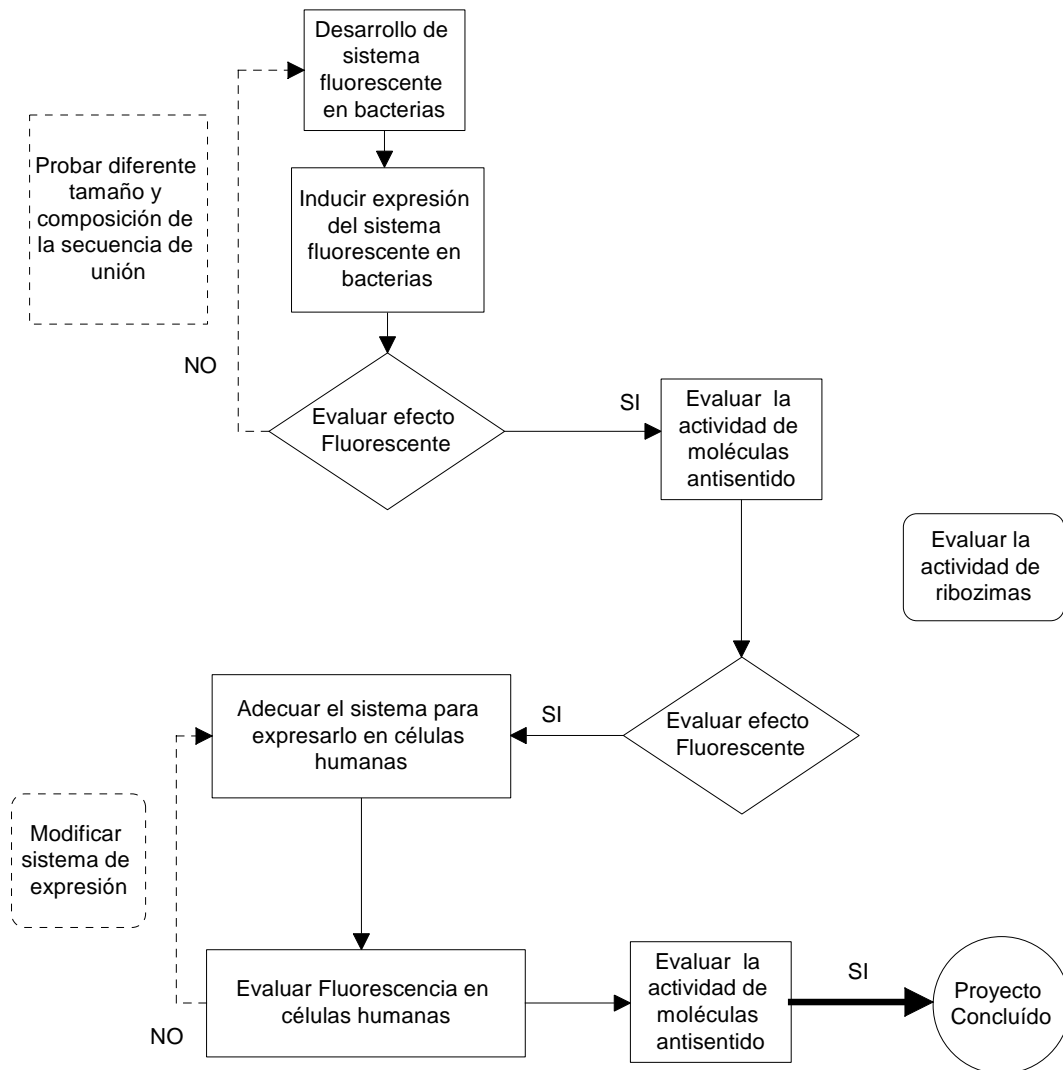


Figura 9. Desarrollo global del proyecto.

Entre los genes de GFP y CFP se colocó la secuencia blanco de la ribozima Rz434, de manera que al inducir la expresión de dicha construcción se obtuvo una proteína quimérica funcionalmente fluorescente. El sistema reportero para evaluar la actividad antisentido y catalítica de ribozimas en bacterias utilizó la inducción de la síntesis de proteínas recombinantes así como de las ribozimas mediante el uso de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido; inductor de la β -galactosidasa). Para esto se utilizó la cepa *Epicurian coli* BL21 (DE3). El sistema se evaluó mediante la cuantificación de fluorescencia de los productos traducidos empleando un fluoroespectrofotómetro. Posteriormente, las proteínas producidas se purificaron utilizando glutatión-agarosa para su análisis por inmunoelectrotransferencia.

En este sistema se utilizaron a las variantes de la proteína GFP en unas ocasiones como molécula aceptora de energía y en otros casos esas mismas se utilizó como donadora, por lo que fue importante observar la combinación de proteínas fluorescentes; (en este momento fue importante recordar, que las moléculas donadoras deben de emitir en una longitud de onda que permita excitar a la molécula aceptora), de manera que el efecto de la actividad antisentido o de la ribozimas sobre el RNAm quimérico resultó en cambios característicos del efecto fluorométrico del sistema reportero.

De esta forma, si el antisentido o la ribozima reconocen su secuencia blanco en el RNAm de la construcción quimérica, la actividad de estas moléculas antisentido resultó en la presencia de un solo producto (la proteína GST-GFP). Alternativamente, si el antisentido o la ribozima no reconocieron la secuencia blanco, entonces se sintetizó el producto quimérico completo (la proteína quimérica GST-GFP-CFP) con un espectro fluorescente distinguible de GFP (Figura 10). En vista de que el sistema reportero se fundamentó en la alteración de las características espectrales de GFP más que en las diferencias cuantitativas de su expresión, este sistema reportero fue capaz de medir diferencias mínimas de la actividad catalítica de diferentes ribozimas u otras moléculas antisentido.

Una vez concluida esta primera etapa, se procedió a implementar el sistema reportero en células de mamífero. Para lograr esto se construyó un plásmido de expresión integrado por un promotor de citomegalovirus (CMV, por sus siglas en inglés) en el extremo 5', seguido por el gen quimérico integrado por variantes de GFP unidas por la secuencia blanco de HPV-16. Posteriormente, se evaluó el desempeño del sistema reportero en células de mamífero, mediante la transfección estable y transitoria de vectores de expresión eucariontes. Para este fin, se utilizaron las células C-33A(HTB-31) provenientes de un cáncer cérvico uterino libre de secuencias y transcritos de HPV. Esta línea celular se eligió, ya que es incapaz de producir endógenamente un blanco para el antisentido AntiE6 (dirigida contra HPV-16) y presenta el medio intracelular en el cual los antisentidos deben desempeñar su función.

La evaluación de la actividad catalítica de ribozimas en células C-33A se realizó cuantificando el efecto fluorescente en la transfección de la quimera fluorescente y los

antisentidos empleando un fluoroespectrofotómetro y microscopía de epifluorescencia. El sistema reportero también se evaluó mediante el análisis de los productos traducidos por inmunoelectrotransferencia.

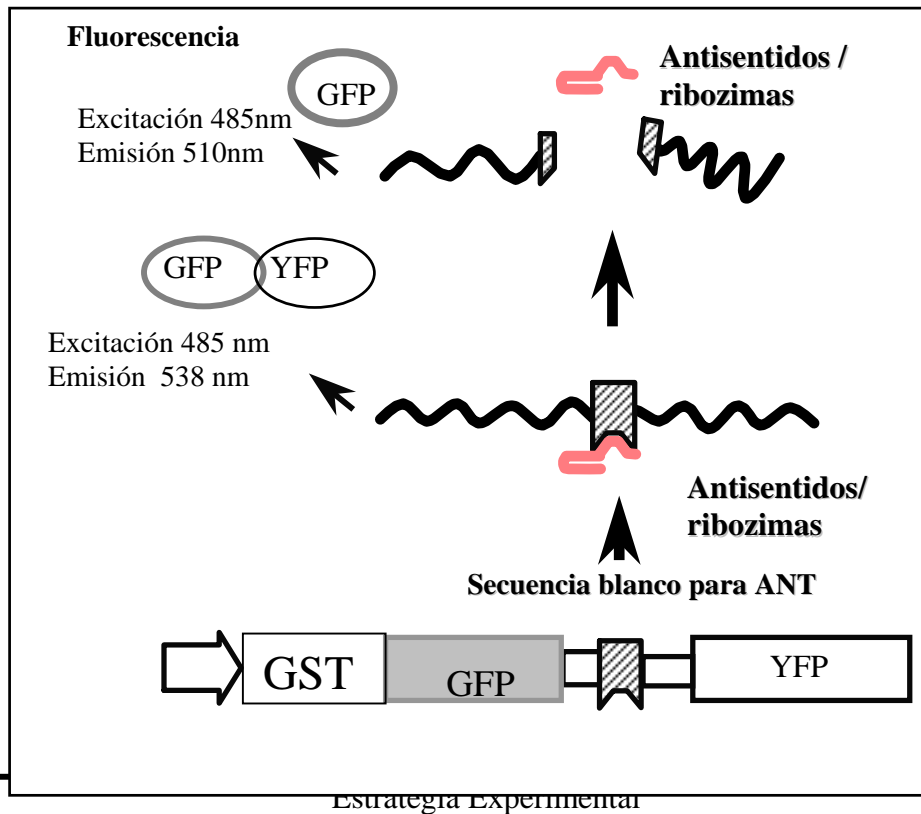


Figura 10. Sistema reportero fluorescente para evaluar la actividad catalítica de ribozimas y actividad de los antisentidos *in vivo*.

Materiales y Métodos

OLIGODEOXINUCLEÓTIDOS (ODN) y PLÁSMIDOS

FRET2ds

El ODN FRET2 (Figura 11), contiene al sitio de reconocimiento de la ribozima R434 (RzTS) (11), que abarca desde el nucleótido 430 al 445 del gen del Papilomavirus Humano Tipo 16 [GenBank K02718; (63)]. Este ODN se encuentra flanqueado por un sitio *Hind*III en el extremo 5' y un sitio *Nco*I en el extremo 3'.

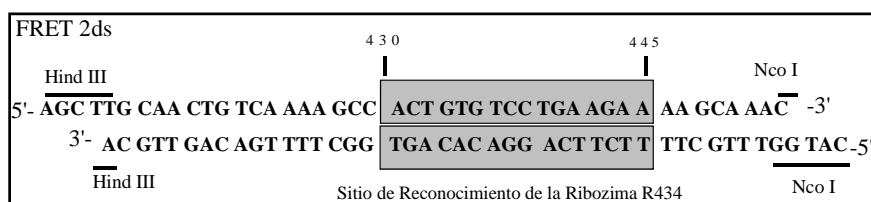


Figura 11. ODN FRET 2 ds; que se caracteriza por contener la secuencia de un fragmento del Gene de Papilomavirus Humano tipo 16 que abarca del nucleótido 430 al 445 (Blanco de la ribozima R434). Teniendo un el sitio de restricción 5' *Hind*III y un sitio de restricción *Nco*I en el extremo 3'

pEFSCFP-kos

El ODN pEFSCFP-kos (Figura 12), contiene 5 mutaciones en el sitio Kozak (GGTCGCCA) modificado por (TAATTAT). Este ODN se encuentra flanqueado por un sitio *Bam*HI en el extremo 5' y un sitio *Nco*I en el extremo 3'. Este ODN fue sintetizado en la Unidad de Ácidos Nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV.

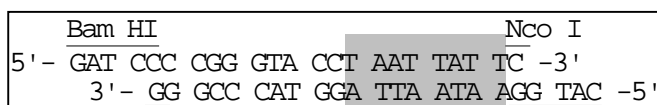


Figura 12. ODN pEFSCFP-kos ds.

ODNs para el ensayo de extensión del cebador y ensayos de RNasaH

Se diseñaron y sintetizaron los siguientes ODNs:

Nombre	Secuencia	Tamaño	Referencia
AntiE6	5'- TTC TTC AGG ACA CAGT-3'	16nt	(9)
M7	5'- TTC TTA <u>C</u> TAG <u>AA</u> C AGT-3'	16nt	(9)
419	5'- GGC TTT TGA CAG TTA-3'	15nt	US Patent No. 6 277 980
419m	5'- GGC <u>AAC CTT GTC</u> TTA-3'	15nt	US Patent No. 6 277 980
M280 HPV16	5'- CCG GAA TTC TTC AGA GA-3'	17nt	
M253 HPVc	5'- TAC TGT TCT CTG AAG-3'	15nt	
Rz M281	5'- C CGG AAT TCT ACC AGG T-3'	17n	

Los ODNs mutados presentan 6 o 9 bases mutadas (bases subrayadas) con respecto al ODN experimental.

Los ODNs antisentido 419 y AntiE6 tienen la capacidad de hibridar con el transcrito de E6 de HPV tipo 16 del nucleótido 415 al 429 y del 430 al 445, respectivamente, al hacer una analogía con el sitio de reconocimiento GUC y corte de la ribozima *hairpin*.

La nomenclatura de las moléculas antisentido se relaciona con el nucleótido que reconoce y se realiza el corte con la ribozima, de esta manera tenemos que el ODN AntiE6 reconoce la misma secuencia blanco que la ribozima 434 y el corte de ésta se da en el nucleótido 434. Las versiones mutadas de estas moléculas antisentido no tienen la posibilidad de hibridar totalmente con el blanco.

El ODN M281 Rz es complementario al transcrito de la ribozima justo en la región catalítica, de manera que al hibridar según el modelo Watson-Crick se puede utilizar este ODN tanto como cebador para una reacción de PCR como para en ensayo de alargamiento y generar un DNA complementario.

El ODN M253 HPVc es una molécula es sentido del transcrito de gen E6 de HPV-16, de manera que no tiene la capacidad de hibridar con el transcrito correspondiente al blanco. El ODN M280 HPV es una molécula inespecífica del sistema, es decir no puede hibridar.

PLÁSMIDOS

Todos los plásmidos fueron propagados inicialmente en la bacteria *Escherichia coli* DH5 α (F⁻ N80dlacZ)M15) (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 end A1 hsd R17 (r_K⁻,m_K⁺) phoA sup E44 8⁻ thi-1 gyrA96 rel A1), y posteriormente fueron transformados (41) en *Epicurian* BL21 (DE3) ((*E. coli* B) F⁻ dcm ompT hsd (r_B⁻ m_B⁻)gal λ (DE3)) para su expresión en bacterias. Todas las construcciones generadas fueron analizadas por restricción y secuenciación, antes de ser utilizadas en experimentos de expresión.

La expresión de los vectores comerciales: pEGFP-C1, pECFP y pEBFP (Clontech, Inc.) se realiza a partir de diferentes promotores, pEGFP-C1 utiliza el promotor de Citomegalovirus (CMV) en eucariontes, mientras que pECFP y pEBFP se expresan en procariontes a partir del promotor de lac, en los tres casos existe un sitio de clonación múltiple (GFP 3' y BFP o CFP 5') y en ambos plásmidos se encuentra en el extremo 5' del gen una región Kozak de inicio de la traducción en eucariontes (7).

EGFP

La secuencia que codifica a la GFP contiene más de 190 mutaciones silenciosas que permiten la correcta traducción en codones utilizados con mayor frecuencia en mamíferos. La secuencia que flanquea a la EGFP se convirtió en una secuencia Kozak la cual es una secuencia consenso para el inicio de la traducción, la que incrementa la eficiencia y traducción en eucariontes. El sitio de clonación múltiple (MCS) se encuentra entre la EGFP y la señal de poliadenilación de SV40 (SV40 polyA). Los genes clonados en MCS se expresan como proteínas de fusión al extremo carboxilo terminal de GFP (5,7,53).

El plásmido posee un origen de replicación pUC para la propagación en *E. coli* y un origen fl para la producción de DNAss.

ECFP

El plásmido pECFP (5,7,37,38,90), contiene una variante del gen que codifica para la proteína verde fluorescente de la medusa *A. victoria*, dando lugar a una proteína cian fluorescente (CFP).

EBFP

El plásmido pEBFP, contiene una variante del gen que codifica para la proteína verde fluorescente de la medusa *A. victoria*, dando lugar a una proteína Azul fluorescente (BFP). El resto del vector es idéntico al pECFP (5; 7; 37; 38; 90).

EYFP

El plásmido pEYFP, contiene el gen que codifica para la variante amarillo - verde de la proteína verde fluorescente de la medusa *A. victoria* codifica para la proteína. El gen EYFP muestra 4 substituciones aminoacídicas Ser⁶⁵- Gly; Val⁶⁸- Leu; Ser⁷²- Ala; y Thr²⁰³-Tyr. La excitación máxima del fluoróforo es a 513nm y el espectro de emisión tiene un pico a 527nm (5; 7; 17).

La secuencia que codifica para las variantes de la proteína fluorescente: ECFP, EBFP y EYFP están flanqueada por un extremo 5' que corresponde a una secuencia Kozak (Sitio de Iniciación de la Traducción). Este cambio, incrementa la eficiencia de la traducción del RNAm fluorescente y consecuentemente la expresión de ECFP en células humanas o de plantas. El gen fluorescente contiene sitios de clonación múltiple hacia a los extremos 5' y 3', provenientes del plásmido parental pUC19, creando el derivado pPD16.43. En *E. coli*, se expresan a partir del promotor de lac como fusión de los primeros cinco aminoácidos de la proteína lac Z. El plásmido parental pUC19 le da al vector un origen de replicación con alto número de copias y un gen de resistencia a ampicilina, lo que permite su propagación y selección en *E. coli*.

Construcción de Vectores para Expresión en Procariontes

Para la construcción de los plásmidos pGST-GFP, pGST-CFP, pGST-YFP y pGST-BFP, se purificaron los fragmentos *NcoI* - *EcoRI* de los vectores comerciales pEGFP-C1, pECFP, pEYFP y pEBFP (Clontech Laboratories Inc.), que contienen las versiones modificadas de los genes que codifican para las proteínas fluorescentes verde, cian, azul y amarilla (GFP, CFP, YFP y BFP respectivamente). Dichos fragmentos fueron clonados en el vector de expresión bacteriano pGEX-2TK-MCS (plásmido donado por el Dr. Hans Rotheneder; Intitut Für Molekularbiologie, University of Viena), digerido con las enzimas *NcoI* - *EcoRI*. Los plásmidos pGST-GFP (Figura 13), pGST-CFP, pGST-YFP y pGST-BFP se utilizaron para determinar las características

espectrales de GFP, CFP, YFP y BFP producidas en bacterias (Figura 14). Para lograr la construcción del prototipo FRET Cían, Azul y Amarilla, se procedió en primer lugar a realizar un grupo de construcciones intermediarias: llamadas: pRzSCFP pRzSBFP, pRzSYFP, pRzSFSCFP, pRZSFSBFP (todas conteniendo la secuencia blanco para la ribozima Rz434), y la construcción pFSCFP-kos (carece de una secuencia blanco para la ribozima Rz434 y de una secuencia Kozak anterior al gen que codifica para la CFP). Los plásmido pRzSBFP, pRzSCFP y pRzSYFP contiene el ODN FRET2 clonado en el sitio *Hind*III- *Nco*I del vector pEBFP, pECFP y pEYFP, respectivamente (Clontech, BD Biosciences) (Figura 15). Con la finalidad de eliminar la posible interferencia de los sitios Kozak presente en el vector comercial pECFP, se construyó el plásmido pEFSCFP-kos que contiene el ODN EFSCFP-kos en el sitio *Bam*HI- *Nco*I del vector pECFP (Figura 16).

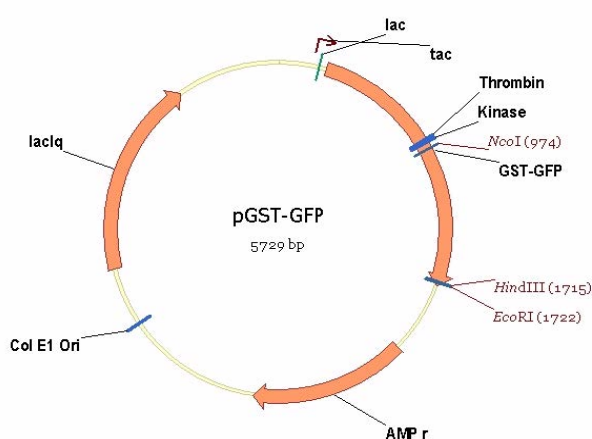
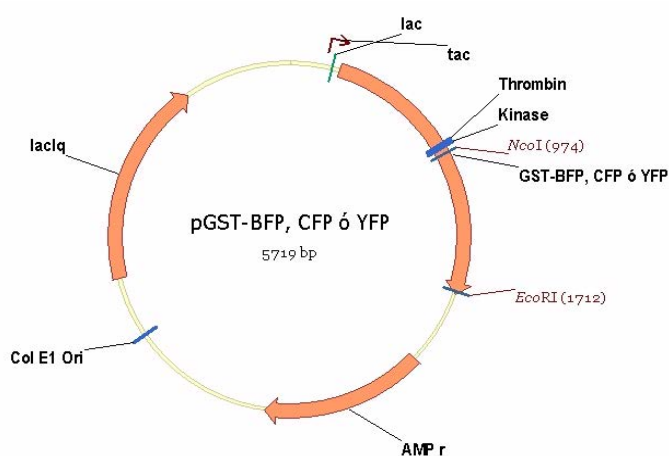


Figura 13. Mapa del plásmido pGST-GFP. Expresa la proteína de fusión Glutation-S-Transferasa (GST)- GFP. El vector contiene un cassette de resistencia a ampicilina (AMP_r), un origen de replicación Col E1, al represor lac (*lacIq*) y al promotor de lac (*lac*). El gen que codifica para la proteína GFP se clonó entre los sitios de restricción *Nco*I-*Eco*RI.

Figura 14. Mapa general de los plásmidos pGST-BFP, pGST-CFP ó pGST-YFP. Expresa la proteína de fusión Glutation-S-Transferasa (GST) unida a la proteína fluorescente respectiva. El vector contiene un cassette de resistencia a ampicilina (AMP_r), un origen de replicación Col E1, al represor del lac (*lacIq*) y al promotor de lac (*lac*). El gen que codifica para la proteína fluorescente se clonó entre los sitios de restricción *Nco*I-*Eco*RI.



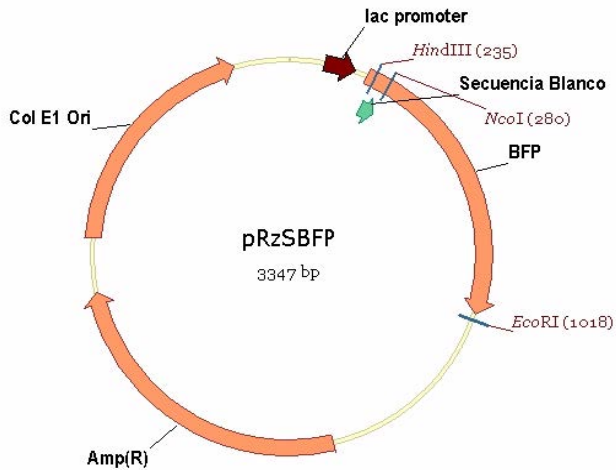


Figura 16. Mapa del plásmido pEFSCFP-Kos. El vector contiene un cassette de resistencia a ampicilina (AMPr), un origen de replicación Col E1 y al promotor de lac (lac promoter). Entre el sitio de restricción *Bam*HI-*Nco*I se encuentra el oligo EFSBFP-Kos, el cual elimina la secuencia kosak del vector comercial y además recorre el marco de lectura de la proteína CFP cuyo gen se encuentra entre los sitios de restricción *Nco*I-*Eco*RI.

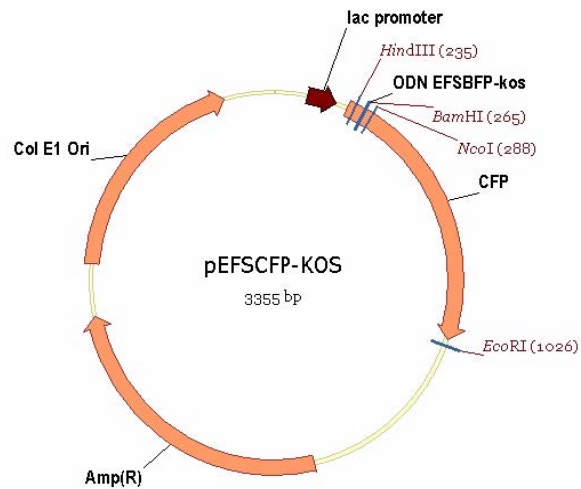
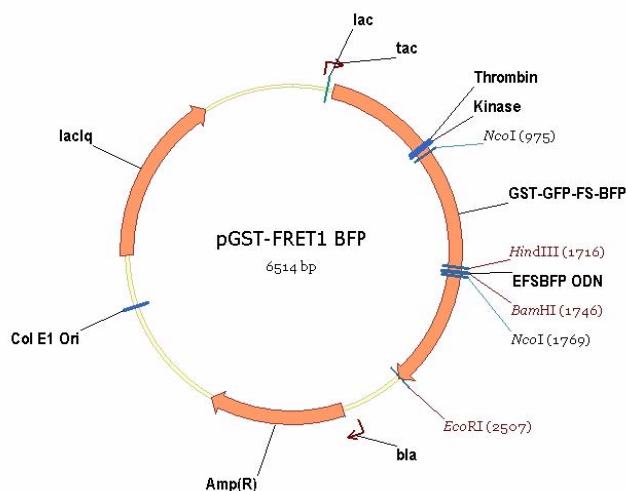


Figura 17. Mapa general de los plásmidos pGST-FRET1 BFP y pGST-FRET1 CFP. El vector contiene un cassette de resistencia a ampicilina (AMPr), un origen de replicación Col E1, el represor de lac (*lac*Iq) y al promotor de lac (*lac*). Entre el sitio de restricción *Bam*HI-*Nco*I se encuentra el oligo EFSBFP-Kos, el cual elimina la secuencia kosak que antecede a la BFP o CFP. Este vector solo expresa la proteína de fusión GST-GFP, debido a que después de este producto se genera un codon de paro. La proteína BFP o CFP que no se traduce se encuentra entre los sitios de restricción *Nco*I-*Eco*RI.



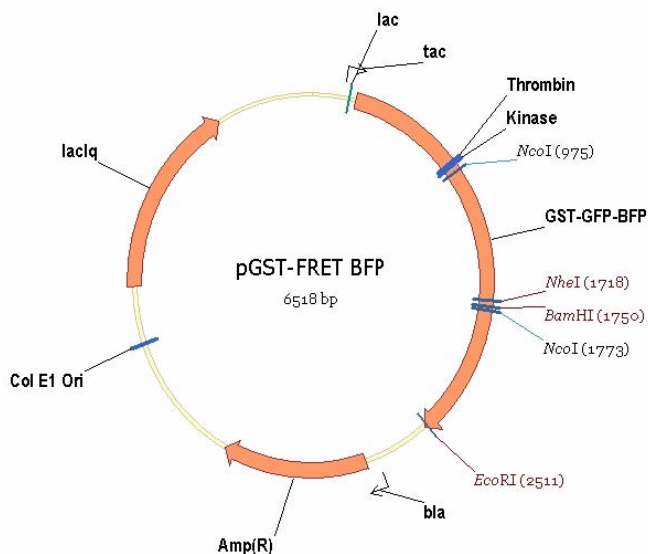
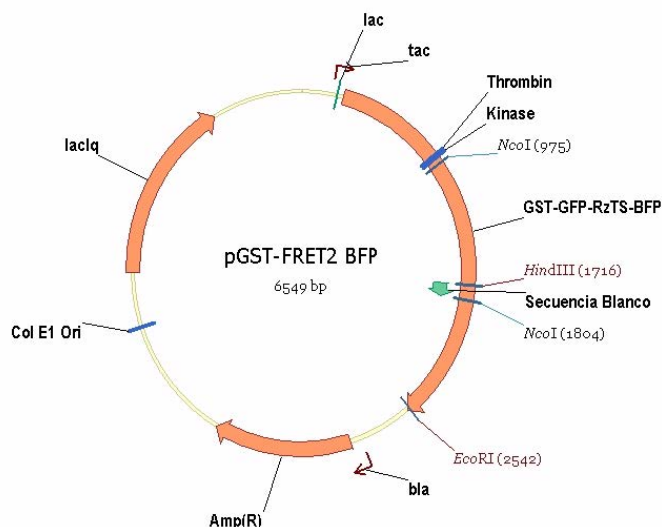


Figura 18. Mapa general de los plásmidos pGST-FRET BFP y pGST-FRET CFP. El vector contiene un cassette de resistencia a ampicilina (AMPr), un origen de replicación Col E1, al represor de lac (lacIq) y al promotor de lac (lac). Entre el sitio de restricción *Bam*HI-*Nco*I se encuentra el oligo EFSBFP-Kos, el cual elimina la secuencia kosak del vector comercial. Se reparó el sitio *Hind* III, creando un sitio *Nhe*I lo que permite la traducción del producto quimérico completo.

