

9
2ej. 03088



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y
HUMANIDADES

***MOLÉCULAS DE PNA EN SISTEMAS
FLUORESCENTES DE DETECCIÓN POR
HIBRIDACIÓN Y EN LA DISCRIMINACIÓN
DE ALELOS***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA**

P R E S E N T A

ERNESTO ORTIZ SURI



**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CUERNAVACA, MOR.**

262857

JUNIO DE 1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

PAGINACION

DISCONTINUA

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, con la asesoría de los Drs. Paul M. Lizardi López y Alejandro Alagón Cano.

RESUMEN

Hemos desarrollado un método para la detección rápida de productos de PCR basado en el uso de sondas híbridas de PNA-DNA inmovilizadas en superficie, las cuales sufren un cambio conformacional acoplado a emisión de fluorescencia en presencia del blanco complementario de DNA. El DNA amplificado puede ser detectado simplemente añadiendo una alícuota de la reacción al pozo de una placa de microtitulación y leyendo la fluorescencia emitida. Ninguna otra transferencia de material ni lavados son requeridos. En este trabajo demostramos la especificidad del método para la detección del DNA ribosomal de *Entamoeba histolytica*.

Las sondas de PNA forman híbridos estables con las moléculas de DNA. Estos híbridos son notablemente desestabilizados por bases mal apareadas. Sin embargo, el rango de temperatura al cual la discriminación óptima entre un apareamiento imperfecto y uno perfecto tiene lugar es alto y relativamente estrecho. En este trabajo hemos explorado las ventajas del empleo de una sonda estructurada, con el objetivo de mejorar la especificidad de la discriminación de apareamientos imperfectos por el PNA. Empleando la mutación “Leiden” del Factor V de coagulación sanguínea de humanos como secuencia modelo, hemos encontrado que una sonda de PNA con estructura de tallo y asa es capaz de discriminar apareamientos imperfectos en el DNA complementario en un rango de temperatura mucho más amplio que el de un PNA no estructurado con la misma secuencia sonda.

INDICE GENERAL

RESUMEN	0
1. INTRODUCCION	1
1.1 Diagnóstico molecular.....	1
1.2 Comparación entre los sistemas de diagnóstico empleando ácidos nucleicos y anticuerpos.....	2
1.3 Métodos de diagnóstico empleando ácidos nucleicos.....	4
1.4 Sistemas fluorescentes de detección.....	5
1.5 Moléculas estructuradas como sondas.....	6
1.6 PNA.....	8
1.7 Modelo biológico N° 1: <i>Entamoeba histolytica</i>	14
1.8 Modelo biológico N° 2: Factor V de Coagulación Sanguínea.....	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo general 1.....	18
2.1.1 Objetivos particulares.....	18
2.2 Objetivo general 2.....	18
2.2.1 Objetivos particulares.....	18
3. MATERIALES Y METODOS	19
3.1 Buffers y soluciones.....	19
3.2 Desoxiribooligonucleótidos.....	20
3.3 Acidos Péptido Nucleicos.....	22
3.4 Productos de PCR.....	22
3.5 Protocolos.....	23
3.5.1 Cromatografía de alta presión en fase reversa (RP-HPLC).....	23
3.5.2 Retardamiento de oligos biotinilados con streptavidina en geles de Poliacrilamida-Urea.....	23
3.5.3 Marcado del oligo EOstem10 con DABCYL-NHS.....	24
3.5.4 Marcado del PNA EO24 con AMCA-NHS.....	24
3.5.5 Activación del sulfidrilo del PNA-Coumarina con Aldritiol.....	25
3.5.6 Reacción de acoplamiento del Tiopiridil-PNA-Coumarina con el aducto EOstem10-DABCYL. Síntesis del switch PNA-DNA.....	25
3.5.7 Determinación de la cinética de calentamiento y enfriamiento del sistema de baños de agua conectados al espectrofluorímetro LS-50 (Perkin Elmer).....	26
3.5.8 Curvas de fusión.....	26
3.5.9 Interacción del switch PNA-DNA con el efector sintético EO19.....	27

3.5.10 Titulación del efector sintético EO19 con el switch de PNA-DNA en solución.....	27
3.5.11 Comparación de la cinética de hibridación del switch PNA-DNA con la del faro molecular.....	28
3.5.12 Titulación del producto de sPCR D5 de cadena sencilla de <i>E. histolytica</i> con el switch de PNA-DNA en solución.....	28
3.5.13 Retardamiento del producto de nPCR de <i>E. histolytica</i> con PNA en geles de PAA.....	29
3.5.14 Titulación de muestras en microplacas. Coeficiente de decremento.....	29
3.5.15 Ensayo de detección del efector sintético EO19 con el switch PNA-DNA en placas de microtitulación.....	30
3.5.16 Ensayo de detección del nPCR de <i>E. histolytica</i> con el switch PNA-DNA en placas de microtitulación.....	31
3.5.17 Purificación de oligos por FPLC.....	33
3.5.18 Hibridación y geles de retardamiento de DNAs con PNAs.....	34
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	35
4.1 Criterios para el diseño de un switch molecular fluorescente.....	35
4.2 Ensablaje del switch PNA-DNA y acoplamiento del par fluoróforo:quencher.....	38
4.3 Determinación de la temperatura de fusión del switch PNA-DNA.....	39
4.4 Interacción del switch PNA-DNA con el oligo efector sintético.....	40
4.5 Titulación de los efectores con el switch PNA-DNA.....	40
4.6 Ensayos en formato de microtitulación.....	41
4.6.1 Detección del efector sintético EO19.....	41
4.6.2 Detección de productos de PCR normal de <i>E. histolytica</i>	42
4.7 Detección de mutaciones puntuales con moléculas de PNA estructuradas.....	43
4.8 Tm's teóricas en las interacciones PNA:DNA y PNA:PNA.....	43
4.9 Diseño de las sondas para la detección del Factor V Leiden.....	44
4.10 Comparación de la capacidad de discriminación de bases mal apareadas entre el PNA estructurado y el no estructurado a diferentes temperaturas.....	45
5. CONCLUSIONES.....	47
6. PERSPECTIVAS.....	49
7. REFERENCIAS.....	52

INTRODUCCION

Diagnóstico molecular.