Figura 19. Mapa general de los plásmidos pGST-FRET2 BFP, pGST-FRET2 Cian y pGST-FRET2 YFP. El vector contiene un cassette de resistencia a ampicilina (AMPr), un origen de replicación Col E1, al represor lac (lacIq) y al promotor de lac (lac). Expresa la secuencia blanco entre los sitios *Hind*III-*Nco*I que corresponde a los nucleótidos 409-453 del gen E6 de HPV-16. El vector contiene un cassette de resistencia a ampicilina (AMPr) y un origen de replicación Col E1.



Utilizando como base el plásmido pGST-GFP se clonaron los fragmentos *Hind* II - *Eco*RI de pEFSCFP-kos, pRzSBFP, pRzSCFP y pRzSYFP para generar las construcciones quiméricas pGST-FRET1 Cian, pGST-FRET2 BFP, pGST-FRET2 Cian y pGST-FRET2 YFP y respectivamente. De esta forma, la construcción pGST-FRET1 Cian expresa el RNAm quimérico GST-GFP-CFP, sin embargo, solo expresa la proteína GST-GFP debido a la presencia de un codon de terminación al final de la GFP (Figura 17). Para eliminar este codon de terminación, se reparó el sitio *Hind*III del pGST-FRET1 Cian, generando la construcción pGST-FRET Cian, que efectivamente expresa la proteína quimérica GST-GFP-CFP (Figura 18). Por su parte, las construcciones pGST-FRET2 (con donadores Cian, Azul y Amarillo, respectivamente) expresan

la proteína de fusión, GST-GFP-RzTS-CFP, GST-GFP-RzTS-BFP y GST-GFP-RzTS-YFP, cuyo RNAm contiene el sitio blanco de la ribozima Rz434 (Figura 19).

Construcción de Vectores para Expresión en Eucariontes

Para la construcción de los plásmidos pCR3.1-GFP, pCR3.1-BFP, se purificaron los fragmentos *NheI* - *EcoRI* de los vectores comerciales pEGFP-C1, pEBFP, pECFP, pEYFP, respectivamente. Dichos fragmentos fueron clonados en el vector comercial pCR3.1 (Invitrogen) digerido con las enzimas *NheI* - *EcoRI*. Los plásmidos pCR3.1-GFP (Figura 20), pCR3.1-BFP, pCR3.1CFP y pCR3.1YFP (Figura 21) se utilizaron para determinar los ensayos de transcripción-traducción *in vitro*.

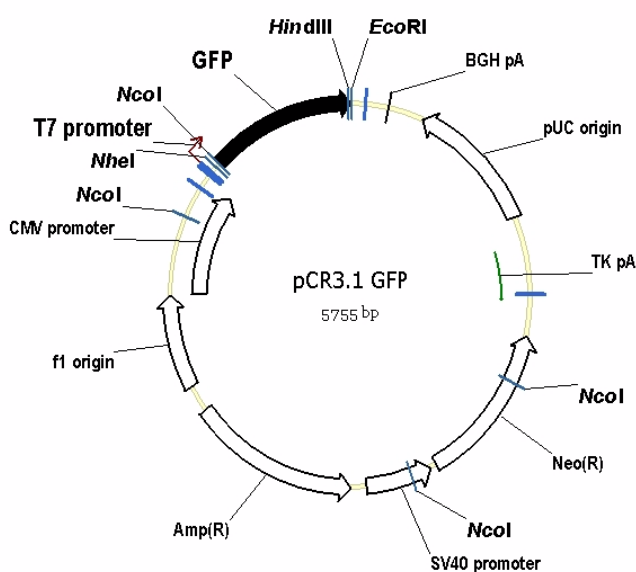


Figura 20. Mapa del plásmido pCR3.1GFP. Expresa la proteína GFP. El vector contiene un cassette de resistencia a ampicilina [AMP (R)] y otro a kanamicina/neomicina [Neo (R)]. Un origen de replicación Col E1 (pUC origin). Un promotor de CMV, SV40 y de la RNA polimerasa del fago T7. Posee sitios de poliadenilación (TK pA, BGH pA). El gen que codifica para la proteína GFP se encuentra entre los sitios de restricción *NheI-EcoRI*

Utilizando como base el plásmido pCR3.1-GFP se clonaron los fragmentos *HindIII-EcoRI* de pEFSBFP y pEFSCFP para generar las construcciones quiméricas pCR3.1-FRET1-BFP, pCR3.1-FRET1-CFP (Figura 22), a partir de estos plásmidos se reparó el sitio *HindIII*, para tener la segunda proteína fluorescente en el mismo marco de expresión que la proteína GFP, generando las construcciones pCR3.1FRET-BFP, pCR3.1-FRET-CFP (Figura 23).

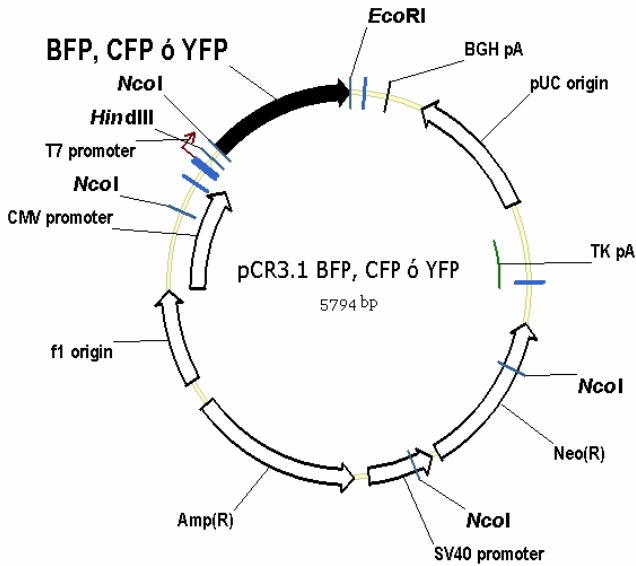


Figura 22. Mapa general de los plásmidos pCR3.1 FRET1 BFP y pCR3.1 FRET1 Cian. Expresa la proteína GFP, seguida del EFSBFP ODN que evita la expresión de las proteínas BFP o CFP, respectivamente. El vector contiene un cassette de resistencia a ampicilina [AMP (R)] y otro a kanamicina/neomicina [Neo (R)]. Un origen de replicación Col E1 (pUC origin). Un promotor de CMV, SV40 y de la RNA polimerasa del fago T7. Posee sitios de poliadenilación (TK pA, BGH pA).

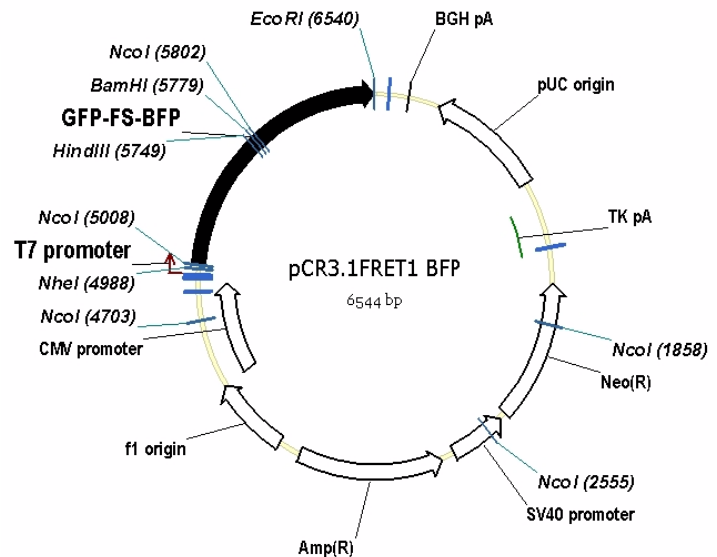
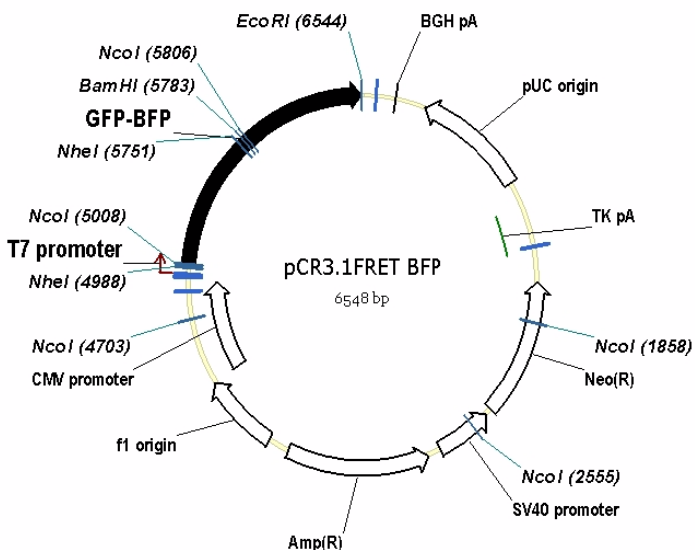


Figura 23. Mapa general de los plásmidos pCR3.1 FRET BFP y pCR3.1 FRET Cian. . Entre el sitio de restricción BamHI-NcoI se encuentra el oligo EFSBFP-Kos, el cual elimina la secuencia kosak del vector comercial. Se reparó el sitio Hind III, creando un sitio NheI lo que permite la traducción del producto quimérico completo. El vector contiene un cassette de resistencia a ampicilina [AMP (R)] y otro a kanamicina/neomicina [Neo (R)]. Un origen de replicación Col E1 (pUC origin). Un promotor de CMV, SV40 y de la RNA polimerasa del fago T7. Posee sitios de poliadenilación (TK pA, BGH pA).



De igual manera los fragmentos *Hind*III-*Eco*RI de pRzSBFP, pRzSCFP y pRzSYFP generando pCR3.1-FRET2-BFP, pCR3.1-FRET2-CFP y pCR3.1-FRET2-YFP, respectivamente (Figura 24).

Por su parte, la construcción pCR3.1-FRET2 y sus variantes (YFP, CFP, y BFP) expresan la proteína de fusión, GFP-RzTS-YFP ó GFP-RzTS-CFP ó GFP-RzTS-BFP, respectivamente cuyo RNAm contiene el sitio blanco de la ribozima Rz434.

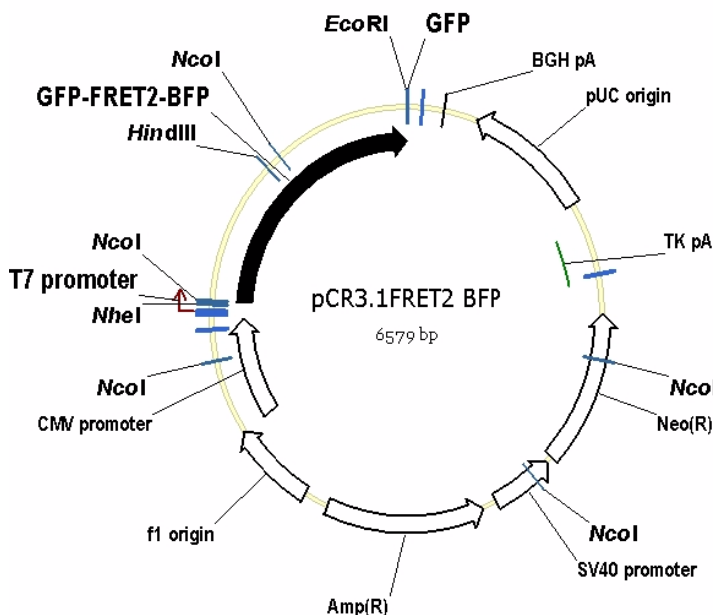


Figura 24. Mapa general de los plásmidos pCR3.1 FRET2 BFP, pCR3.1 FRET2 Cian y pCR3.1 FRET2 YFP. Entre el sitio de restricción *Hind*III-*Nco*I se encuentra el oligo FRET2 que corresponde a los nucleótidos 409-453 del gen E6 de HPV-16, el cual contiene la secuencia blanco para las moléculas terapéuticas. El vector contiene un cassette de resistencia a ampicilina [AMP (R)] y otro a kanamicina/neomicina [Neo (R)]. Un origen de replicación Col E1 (pUC origin). Un promotor de CMV, SV40 y de la RNA polimerasa del fago T7. Posee sitios de poliadenilación (TK pA, BGH pA).

Vectores para evaluar actividad catalítica de las ribozimas

pE6-GFP

Es un vector reportero diseñado para evaluar la actividad de la ribozima 434. Su construcción se basó en el vector pGreen-Lantern-2 (Life Technologies) con el ODN E6-GFP de doble cadena (5' AAT TCA ATG ATT AAC TGT CAA AAG CCA CTG TGT CCT GAA GAA AGC AAA GCC GCC ACC AAT GCC-3'), que contiene la secuencia blanco para la ribozima Rz434 en los sitios *Eco*RI - *Not*I.

Para evaluar la actividad de la ribozimas se construyeron tres diferentes ribozimas Rz434, Rz434i y Rz434m, las cuales corresponden a los vectores pCRU6Rz434, pCRU6Rz434i y pCRU6Rz434m (Figura 25). En donde Rz434, mostraría un efecto catalítico, por contener la

secuencia blanco de HPV-16 E6, Rz434i mostraría un efecto de antisentido pasivo, por ser inactiva pero contener la secuencia blanco de HPV-16 E6 y la Rz434m no debería de mostrar ningún efecto, debido a no guarda especificidad por el blanco.

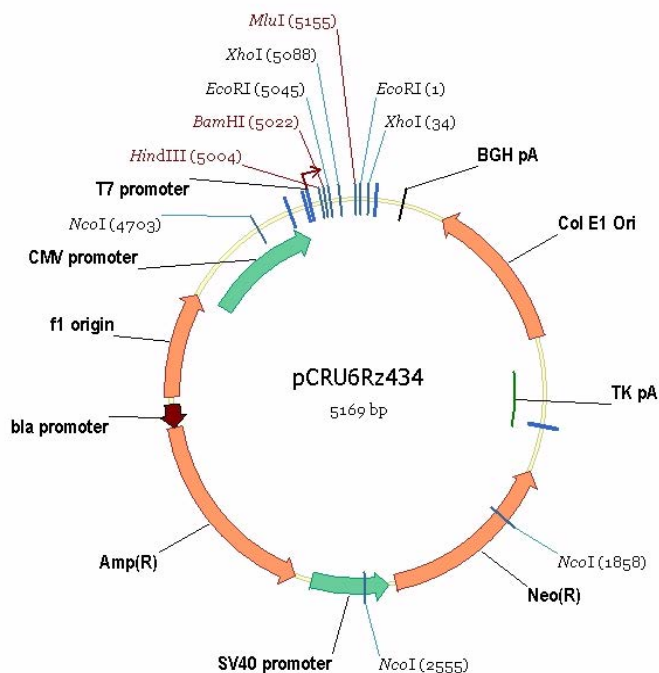


Figura 25. Mapa general de los plásmidos pCRU6 Rz434, pCRU6 Rz434i, pCRU6 Rz434m. Entre el sitio de restricción *XhoI-MluII* se encuentra la secuencia que codifica para las ribozimas. El vector contiene un cassette de resistencia a ampicilina [AMP (R)] y otro a kanamicina/neomicina [Neo (R)]. Un origen de replicación Col E1 (pUC origin). Un promotor de CMV, SV40 y de la RNA polimerasa del fago T7. Posee sitios de poliadenilación (TK pA, BGH pA).

Vectores de Expresión in vitro y en Eucariontes

pCRU6Rz434, pCRU6Rz434i y pCRU6Rz434m

Es el plásmido de expresión de la ribozima Rz434, basado en el vector pCR3.1 (Invitrogen), que contiene a la Rz434 flanqueada por dos estructuras de protección; un tallo - burbuja del RNA pequeño nuclear U6 en el extremo 5' y una horquilla de cuatro nucleótidos en el extremo 3'. La Rz 434 se expresa a partir del promotor de fago de T7 (Figura 25). Los otros dos vectores son semejantes a pCRU6Rz434, sin embargo, se diferencian en la ribozima expresada. Por un lado tenemos a la ribozima inactiva Rz434i y a la ribozima mutada Rz434m, respectivamente.

Los vectores que expresan las ribozimas se caracterizan por la expresión de los genes de resistencia a ampicilina y kanamicina, mientras que el sistema reportero fluorescente solo expresa

el gen de la β -lactamasa. Como se deseaba co-expresar dos plásmidos, el gen que codifica para la ampicilina fue eliminado de los plásmidos que expresan la ribozima. Esto se logró mediante la digestión del DNA con la endonucleasa de restricción *AcII*, la cual posee sitios de corte flanqueando la secuencia del gen de β -lactamasa, y eliminando un fragmento de 379pb (Figura 26). Las clonas obtenidas se seleccionaron sembrando las bacterias en cajas de agar LB con ampicilina (100 μ /ml) y en cajas con kanamicina (25 μ g/ml), se incubaron a 37°C durante la noche y se seleccionaron las colonias que únicamente crecieron en kanamicina. Las construcciones generadas se denominaron pCRU6Rz434 + kan, pCRU6Rz 434i + kan.

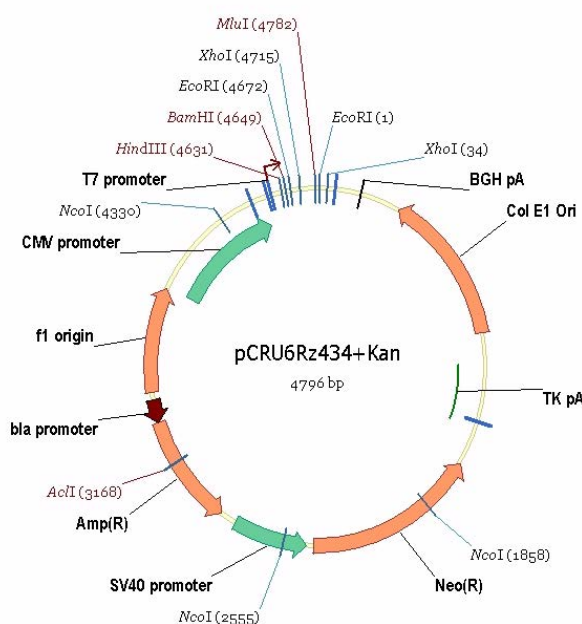


Figura 26. Mapa general de los plásmidos pCRU6 Rz434+kan, pCRU6 Rz434i+kan, pCRU6 Rz434m+kan. Entre el sitio de restricción *XhoI-MluII* se encuentra la secuencia que codifica para las ribozimas. El vector contiene una deleción en el cassette de resistencia a ampicilina [AMP (R)] y mantiene la el cassette de resistencia a kanamicina/neomicina [Neo (R)]. Un origen de replicación Col E1 (pUC origin). Un promotor de CMV, SV40 y de la RNA polimerasa del fago T7. Posee sitios de poliadenilación (TK pA, BGH pA).

Vectores de Expresión en Procariontes

pACYCU6Rz434, pACYCU6Rz434i y pACYCU6Rzmut

A partir de los vectores pCR3.1 U6Rz434, pCR3.1U6Rz434i y pCR3.1U6Rzmut se amplificó por PCR, el producto conteniendo: el promotor de CMV, el promotor de T7 y la secuencia que codifica para la Rz 434, la Rz 434i o la Rz 434 mut.

El producto amplificado se clonó en el vector pCR2.1 utilizando la tecnología TOPO-TA. Posteriormente, el fragmento *EcoRV* se clonó en el vector pACYC184, cuyo origen de replicación es p15A. El inserto liberado por la digestión del DNA del plásmido con la

endonucleasa *EcoRV* fue purificado del gel y clonado en el vector pACYC184. Las clonas resistentes a cloranfenicol, que liberaron el producto, fueron secuenciadas (Figura 27).

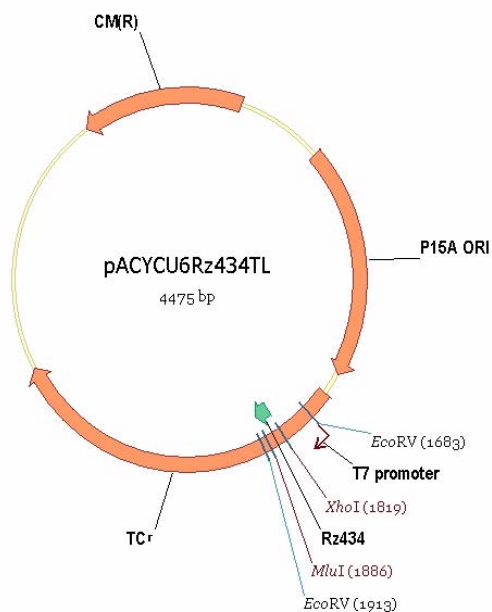


Figura 27. Mapa general de los plásmidos pACYCU6 Rz434, pACYCU6Rz434i, pACYCU6Rz434m. Entre el sitio de restricción *XhoI-MluI* se encuentra la secuencia que codifica para las ribozimas. El vector contiene un cassette de resistencia a cloranfenicol [CM(R)] y a tetraciclina (TC^r). Un origen de replicación p15A (p15A ORI). Un promotor de la RNA polimerasa del fago T7 (T7promoter).

Inducción y purificación de proteínas de fusión GST

Crecimiento de bacterias para Inducción con IPTG:

Las bacterias BL21(DE3) transformadas con los plásmidos de interés se crecieron en medio LB líquido con ampicilina (100 μ g/ml), durante toda la noche con agitación a 200rpm a 37°C. Posteriormente, se realizó una dilución 1:16 del cultivo y las bacterias se incubaron por 2 horas 30°C en agitación a 200rpm. Pasado el tiempo de incubación, se añadió el inductor isopropiltio- β -galactósido [IPTG(72)] a una concentración 1mM final y nuevamente los cultivos se incubaron 2 horas a 30°C en agitación 200rpm (excepto en los cursos temporales de inducción donde los tiempos fueron 30, 60, 90 y 120min.).

Para la purificación de proteínas de fusión (32) se partió de un volumen de cultivo inducido de 50ml. El cultivo se vació en tubos estériles Falcon 2070 pre-enfriados 10min. en hielo. Las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 3,000rpm (centrifuga IEC CENTRA CL2), el sobrenadante se eliminó por aspiración con vacío. El botón de bacterias se resuspendió en 500 μ l de solución de lisis frío (NaCl 100mM SIGMA, Tris-HCl pH 8, Life

Technologies; EDTA 1mM Life Technologies; 0.5% IGEPAL, SIGMA; 0.5mM AEBSF (clorhidrato de 4-(2-aminoetil)bencensulfonilfluoruro, Pharmacia; 2 tabletas de COMPLETE, Boehringer), seguido de una sonicación en intervalos de 30 segundos en baño de hielo a una potencia de 5 y eficiencia del 50% (Sonicador Brandson)). El lisado se transfirió a microtubos y fue centrifugado por 10min. a 13,000rpm (Microcentrífuga Biofuge Pico, Sorvall) para aclararlo, tras lo cual se separó el sobrenadante en un microtubo limpio.

Fluorescencia en bacterias vivas

En los análisis de fluorescencia *in vivo* se partió de un volumen de cultivo inducido de 3ml. El cultivo bacteriano se transfirió a microtubos de 1.5ml. Las muestras se centrifugan por 1 minuto a 13,000rpm. El sobrenadante se eliminó por aspiración con vacío (se repite este paso 2 veces). Los botones bacterianos se dejan secar por 3 minutos sobre una toalla absorbente. El botón bacteriano se lavó 3 veces con 900µl de buffer PBS [(0.2g/L KCl, 0.2g/L KH₂PO₄, 8.0g/L NaCl, 1.15g/L Na₂HPO₄)] y se resuspendió en 500µl de PBS para su lectura en el fluorómetro. Las muestras se analizaron por triplicado utilizando un volumen de 100µl.

Purificación de las proteínas recombinantes ligadas a GST.

A 500µl de lisado bacteriano se agregaron 100 µL de glutatión agarosa [Sigma G-4510, (67)] hidratada en solución bloqueadora de leche descremada en polvo de (0.05g de leche descremada en 10ml de solución de lisis bacteriana), seguido de agitación durante 1 hora a 4°C. Cumplido el tiempo se centrifugó un minuto a 12,500rpm y se realizaron 3 lavados del botón extracto-glutatión agarosa con 500µl de solución de lisis fría. Las muestras se resuspendieron en 100µl de buffer de lisis frío y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Inmunoelectrotransferencia.

Los extractos crudos o purificados fueron cuantificados con el estuche comercial Nanorange (Molecular Probes) y sometidos a electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida (29:1) al 8% ó 10% en solución amortiguadora de tris-glicina-SDS 1x (TrisHCl 25mM pH 8.3, Glicina 192mM, SDS 0.1% p/v) a 125V (20). Una vez terminada la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilo (Immobilon P de Millipore). Las

membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en 100ml PBS-Tween 20. Después del bloqueo las membranas se incubaron con anticuerpo anti-GFP (Sigma en una dilución 1:2000), durante una hora en agitación. La membrana se lavó tres veces con PBS-TWEEN 20 al 0.1% y posteriormente se incubó con el anticuerpo peroxidasa anti-ratón (en una dilución 1:5000). Finalmente la reacción se reveló por quimioluminiscencia utilizando el estuche comercial ECL de (Amersham) y se obtuvieron las imágenes mediante una autoradiografía.

Ensayos de fluorescencia.

Barrido de excitación-emisión.

Las mediciones de fluorescencia se efectuaron en un equipo Fluoroskan Ascent con los filtros de excitación a 355, 395 y 430nm (longitud a la cual se excita preferentemente la proteína donadora; Azul o Cíán), y 485nm (longitud a la cual se excita preferentemente la proteína verde). Se rescataron las emisiones a cinco longitudes de onda: 460, 510, 538, 590 y 620nm. Las lecturas se efectuaron con un tiempo de integración de 20 milisegundos (ms) y a temperatura ambiente (25°C a 27.8°C) utilizando 100µl de muestra para cada caso.

Determinación de la eficiencia de FRET.

La eficiencia de FRET se calculó utilizando la siguiente fórmula (82):

$$E = 1 - (F_{AD} / F_D)$$

E es la eficiencia de FRET, F_{AD} es la intensidad de fluorescencia del donador en presencia del aceptor y F_D es la fluorescencia del donador sin aceptor.

Ensayos *in vitro* de Transcripción-Traducción.

Para estos ensayos se utilizó el estuche comercial de transcripción acoplada a traducción T7 TnT Quick (Promega). Los fragmentos GFP, CFP, FRET, FRET1, FRET2 y FRET3 fueron clonados en el vector pCR3.1 (Invitrogen) que contiene en promotor T7. Las proteínas sintetizadas fueron marcadas por la incorporación L-metionina ^{35}S (Amersham) a 30°C por una

hora. Una vez concluido el tiempo de reacción, las muestras se analizaron en un gel SDS-PAGE al 10%.

Transcripción *in vitro* (Run-off).

Para realizar la reacción de transcripción *in vitro* [TIV (Promega)] los vectores fueron previamente linearizados con enzimas de restricción y el DNA es purificado.

Los vectores utilizados fueron:

pE6-GFP, linearizado con NotI, que contiene el blanco de la Rz434 (64nt).

pCRU6Rz434, linearizado con PstI, que contiene a Rz434.

pCRU6Rz434i, linearizado con PstI, que contiene a Rz434i (ribozima inactiva).

pCR3.1FRET2-Cian, linearizado con *EcoRI*, que contiene el sistema reportero FRET2-Cían.

El ensayo consiste en la producción *in vitro* de RNAm a partir del promotor del fago T7 para las ribozimas y el sistema reportero; mientras que el blanco se produce a partir del promotor del fago SP6. En las reacciones de transcripción de Rz434 y Rz434i (inactiva), se realizaron con la incorporación de ribonucleótidos no marcados; mientras que para pE6-GFP y pCR3.1FRET2 la reacción de transcripción incorporó α -[³²P]-UTP (100TBq/mmol) para el marcaje radioactivo de los transcritos. Posteriormente, los transcritos marcados fueron purificados en un gel de poliacrilamida al 6%, urea 7M en TBE 1x (Tris 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM pH 8.3). El producto de la transcripción *in vitro* se purificó mediante una extracción fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

Reacciones de corte con ribozimas

El RNA blanco de pE6-GFP se incubó durante 1 hora a 37°C con las ribozimas Rz434 y Rz434i. Los productos de la digestión fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% urea 7M. Los geles fueron secados y los resultados se observaron en una autoradiografía (13; 57).

Ensayo de RNasaH

La RNasaH es una endoribonucleasa que específicamente degrada la hebra de RNA en un híbrido RNA-DNA produciendo oligoribonucleótidos con extremo 5'-fosfato terminal y hebras sencillas de DNA. Se utilizó para evidenciar la hibridación de un ODN con un RNA. El blanco pCR3.1 FRET2 marcado por TIV y purificado se incubó durante 5, 15, 30 y 60 minutos a 37°C en ausencia a presencia de los ODNs 419, AntiE6, M7, 419m, M280 y M253 con 0.5U de RNasaH (16). Los resultados se analizaron basándose en la generación de fragmentos 5' y 3' del blanco y su migración en geles de poliacrilamida 6% urea 7M.

Extensión de cebador (Primer extension)

Con el fin de evaluar la producción del transcrito correspondiente a las ribozimas, se transformaron bacterias BL21(DE3) con el vector pCRU6Rz434. Se crecieron durante la noche a 37°C en LB kanamicina (25 µg/ml), las bacterias diluidas se indujeron a diferentes tiempos con IPTG 1mM. Se extrajo RNA de ellas utilizando trizol (Invitrogen). El RNA fue cuantificado para realizar un ensayo de extensión del cebador (62). Para este ensayo se utilizaron dos cebadores uno complementario a la secuencia terminal de la ribozima (M281 Rz 434, región catalítica de la Rz), y uno en sentido de la secuencia inicial de la Rz (M280 HPV-16, región de reconocimiento del blanco). El cebador en sentido fue utilizado como control negativo, ya que al encontrarse en sentido del RNAm éste no puede actuar como cebador.

Para demostrar la expresión de la ribozima Rz434 en bacterias inducidas con IPTG se realizó un ensayo de extensión de cebador en el que se utilizó como control el ODN HPV-16 el cual no puede hibridar con el transcrito. El ODN Rz434 se utilizó como cebador, ya que es complementario a la Rz434 y se hibrida a 184pb del promotor de T7. El análisis de extensión de cebador se utilizó para determinar la localización y cuantificación del RNA de las ribozimas. Un ODN marcado terminalmente se hibridó a un RNA blanco y se utilizó como cebador de la reverso transcriptasa en presencia de desoxirribonucleótidos. De esta manera el RNA blanco es reverso-transcrito en un cDNA y se analiza en un gel desnaturizante de poliacrilamida. El cDNA producido refleja la distancia del cebador al extremo 5'- terminal del RNA. Adicionalmente la cantidad de cDNA es proporcional a la cantidad de RNA blanco (62).

Para obtener una buena extensión del cebador es importante considerar tanto la longitud del cebador como la distancia del mismo al extremo 5'-terminal del RNA blanco. Un cebador de 20 nucleótidos permite un nivel suficiente de especificidad cuando se usa en una población mezclada de RNA. Idealmente, el cebador se debe hibridar aproximadamente 100 bases río abajo del extremo 5'-terminal del RNA y no debe ser auto-complementario.

El ensayo consistió en la incubación del cebador (10mM) con el RNA extraído de bacteria inducidas en solución amortiguadora de extensión (Tris-HCl 250mM pH 8.3, KCl 375mM, MgCl₂ 15mM, DTT 100mM) por 15min. a 65°C, seguido de una incubación de 10min. a 37°C. Enseguida se adicionó una mezcla de desoxirribonucleótidos (dCTP, dGTP y dTTP 2.5mM y α -[³²P] -dATP (110TBq/mmol)) y 200U de reverso transcriptasa M-MLV. La mezcla se incubó por 30min. a 37°C. Los productos polimerizados fueron separados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 6% urea 7M. Los geles fueron secados y expuestos a placas radiográficas.

Modelado matemático de la estructura del mensajero

A partir de la secuencia del vector pCR3.1FRET2 Cían, se simuló una transcripción a partir del promotor de T7, lo que nos generó un transcrito que codifica GFP-secuencia blanco-CFP. Dicha secuencia se introdujo en el programa M-fold (92) se dibujó y analizó la estructura correspondiente al mensajero (mostrada en los resultados).

Ensayos con Antisentidos en bacterias vivas

Selección de colonias fluorescentes y preparación para administración de antisentidos.

Se transformaron bacterias BL21 (DE3) con el vector pGST-GFP-FRET2-YFP y los controles respectivos pGST-GFP y pGST-YFP, se seleccionaron y sembraron por triplicado en 3ml de LB amp 100µg/ml. Se realizó un experimento de inducción y se evaluó la fluorescencia. Las clonas bacterianas seleccionadas se crecieron en 30ml SOC amp 100µg/ml durante la noche a 37°C en agitación. Las bacterias se colectaron mediante centrifugación (10min. a 2500rpm) y se decantó el sobrenadante en condiciones de esterilidad. Los botones se resuspendieron en 15ml de con CaCl₂ 0.1M frío, y se incubaron en hielo por 15min. Después se centrifugaron nuevamente y el botón se resuspendió en 1ml de CaCl₂ 0.1M frío (41).

Administración de antisentidos en bacterias.

Se tomaron alícuotas de 50µl de bacterias tratadas con CaCl₂, y se colocaron en tubos de 6ml de polipropileno 2059 (BD Biosciences). Enseguida, se administraron los fosforotioatos antisentido AntiE6 y M7 en dos dosis de 0.1 y 1µM. La mezcla de bacterias y AS-ODN se incubó por 30min. en hielo, seguida de un choque térmico de 45 segundos a 42°C. Posteriormente se adicionaron 3ml de SOC Amp 100µg/ml, y se prosiguió con el protocolo de inducción. Terminado el tiempo de inducción, se evaluó la actividad de las AS-ODN en por fluorescencia y se purificaron las proteínas para ensayo de inmunoelectrotransferencia.

Línea celular

Se utilizó la línea celular C-33A (clave ATCC HTB-31). Esta línea celular se deriva de una biopsia de cáncer cervical, de una mujer caucásica de 66 años; las características particulares de esta línea es que la proteína de retinoblastoma (pRB) está presente pero de tamaño anormal. La expresión de p53 es elevada y presenta una mutación. Esta línea es negativa para DNA o RNA del virus de papiloma humano.

CULTIVO CELULAR:

Las células fueron crecidas en medio D-MEM (Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino al 5% (SFB; Invitrogen) y antibióticos (estreptomicina-penicilina 1%). Las células se cultivaron en una incubadora (Nuair RI AutoFlow) a 37°C en un ambiente húmedo con CO₂ al 5% en cajas de 100mm (Nunc). Una vez que las células alcanzaron el 80% de confluencia, se lavaron 2 veces con 5ml de PBS (Invitrogen), y se prepararon para los experimentos de transfección.

Transfección

Para la expresión del sistema reportero en células C-33A, se establecieron dos protocolos. El primero fue utilizado para caracterizar el sistema fluorescente (transfección estable; seleccionando las clonas por un mes con geneticina 0.1%, Invitrogen) y el segundo se utilizó para evaluar el efecto de los antisentidos (transfección transitoria).

Como agente transfectante se utilizó Lipofectin [Invitrogen(31)]. Para las transfecciones se utilizaron 10µg de DNA del plasmido (pDNA) de todas las construcciones. Este pDNA se incubó por 15min. a temperatura ambiente en 0.5 ml de medio basal (D-MEM no suplementado) y en paralelo, se incubaron 50µl de Lipofectin, pasado este tiempo se mezclaron ambas soluciones y se incubaron por 15min. adicionales. Posteriormente se adicionó a las células la mezcla de lipofectin-pDNA y medio basal por goteo. Las células se mantuvieron en la incubadora por 2 horas, en donde se agitaban suavemente cada 30min. La transfección se detuvo por adición de medio D-MEM con SFB 5% y se inició la selección de clonas resistentes a geneticina.

Cosecha de células

Consiste en la aspiración y lavado de las células con PBS. Una vez que se aspiró totalmente el PBS y se adicionó tripsina (PBS-Verseno 1:1 v/v y tripsina 0.01%; todos de Invitrogen), se incubaron durante 5 minutos en la incubadora y posteriormente se inhibió la actividad de la tripsina adicionando D-MEM suplementado. Se colocaron en tubos de 15ml (BD Biosciences) y se centrifugaron por 5 minutos a 2500rpm en una centrífuga clínica (IEC Centra CL2). El medio fue aspirado y las células se resuspendieron en diferentes soluciones amortiguadoras. Para los ensayos de fluorescencia el botón celular se resuspendió en PBS; para los ensayos de citometría de flujo, fijaron las células en 80% etanol y se almacenaron a -20°C al menos por 12 horas.

Administración de antisentidos en células que expresan el sistema fluorescente.

Las células previamente transfectadas fueron tripsinizadas y se sembraron 10⁶ células en cada caja de 30mm, se dejaron crecer durante 2 días y al tercer día se les aspiró el medio y se adicionaron los antisentidos en medio D-MEM suplementado (M7 y AntiE6 1µM en un volumen de 1ml). Después de dos días, se cosecharon las células y se analizó el efecto del tratamiento con los antisentidos por citometría de flujo.

Preparación de las muestras para citometría de flujo:

Una vez que las células se fijaron en etanol al 80%, se centrifugaron por 3min. a 2000rpm, se decantó el sobrenadante y se dejaron secar por 5min. a temperatura ambiente, posteriormente se resuspendieron en FacsFlow (BD Biosciences) a una concentración de 10^6 células/ml.

Análisis por citometría de flujo

Se utilizó un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) cuya óptica de excitación es un láser de argón con longitud de onda de 488nm. Para evaluar la emisión del sistema fluorescente se utilizaron dos filtros: FL1 (filtro de 530/30nm) o FL2 (filtro de 585/42nm). Se analizaron un total de 10^4 células de cada una de las construcciones.

RESULTADOS

El proyecto consistió en el desarrollo de un prototipo de sistema reportero fluorescente *in vivo* para evaluar la actividad de moléculas antisentido. Este prototipo, se basó en las características fluoroespectroscópicas de las variantes de la proteína verde fluorescente (GFP) e incluye la variante azul (BFP), la amarilla (YFP) y la cian (CFP). El sistema se fundamentó en la expresión de las proteínas fluorescentes y en la posible transmisión de energía (FRET) de un fluoróforo a otro al estar a cierta distancia y orientación.

El proyecto se planteó para dividirse en dos fases, la primera fase consistió en conocer el sistema a desarrollar, caracterizarlo y obtener el máximo de información de este para que la adaptación y su uso en la segunda fase que se desarrolló *in vivo*, estuvieran bien fundamentados y con la experiencia ganada en los experimentos *in vitro* el sistema fuera factible de desarrollar.

Experimentos in vitro

Descripción de la Ribozima Rz434

La ribozima Rz434 (11) se flanqueó por estructuras de RNA que la hicieron resistente a degradación por ribonucleasas intracelulares. Estas estructuras fueron: hacia el extremo 5' la secuencia de una ribonucleoproteína pequeña nuclear (snRNP) U6 y hacia el extremo 3' una estructura secundaria denominada tetraloop (Figura 28). En esta configuración, se incrementó la longitud de Rz434 en la hélice 4 y se modificó la horquilla 3 para dar mayor estabilidad a la conformación de la ribozima.

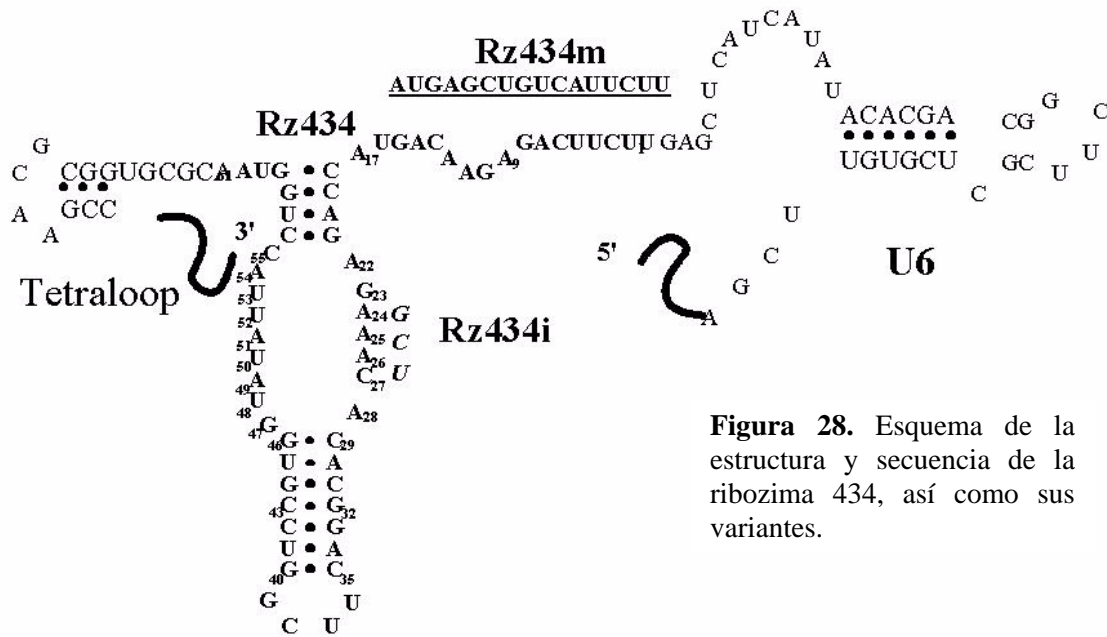
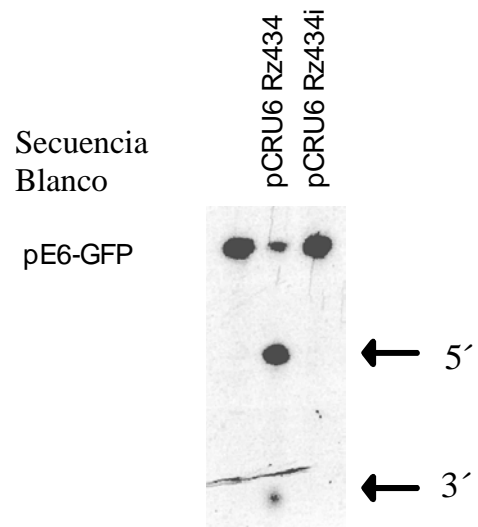


Figura 28. Esquema de la estructura y secuencia de la ribozima 344, así como sus variantes.

Figura 29. Ensayo de actividad catalítica de la Rz 344, utilizando como blanco el vector pE6-GFP linealizado. El ensayo consiste en la incubación del blanco marcado radiactivamente con cada ribozima durante 1 hora a 37°C. Los productos del corte se analizaron en un gel de poliacrilamida 19:1 al 6% 7M Urea en TBE 1x, . Se secó el gel y lo que se muestra es la autoradiografía.



Actividad catalítica de la Rz434

Para confirmar la actividad catalítica de la Rz434, se realizó una transcripción *in vitro* con tres diferentes plásmidos linearizados: pE6-GFP, pCRU6Rz434 y pCRU6Rz434i. Los resultados demostraron la capacidad de corte de la Rz434, ya que al incubarla en presencia del blanco pE6-GFP, se generaron dos fragmentos, correspondientes a los extremos 5' y 3' del producto. La presencia de la ribozima Rz434i no muestra actividad catalítica y por lo tanto no se generan fragmentos, así como en el control en ausencia de ribozima (Figura 29).

Desarrollo del sistema fluorescente *in vitro*.

Se diseñó y desarrolló un vector de expresión del sistema fluorescente *in vitro*, utilizando para ello el promotor de la RNA polimerasa del fago de T7, característico del vector pCR3.1. En este vector se clonó el gene que codifican para la proteína verde fluorescente (GFP), y para la proteína azul fluorescente (BFP), ambos fueron utilizados como controles. Por otro lado, se construyeron de las quimeras, que expresarían el sistema fluorescente formado por la co-expresión de ambos fluoróforos, así como de los controles necesarios, que nos permitieron determinar la interacción entre las moléculas fluorescentes en el sistema reportero. Los controles utilizados fueron: 1) el aceptor (GFP); 2) el donador (BFP); 3) el aceptor en presencia de donador (GFP-BFP, denominada FRET, por la presencia de dicho efecto) y 4) el aceptor sin donador (sin FRET; obtenido por el corrimiento del marco de lectura de la segunda molécula fluorescente, al que se le denominó FRET1).

Como la finalidad del sistema es evaluar la actividad de moléculas antisentido, fue necesario introducir la secuencia blanco de estas moléculas entre la GFP y la BFP, lo cual para continuar con la nomenclatura llamamos FRET2.

Una vez que se terminaron todas las construcciones, se realizaron ensayos acoplados de transcripción-traducción *in vitro*, y los productos protéicos fueron marcados radiactivamente con ³⁵S-L-metionina y analizados en un gel desnaturalizante. Los resultados mostraron los tamaños característicos de 30kDa para GFP y BFP; de 60kDa para FRET2. Sin embargo, en FRET, se registró la presencia de dos productos protéicos uno de 60kDa y otro de 30kDa correspondientes al producto de fusión GFP-BFP y de BFP, respectivamente. La síntesis de dos productos

protéicos para FRET se explicó por la presencia de dos sitios Kozak correspondientes a las regiones 5' traducidas de cada gen (GFP y BFP), resultando en la traducción simultánea de ambos productos. Desde luego, esto tendría como consecuencia un enmascaramiento de un efecto FRET. Por lo que se eliminó la secuencia Kozak del fluoróforo donador (Figura 30).

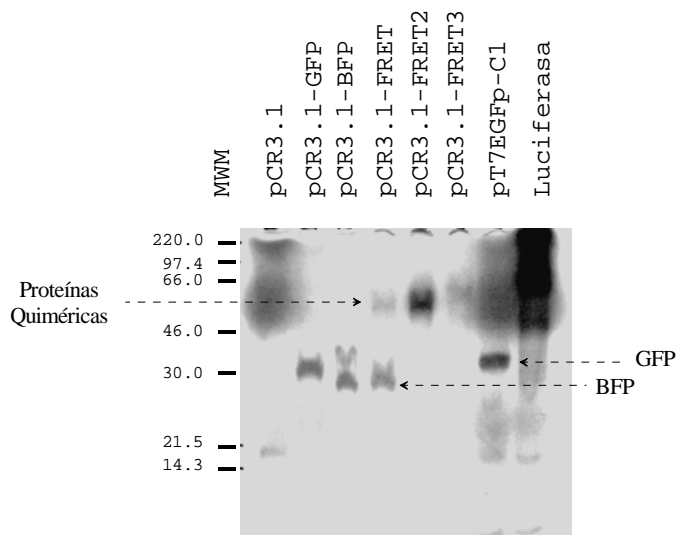


Figura 30. Transcripción-Traducción *in vitro*. Donde se observa producción de las proteínas quiméricas y los controles GFP (dos diferentes construcciones) y BFP. La luciferasa se utilizó como control de la reacción de transcripción traducción acoplada.

Accesibilidad del sitio

Se demostró que la secuencia blanco de la Rz434 se mantenía accesible en el sistema reportero FRET-2, mediante una transcripción *in vitro* (TIV) del plásmido pCR3.1 FRET2 el cual fue utilizado como blanco. El transcrito blanco se incubó en presencia y ausencia de los antisentidos AntiE6 (9), M7 (9), 419, 419m, M280 y M253 en presencia de RNasaH por 5 minutos a 37°C. Los ODNs M280 y M253 fueron usados como controles. El M280 es una molécula en sentido y el M253 es una molécula inespecífica (no puede hibridar con el transcrito de interés). Los resultados mostraron que al incubar el blanco con el ODN AntiE6 o el 419 se generaron fragmentos de diferentes tamaños indicando que la secuencia de reconocimiento de la Rz434 quedó accesible (Figura 31), en el resto de los controles (moléculas sentido, inespecíficas y mutadas) no se observaron los fragmentos correspondientes a los productos de la catálisis de la RNasaH generados por la hibridación de los antisentidos con la secuencia blanco del mensajero. Fue importante notar que el fragmento 3' que corresponde al transcrito que incluye la región blanco fusionado al transcrito de la proteína CFP es de diferente tamaño, lo cual concuerda con la región de hibridación de los antisentidos (Figura 32 y 33).

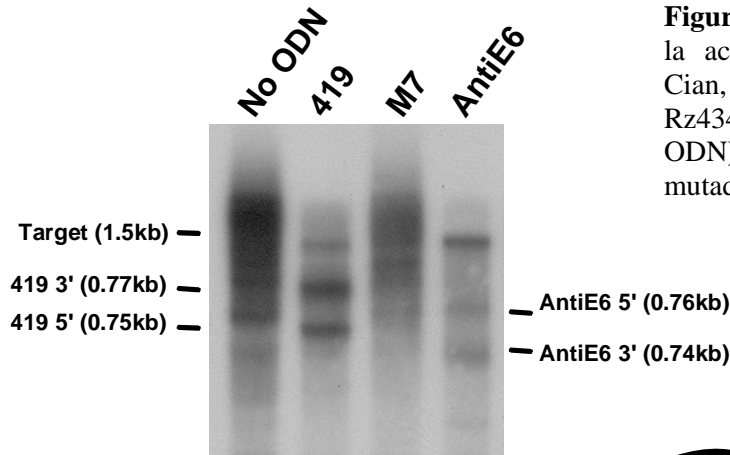


Figura 31. Ensayo de RNasaH para demostrar la accesibilidad del blanco pCR3.1-FRET2-Cian, en la región de reconocimiento de la Rz434. Transcrito incubado en ausencia (No ODN) o presencia de ODNs. AntiE6, 419 y mutado (M7).

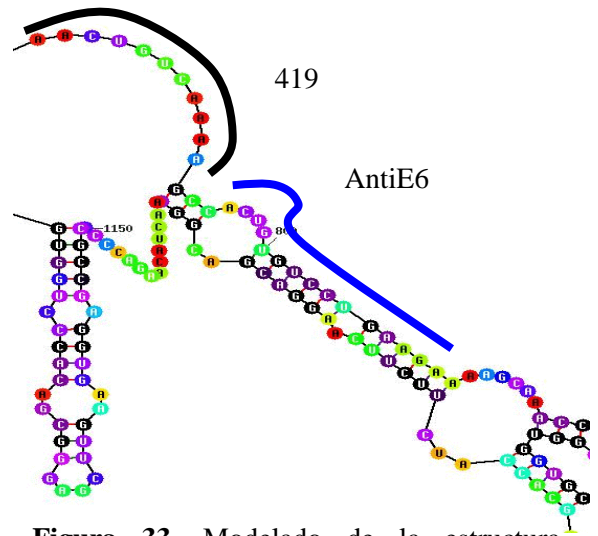
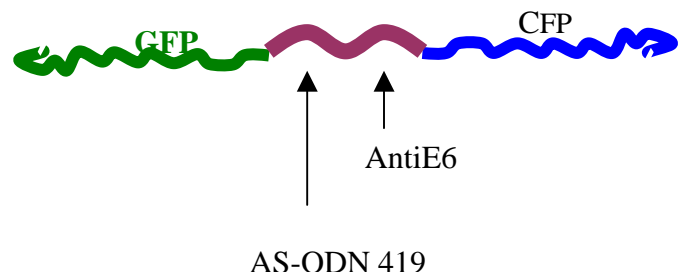


Figura 33. Modelado de la estructura secundaria del transcrito correspondiente al sistema reportero fluorescente pCR3.1 FRET2-Cian, se marca la secuencia de reconocimiento de los antisentidos.

Figura 32. Representación del transcrito correspondiente al plásmido pCR3.1 FRET2 Cían. De esta manera el transcrito generado por la hibridación con al AS-419 es 15 bases mayor que el generado por el AntiE6.



En un programa de análisis de estructura de mensajeros (Figura 33), se introdujo la secuencia de pCR3.1 FRET2 y se observó que el sitio blanco de la ribozima estaba disponible, lo cual se corroboró con el ensayo de RNasaH. Sin embargo, por la estructura secundaria predicha supusimos que la accesibilidad era mayor en la región de reconocimiento del ODN 419 ya que forma una horquilla, mientras que la región de hibridación del antiE6 se encontró una estructura secundaria de doble cadena. Sin embargo, los resultados experimentales mostraron que ambas moléculas tenían acceso a su blanco de igual manera, y que la generación de fragmentos se observó a partir de los 5 minutos de incubación (Figura 31) hasta 1 hora (datos no mostrados).

Transcripción-Ensayo de RNasaH- Traducción

Para determinar si los fragmentos del transcrito del sistema reportero generados por la activación de la RNasaH eran suficientes para observar cambios en la traducción se decidió repetir el ensayo de transcripción, seguido de un ensayo de RNasaH y finalmente terminar con un ensayo de traducción *in vitro*. En este experimento se observó que al incubar el transcrito en presencia de una molécula AS-HPV y en ausencia de un ODN (control), y adicionando RNasaH e incubando la reacción anterior en extractos de reticulocitos de ratón, la producción de la proteína quimérica del sistema fluorescente es total (60kDa). Sin embargo, en presencia del antiE6, el producto quimérico se desapareció, y solo observó un producto de 30kDa correspondiente al tamaño molecular de las proteínas fluorescentes de manera independiente (Figura 34).

Con la experiencia obtenida y realizando las modificaciones pertinentes al sistema *in vitro*, se cambió el sistema reportero a un vector que permitiera expresarlo en bacterias y así se procedió a su evaluación *in vivo*. Para tal propósito se decidió utilizar el vector comercialmente disponible pGEX-2TK, el cual nos permitió obtener los productos fluorescentes fusionados a la glutatión-S-transferasa, y se planteó la posibilidad de evaluar fluoroscópicamente el sistema expresado en bacterias así como caracterizar las proteínas fluorescentes purificadas.

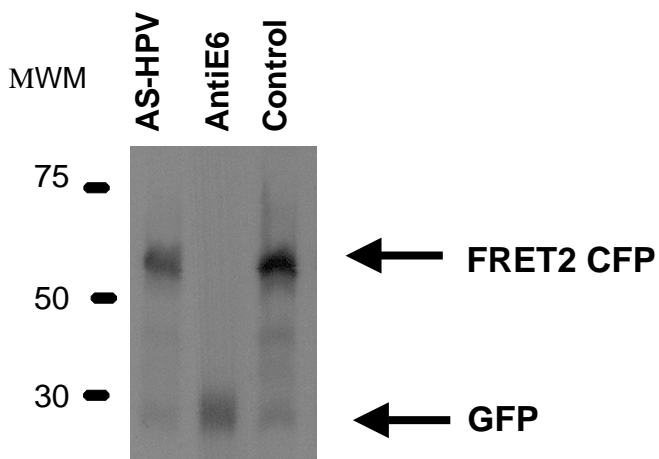


Figura 34. Productos traducidos a partir de la transcripción *in vitro* y del ensayo de RNasaH.

Experimentos in vivo en Bacterias

Análisis de fluorescencia del solvente.

Antes de iniciar la caracterización espectroscópica de las proteínas quiméricas, se realizó un análisis de la autofluorescencia del medio líquido utilizado para crecer las bacterias con la finalidad de establecer si era posible leer la fluorescencia del sistema reportero en bacterias vivas de una manera directa. Inicialmente, se analizó la fluorescencia del medio LB líquido (ampicilina 50µg/ml) para lo cual se realizó un barrido de longitud de onda de excitación-emisión, donde observamos que el medio de cultivo bacteriano líquido mostraba cierta autofluorescencia (datos no mostrados). Se observó que los valores de autofluorescencia del medio eran grandes (de 5 a 20 unidades de fluorescencia) y solapaban con los valores de emisión de GFP y BFP, se decidió evaluar otras soluciones de suspensión (Tris 1M pH 8, H₂O desionizada y PBS). Al comparar la autofluorescencia de las siguientes soluciones: Tris 1M pH 8, H₂O desionizada y PBS, se observó la autofluorescencia de estas es mínima casi nula y los rangos de autofluorescencia eran mínimos determinando que no existía diferencia entre ellas (datos no mostrados), por lo que se utilizó PBS en los futuros experimentos.

Caracterización de las proteínas fluorescentes

El producto de fusión de la GST y las proteínas fluorescentes, se obtuvo después de 2hr de inducción en presencia de 1mM IPTG, se purificó y los extractos se utilizaron para caracterizar

los espectros de las proteínas fluorescentes. Las muestras se analizaron mediante un fluorómetro y evaluamos las diferentes soluciones de suspensión.

Entre las soluciones evaluadas la que mostró los mejores resultados fue el PBS, que además no modificaba las características fluorescentes de las proteínas purificadas (Figura 35), por lo que se decidió utilizarlo para el resto de los experimentos.

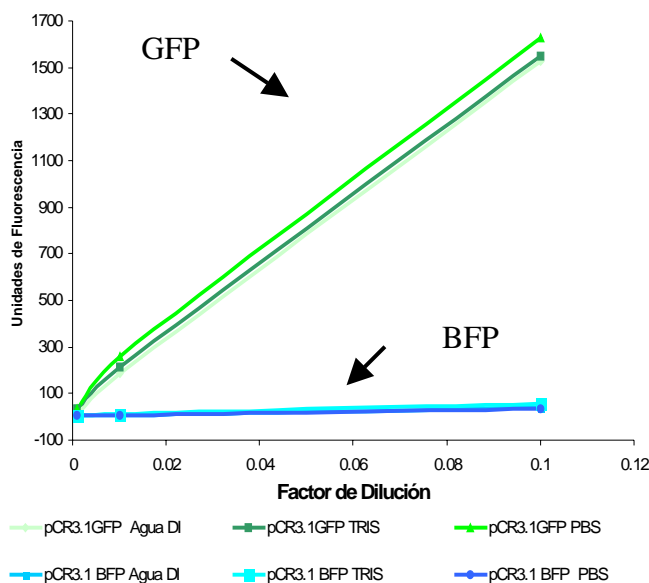
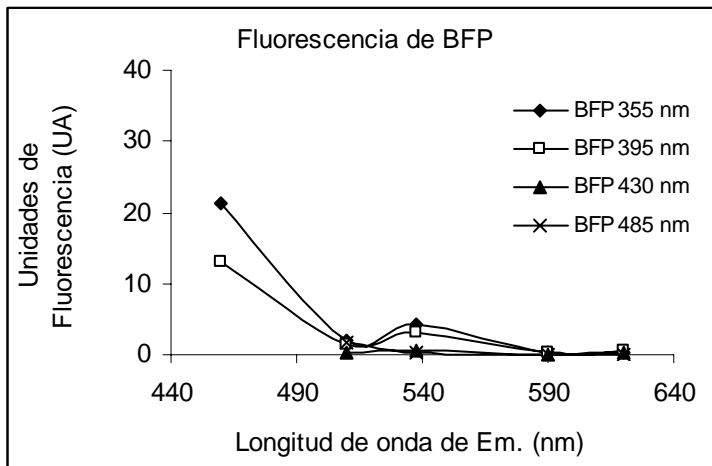


Figura 35. Evaluación del efecto de diferentes soluciones en la emisión de fluorescencia de la proteína verde fluorescente. Excitación a 485nm y emisión 510nm.

Determinación de los picos máximos de excitación y emisión de los fluoróforos.

Al caracterizar las variantes fluorescentes basándose en sus longitudes de onda de excitación (Ex.) y emisión (Em.), se observó que BFP presenta dos picos de Ex. a 355 y 395nm y Em. 430nm (Figura 36 Panel A). CFP se excitó a 430nm y emite a 410nm teniendo un pico máximo a 438nm (Figura 36 Panel B). Por su parte la GFP se excitó a 485nm y teniendo dos picos de emisión uno máximo 510 y menor a 538nm (Figura 36 Panel C) mientras que YFP tiene dos picos de emisión-excitación, a 430nm-538nm y 485nm-510nm (Figura 37).

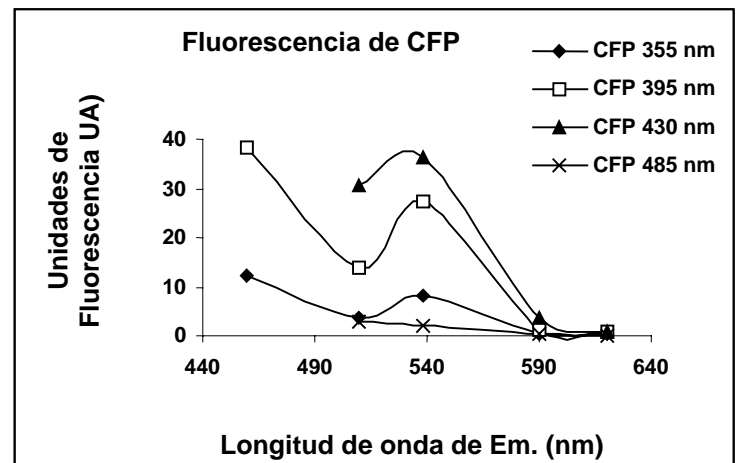
A partir de los espectros obtenidos, se analizó el solapamiento entre las curvas de emisión-excitación de las siguientes combinaciones: GFP-BFP, GFP-CFP y GFP-YFP, donde se observó que en la combinación GFP-BFP el solapamiento es marginal (Figura 38 Panel A) el solapamiento se incrementa en la combinación GFP-CFP (Figura 38 Panel B), sin embargo, es mayor en la combinación GFP-YFP (Figura 38 Panel C).



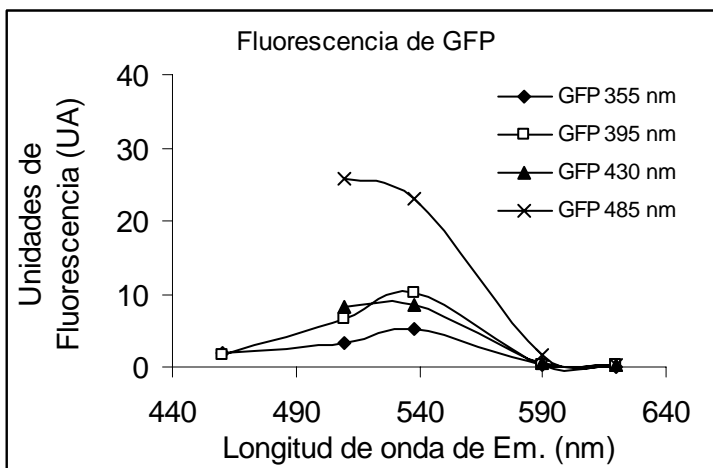
A

Figura 36. Barrido de longitudes de onda de absorción (355, 395, 430 y 485nm) y de emisión (510, 538 y 620nm) para la caracterización de los espectros de excitación y emisión de las proteínas fluorescentes. (A) BFP, (B) CFP y (C) GFP.

B



C



Como para obtener un efecto FRET es importante considerar el solapamiento de ambos fluoróforos, se decidió evaluar el efecto de FRET entre los fluoróforos, lo que nos dio como resultado tres generaciones de sistema fluorescente. La primera generación consistió en la combinación de GFP- BFP, la segunda generación la forma la quimera GFP-CFP y la tercera generación se da por la combinación GFP-YFP.

Sin embargo, por disponibilidad inmediata de los vectores comerciales, los resultados preliminares se realizaron utilizando una proteína quimérica con la combinación GFP-BFP, en donde la GFP es la molécula aceptora mientras que la BFP es la molécula donadora. A lo largo del desarrollo del prototipo, se consideró cambiar el orden en la expresión de la molécula donadora y aceptora, con el fin de mejorar el prototipo de sistema reportero. La figura 39, denota la utilización de cada molécula fluorescente.

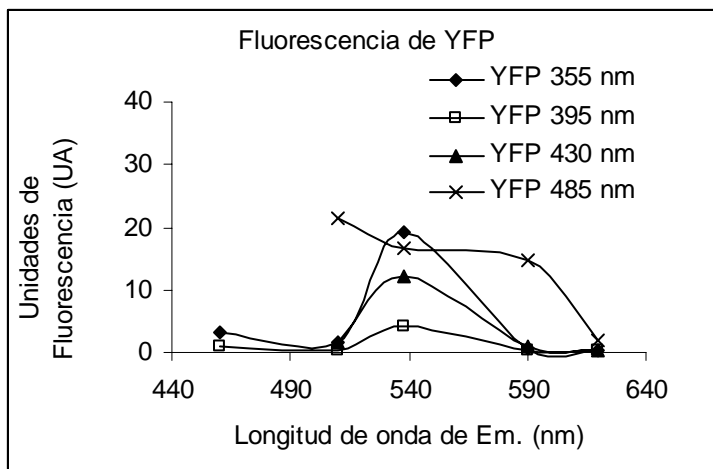


Figura 37. Barrido de longitudes de onda de absorción (355, 395, 430 y 485nm) y de emisión (510, 538 y 620nm) para la caracterización de los espectros de excitación y emisión de la proteína amarillo fluorescente.

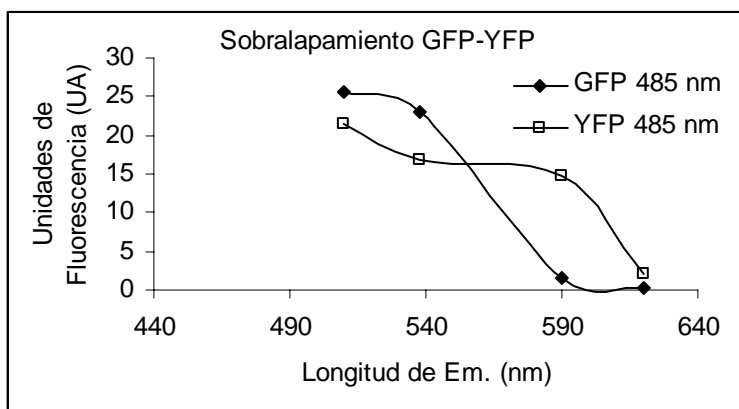
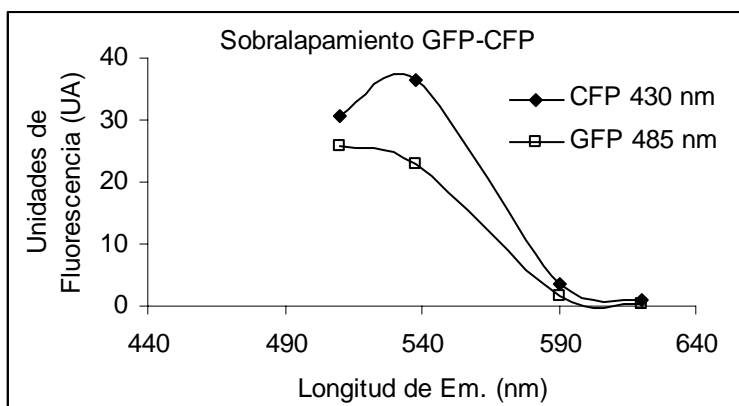
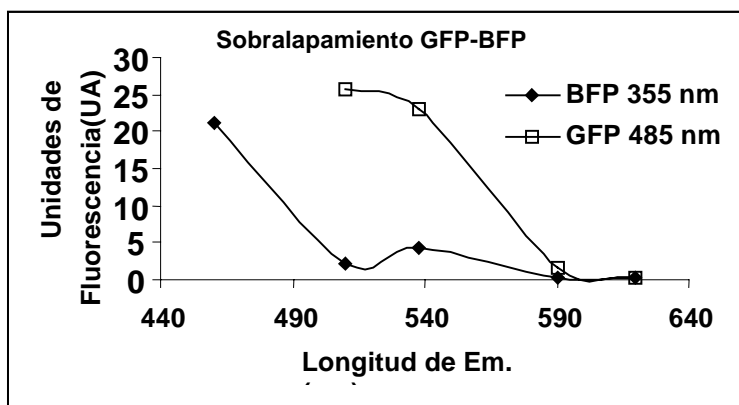


Figura 38. Sobrelapamiento de los espectros. Panel A: GFP-BFP, Panel B. GFP-CFP y Panel C. GFP-YFP.

A

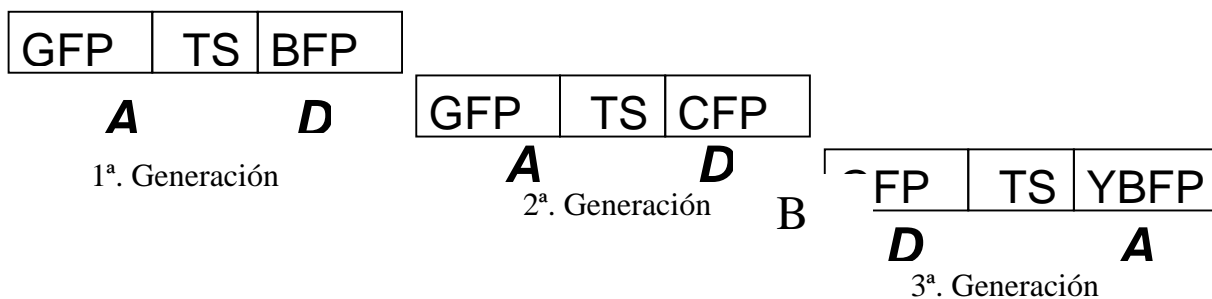


Figura 39. Características de las proteínas fluorescentes en cada una de las generaciones desarrolladas. A es equivalente a Aceptor y D es equivalente a donador.

Determinación de los espectros de la primera generación del sistema reportero GFP-BFP.

Para determinar las características espectrales de los productos de los plásmidos pGST-FRET2, se realizó inicialmente un barrido de excitación y emisión. Al analizar las quimeras GST-FRET1 se observó un espectro semejante al de GST-GFP con un pico de Ex. a 485nm y un pico de Em. a 510nm (Figura 40; quimera en la que se corrió el marco de lectura del fluoróforo donador BFP). Se analizó la construcción quimérica GST-FRET2, en la cual esperamos observar el efecto FRET, sin embargo, se observó una disminución del 50% en la magnitud de fluorescencia de los valores observados si se compara con lo que se observó en GST-GFP y GST-BFP (Figura 39). Esta disminución en la fluorescencia podría deberse a un efecto de opacamiento característico de la interacción entre los dos fluoróforos (GFP-BFP).

Como se había observado en experimentos previos (Figura 38), el solapamiento de los espectros es pobre entre la pareja de fluoróforos GFP-BFP, por lo que se decidió evaluar una segunda combinación de fluoróforos GFP-CFP, dando lugar a la segunda generación del sistema reportero.

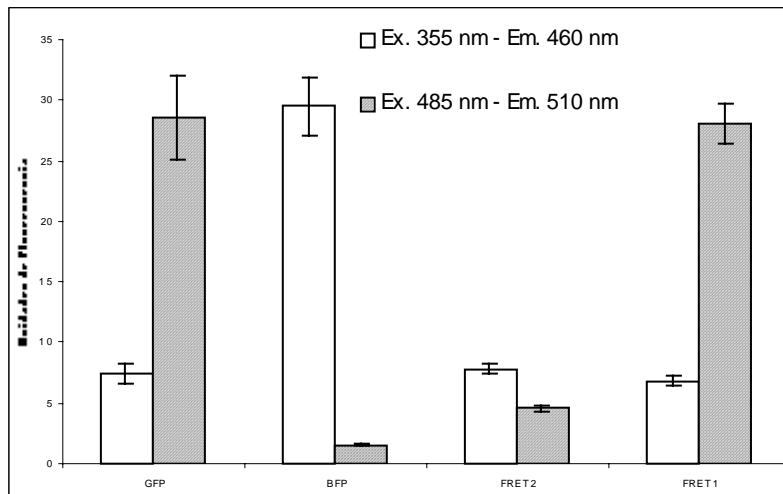


Figura 40. Análisis de los espectros de bacterias BL21 (DE3) vivas después de 2 horas de inducción con IPTG. Inducción de las proteínas de fusión de las diferentes construcciones generadas

Características de las proteínas quiméricas de la segunda generación del sistema GFP-CFP.

Se construyó una nueva serie de plásmidos comenzando por pGST-CFP el cual expresó la proteína de fusión GST-CFP de alrededor de 60kDa. Los plásmidos pGST-FRET y pGST-FRET2 expresan las proteínas GFP y CFP unidas en el mismo marco de lectura. Entre ellas se ubicó una secuencia puente de tamaño semejante (27 y 23 a.a., respectivamente), pero de composición

aminoacídica distinta (Figura 41). Como resultado se observó la producción de proteínas quiméricas de cerca de 90kDa. Por su parte, pGST-FRET1 contiene los genes para GFP y CFP clonados en diferente marcos de lectura, lo que desenmascaró un codón de paro en CFP, de manera que se obtuvo una proteína de fusión de tamaño semejante a pGST-GFP (Figura 42). Se analizó el tamaño de las proteínas expresadas por las nuevas construcciones y concordaron con los tamaños previstos, demostrando la expresión completa de las quimeras.

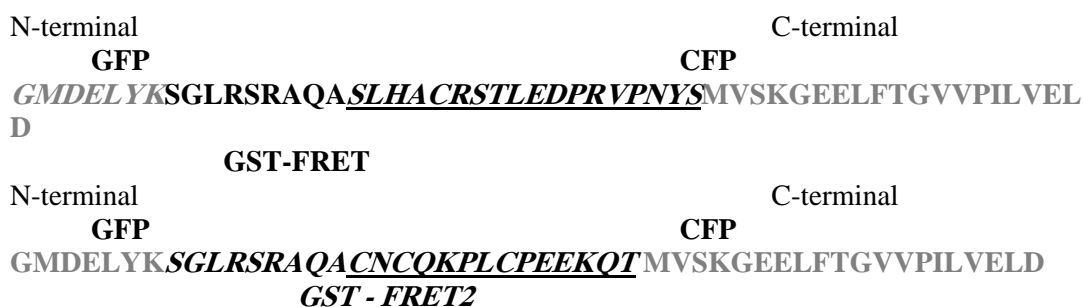


Figura 41. Composición aminoacídica de las variantes FRET.

Caracterización espectral de las proteínas quiméricas.

Para determinar las características espectrales de los productos de los plásmidos pGST-FRET, pGST-FRET1 y pGST-FRET2, se realizó nuevamente un barrido de excitación y emisión. Al analizar las quimeras GST-FRET1 se observó un espectro semejante al de GST-GFP con un pico de Ex. a 485nm y un pico de Em. a 510nm (Figura 43). Es importante notar que en esta quimera no se esperaba obtener un efecto FRET debido a que por el corrimiento de los marcos de lectura respectivos en la molécula donadora se impide la correcta traducción de CFP. Al analizar las construcciones quiméricas GST-FRET y GST-FRET2, en la cual esperamos observar el efecto FRET. En ésta se observó que la magnitud de fluorescencia se disminuye a la mitad de los valores observados para GST-GFP y GST-CFP (Figura 43). Esta disminución de la fluorescencia podría deberse a un efecto de opacamiento característico de la interacción entre los dos fluoróforos (GFP-CFP), ya que dicho efecto no se modifica ni por el contenido ni por el número de aminoácidos que unen a GFP y CFP (Figura 41).

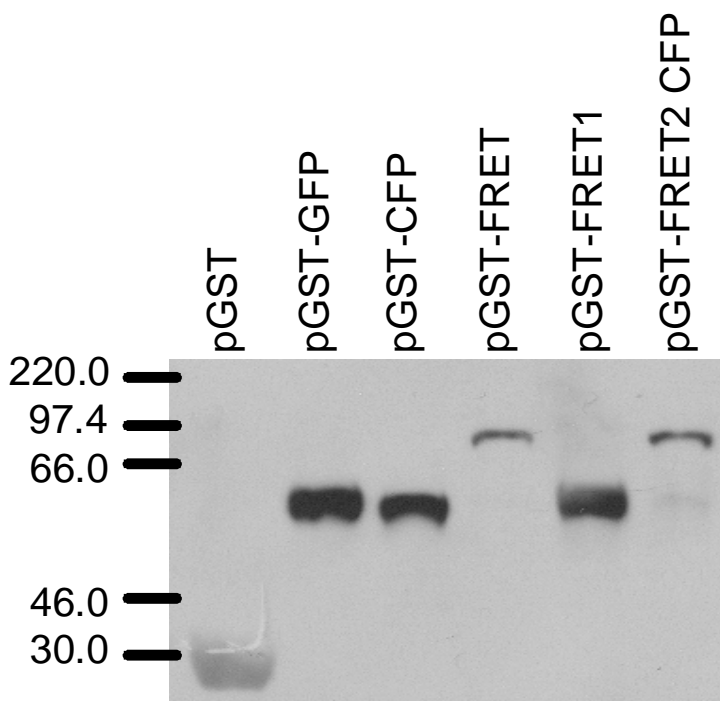


Figura 42. Inmunoelectrotransferencia de proteínas purificadas de las diferentes construcciones. Anticuerpo primario Anti-GFP y secundario Anti-IgG de ratón ligado a peroxidasa. Gel SDS-PAGE al 10%.

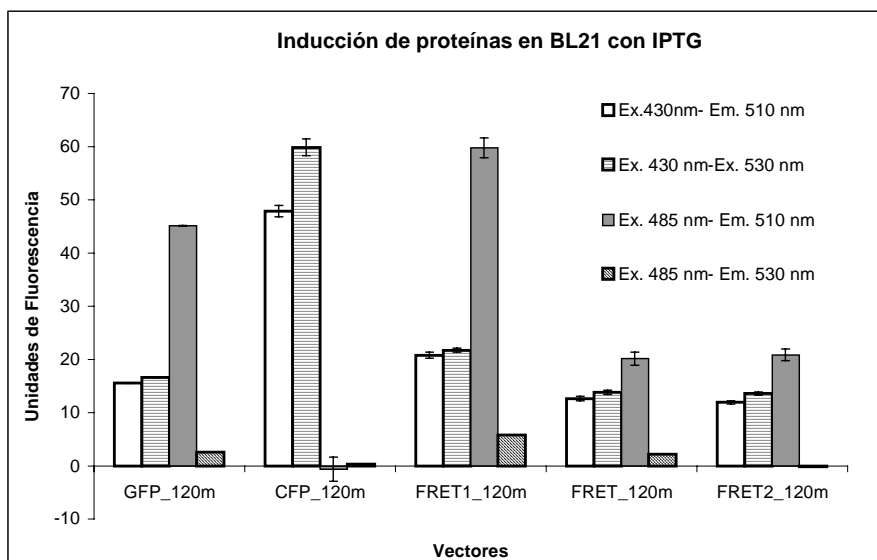


Figura 43. Análisis de los espectros de bacterias BL21 (DE3) vivas después de 2 horas de inducción con IPTG 1mM.

Al caracterizar las moléculas FRET y FRET2, se descartó la posibilidad de una interferencia entre la fluorescencia de GFP y CFP en estas construcciones ya que no existió ninguna modificación en las longitudes de onda de excitación y emisión de GFP como se observa en GST-FRET1 (Figura 43). De esta forma, estos resultados sugirieron que la disminución de la

fluorescencia observada en las quimeras FRET y FRET2 se ocasionó por la transferencia de energía entre las moléculas GFP y CFP.

Hasta ese momento la determinación de la presencia o ausencia de un efecto FRET en el sistema fue una incógnita, y en el caso que existiera un efecto FRET, sería interesante determinar la eficiencia de la transferencia entre los fluoróforos. Para aclarar eso se realizó una búsqueda bibliográfica de los sistemas descritos que generaron un efecto FRET, y se tomaron como ejemplos para evaluar la eficiencia de transferencia de energía entre el donador y aceptor en el prototipo diseñado. Como cada reporte utilizaba una combinación de fluoróforos diferente, y además de que las secuencias blanco eran para otros propósitos diferentes a los nuestros, se decidió homogeneizar la información, con lo que me refiero a que se evaluaron las diferentes secuencias de unión con una misma combinación de fluoróforos (GFP-CFP).

Para cada secuencia blanco reportada se localizó el blanco de interés del autor y se modificó por el blanco de las moléculas antisentido a utilizar en nuestro proyecto. En este punto, fue importante no modificar o lo menor posible el perfil de hidrofobicidad del blanco reportado. De esta manera las moléculas evaluadas contenían una secuencia blanco de diferente tamaño, y contenido aminoacídico. A estas moléculas las denominamos FRET2 y llevan el nombre de la referencia bibliográfica; por lo que tenemos FRET2-Mitra (FRET2 My), FRET2-Heim (FRET2He) y FRET2-Tyas (FRET2Ty) cuyas longitudes y contenido aminoacídico se especifican en la Figura 44.

Ya realizadas las anteriores variantes de FRET, se transformaron bacterias de la cepa BL21(DE3) y se realizó una inducción. Se evaluó la fluorescencia y se determinó la eficiencia de transferencia de energía utilizando la fórmula descrita previamente.

Se observó que la mayor transferencia de energía se obtuvo con el sistema FRET2 desarrollado por nosotros (0.78), seguida por los siguientes resultados: FRET2-Tyas (0.777), FRET2-Heim (0.776), FRET2-Mitra (0.771) y la de menor transferencia resultó ser FRET (0.755). Aunque todas las eficiencias son bastante semejantes, fue importante demostrar que la disminución de la fluorescencia cian en el sistema FRET2 se debe a la transferencia de energía

fluorescente y se demuestra que el efecto que estamos observando es un efecto FRET (Figura 44), semejante a los reportados en la bibliografía (38;50;80).

N-terminal						C-terminal
GFP	9	+	18	=	27	CFP
GMDELYKSGLRSRAQASLHACRSTLEDPRVPNYSMVSKGEELFTGVVPILVELD						
	GST-FRET			E=	0.755	
N-terminal						C-terminal
GFP	9	+	14	=	23	CFP
GMDELYKSGLRSRAQACNCQKPLCPEEKQT MVSKGEELFTGVVPILVELD						
	GST - FRET2			E=	0.780	
N-terminal						C-terminal
GFP	9	+	17	=	26	CFP
GMDELYKSGLRSRAQASSELGLCPEEGTSGSEF MVSKGEELFTGVVPILVELD						
	GST - FRET2-Ty			E=	0.777	
N-terminal						C-terminal
GFP	9	+	27	=	36	CFP
GMDELYKSGLRSRAQASSMTGGQQLCPEEEYDDDDKDPPEAFMVSKGEELFTGVVPILVELD						
	GST - FRET2-He			E=	0.776	
N-terminal						C-terminal
GFP	9	+	22	=	31	CFP
GMDELYKSGLRSRAQASSSSGSSSSGLCPEESSSSGSF MVSKGEELFTGVVPILVELD						
	GST - FRET2-Mi			E=	0.771	

Figura 44 . Análisis de los aminoácidos que forman la región puente entre pGST-FRET2 y las reportadas en la literatura indicando el contenido y longitud de aa y la eficiencia de FRET (E).

Cursos temporales de inducción.

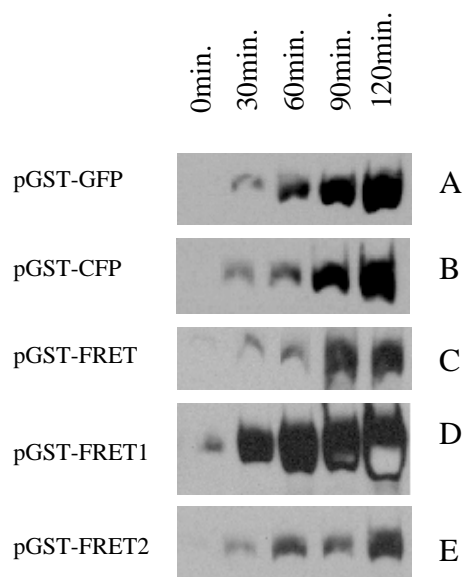
Para caracterizar el sistema en relación con los tiempos de inducción y el incremento de proteína sintetizada, se realizaron cursos de inducción a diferentes tiempos (30, 60, 90 y 120min). Inicialmente se evaluaron períodos de inducción mayores (3hr), en donde se observó la acumulación de proteínas fluorescentes insolubles formando cuerpos de inclusión, por lo que se determinó que el tiempo máximo de inducción sería de 2hr (datos no mostrados).

En todas las construcciones se observó una correlación entre el tiempo de inducción, la cantidad proteína y la cantidad de fluorescencia producida (Figura 45). Es importante notar que existió un mayor incremento por unidad de tiempo en concentración en las quimeras más pequeñas (GST-GFP GST-CFP, GST-FRET1; Figura 45 A, B y C, respectivamente) que en las

quimeras más grandes (GST-FRET y GST-FRET2, Figura 45 E y F) por lo que consideramos era importante utilizar los tiempos de inducción correctos e individuales a para cada construcción observando en ellas características diferentes en la acumulación de proteínas (Tabla 2).

Tabla 2. Tiempos de inducción óptimos para la inducción de las proteínas de fusión.

GST-GFP	GST-CFP	GST-FRET Cían	GST-FRET1 Cían	GST-FRET2 Cían
< 60 min.	< 60 min.	< 90 min.	< 30 min.	< 90 min.



En los espectros de inducción de las proteínas quiméricas (Figura 46) GST-FRET1 Cían se observa una tendencia lineal, mientras que en GST-GFP y GST-CFP se observa un incremento notable en los primeros tiempos, sin embargo, en los tiempos de 90 a 120min el incremento en fluorescencia es de una menor magnitud (logarítmica con respecto al tiempo).

En GST-FRET el incremento en la fluorescencia es de tipo exponencial. En estos ensayos centraremos nuestra atención en la construcción experimental GST-FRET2, donde observamos dos tipos de comportamientos en los espectros correspondientes al curso temporal de inducción; uno lineal que corresponde a los tiempos cortos (menor a 60min de inducción), y el resto de los tiempos de inducción (mayores a 60min) en donde no se observa un incremento notable en la fluorescencia; posiblemente se alcance la meseta del sistema (Figura 46). De esta forma

determinamos que para los siguientes ensayos era conveniente inducir la producción de la quimera GST-GFP-RzTS-CFP en tiempos menores a 60min donde el comportamiento de la relación fluorescencia vs. tiempo es de tipo lineal, lo que nos permitiría observar de manera óptima el decremento o incremento de fluorescencia evitando llegar a la meseta donde la acumulación de proteína enmascararía el efecto o actividad de las moléculas antisentido o ribozimas.

Determinación del efecto FRET por citometría de flujo en bacterias.

Para evaluar la citometría de flujo de emisión del sistema fluorescente bacteriano se utilizó un filtro pasa banda de 530/30nm. Los controles expresaron únicamente a la proteína

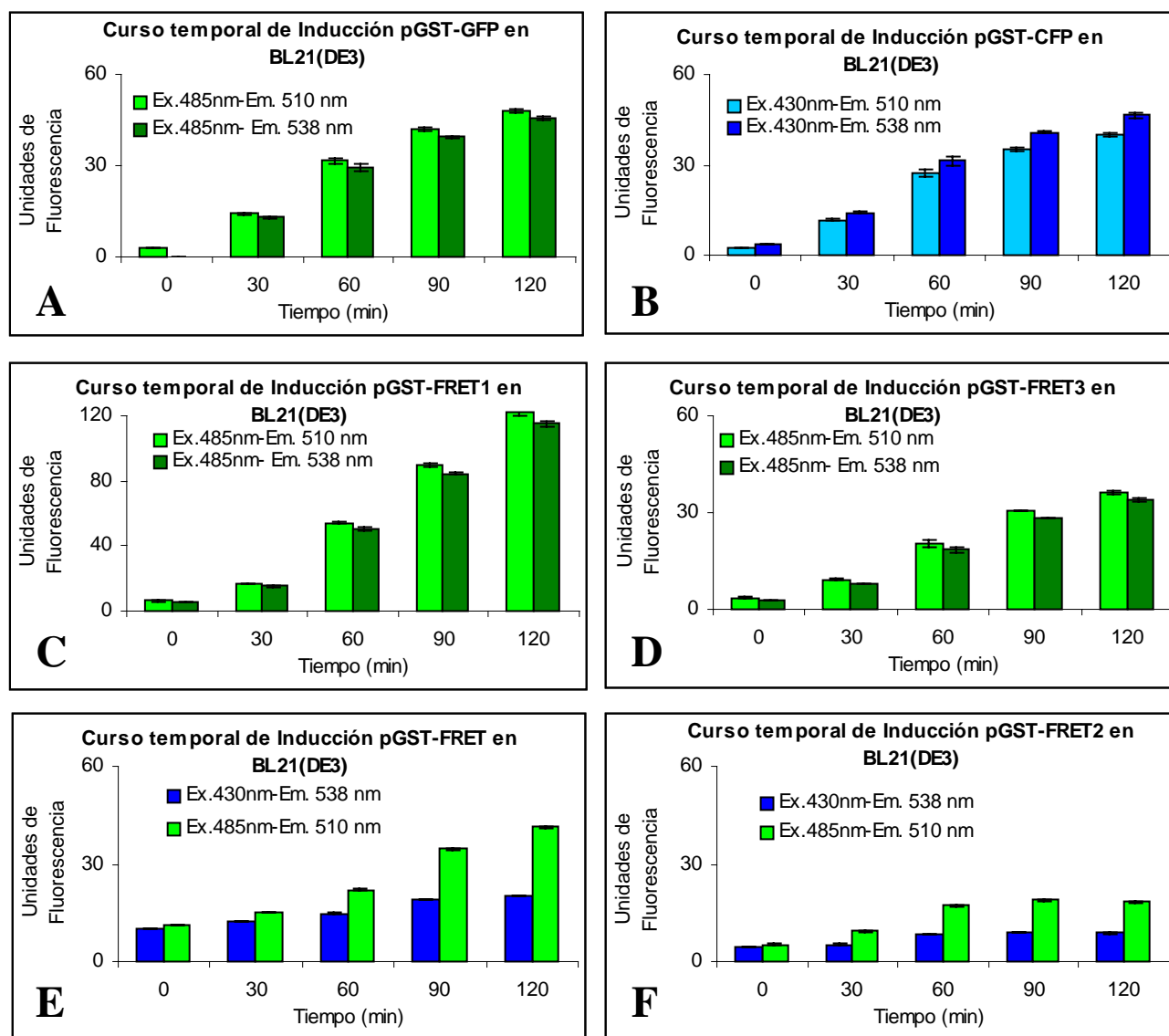


Figura 46. Caracterización de los espectros fluorescentes de las diferentes construcciones generadas en bacterias vivas después de un curso temporal de inducción con IPTG 1mM. construcciones generadas en bacterias vivas después de un curso temporal de inducción con IPTG.

fluorescente verde o cian, estas bacterias se utilizaron para calibrar y compensar la lectura de la fluorescencia en el citómetro de flujo. Al compensar el sistema consideramos que las bacterias que no expresan proteínas fluorescentes (pGST, Figura 47 Panel A) muestran una auto fluorescencia muy baja, alrededor de 1 unidad de fluorescencia, las bacterias que expresan la proteína cian fluorescente pobremente alrededor de 10 (Figura 47 Panel C) mientras que las bacterias que expresan a GFP fluorescen notablemente (10^3) (Figura 47 Panel B y E). Al analizar una mezcla de CFP y GFP (Figura 47 Panel G) se observó que claramente se puede distinguir cada una de las poblaciones bacterianas, lo cual nos permite establecer que la población que expresa las variantes FRET2 del sistema reportero fluorescente [pGST-FRET o pGST-FRET2 (Figura 47 Panel D y F) y las variantes referidas en la literatura (datos no mostrados)] se comportan como un híbrido cian-verde debido a que se observa que los valores de fluorescencia se encuentra justamente entre las poblaciones control. Sobre la base de estos resultados demostramos que la interacción entre las proteínas fluorescentes generó un efecto FRET, debido a que la mezcla de fluoróforos que no interactuaron se separan perfectamente y sus espectros están bien definidos.

Caracterización de los promotores a utilizar en un sistema bacteriano

Para caracterizar el sistema de inducción se utilizó a la GFP como reportero, de manera que en un vector esta proteína se expresó utilizando al promotor lac (pGST-GFP) mientras que en otro vector se expresó a partir de promotor del fago T7 (pRSETA-GFP), con dichos vectores, se transformaron bacterias competentes de las cepas BL21(DE3) y BL21-SI. Las bacterias transformadas se crecieron durante la noche en medio selectivo. Al día siguiente se realizó la inducción con IPTG 1mM y se observó que el promotor lac tiene un buen control sobre la inducción del reportero fluorescente en la cepa BL21(DE3) debido a que la diferencia entre las bacterias inducidas es de un orden de magnitud mayor en intensidad relativa al control sin inducción (Figura 48 Panel A). En esta misma cepa bacteriana no existe diferencia significativa entre el control y las bacterias inducidas cuando se utiliza al promotor del fago T7 para expresar la GFP (Figura 48 Panel B), lo que demuestra que el reportero se expresa de manera constitutiva (no inducible, como lo describe el proveedor). De manera semejante se evaluó la expresión del reportero a partir del promotor de T7 en la cepa BL21-SI. Los resultados muestran que en presencia del agente inductor (NaCl 0.3M) se disminuye la intensidad de fluorescencia del

reportero en un 16% con respecto al control sin inductor, esto indica que de manera constitutiva se expresa el reportero con una mayor intensidad que en los otros dos sistemas, sin embargo, en estas bacterias la presencia de inductor se reprime la expresión del sistema (Figura 48 Panel C).

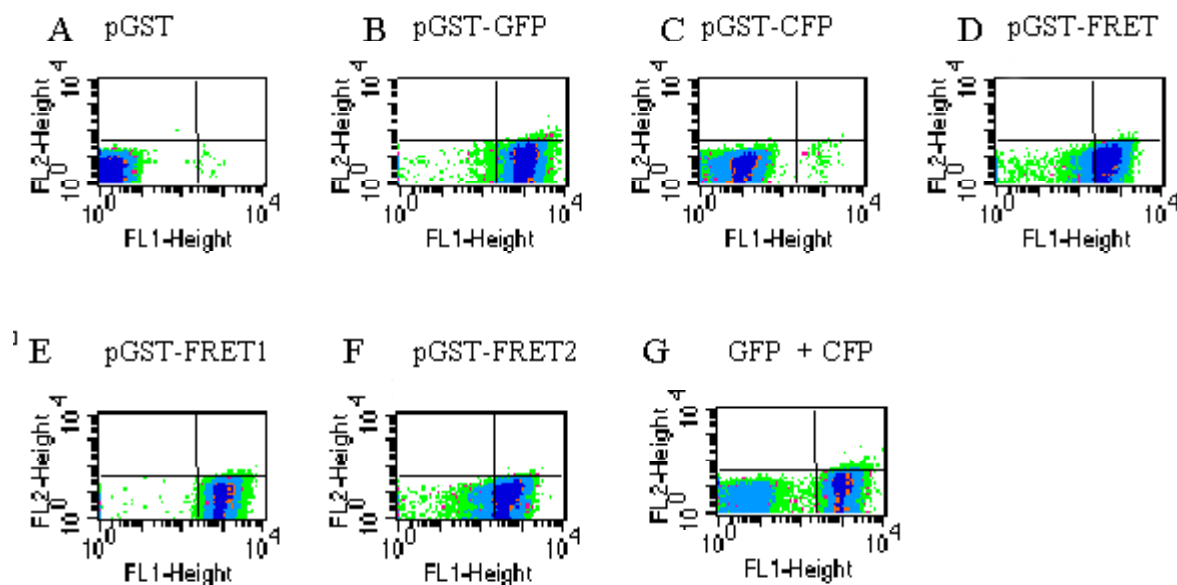


Figura 47 Mapa de puntos (*dot plot*) de la fluorescencia del sistema reportero y sus controles en bacteria vivas transformadas e inducidas.

Inducción de la ribozima en bacterias

Aunque con los experimentos preliminares (Figura 48), se demostraron que en esta cepa bacteriana la expresión de un gen a partir del promotor de la T7 RNA polimerasa no es inducible, quisimos confirmar si la ribozima es capaz de expresarse en bacterias, para lo cual se transformaron bacterias de la cepa BL21(DE3) con el vector que expresa la ribozima activa a partir del promotor de T7 (pCRU6Rz 434). Las bacterias se crecieron durante la noche y al día siguiente se realizó la inducción. Una vez terminada, se purificó el RNA y se procedió a realizar un ensayo de extensión de cebador utilizando el ODN Rz como cebador específico para la porción catalítica de todas las ribozimas. Los resultados muestran la presencia de transcritos correspondientes a la ribozima; sin embargo, la extensión del cebador resultó en tres bandas 65, 81 y 121b en lugar de dar el tamaño esperado de 184b (Figura 49). Estas terminaciones prematuras del cDNA se relacionaron con la estructura secundaria de las ribozimas. La banda de 65b correlacionaron con el inicio de la Rz434, mientras que las bandas de 81 y 121b

correlacionan con el inicio de la estructura de U6 y el vector, respectivamente (Figura 29 y 49). Por otro lado, observamos que al comparar el patrón del RNAm obtenido de las bacterias inducidas con el patrón dado por los controles (RNAm sin cebador, y con un cebador que no hibrida con la ribozima) es diferente justo en las regiones 65, 81 y 121b. La intensidad de las bandas en tiempo máximo de inducción (2hr) no parece correlacionar con la cantidad de transcrito, ya que la cantidad de transcrito es semejante a los intervalos de tiempo analizados (0 y 2hr de inducción), además de que se muestra un patrón de bandeo idéntico. Esto sugirió que existió un escape considerable de transcritos de la ribozima antes de la inducción, lo cual se corrobora con la expresión del reportero GFP de manera constitutiva al utilizar el mismo promotor (Figura 48 Panel B).

Para lograr la expresión del sistema reportero y las ribozimas *in cis*, las ribozimas U6Rz434 y U6Rz434i fueron clonadas después del codon de paro del sistema fluorescente y en sentido. La clonación fue por extremos *EcoRI* digeridas del vector pCR3.1 U6Rz434 o pCRU6Rz434i. Las clonas que codificaban a la ribozima fueron seleccionadas por restricción para verificar la correcta orientación.

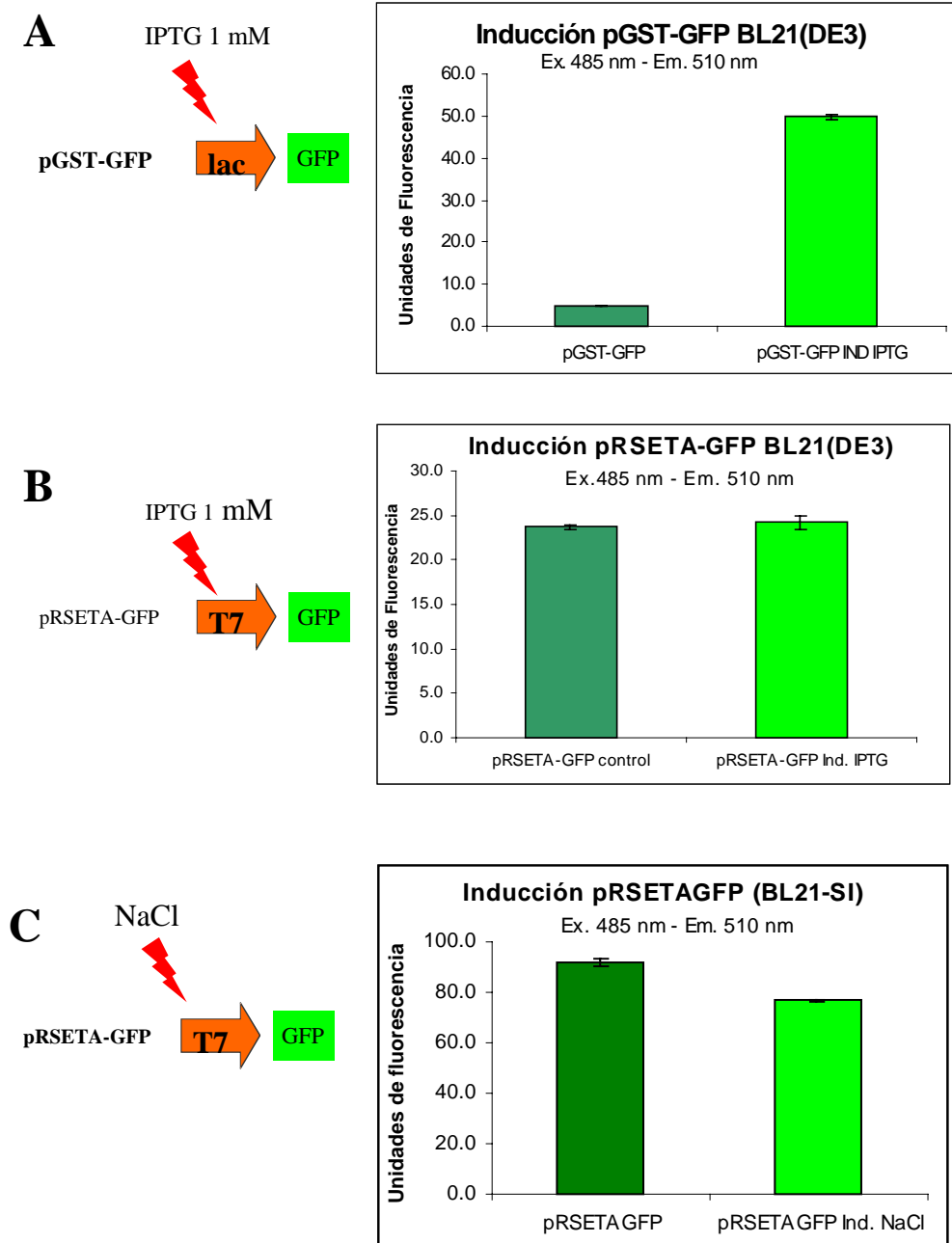


Figura 48. Caracterización de la inducción de la GFP utilizando diferentes inductores, promotores y cenizas bacterianas

Inducción del sistema reportero expresando las ribozimas en *cis*.

Se transformaron bacterias de la cepa *E. coli* BL21(DE 3) con los plásmidos que expresan el sistema reportero con la Rz434 o Rz434i en *cis*. Las bacterias se crecieron durante la noche utilizando medio selectivo, al día siguiente, las bacterias fueron diluidas para ser inducidas con IPTG 1mM.

Los resultados de inducción del sistema en *cis* muestran que no existe diferencia en los niveles de fluorescencia del sistema en ausencia, o presencia de las ribozimas (Figura 49). Esto posiblemente se debió a que en los sistemas procariontes, la transcripción- traducción es casi simultánea; y los transcritos que no son traducidos son degradados rápidamente, por lo que el tiempo en el que ocurrió la interacción entre los transcritos del sistema fluorescente y la ribozima era tan corto que no pudimos observar cambios en el efecto FRET.

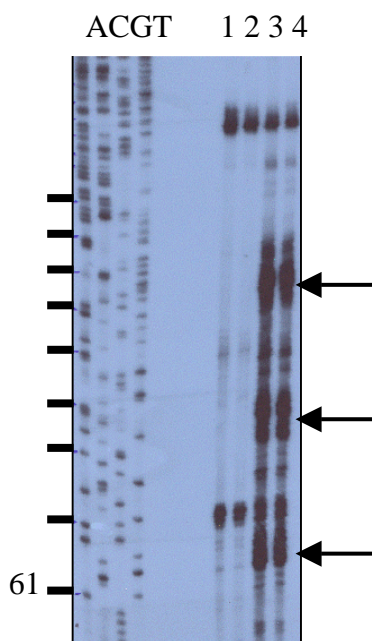


Figura 49. Expresión de la Rz 434 en un sistema bacteriano. En el lado izquierdo de la imagen se observa la secuencia de pUC18, utilizada para determinar el tamaño del cDNA. En el lado derecho, se muestra el ensayo de extensión de cebador. Carril (1) En ausencia de cebador, (2) En presencia de un cebador HPV-16 que no puede hibridar, (3) En presencia del cebador complementario al RNAm obtenido de las bacterias sin inducir (Tiempo 0Hr) y (4) En presencia del cebador complementario al RNAm obtenido de las bacterias inducidas por 2 horas.

Doble inducción del sistema reportero en presencia de las tres diferentes ribozimas.

Para evaluar el efecto de la ribozimas en bacterias BL21-SI, fue necesario transformar en concentraciones equimolares de DNA tanto el sistema reportero como los plásmidos que expresaron las ribozimas activa, inactiva y no específica (pGST-FRET2cían con pCRU6Rz434, pCRU6Rz434i ó pCRU6Rz434m, respectivamente). La utilización de medio con dos antibióticos,

tuvo como objetivo asegurar la presencia de ambos plásmidos en las bacterias transformadas. De manera que la resistencia a ampicilina fue dada por pGST-FRET2, mientras que la resistencia a kanamicina fue dada por los plásmidos que expresan las ribozimas. Las bacterias con ambas resistencias fueron seleccionadas y diluidas para ser inducidas con IPTG 1mM (sistema fluorescente) y NaCl 0.3M (diferentes ribozimas).

Inducción del sistema de manera independiente.

Después de los experimentos iniciales en bacterias BL21-SI transformadas con FRET-2, el sistema empezó a tener problemas de estabilidad ocasionando resultados no reproducibles. En consecuencia, se realizaron nuevas transformaciones en BL21-SI, sin embargo, las bacterias transformadas empezaron a lisarse al crecerlas en medio líquido, tomando una apariencia viscosa. La compañía responsable de la cepa bacteriana comentó que otros grupos de investigación tenían problemas semejantes a los nuestros con esta cepa, por lo que al esperar un reemplazo a corto tiempo fue imposible ya que se nos informó que se encontraba descontinuadas. En vista de que se trataba de un problema terminal, se decidió reemplazar la cepa bacteriana BL21-SI por *E. coli* BL21(DE3) y realizar los experimentos necesarios.

A diferencia del agente inductor (NaCl 0.3M) utilizado para la cepa BL21-SI, el inductor en la cepa BL21(DE3) es IPTG 1mM y este agente control tanto al promotor de *lac* como al promotor del fago T7, de esta manera la plasticidad del sistema se disminuyó al utilizar esta cepa bacteriana [BL21(DE3)] debido a que fue posible controlar de manera independiente los productos clonados después del promotor de *lac* y del promotor de T7; lo que modificó considerablemente la estrategia experimental planteada al inicio del proyecto. De manera que solo logramos la expresión de la ribozima y del sistema reportero de manera simultanea (Figura 50).

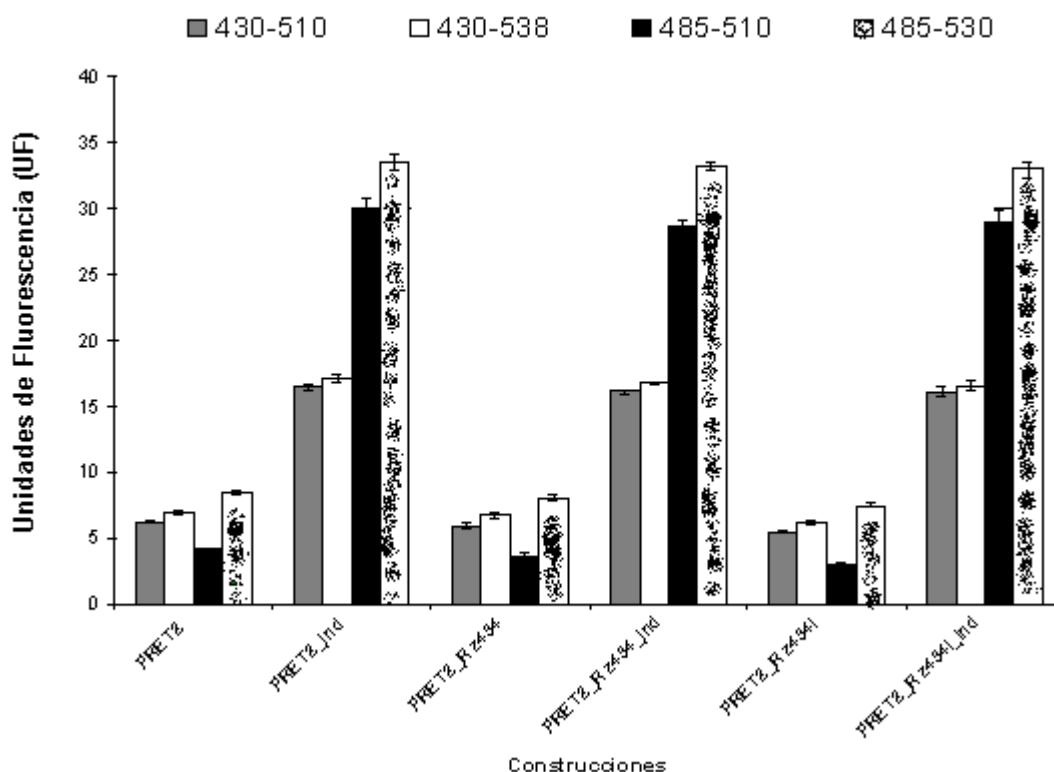


Figura 50. Inducción del sistema fluorescente de las Rz en *cis*

Inducción simultánea del sistema reportero y las ribozimas en *trans*

Al transformar e inducir ambos sistemas en las BL21(DE3), se observó que la co-inducción de los dos plásmidos en estas bacterias resultó en mínima fluorescencia (Figura 51 Paneles B, C y D). Sin embargo, en el control con sólo el reportero pFRET2 (Figura 51 Panel A) se mantienen niveles altos de fluorescencia obtenidos anteriormente sugiriendo un problema en la co-expresión de los plásmidos pGST-FRET2 y los derivados de pCR3.1 dentro de BL21(DE3).

En un intento de averiguar que era lo que estaba pasando, obtuvimos DNA de las bacterias inducidas, y corroborar la presencia de los dos plásmidos. El DNA obtenido fue digerido con una enzima de restricción que lineariza ambos plásmidos (FRET + Rz se utilizó *Bam*HI y para FRET2+ Rz se utilizó *Pst*I) (Figura 52), de manera que si estaban presentes, esperaríamos ver dos bandas. Los resultados de esta digestión mostraron una sola banda, en lugar de dos bandas esperadas, respectivas a cada plásmido. El plásmido ausente es el que expresaba al

sistema reportero (dado que la fluorescencia disminuye). El plásmido que expresa la ribozima originalmente confería resistencia tanto a ampicilina como a kanamicina, y si recordamos eliminamos un fragmento de 800pb del gen de β -lactamasa. Sin embargo, de manera inesperada al forzar la selección de bacterias resistentes a ambos antibióticos provocamos una recombinación entre las secuencias homologas del gen de β -lactamasa expresado en pGST-FRET2 y el remanente de este mismo gen en pCR3.1U6Rz434. De manera que por complementación y recombinación se restauró la resistencia a ambos antibióticos en el plásmido pCR3.1U6Rz434. Con lo que en las bacterias analizadas solamente expresaron este plásmido (la ribozima) mientras que quedó eliminando el vector que expresaba el sistema fluorescente.

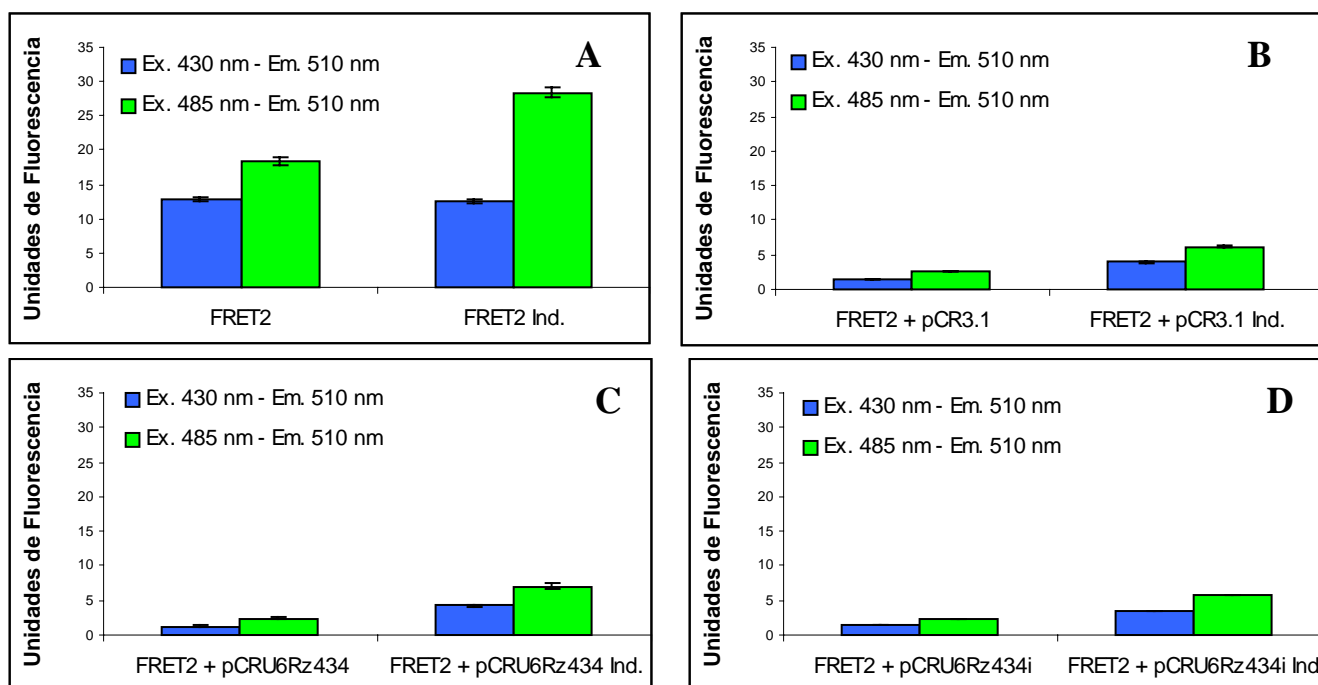


Figura 51. Inducción del sistema reportero con los siguientes vectores. pCR3.1, pCRU6Rz434+kan, pCRU6Rz434i+kan

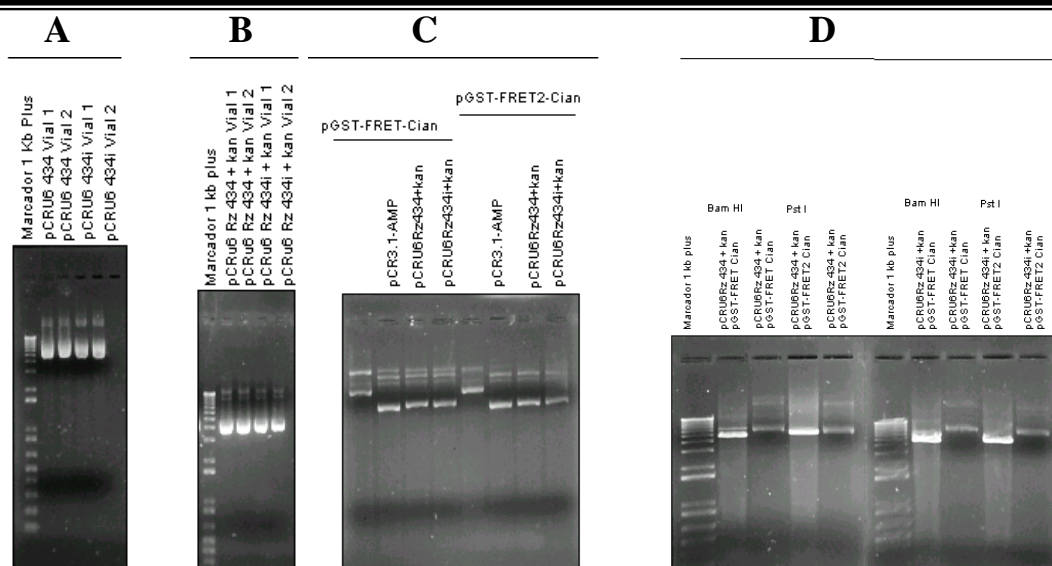


Figura 52. Geles de agarosa al 1%. (A) Miniprep de pCRU6Rz434 y pCRU6Rz434i. (B) Miniprep de pCRU6Rz434 + kan y pCRU6Rz434i +kan. (C) Miniprep de bacterias transformadas con concentración equimolar de DNA de pCR3.1, pCRU6Rz434+kan o pCRU6Rz434i y del sistema reportero pGST-FRET-Cían o pGST-FRET2-Cian. (D) Ensayo de restricción de las bacterias transformadas con concentraciones equimolares de DNA, linearizados (FRET + Rz con *Bam* HI; FRET2 + Rz con *Pst* I).

Inducción del sistema reportero expresando la segunda generación de ribozimas en *trans*

En vista de los problemas de recombinación entre los plásmidos derivados de pCR3.1 y pGST, decidimos cambiar el vector que expresaba la ribozima. Para esto se eligió el vector pACYC184, en donde las ribozimas se clonó por amplificación de los vectores pCRU6Rz434 o pCRU6Rz434i. El vector pACYC184, cuyo origen de replicación (p15A) es diferente al del sistema reportero (colE1). El tener diferentes orígenes de replicación en cada vector nos permitió que coexistan. La manera de asegurar la presencia de ambos plásmidos y su expresión fue mediante selección con los antibióticos cloranfenicol y ampicilina en donde el vector pACYC183 confiere resistencia a cloranfenicol, mientras que el vector pGST confiere resistencia a ampicilina.

Para asegurarnos de la coexistencia de los plásmidos, se transformaron bacterias BL21(DE3) con concentraciones equimolares. Después de un crecimiento por 16hrs. En medio selectivo, se analizó el contenido plasmídico de las bacterias, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Brevemente se linearizó el DNA de los plásmido con *Xba*I. Las muestras fueron

analizadas en un gel de agarosa al 1% en donde se observaron 2 bandas correspondientes a los plásmidos linearizados [pGST-FRET2 Cían (6512pb), pACYCU6Rz434 (4475pb) y pACYC184 (4245pb)] (Figura 53).

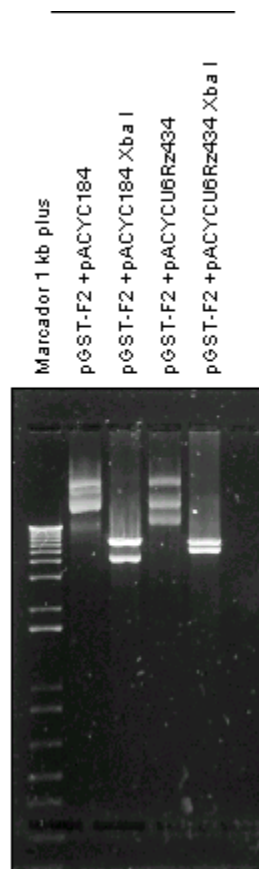


Figura 53. Co-existencia de plásmidos pACYC184 o pACYCU6Rz434 con pGST-FRET2 en bacterias BL21(DE3). El pDNA fue digerido con la enzima *Xba* I y analizado en un Gel de Agarosa 1 % en TBE 1x.

Inducción simultánea del sistema reportero en presencia de las ribozimas en *trans*.

Para evaluar el efecto de la ribozimas en bacterias BL21-(DE3), fue necesario transformar en concentraciones de DNA equimolares tanto el sistema reportero como los plásmidos que expresan las ribozimas y utilizando medio selectivo con ambos antibióticos (ampicilina (100µg/ml y cloranfenicol 35µg/ml). Después de la incubación durante 16 horas a 37°C en agitación, se observó que el crecimiento durante las primeras horas de incubación fue muy pobre y al ser el cloranfenicol un agente bacteriostático y cuyo mecanismo de acción es la inhibición en la síntesis de proteínas, fue necesario modificar la concentración de antibióticos a usar. Después de realizar varios ensayos modificando la dosis de uno o ambos antibióticos se determinó que el

disminuir ambos antibióticos a la mitad de la concentración descrita, el número de bacterias aumentaba de manera exponencial durante las primeras dos horas de crecimiento (datos no mostrados).

Una vez estandarizada la concentración adecuada de antibióticos, los cultivos de 16 horas fueron diluidos en una relación 1:16 en medio selectivo (ampicilina 25µg/ml y cloranfenicol 8.5µg/ml), e incubados durante 2hr a 30°C en agitación, pasada la incubación se tomó una alícuota de 3ml de bacterias crecidas y de esta se realizó una miniprep para evaluar la coexistencia de los plásmidos. El DNA plasmídico fue linearizado con una enzima de restricción (*Xba*I) que realizó un solo corte en cada plásmido (sistema reportero pGST-FRET2-Cian y pACYCU6Rz434), lo cual nos permitiría determinar la presencia de ambos; es decir que mantuvieran el tamaño correspondiente así como la relación molar en la que se encuentran. En esta ocasión lo que observamos es que ambos plásmidos se encuentran presentes (Figura 53) y los tamaños de cada uno son los esperados [pGST-FRET2 Cian (6512pb), pACYCU6Rz434 (4475pb) y pACYC184 (4245pb)].

Mientras se analizaba el DNA del plásmido, se continuó con el protocolo de inducción, el cual consistió en la inducción de la expresión de los productos quiméricos por la adición de IPTG a una concentración final de 1mM, nuevamente se incubaron 2hr en las condiciones antes descritas. Al finalizar la inducción, se cuantificó el número de bacterias por ml de medio midiendo la absorbancia a 550nm. Una vez determinada la concentración de bacterias por mililitro, se decidió analizar 3×10^6 células. En este caso se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia de la proteína en el espectro característico de la GFP, mientras que en el caso en el sistema que expresa la Rz inactiva se observa una menor intensidad (Figura 54).

En vista de que el sistema permitió evaluar la actividad de ribozimas, y para estos momentos se había recibido el plásmido comercial que expresara la proteína amarilla fluorescente, se evaluó la combinación GFP-YFP, lo que nos dio una tercera generación del sistema fluorescente y ésta sería evaluada utilizando molécula antisentido.

Comparación de la eficiencia de FRET entre generaciones de sistema reportero.

Para determinar cual de los prototipos de sistema reportero era el r

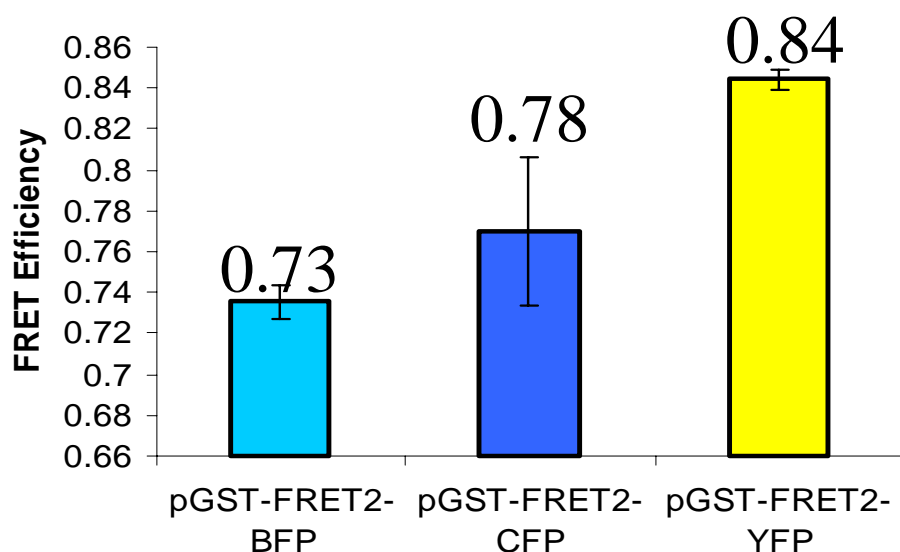
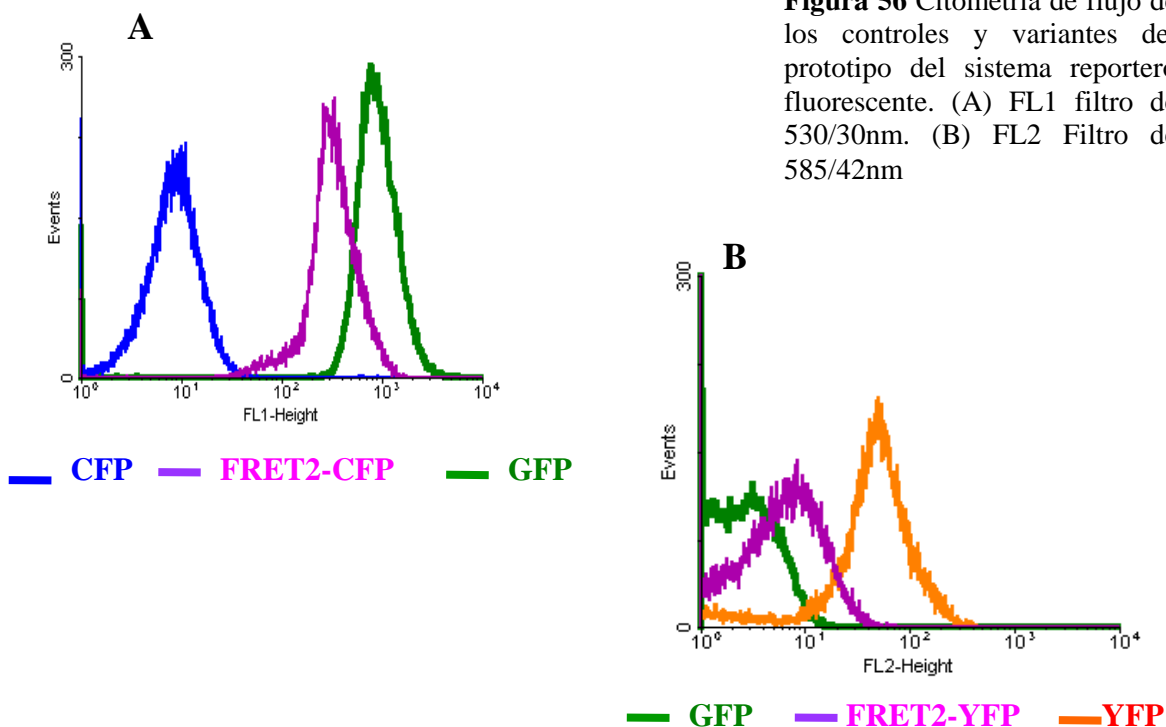


Figura 55. Determinación de la Eficiencia de FRET entre las tres generaciones del prototipo del sistema reportero fluorescente.

comparar la eficiencia de FRET (Figura 55) entre las combinaciones GFP-BFP, GFP-CFP y GFP-YFP, en donde se observó que la mayor eficiencia de FRET se presentó al utilizar la combinación GFP-YFP.

Utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur, cuya óptica de excitación se basa en el uso de un láser de argón con longitud de onda de 488nm, para evaluar la emisión del sistema fluorescente GFP-CFP se utilizó un filtro de 530/30nm, mientras que para evaluar la emisión del sistema GFP-YFP se utilizó un filtro 585/42nm. Bajo estas condiciones se analizó la fluorescencia emitida en una población de bacterias transformadas e inducidas expresando tanto los controles (GFP, YFP y CFP); como el sistema fluorescente (FRET2 YFP y FRET2 CFP).



Los controles que expresan únicamente a la proteína fluorescente verde, cian o amarilla se utilizaron para calibrar y compensar la lectura. En este análisis se observa que las poblaciones quiméricas (tanto FRET2-CFP como FRET2-YFP) se presentan en medio de las poblaciones control (Figura 56), verificando el comportamiento espectral del prototipo quimérico.

Administración de los Antisentidos

En vista de que los métodos descritos en la literatura para la administración de moléculas antisentidos estaban fuera de nuestro alcance, por el equipo y la complejidad de los protocolos, decidimos implementar un sistema utilizando CaCl_2 . Como no se ha reportado dicho tratamiento para la administración de moléculas antisentidos a bacterias, decidimos evaluar la administración de dichas moléculas en bacterias previamente tratadas con CaCl_2 , para lo cual utilizamos ODNs marcados con fluoresceína. La incorporación del ODN fluoresceinado fue monitoreado mediante citometría de flujo, de manera que las bacterias que fluorescen son aquellas que incorporaron la molécula antisentido marcada. De manera que al analizar los resultados observamos (Figura 57) que al administrar el antisentido a una concentración de ODN $1\mu\text{M}$ se incrementa la intensidad de fluorescencia en la región M2 en un 62%.

Una vez que se demostró que el protocolo propuesto como método efectivo de administración, se decidió evaluar la actividad de AntiE6 y el control en bacterias vivas que expresaran el sistema fluorescente.

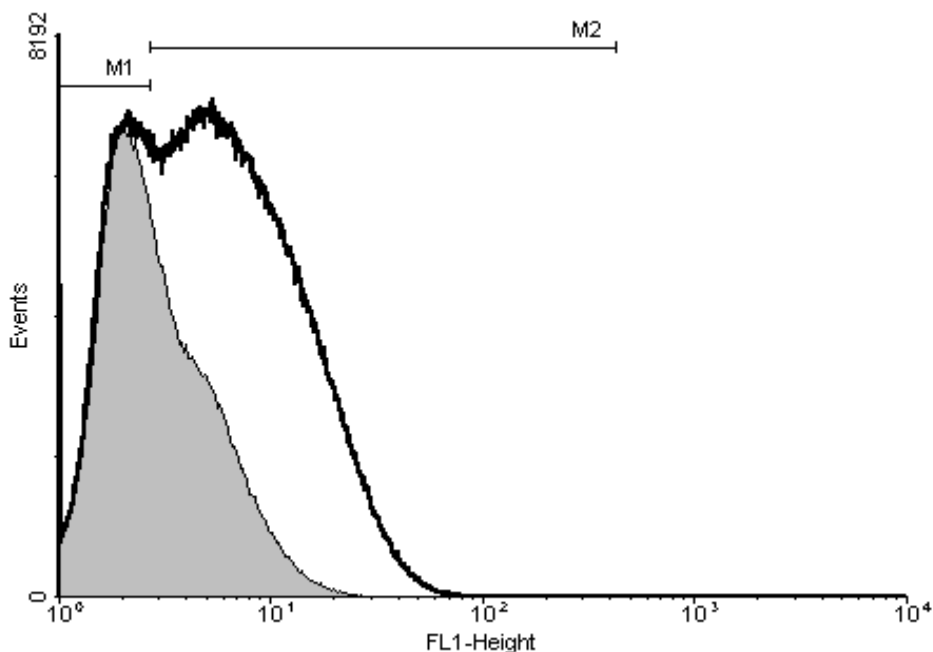


Figura 57. Administración de antisentidos marcados con fluoresceína en bacterias vivas.

Inhibición del efecto FRET por la administración del ODN AntiE6 en bacterias vivas

Para determinar si el sistema reportero GFP-YFP permitía evaluar la actividad de moléculas antisentido, se utilizaron bacterias que expresaron de manera estable al sistema reportero pGST-FRET2 YFP, y los controles necesarios (pGST-GFP y pGST-YFP). Estas se caracterizaron por cuadruplicado, y todas mostraron las mismas características espectrales. Se hizo una mezcla de todas las clonas y estas se prepararon con CaCl₂ para la administración de dos concentraciones (0.1 y 1μM) de los fosforotioatos AntiE6 y M7. Se crecieron durante 2hr y se administró el agente inductor IPTG 1mM, y se incubaron nuevamente a 30°C durante 2hr en agitación, una vez terminado el tiempo, se lavaron tres veces con PBS y las muestras se analizaron por triplicado en un fluoroespectroscopio. Los resultados mostraron que en presencia del ODN AntiE6 se disminuyó la eficiencia de FRET, mientras que en el control con M7 y en ausencia de ODN no existió una diferencia significativa en la eficiencia de FRET. En este

resultado es importante notar que la inhibición del efecto FRET correlacionó con la dosis, de manera que a mayor concentración de AntiE6, mayor inhibición del efecto FRET (Figura 58). Por otro lado también se decidió evaluar si los cambios en la eficiencia de FRET se relacionaban con el corte del mensajero, por lo que se evaluó el efecto de AntiE6 de forma convencional. En este análisis se observó que efectivamente el efecto de AntiE6 a nivel del RNAm del sistema fluorescente se traduce en la generación de un producto proteico que corresponde a la GFP (Figura 59).

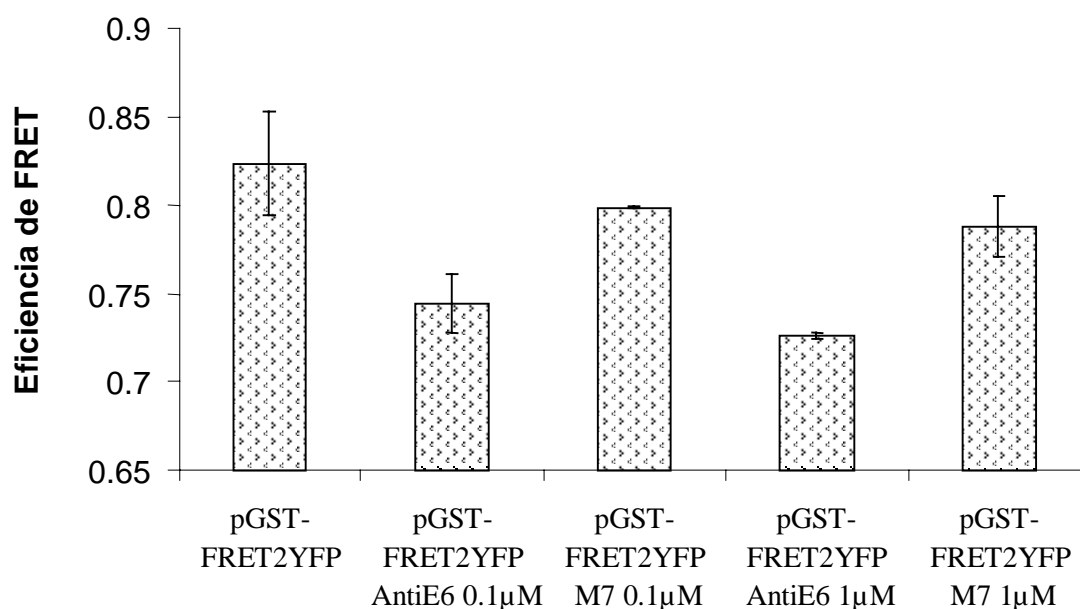


Figura 58. Evaluación de la eficiencia del efecto FRET en bacterias vivas tratadas con los antisentidos AntiE6, y M7.

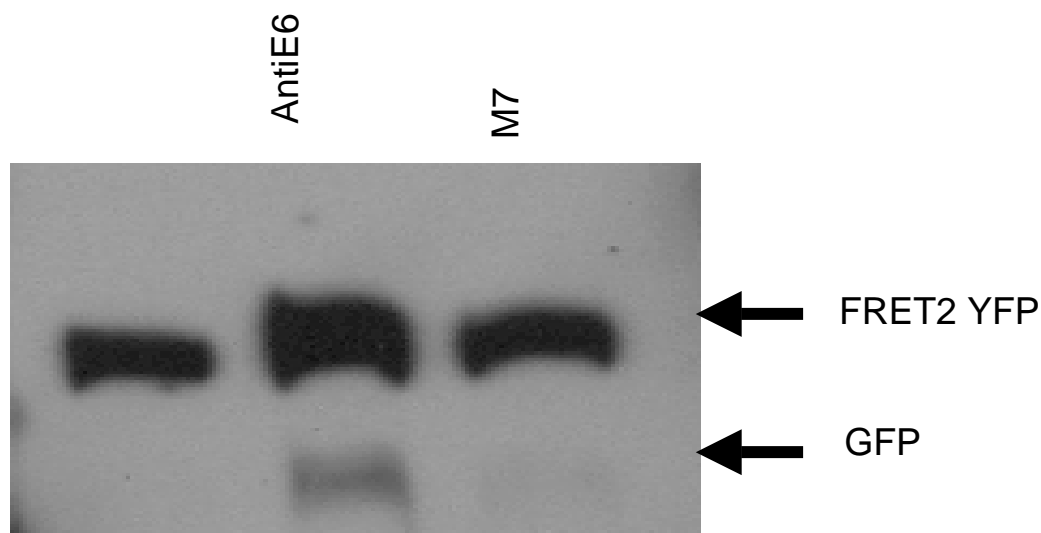


Figura 59. Evaluación a nivel traduccional del sistema reportero FRET en extractos de bacterias tratadas con los antisentidos AntiE6 y M7.

Expresión y caracterización del sistema reportero fluorescente en célula tumorales humanas.

Se transfectaron células de la línea C-33A con los vectores de expresión pCR3.1GFP, pCR3.1CFP, pCR3.1FRET1Cian, pCR3.1FRET2Cian y pCR3.1FRET2Cian, las células fueron seleccionadas por un mes con geneticina, las células resultantes resistentes se cosecharon y crecieron en portaobjetos por 1 día, y se tomaron fotografías con un microscopio óptico de fluorescencia. En estas fotografías se observa la fluorescencia de las células transfectadas con los diferentes vectores fluorescentes (Figura 60).

Una vez que demostramos que las línea expresaban del sistema reportero de manera estable y estas células eran fluorescentes, lo siguiente fue caracterizarlas fluoroespectroscópicamente, para lo cual las células en cultivo se cosecharon y se lavaron tres veces con PBS, y se analizaron por triplicado utilizando un espectrofluorómetro, al analizar los espectros de cada vector de expresión observamos un comportamiento semejante al observado previamente en los experimento en bacterias vivas, es decir un efecto de opacamiento en fluorescencia de las células que expresan las construcciones FRET y FRET2, sin embargo,

observamos que en FRET2 el incremento en la emisión a 510nm es notable en comparación con la construcción homóloga FRET (Figura 61).

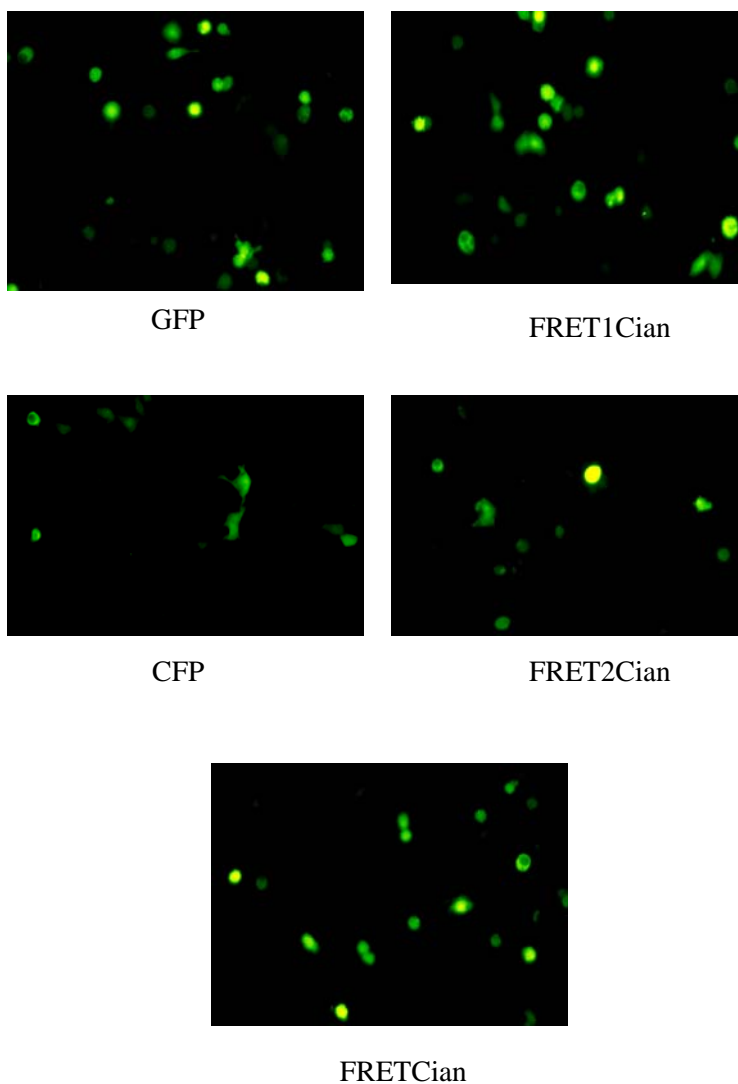


Figura 60. Fotografías de la línea celular C-33A transfectadas con los vectores pCR3.1 GFP, pCR3.1 CFP, pCR3.1 FRET Cían, pCR3.1 FRET1 Cían y pCR3.1 FRET2 Cían, con un aumento en el objetivo de 10 X utilizando un filtro verde.

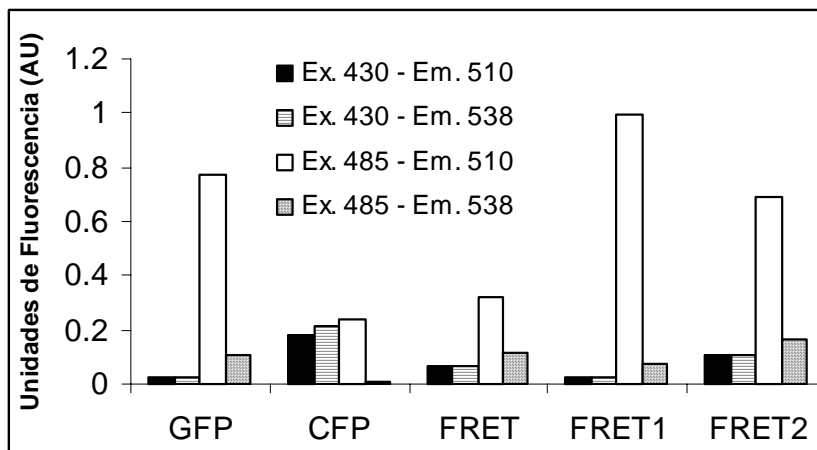


Figura 61. Espectro fluorescente de células C33 transfectadas con los vectores de expresión pCR3.1GFP, pCR3.1 CFP, pCR3.1FRET, pCR3.1 FRET1 y pCR3.1 FRET2, utilizando diferentes longitudes de onda de excitación (430 y 485nm) y emisión (510 y 538nm)

Para corroborar los resultados del espectrofluorómetro, las células transfectadas se analizaron por citometría de flujo; durante este análisis las células control C-33A se utilizaron para calibrar la autofluorescencia de las células. En estos resultados se observa el láser cuya longitud de onda de excitación es 488nm, excita ligeramente las células transfectadas con el vector pCR3.1CFP, mientras que la intensidad de emisión en las células transfectadas con el vector pCR3.1GFP es mucho mayor. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia del sistema reportero FRET-Cían, es muy semejante a la de las células que expresan la proteína GFP (Figura 62).

Administración de antisentidos fluorescentes en células C33-A

Para evaluar la capacidad de penetración de las moléculas antisentido a las células en cultivo, fue necesario crecer las células a un 80% de confluencia, las células se pasaron a placas de 6 pozos, y en cada pozo se sembraron 5×10^4 células, se crecieron por la noche y al día siguiente se le administraron los antisentidos 419 y 419M (marcados con fluoresceína) al medio a una concentración de $1 \mu\text{M}$. Se incubaron durante la noche. Al día siguiente se fijaron las células en etanol al 80% por 24 horas y se analizó la penetración del antisentido fluoresceinado por citometría de flujo. Se analizó un total de 10^4 células y se observó que los antisentidos 419M y 419 fluoresceinados penetran en un 99% de las células (99.34 y 99.73%, respectivamente) (Figura 63).

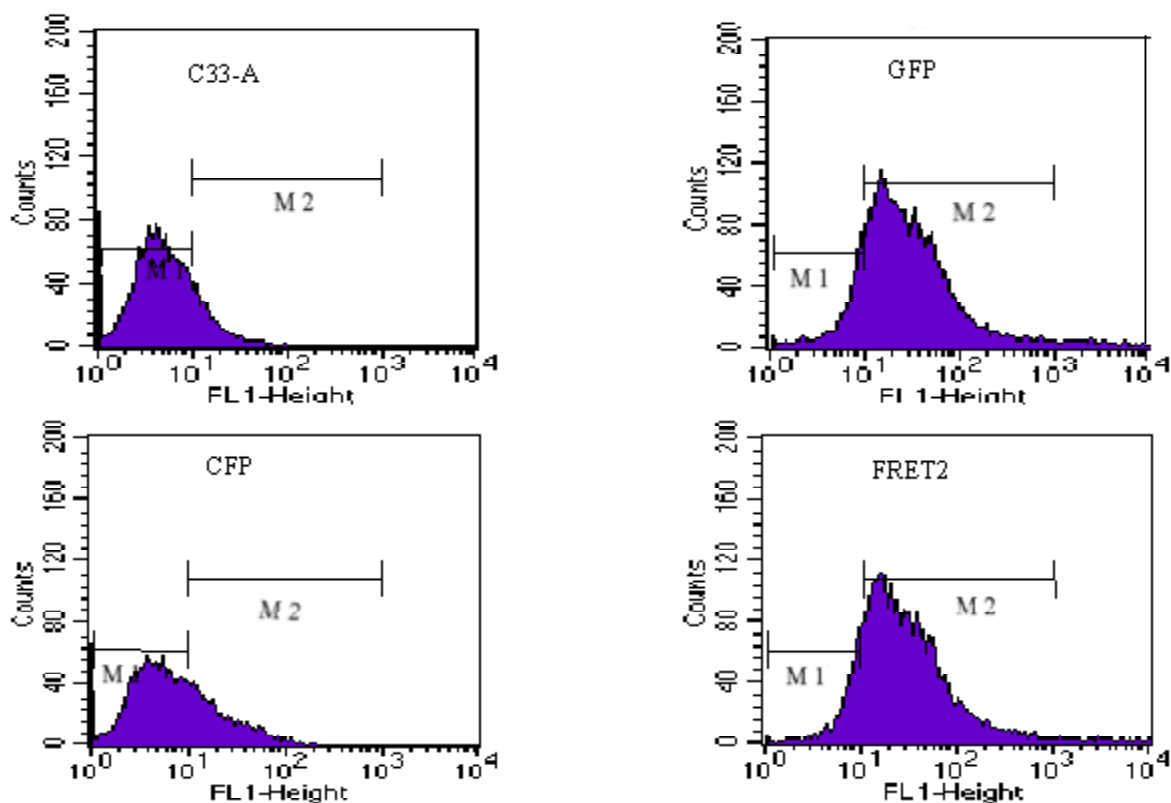


Figura 62. Caracterización de los vectores de expresión pCR3.1GFP, pCR3.1CFP y pCR3.1FRET2-Cian en células C-33A

Efecto de AntiE6 y 419 en la línea celular C33-A transfectada con el sistema reportero

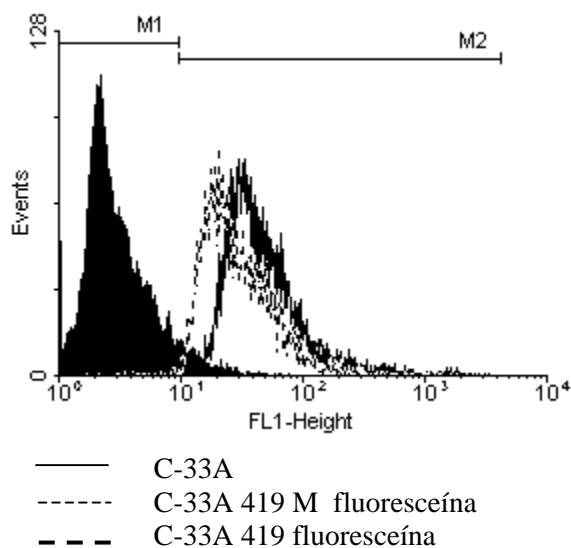


Figura 63. Análisis de la incorporación del ODN fluoresceinado en las células C-33A

FRET2 Cían

Para evaluar el efecto del sistema fluorescente FRET2-Cían en la línea celular C-33A se transfectaron células con los vectores pCR3.1 GFP, pCR3.1 CFP y pCR3.1FRET2 Cían. Las células se crecieron por dos días antes de la administración de los ODNs M7 y AntiE6 (1 μ M) y las células se cosecharon dos días después del tratamiento.

El efecto del tratamiento con antisentidos se evaluó por citometría de flujo, en donde se evaluó el porcentaje de la población fluorescente y la intensidad de la fluorescencia. Para evaluar el efecto de los antisentidos se delimitaron 2 regiones: 1) región que incluye el 80 % de las células C-33A (autofluorescencia) y las células que expresan la CFP, las cuales muestran una emisión muy pobre. 2) Región en donde se observó la emisión de las células que expresan GFP. Al analizar la región 1 se observó el 80% de la población de C-33A y CFP; el 60 % de la población que expresa GFP y FRET-2 Cían tratada con el ODN M7 y el 52% de la población que expresa FRET-2Cían tratada con los ODNs AntiE6 y 419. En esta misma región observamos que no existe diferencia en la intensidad de fluorescencia entre las células control, CFP, GFP y las tratadas con los diferentes antisentidos que expresan FRET2-Cían; en general lo que se observó es que la intensidad de fluorescencia era muy poca (Figura 64, Panel superior).

En la región 2, solamente se observó el 20% de la población de C-33A así como las que expresan CFP, el 40% de la población de las células que expresaron GFP y el sistema reportero FRET2-Cían tratadas con el antisentido M7 , mientras que el 45% de la población de las células que expresan FRET2-Cían tratadas con AntiE6 y el ODN 419, por lo que se observa un 5 % de incremento en la población por efecto del tratamiento con AntiE6 y con 419, y en estas mismas células se observa un incremento en la intensidad de emisión (Figura 64, Panel Inferior).

Comparación entre los antisentidos 419 y AntiE6

Una vez que se observó que existía un incremento en la población y un aumento en la intensidad de fluorescencia por efecto de la actividad de los 419 y AntiE6 en el sistema reportero FRET2-Cían, se decidió evaluar la actividad de los antisentidos de manera cuantitativa. En donde encontramos un incremento de 6% en la intensidad de fluorescencia de FRET2Cían en presencia del ODN 419.

En vista de que los antisentidos funcionaron adecuadamente es decir inhibieron el efecto FRET del sistema reportero decidimos evaluar la actividad de ribozimas.

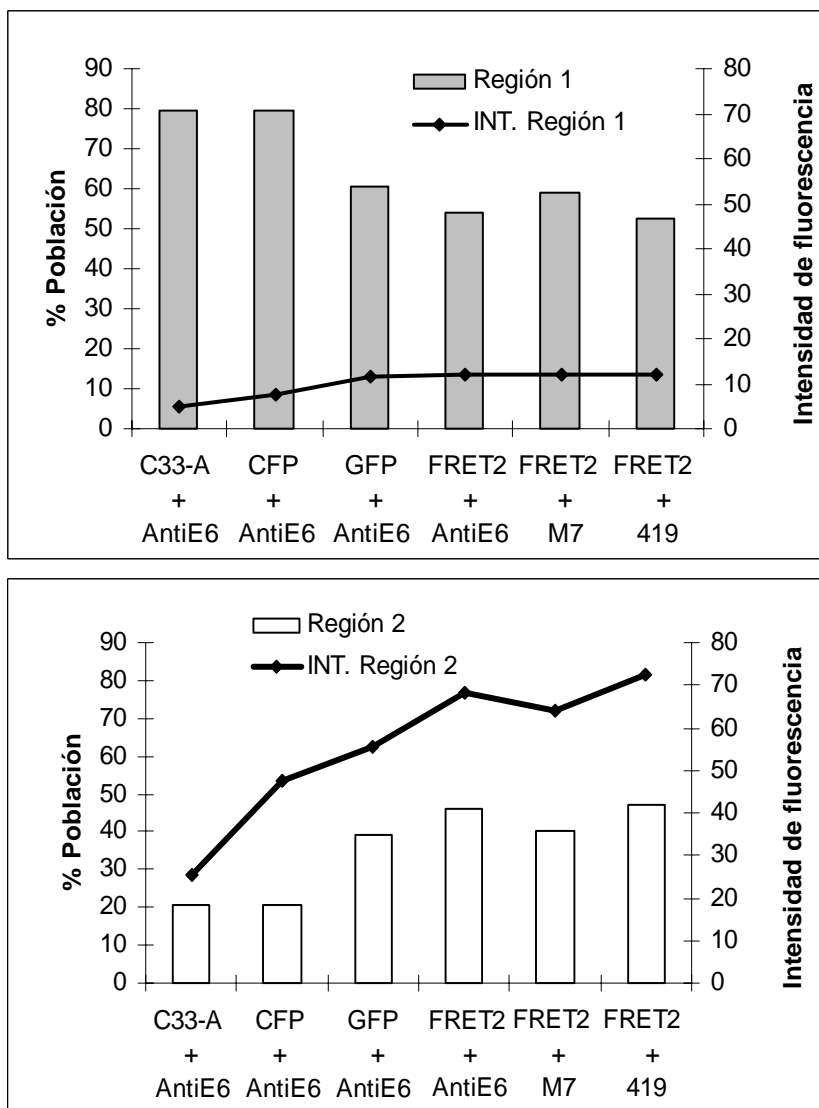


Figura 64. Evaluación del efecto del ODN AntiE6 y del 419 sobre la fluorescencia del sistema reportero.

Panel Superior. Análisis de la región 1.

Panel Inferior. Análisis de la región 2.

En ambas gráficas las barras indican en porcentaje de la población y con una línea se indica la intensidad de la fluorescencia.

Evaluación de la actividad de ribozimas

Para la determinar la actividad de las ribozimas en el sistema reportero, se realizó una doble transfección transitoria utilizando 5 μ g de cada vector. Como control del sistema se cotransformó el vector pCR3.1 FRET Cían con pCR3.1 (vector vacío), pCRU6Rz434TL (Rz activa) o con pCR3.1U6Rz434iTL (Rz inactiva). Este grupo de experimentos nos permitió demostrar que la coexpresión del sistema fluorescente y el vector que expresa la ribozima no afectan la fluorescencia del sistema.

El vector pCR3.1FRET2-Cían se cotransfectó en compañía de pCR3.1, pCRU6Rz434TL o pCRU6Rz 434iTL. En este ensayo (Figura 65) se observó que no existe una diferencia significativa en la fluorescencia del sistema reportero en presencia de la Rz434 o de la Rz434i.

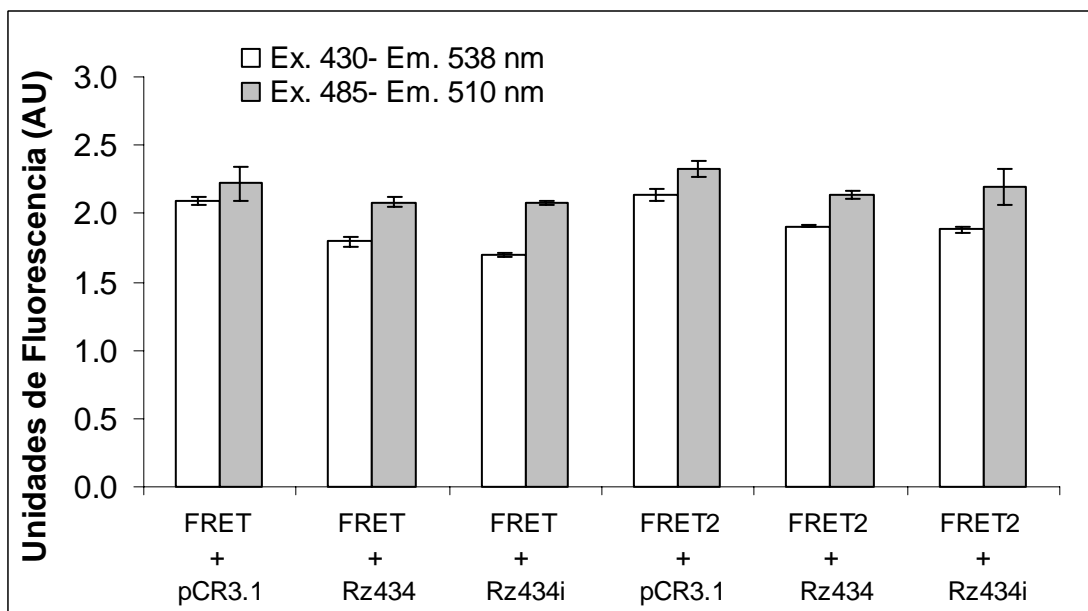


Figura 65. Evaluación de la actividad de diferentes ribozimas en células C33-A que expresan el sistema reportero fluorescente FRET Cían y FRET2 Cían.

Discusión

El sistema FRET para evaluar la actividad de moléculas antisentido resulta ser novedoso, siendo el único sistema *in vivo* disponible cuyos resultados se pueden obtener en tiempo real, de manera simple muy con alta sensibilidad y bajo costo. Aunque el efecto FRET se describió hace más de dos décadas, su aplicación inicial con GFP de *A. victoria* había sido poco utilizada. Sin embargo, esta tecnología ha incrementado notablemente su uso por la aparición de las variantes derivadas de GFP como son las proteínas: azul, cían (38) y amarilla (7), además de las variantes rojas provenientes del coral *Discosoma sp.* (49). Esto ha permitido un número considerable de combinaciones, además permite rastrear diferentes moléculas marcadas con fluoróforos diferentes, dando un espectro fluorescente característico.

El desarrollo de moléculas antisentido con finalidad terapéutica requiere de una gran cantidad de pasos, incluyendo la selección del mensajero, la accesibilidad, la longitud del antisentido, la inducción de la actividad de RNasaH, la incorporación intracelular del antisentido y corte *in vivo* del mensajero (10). Aunque se han desarrollado modelos matemáticos para predecir la accesibilidad de un blanco, la mayor parte de los antisentidos son diseñados por métodos empíricos. Uno de los problemas más comunes y persistentes en el desarrollo de antisentidos terapéuticos son las diferencias en la potencia del antisentido dada por la variabilidad biológica, la cual comúnmente se observa en un grupo de antisentidos dirigidos contra un RNAm blanco característico. Este fenómeno se reporta para la mayor parte de los RNAm blanco de moléculas terapéuticas: antisentidos (12), ribozimas sintéticas (44), pequeños RNA de interferencia (39) y moléculas de RNA expresadas a partir de vectores artificiales de DNA. Además se han reportado cambios notables en la actividad al recorrerse una base del antisentido en relación al blanco (56). Por esta razón el desarrollo y utilización de sistemas reporteros es de gran importancia, permitiendo una rápida y efectiva evaluación de las moléculas antisentidos *in vivo*. Nuestra aproximación a la utilización de la tecnología FRET se basa en la transferencia de energía de un fluoróforo excitado a un fluoróforo aceptor, permitiendo el monitoreo *in vivo* de los cambios en la interacción de las proteínas en tiempo real (52). La principal ventaja de utilizar como fluoróforos las variantes de GFP en un sistema FRET, es la posibilidad de realizar experimentos en células vivas.

Debido a que el efecto FRET sólo requiere de una pequeña concentración de los fluoróforos que interactúan, se pueden medir rápidamente la distancia o cambios en la distancia de un complejo de moléculas en solución. Sin embargo, en contraste con los sistemas reporteros que utilizan una simple inhibición de GFP, la disrupción del efecto FRET entre variantes de GFP se puede detectar y diferenciar de los niveles basales y así proveer resultados cuantitativos. El sistema FRET reportado en este trabajo (FRET2) permitió detectar la actividad de moléculas antisentido en tiempo real *in vivo*.

El sistema FRET2 involucra la resonancia de la fluorescencia entre GFP y una de tres variantes espectrales de GFP (azul, cian y amarilla) unidas por una secuencia que codifica para los nucleótidos 410-445 del gen E6 de HPV-16. La región de unión entre los fluoróforos es una región previamente descrita y que es blanco para los antisentidos dirigidos contra el HPV-16 (9). La interacción del antisentido con el transcrito quimérico que codifica para FRET2 resultó en la inducción de RNasaH y como consecuencia del corte se observó una inhibición del efecto de FRET con lo que se restauraron las características espectrales de GFP.

En los experimentos involucrando la fusión de proteínas, la sobre expresión de las proteínas recombinantes podría resultar en una interacción no específica entre el donador y el aceptor. La proteína GFP purificada ha mostrado que tiene la capacidad de formar dímeros a concentraciones extremadamente altas ($>0.4\mu\text{mol/L}$) *in vitro* (38). En nuestro sistema reportero, no se observó un efecto FRET relacionado a la interacción no específica entre las proteínas fluorescentes. Aún en los casos de sobreexpresión, no observamos variaciones en las características fluoroespectroscópicas de GFP y CFP en bacterias expresando ambas proteínas, incluso al evaluarlas por citometría de flujo, observamos que las poblaciones se separan característicamente. Otro punto de importante consideración es la interacción no-fisiológica entre las proteínas recombinantes (9). Aunque esta posibilidad no puede ser totalmente controlada, se tomaron los cuidados y pasos necesarios para minimizar la probabilidad de tener interacciones no-fisiológicas debidas a la sobre expresión. Un ensayo consistió en monitorear cambios funcionales como resultado de la expresión de proteínas recombinantes *in vivo*, en donde observamos que al hacer una cinética de inducción los espectros fluorescentes se conservaron aún después del tiempo estandarizado, incluso se mantenía el espectro en condiciones en donde las

proteínas fluorescentes formaban cuerpos de inclusión. Otra de las consideraciones fue analizar globalmente el efecto FRET.

Aún cuando el mensajero de FRET2 se evaluó en ambientes *in vitro* e *in vivo*, se observó que el blanco del mensajero HPV-16 fue accesible en todo momento para los antisentidos y que esta hibridación permitió la activación de la enzima RNasaH, lo cual resultó en el corte del mensajero y consecuentemente en la disrupción del efecto FRET tanto en los ensayos *in vitro* como en los *in vivo*. Además, las diferentes combinaciones de las variantes de GFP y las diferentes secuencias de unión entre fluoróforos resultó en diferencias en la eficiencia de FRET, estos resultados prueban que el efecto del antisentido es semejante, sugiriendo la anteposición del mensajero que codifica para las proteínas GST y GFP no afecta de manera esencial la estructura del RNAm blanco. El efecto fluorescente (FRET) que observamos es característico de la interacción GFP-CFP y aunque pensamos que la transferencia de energía podría modificarse, se consideró comparar secuencias de diferente tamaño y composición en la región de unión entre los fluoróforos. De manera que comenzamos con las quimeras GST-FRET y GST-FRET2, donde la eficiencia de FRET es de 0.755 y 0.780 con 27 y 23 aminoácidos, respectivamente. Al observar esta pequeña diferencia decidimos probar si el contenido de aminoácidos o la longitud entre fluoróforos era un factor determinante en el efecto FRET, por lo que se procedió a comparar estas quimeras con las descritas en la literatura por Heim y col. (38), Mitra y col. (50) y Tyas, *et al.* (80), para lo cual la secuencia de aminoácidos de los artículos publicados se utilizó como base. Las secuencias de aminoácidos entre los fluoróforos mostró una mínima modificación, solo se sustituyó el sitio blanco utilizado por los diferentes autores por la secuencia blanco del gen E6 del HPV-16. En esta sustitución de aminoácidos se tuvo especial cuidado en mantener las características hidrofóbicas de las secuencias ya reportadas. Al comparar el efecto FRET de las moléculas reportadas y las quimeras desarrolladas por nosotros, observamos que tanto los espectros de emisión como la eficiencia de FRET son semejantes, ya que las diferencias son centésimas. Por lo que consideramos que la región de unión entre los fluoróforos no juega un papel determinante en la eficiencia de FRET.

Un aspecto teórico en el desarrollo del sistema FRET y la utilización de GFP, se fundamenta en la naturaleza estructural de GFP, en donde el fluoróforo se encuentra embebido

dentro de un barril formado con hojas β , lo cual da una distancia limitante para la resonancia de electrones entre dos moléculas de GFP. Sin embargo, varios reportes de sistemas FRET basados en GFP han mostrado que la eficiencia del efecto FRET ocurre en dímeros quiméricos de GFP en células eucariontes (47,51,76,77,80,89). FRET también ha sido utilizado para demostrar la interacción de CheY con su blanco FliM en bacterias confirmando su utilización en sistemas procariontes (69). Existen otros reportes en los que utilizan FRET para monitorear la actividad de proteasas (38;50;80;89) o la concentración de calcio intracelular (51), utilizan diferentes combinaciones de fluoróforos y estos están separados por 18 hasta 25 aminoácidos.

La utilización de diferentes combinaciones de fluoróforos ha dado una gran plasticidad al sistema, sin embargo, consideramos que no sólo es importante incrementar la eficiencia de FRET en el sistema, sino también evaluar las características espectroscópicas de cada fluoróforo. En nuestros resultados observamos que el solapamiento entre los espectros entre BFP y GFP es menor que el de CFP y GFP. El tener un mayor solapamiento entre el sistema FRET2 en los espectros de la molécula donadora y aceptora, resulta en un incremento en la eficiencia de FRET, que va de 0.73 utilizando la combinación BFP-GFP a 0.78 utilizando la combinación CFP-GFP. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Miyawaki y cols. que utilizaron la combinación BFP-GFP como indicadores de la concentración de calcio intracelular (51).

En nuestro sistema FRET2 observamos que el solapamiento de los espectros de la molécula donadora y aceptora, resulta en la disminución en la intensidad de la fluorescencia. Estos resultados concuerdan con el reporte de Calleja y cols. (17) en donde la fluorescencia de la quimera GFP-Akt-YFP (Akt proteína cinasa), se disminuye en 2 veces la fluorescencia de los fluoróforos independientes. En este artículo toman una alternativa interesante para demostrar el efecto FRET, y esto es que comparan la fluorescencia de la quimera GFP-Akt-YFP con la fluorescencia de una proteína GFP-Akt- Black-YFP que corresponde a una proteína que mantiene la estructura de barril de YFP, pero el fluoróforo está mutado, por lo que no es fluorescente. Al expresarla observan que los valores de fluorescencia se restablecen y son semejantes al de GFP, por lo que el opacamiento o disminución de la fluorescencia en FRET justamente se debe a la interacción entre las proteínas fluorescentes.

Ensayos de traducción *in vitro* para evaluar la actividad de moléculas antisentido.

La utilización de sistemas de transcripción-traducción para la evaluación de moléculas antisentido es relativamente nueva existiendo pocos reportes (1) adicionales al nuestro. En estos casos utilizan extractos de germen de trigo en un sistema de transcripción-traducción acoplados, preferentemente sobre un sistema basado en reticulocitos de conejo. Esto se debe a que los autores mencionan que la actividad de la RNasaH propia del sistema es menor en reticulocitos que en extractos de conejo, considerando estas observaciones durante estos ensayos se adicionó en la reacción 0.2U de RNasaH (91).

Modelado de la estructura del RNA de FRET2

Hasta el momento, una gran cantidad de investigadores han seleccionado secuencias blanco utilizando programas computacionales en donde principalmente se enfocan en la búsqueda de regiones de cadena sencilla que incluyan el trinucleótido NUX (secuencia blanco para las ribozimas). Desafortunadamente, es muy frecuente el observar que una fracción mínima de estas ribozimas construidas *in silico* solo reducen mínimamente los niveles del RNA blanco en células (55).

La aproximación inicial de la accesibilidad a la región blanco por las moléculas terapéuticas en el sistema fluorescente fue analizada mediante una simulación matemática [Programa M-fold, (92)] en donde observamos que la región para el Anti419 y la Rz 419 se encuentra en una zona de horquilla, mientras que la región de reconocimiento de AntiE6 y de la Rz434 se encuentra en una doble cadena y una horquilla, lo que nos hizo pensar que posiblemente tendríamos problemas al hibridar dichas moléculas. Aunque el programa M-fold es una de las aproximaciones más factibles, para la determinación de secuencias accesibles para la hibridación con ribozimas o antisentidos, parece que dicho programa en el mejor de los casos solo ha mostrado un éxito parcial en la determinación de sitios accesibles (14;88). Basándonos en los reportes que describen la actividad *in vitro* de la Rz 434 (9) y la capacidad del AntiE6 (9) de activar la RNasaH tanto *in vitro*, como *in vivo*, decidimos utilizar dichas moléculas para evaluar el sistema fluorescente FRET2. Al evaluar moléculas terapéuticas con el mismo blanco de acción en el mensajero del gen E6 de HPV-16, observamos que el AntiE6 eficientemente inhibe la transferencia de energía entre los fluoróforos expresados en el sistema FRET2. También, basándonos en los resultados experimentales que comparan la actividad de los antisentidos Anti-

419 y AntiE6 en el sistema FRET2 observamos que en los experimentos en células efectivamente la presencia del Anti-419 se disminuye en un 6% la eficiencia de FRET en comparación de la utilización de AntiE6, lo cual demuestra que el Anti419 se hibrida a una región de mayor accesibilidad, lo cual concuerda con los resultados del modelado.

Aunque se ha postulado que las ribozimas sean más efectivas que los antisentidos pasivos, la inestabilidad y la actividad de las ribozimas *in vivo* es menor a la esperada, lo que supone la degradación por nucleasas, la inhibición de la actividad catalítica por otras proteínas o el plegamiento incorrecto de las ribozimas en el entorno intracelular (14). Considerando lo anterior, en nuestro sistema reportero observó que aunque la región blanco es accesible para los antisentidos, los ensayos de actividad catalítica de las ribozimas fueron más difíciles de lo que esperábamos, debido a los problemas en la co-expresión del sistema reportero y de las ribozimas. Aún superando las dificultades, los resultados obtenidos con las ribozimas son notablemente inferiores al compararlos con los ODNs antisentido. Esto nos hace pensar que aunque la región blanco dentro de la estructura del mensajero del sistema FRET2 es accesible, las secuencias que flanquean esta región pueden estar impidiendo la correcta hibridación con la región de reconocimiento de la ribozima tipo *hairpin* o que simplemente el tamaño de dicha molécula no sea capaz de interactuar de manera muy adecuada con la secuencia blanco. Lo cual nos hace pensar que en un futuro sería importante evaluar la actividad de las ribozimas utilizando el transcrito completo del gen de E6 de HPV-16 en el sistema reportero y por otro lado sería interesante utilizar una ribozima de menor tamaño (ej. ribozima tipo *hammerhead*).

La utilización de un modelo de expresión bacteriano para evaluar la actividad de ribozimas ha sido controversial. En algunos reportes se determina que no existe actividad *trans* de las ribozimas (19), mientras que también se reporta la completa inhibición de un blanco no bacteriano.(66). Fujita y col. (33) demuestran la actividad de ribozimas tipo *hammerhead* *cis* al colocarlas en el extremo 5' del reportero y por otro lado Inokuchi y col. (42) demuestran la actividad inhibitoria de ribozimas expresadas en *trans*.

En experimentos semejantes realizados por Sioud, M. y cols.(66) observaron que en ensayos mixtos (expresión de la ribozima y el blanco Integrasa tipo I de HIV en bacterias e *in*

vitro) los niveles del mensajero blanco se eliminan totalmente. En un intento por mostrar evidencia de la actividad catalítica de las ribozimas, sobreexpresan el mensajero de la Integrina tipo I de HIV y posteriormente expresan la ribozima tipo *hammerhead* en *trans* (10min.), logrando demostrar los fragmentos generados por el corte del mensajero. Cuando la ribozima se expresa 20min. no existe evidencia del mensajero ni de la ribozima. Al utilizar una capa bacteriana que no expresa RNasaIII, logran observar los productos generados por la catálisis del mensajero de la integrina tipo I de HIV. En nuestros resultados de extensión del cebador (*primer extension*) observamos que a 37°C se generaban estructuras de doble cadena localizadas en los extremos 5' y 3', que estaban incluidas en la ribozima para su protección a nucleasas, sin embargo, esta estructura de doble cadena también puede ser reconocida por la RNasaIII y degradar el mensajero que expresa la ribozima.

Existe una gran cantidad de artículos en los que comparan la actividad de ODNs antisentido contra la actividad de ribozimas, sin embargo, en nuestra forma de ver, las condiciones experimentales hasta cierto punto son significativamente diferentes, debido a que los antisentidos utilizados están modificados químicamente (fosforotioatos), mientras que la ribozimas son expresada a partir de un vector; y ciertamente no están modificadas químicamente. Al flanquear la ribozima con estructuras de asa y horquilla, se favorece la estabilidad de estas moléculas lo que correlaciona con la inhibición del gen de interés, mientras que al expresar un antisentido de RNA en ausencia de estas estructuras no se observa ningún efecto (14). Basándose en las diferencias entre las moléculas terapéuticas, y en los resultados obtenidos hasta ahora, consideramos que sería un poco apresurado el determinar cual molécula resulta ser más adecuada como agente terapéutico. Por lo que en el futuro sería importante evaluar *in vivo* en el sistema FRET2 la actividad de antisentidos así como ribozimas preformadas modificadas químicamente, y administradas a una misma concentración.

Especificidad terapéutica y Toxicidad

La utilización de antisentidos como agentes terapéuticos, se relaciona con la habilidad de los antisentidos a unirse selectivamente con la molécula blanco, evitando interactuar de manera inespecífica con componentes intracelulares. En los protocolos experimentales se han utilizado un rango bastante amplio de concentraciones de dichas moléculas los cuales van desde 50µM hasta

200 μ M (14). Considerando que existen reportes en los que se ha descrito a los fosforotioatos como agentes terapéuticos ya que pueden interactuar con componentes intracelulares es importante determinar una concentración en la cual se obtenga el efecto deseado e inhibir las interacciones específicas, como en cualquier tipo de fármaco. En nuestro sistema de evaluación decidimos utilizar concentraciones de 0.1 y 1 μ M de manera que podríamos determinar que tan sensible era nuestro método experimental y también para evitar la presencia de efectos tóxicos por la concentración de los antisentidos (14). En nuestros experimentos observamos que ambas dosis nos permiten evaluar la actividad de las moléculas antisentido, sin tener efectos tóxicos. Por lo que en todo momento fue importante tener los controles adecuados.

El sistema FRET2 descrito en este trabajo muestra la actividad de antisentidos modificados (fosforotioatos) sobre un blanco de HPV-16 en tiempo real y en un ambiente intracelular, en donde este sistema puede ser aplicado para la evaluación de otros antisentidos con modificaciones químicas novedosas o incluso otro tipo de moléculas terapéuticas. De esta manera, el sistema reportero FRET2 facilitará el desarrollo de diferentes moléculas antisentido dirigidas contra la región E6 de HPV-16, agente causal del 50% de los casos positivos a cáncer cérvico uterino.

CONCLUSIONES

Al término de este proyecto se desarrolló el prototipo fluorescente FRET2 en dos fases (procarionte y eucarionte). Así, utilizando un modelo sencillo y manipulable se evaluó *in vivo* la actividad de ODNs antisentido de manera rápida y a bajo costo con las siguientes conclusiones:

1. - Diseño y construcción de un prototipo de sistema reportero fluorescente con GFP y sus variantes.

A lo largo de la generación de un prototipo de sistema fluorescente para evaluar la actividad de moléculas terapéuticas, fue necesario realizar un número considerable de modificaciones en el diseño y construcción del mismo, lo que incremento la dificultad del proyecto; sin embargo, los problemas se superaron y el sistema fluorescente funcionó adecuadamente.

Las modificaciones involucraron diferentes aspectos:

- (i) Cambio de cepas bacterianas.- originalmente se planteo la expresión los genes de interés en dos vectores y que su expresión fuera de manera independiente. En vista de que la cepa BL21-SI, no permitió dicho control se cambió a la cepa BL21(DE3).
- (ii) Cambio de fluoróforos para optimizar el efecto FRET
- (iii) Cambio de vectores de expresión
- (iv) Eliminación de la secuencia kosak, para evitar la generación de productos quiméricos incompletos del sistema fluorescente al realizar transcripciones *in vitro*.

2. - Análisis y evaluación fluoroespectroscópica de las proteínas quiméricas correspondientes al sistema reportero fluorescente en bacterias vivas.

Al analizar y evaluar expresión de las proteínas quiméricas correspondientes al sistema reportero fluorescente FRET-2 en bacterias, observamos que todas las construcciones del sistema se expresan adecuadamente, generando las proteínas quiméricas de los tamaños esperados, posibilitando la determinación de los niveles de expresión basándose en las características fluoroscópicas de las diferentes combinaciones de GFP y sus variantes.

3. - *Evaluación y determinación fluoroespectroscópica de la transferencia de energía fluorescente en el sistema reportero.*

Al evaluar y determinar la eficiencia de FRET en el sistema fluorescente FRET2 y sus variantes (FRET2-He, FRET2-Mi y FRET2-Ty) observamos que la eficiencia de FRET no se ve alterada ni por la longitud ni por la composición aminoacídica de la secuencia que une a los fluoróforos en el prototipo del sistema fluorescente. Lo que nos da una eficiencia FRET mayor al 70% (FRET2 E= 78.0%, FRET2-He E = 77.6%, FRET2-Mi E =77.1% y FRET2-Ty E= 77.7%), lo que indica que la mayor eficiencia de FRET se observa en la construcción FRET2 cual es óptimo para nuestros ensayos.

Sin embargo, la combinación de fluoróforos GFP sí muestra diferencias en la eficiencia de FRET. La eficiencia en la transferencia de energía fluorescente se incrementa en base en las características fluoroespectroscópicas del donador y del aceptor: mientras mayor sea el solapamiento de los espectros mayor será la eficiencia de FRET.

4. - *Determinar la eficiencia de FRET entre las variantes de la proteína GFP.*

Con el propósito de evaluar y determinar fluoroespectroscópicamente el efecto FRET entre las variantes de la familia de GFP, este proyecto involucró el desarrollo de tres generaciones del sistema fluorescente (GFP-BFP E= 73%, GFP-CFP E= 78% y GFP-YFP E= 84%). Al comparar la eficiencia de FRET entre estas combinaciones de fluoróforos en el sistema reportero FRET2 observamos que la mejor corresponde a la tercera generación en donde GFP fue utilizada como molécula donadora, mientras que YFP fue la molécula aceptora.

5. - *Demostrar la accesibilidad de la secuencia blanco en el sistema reportero y la posible interacción de este con moléculas antisentido in vitro.*

Se demostró que el ARNm del blanco es accesible y reconocido por la molécula antisentido, esto se fundamenta en los resultados obtenidos de los ensayos de RNasaH, se observa que tanto el ODN 434 como el ODN 419 tienen la capacidad de hibridar con el RNAm, formando un blanco para la RNasaH. Esto nos permitió utilizar el sistema tanto para evaluar *in vivo* ODNs antisentido así como ribozimas. Esta dualidad de uso, amplía las futuras aplicaciones del sistema fluorescente en la evaluación de ODNs con diferentes químicas, pequeñas moléculas de RNA de interferencia e incluso ribozimas preformadas.

6. - *Establecer las condiciones para administrar antisentidos a bacterias vivas.*

Los métodos de administración de los antisentidos resultaron ser adecuados en el sistema procarionte, obteniendo una incorporación del antisentido del 62% en bacterias vivas, lo que indica que el método de administración de los antisentidos estandarizado en este proyecto es óptimo.

7. - *Evaluar la inhibición del efecto FRET al administrar antisentidos en bacterias vivas.*

Se demostró la inhibición del efecto FRET al administrar el ODN AntiE6 en bacterias vivas, mientras que al administrar el ODN M7 no se observó ningún cambio. La disminución en la eficiencia del efecto FRET en presencia de AntiE6 es resultado de la hibridación con el blanco y por actividad de la RNasaH, lo que condujo al corte del ARNm del blanco, y la traducción de un solo producto proteico.

8. - *Demostrar la expresión de las ribozimas en un sistema bacteriano.*

Se demostró que las ribozimas se expresan adecuadamente en un sistema bacteriano, según los datos obtenidos de los experimentos de extensión del cebador; aunque no existe una correlación entre el tiempo de inducción y la cantidad de cDNA generado. En este punto, es importante mencionar que la generación del cDNA correspondiente a la ribozima no es del todo completa, lo que se observa por la generación de tres diferentes fragmentos. Al revisar el modelado de la estructura secundaria del RNAm, observamos que la terminación del cDNA coincide con regiones en las que existe una auto-hibridación del RNAm, lo cual sugiere que tales sitios impiden de manera azarosa el paso de la reverso-transcriptasa o que existe una degradación específica de RNA dúplex.

9. - *Expresar y evaluar el efecto de las diferentes ribozimas sobre el sistema reportero en bacterias vivas en una conformación cis-actuante.*

La expresión del sistema reportero y las ribozimas en una posición *cis* actuante no nos permitió evaluar la actividad de ribozimas, ya que la transcripción -traducción es tan rápida en procariontes que no existe suficiente tiempo para que las ribozimas actúen.

10. - *Co-expresar y evaluar el efecto de las diferentes ribozimas en una conformación trans-actuante sobre el sistema reportero expresado en bacterias vivas.*

La expresión del sistema reportero y las ribozimas en una posición *trans* actuante nos permitió evaluar de manera temporal la actividad de ribozimas.

11. - *Construcción de un prototipo las variantes de la proteína GFP que permita expresar el sistema reportero en líneas celulares tumorales de humanas.*

Para expresar el sistema fluorescente en células tumorales humanas fue necesario transferir el sistema fluorescente a vectores de expresión eucarionte, lo cual se realizó con éxito.

12.- *Análisis y evaluación fluoroespectroscópica del sistema reportero fluorescente GFP en células tumorales humanas.*

El sistema reportero FRET-2 se expresó adecuadamente en células tumorales humanas, generando las proteínas quiméricas de los tamaños esperados, posibilitando la determinación de los niveles de expresión basándose en las características fluoroscópicas de las diferentes combinaciones de GFP y sus variantes.

13. - *Establecer las condiciones adecuadas para la administración a líneas tumorales en cultivo celular.*

Los métodos de administración de los antisentidos resultaron ser adecuados en el sistema eucarionte, obteniendo una incorporación del antisentido del 99% en células tumorales, lo que indica que el método de administración de los antisentidos estandarizado en este proyecto es óptimo.

14. - *Evaluar la inhibición del efecto FRET al administrar antisentidos en células tumorales en cultivo.*

Al administrar antisentidos 419 y AntiE6 en las células C33-A expresando el sistema reportero FRET2, observamos que el ODN antisentido 419 tiene un mayor efecto en la inhibición del efecto FRET.

Bibliografía

1. 'T Hoen, P.A.C., Out, R., Commandeur, J.N., Vermeulen, N.P., van Batenburg, F.H., Manoharan, M., van Berkel, T.J., Biessen, E.A., and Bijsterbosch, M.K. (2002): Selection of antisense oligodeoxynucleotides against glutathione S-transferase Mu. *RNA*.2002.Dec.;8.(12.):1572.-83., 8:1572-1583.
2. Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy (FRET). UNC. School of Medicine. Chapter Cell and Developmental biology. <http://www-cellbio.med.unc.edu/facilities/fret.htm>. 2004.
3. Fluorescent Spectrum of GFP. <http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/pps99.cryst.bbk.ac.uk/projects/gmo cz/gfp.htm>. 2004.
4. Green Fluorescent Protein. Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb/> Protein ID:1EMA. 2004.
5. Living Colors GFP User Manual <http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/manuals>. 2004.
6. Living colors. User Manual. Capitulo II. Properties of GFP & GFP variants. Protocol PT2040-1. <http://www.clontech.com>. 2004.
7. pEGFP-C1, pECFP, pEYFP and pEBFP vector information <http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/vectors/catlc.shtml>. 2004.
8. Agrawal, S. (1999): Importance of nucleotide sequence and chemical modifications of antisense oligonucleotides. *Biochim.Biophys.Acta*, 1489:53-68.
9. Alvarez-Salas, L.M., Arpawong, T.E., and DiPaolo, J.A. (1999): Growth inhibition of cervical tumor cells by antisense oligodeoxynucleotides directed to the human papillomavirus type 16 E6 gene. *Antisense.Nucleic.Acid.Drug Dev.*, 9:441-450.
10. Alvarez-Salas, L.M., Benitez-Hess, M.L., and DiPaolo, J.A. (2003): Advances in the development of ribozymes and antisense oligodeoxynucleotides as antiviral agents for human papillomaviruses. *Antivir.Ther.*, 8:265-278.
11. Alvarez-Salas, L.M., Cullinan, A.E., Siwkowski, A., Hampel, A., and DiPaolo, J.A. (1998): Inhibition of HPV-16 E6/E7 immortalization of normal keratinocytes by hairpin ribozymes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95:1189-1194.
12. Baker, B.F., Condon, T.P., Koller, E., McKay, R.A., Siwkowski, A.M., Vickers, T.A., and Monia, B.P. (2001): Discovery and analysis of antisense oligonucleotide activity in cell culture. *Methods*, 23:191-198.

13. Beck, J. and Nassal, M. (1995): Efficient hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the structured hepatitis B virus encapsidation signal *in vitro* and in cell extracts, but not in intact cells. *Nucleic Acids Res.*, 23:4954-4962.
14. Birikh, K.R., Berlin, Y.A., Soreq, H., and Eckstein, F. (1997): Probing accessible sites for ribozymes on human acetylcholinesterase RNA. *RNA*, 3:429-437.
15. Boado, R.J., Kazantsev, A., Apostol, B.L., Thompson, L.M., and Pardridge, W.M. (2000): Antisense-mediated down-regulation of the human huntingtin gene. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 295:239-243.
16. Boiziau, C., Thuong, N.T., and Toulme, J.J. (1992): Mechanisms of the inhibition of reverse transcription by antisense oligonucleotides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 89:768-772.
17. Calleja, V., Ameer-Beg, S.M., Vojnovic, B., Woscholski, R., Downward, J., and Larijani, B. (2003): Monitoring conformational changes of proteins in cells by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biochem.J.*, 372:33-40.
18. Chalfie, M. (1995): Green fluorescent protein. *Photochem.Photobiol.*, 62:651-656.
19. Chuat, J.C. and Galibert, F. (1989): Can ribozymes be used to regulate procaryote gene expression? *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 162:1025-1029.
20. Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., and Laemmli, U.K. (1977): Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J.Biol.Chem.*, 252:1102-1106.
21. Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996): FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173:33-38.
22. Crooke, S.T. (1999): Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim.Biophys.Acta*, 1489:31-44.
23. Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., and Tsien, R.Y. (1995): Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends.Biochem.Sci.*, 20:448-455.
24. Dagle, J.M. and Weeks, D.L. (2001): Oligonucleotide-based strategies to reduce gene expression. *Differentiation.*, 69:75-82.
25. Dale, R.E., Eisinger, J., and Blumberg, W.E. (1979): The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophys.J.*, 26:161-193.
26. Doherty, E.A. and Doudna, J.A. (2000): Ribozyme structures and mechanisms. *Annu.Rev.Biochem.*, 69:597-615.:597-615.

27. Dominski, Z. and Kole, R. (1993): Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 90:8673-8677.
28. dos Remedios, C. and Moens, P.D. (1995): Actin and the actomyosin interface: a review. *Biochim.Biophys.Acta*, 1228:99-124.
29. dos Remedios, C. and Moens, P.D. (1995): Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy is a reliable "ruler" for measuring structural changes in proteins. Dispelling the problem of the unknown orientation factor. *J.Struct.Biol.*, 115:175-185.
30. Fedor, M.J. and Uhlenbeck, O.C. (1990): Substrate sequence effects on hammerhead RNA catalytic efficiency. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 87:1668-1672.
31. Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 84:7413-7417.
32. Frangioni, J.V. and Neel, B.G. (1993): Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal.Biochem.*, 210:179-187.
33. Fujita, S., Koguma, T., Ohkawa, J., Mori, K., Kohda, T., Kise, H., Nishikawa, S., Iwakura, M., and Taira, K. (1997): Discrimination of a single base change in a ribozyme using the gene for dihydrofolate reductase as a selective marker in *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 94:391-396.
34. Gerdes, H.H. and Kaether, C. (1996): Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Lett.*, 389:44-47.
35. Heim, R. (1999): Green fluorescent protein forms for energy transfer. *Methods Enzymol.*, 302:408-23.:408-423.
36. Heim, R., Cubitt, A.B., and Tsien, R.Y. (1995): Improved green fluorescence. *Nature*, 373:663-664.
37. Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y. (1994): Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 91:12501-12504.
38. Heim, R. and Tsien, R.Y. (1996): Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr.Biol.*, 6:178-182.
39. Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M.T., Babaie, E., and Prydz, H. (2002): Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic.Acids Res.*, 30:1757-1766.

40. Huang, S., Stupack, D., Mathias, P., Wang, Y., and Nemerow, G. (1997): Growth arrest of Epstein-Barr virus immortalized B lymphocytes by adenovirus-delivered ribozymes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 94:8156-8161.
41. Huff, J.P., Grant, B.J., Penning, C.A., and Sullivan, K.F. (1990): Optimization of routine transformation of Escherichia coli with plasmid DNA. *Biotechniques*, 9:570-577.
42. Inokuchi, Y., Yuyama, N., Hirashima, A., Nishikawa, S., Ohkawa, J., and Taira, K. (1994): A hammerhead ribozyme inhibits the proliferation of an RNA coliphage SP in Escherichia coli. *J.Biol.Chem.*, 269:11361-11366.
43. Irie, A., Anderegg, B., Kashani-Sabet, M., Ohkawa, T., Suzuki, T., Halks-Miller, M., Curiel, D.T., and Scanlon, K.J. (1999): Therapeutic efficacy of an adenovirus-mediated anti-H-ras ribozyme in experimental bladder cancer. *Antisense.Nucleic.Acid.Drug Dev.*, 9:341-349.
44. Jaschke, A. (2001): Artificial ribozymes and deoxyribozymes. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, 11:321-326.
45. 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.
46. Kurreck, J. (2003): Antisense technologies. *Eur.J.Biochem.*, 270:1628-1644.
47. Li, H.Y., Ng, E.K., Lee, S.M., Kotaka, M., Tsui, S.K., Lee, C.Y., Fung, K.P., and Waye, M.M. (2001): Protein-protein interaction of FHL3 with FHL2 and visualization of their interaction by green fluorescent proteins (GFP) two-fusion fluorescence resonance energy transfer (FRET). *J.Cell Biochem.*, 80:293-303.
48. Mahieu, M., Deschuyteneer, R., Forget, D., Vandenbussche, P., and Content, J. (1994): Construction of a ribozyme directed against human interleukin-6 mRNA: evaluation of its catalytic activity in vitro and in vivo. *Blood*, 84:3758-3765.
49. Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., and Lukyanov, S.A. (1999): Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat.Biotechnol.*, 17:969-973.
50. Mitra, R.D., Silva, C.M., and Youvan, D.C. (1996): Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene*, 173:13-17.
51. Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., and Tsien, R.Y. (1997): Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388:882-887.

52. Miyawaki, A. and Tsien, R.Y. (2000): Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Methods Enzymol.*, 327:472-500.
53. Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (1996): Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 273:1392-1395.
54. Palm, G.J., Zdanov, A., Gaitanaris, G.A., Stauber, R., Pavlakis, G.N., and Wlodawer, A. (1997): The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein. *Nat.Struct.Biol.*, 4:361-365.
55. Pan, W.H., Devlin, H.F., Kelley, C., Isom, H.C., and Clawson, G.A. (2001): A selection system for identifying accessible sites in target RNAs. *RNA*, 7:610-621.
56. Patzel, V., Steidl, U., Kronenwett, R., Haas, R., and Sczakiel, G. (1999): A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxyribonucleotides at high statistical probability. *Nucleic.Acids Res.*, 27:4328-4334.
57. Perriman, R., Delves, A., and Gerlach, W.L. (1992): Extended target-site specificity for a hammerhead ribozyme. *Gene*, 113:157-163.
58. Persidis, A. (1997): Ribozyme therapeutics. *Nat.Biotechnol.*, 15:921-922.
59. Plautz, J.D., Day, R.N., Dailey, G.M., Welsh, S.B., Hall, J.C., Halpain, S., and Kay, S.A. (1996): Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells. *Gene*, 173:83-87.
60. Pollok, B.A. and Heim, R. (1999): Using GFP in FRET-based applications. *Trends.Cell Biol.*, 9:57-60.
61. Rossi, J.J. (1999): The application of ribozymes to HIV infection. *Curr.Opin.Mol.Ther.*, 1:316-322.
62. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
63. Seedorf, K., Krammer, G., Durst, M., Suhai, S., and Rowekamp, W.G. (1985): Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*, 145:181-185.
64. Selvin, P.R. (2000): The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nat.Struct.Biol.*, 7:730-734.
65. Shimomura, O. and Johnson, F.H. (1975): Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 72:1546-1549.

66. Sioud, M. and Drlica, K. (1991): Prevention of human immunodeficiency virus type 1 integrase expression in Escherichia coli by a ribozyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 88:7303-7307.
67. Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988): Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67:31-40.
68. Sohail, M., Hochegger, H., Klotzbucher, A., Guellec, R.L., Hunt, T., and Southern, E.M. (2001): Antisense oligonucleotides selected by hybridisation to scanning arrays are effective reagents *in vivo*. *Nucleic.Acids Res.*, 29:2041-2051.
69. Sourjik, V. and Berg, H.C. (2002): Binding of the Escherichia coli response regulator CheY to its target measured *in vivo* by fluorescence resonance energy transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99:12669-12674.
70. Stage-Zimmermann, T.K. and Uhlenbeck, O.C. (1998): Hammerhead ribozyme kinetics. *RNA.*, 4:875-889.
71. Sullivan, K. & Kay S. *Methods in Cell Biology. Green Fluorescent Protein.* (58). 1999. USA, Academic Press.
72. Susani, M., Jertschin, P., Dolecek, C., Sperr, W.R., Valent, P., Ebner, C., Kraft, D., Valenta, R., and Scheiner, O. (1995): High level expression of birch pollen profilin (Bet v 2) in Escherichia coli: purification and characterization of the recombinant allergen. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 215:250-263.
73. Suwanai, H., Matsushita, H., Kobayashi, H., Ikeda, Y., and Kizaki, M. (2002): A novel therapeutic technology of specific RNA inhibition for acute promyelocytic leukemia: improved design of maxizymes against PML/RARalpha mRNA. *Int.J.Oncol.*, 20:127-130.
74. Tanner, N.K. (1999): Ribozymes: the characteristics and properties of catalytic RNAs. *FEMS Microbiol.Rev.*, 23:257-275.
75. Tatout, C., Gauthier, E., and Pinon, H. (1998): Rapid evaluation in Escherichia coli of antisense RNAs and ribozymes. *Lett.Appl.Microbiol.*, 27:297-301.
76. Tertoolen, L.G., Blanchetot, C., Jiang, G., Overvoorde, J., Gadella, T.W.J., Hunter, T., and den Hertog, J. (2001): Dimerization of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha in living cells. *BMC.Cell Biol.*, 2:8-22.
77. Truong, K., Sawano, A., Mizuno, H., Hama, H., Tong, K.I., Mal, T.K., Miyawaki, A., and Ikura, M. (2001): FRET-based *in vivo* Ca²⁺ imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule. *Nat.Struct.Biol.*, 8:1069-1073.
78. Tsien, R.Y. (1998): The green fluorescent protein. *Annu.Rev.Biochem.*, 67:509-44.:509-544.

79. Tsien, R.Y., Bacsikai, B.J., and Adams, S.R. (1993): FRET for studying intracellular signalling. *Trends.Cell Biol.*, 3:242-245.
80. Tyas, L., Brophy, V.A., Pope, A., Rivett, A.J., and Tavare, J.M. (2000): Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *EMBO Rep.*, 1:266-270.
81. Valdivia, R.H., Hromockyj, A.E., Monack, D., Ramakrishnan, L., and Falkow, S. (1996): Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene*, 173:47-52.
82. Van Der Meer, B.W., Coker, G.I., and Chen, S.-Y. (1994): *Resonance Energy Transfer, Theory and Data*. New York. ζXH Πυβλισηερσ.
83. Ventura, M., Wang, P., Franck, N., and Saragosti, S. (1994): Ribozyme targeting of HIV-1 LTR. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 203:889-898.
84. Venturini, F., Braspenning, J., Homann, M., Gissmann, L., and Sczakiel, G. (1999): Kinetic selection of HPV 16 E6 /E7-directed antisense nucleic acids: anti-proliferative effects on HPV 16-transformed cells. *Nucleic.Acids Res.*, 27:1585-1592.
85. Vickers, T., Baker, B.F., Cook, P.D., Zounes, M., Buckheit, R.W.J., Germany, J., and Ecker, D.J. (1991): Inhibition of HIV-LTR gene expression by oligonucleotides targeted to the TAR element. *Nucleic.Acids.Res.*, 19:3359-3368.
86. Wiechen, K., Zimmer, C., and Dietel, M. (1998): Selection of a high activity c-erbB-2 ribozyme using a fusion gene of c-erbB-2 and the enhanced green fluorescent protein. *Cancer Gene Ther.*, 5:45-51.
87. Wu, P. and Brand, L. (1994): Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal.Biochem.*, 218:1-13.
88. Xing, Z. and Whitton, J.L. (1992): Ribozymes which cleave arenavirus RNAs: identification of susceptible target sites and inhibition by target site secondary structure. *J.Virol.*, 66:1361-1369.
89. Xu, X., Gerard, A.L., Huang, B.C., Anderson, D.C., Payan, D.G., and Luo, Y. (1998): Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer. *Nucleic.Acids.Res.*, 26:2034-2035.
90. Yang, F., Moss, L.G., and Phillips, G.N.J. (1996): The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat.Biotechnol.*, 14:1246-1251.
91. Yonekura, H., Migita, H., Sakurai, S., Wang, H., Harada, S., Abedin, M.J., Yamagishi, S., and Yamamoto, H. (1999): Antisense display-a method for functional gene screening: evaluation in a cell-free system and isolation of angiogenesis-related genes. *Nucleic.Acids.Res.*, 27:2591-2600.

92. Zuker, M. and Jacobson, A.B. (1998): Using reliability information to annotate RNA secondary structures. *RNA*, 4:669-679.

Artículos Publicados

1. Benítez-Hess, M.L., DiPaolo, J.A. y Alvarez-Salas, L.M. (2004). Antisense activity detection by inhibition of fluorescence resonance energy transfer. *Luminescence*. 19:85-93.
2. Alvarez-Salas, L.M., Benitez-Hess, M.L. y DiPaolo, J.A. (2003). Advances in the development of ribozymes and antisense oligodeoxynucleotides as antiviral agents for human papillomaviruses. *Antiviral Therapy*. 8:265-278.