Los microbiólogos clínicos han estado tradicionalmente ocupados en el aislamiento e identificación de organismos patógenos en humanos. Los métodos convencionalmente empleados involucran el aislamiento del organismo de interés en un cultivo, seguido de su identificación mediante el empleo de determinadas pruebas bioquímicas o inmunológicas. En muchos aspectos, los cultivos y los correspondientes métodos utilizados en la identificación son limitados en cuanto a su sensibilidad y/o especificidad. Con el objetivo de mejorar la sensibilidad de los ensayos, acortar el tiempo de diagnóstico y lograr la detección de microorganismos difíciles de cultivar, fueron desarrollados los inmunoensayos. Los inmunoensayos permitieron tanto a grandes laboratorios como a los chicos la expansión de sus servicios para satisfacer los requerimientos de diagnóstico en tiempos adecuados. Aún con esto, la búsqueda de sistemas de diagnóstico más sensibles, más específicos y más rápidos continúa siendo reflejada en los avances en los métodos de biología molecular.

Los sistemas de análisis basados en ácidos nucleicos han estado en la mira desde finales de la década de los 80. Varios de estos sistemas se encuentran ya disponibles para los ensayos rutinarios de laboratorio. Las ventajas del uso de sondas nucleotídicas en la identificación de microorganismos, sin la necesidad de protocolos especiales y tediosos de aislamiento, su capacidad de discriminar organismos no viables y finalmente la posibilidad de detectar mutaciones genéticas u otras alteraciones en el más variado material celular, convierten al desarrollo de técnicas de diagnóstico basadas en nucleicos en tecnología de punta.

El paralelo perfeccionamiento de los métodos químicos de inmovilización de biomoléculas en superficies sólidas ha llevado al desarrollo de métodos muy novedosos como los arreglos de oligonucleótidos de alta densidad. Estos métodos son de vital importancia, ya que a medida que los proyectos de secuenciación de genomas progresan, se pone de manifiesto la necesidad de mecanismos confiables y eficientes que den acceso a la considerable variabilidad genética individual. La hibridación con arreglos de alta densidad puede ser un método rápido y efectivo de acceder^a esta diversidad genética. El método de síntesis química dirigido por luz (una combinación de fotolitografía basada en semiconductores y la síntesis química de fase sólida) ha sido empleado con éxito para generar a gran escala arreglos de oligonucleótidos de más de 20,000 sitios de síntesis, en microchips de 1.28 cm² de área [1]. Instrumentos en desarrollo han demostrado la síntesis de chips de hasta 1,000,000 de sitios por cm², los cuales permiten el tamizado de hasta 250,000 nucleótidos a la vez, para detectar polimorfismos o mutaciones de manera altamente eficiente.

Ese es el futuro, microchips de hibridación para investigaciones rápidas en verificación (o generación) de secuencias, detección de patógenos, monitoreo de expresión génica y estudios

sobre reconocimiento molecular.

Comparación entre los sistemas de diagnóstico empleando ácidos nucleicos y anticuerpos.

Los principales parámetros que caracterizan un ensayo de diagnóstico son su sensibilidad (detectabilidad) y su especificidad. La sensibilidad, detectabilidad o límite de detección está determinada por la menor cantidad o más baja concentración de blanco detectable. La especificidad se refiere al grado de discriminación entre muestras positivas y negativas de un ensayo (o sea, la afinidad relativa de los dos sistemas)

Para los inmunoensayos con mayor detectabilidad, que son los ligados a amplificación de la señal por actividad enzimática (IAE, inmunoensayos acoplados a enzimas), el límite de moléculas detectables es de unas 10^4 . En la práctica esto se obtiene empleando un enorme exceso de anticuerpos con respecto al compuesto analizado. En el caso de los ensayos con ácidos nucleicos el límite de detección llega a los 10 blancos (ver sistema SHARP™ en la sección de métodos de diagnóstico con ácidos nucleicos). La detectabilidad se ve lógicamente incrementada con la afinidad en ambos sistemas, siendo mucho más sencillo diseñar una sonda nucleotídica de alta afinidad (variando dos parámetros: secuencia y longitud), que obtener anticuerpos de alta afinidad.

Es importante destacar una notable diferencia entre los ensayos IAE y los que involucran nucleicos. En el primer caso, el evento de reconocimiento precede siempre al evento de amplificación enzimática, lo cual va en detrimento de la detectabilidad. En el segundo caso, la disponibilidad de sistemas de amplificación de ácidos nucleicos permite incrementar el número inicial de blancos, siendo este un paso previo al reconocimiento molecular. Lógicamente, puede diseñarse un tercer paso de amplificación enzimática posterior a la interacción entre la sonda y el blanco amplificado.

La curva de dosis-respuesta (cambio en la respuesta (dR) por unidad de cantidad de blanco (dC), se iguala a dR/dC y no necesariamente tiene que ser constante) de los dos sistemas se ve afectada por la dependencia de la actividad enzimática de factores ambientales como temperatura, fuerza iónica, inhibidores, activadores o proteasas presentes en muestras biológicas.

La especificidad de los inmunoensayos está determinada por la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo y se incrementa con una mayor diferencia en la afinidad de los anticuerpos por antígenos específicos y no específicos. La no especificidad de un inmunoensayo puede deberse a uno de dos fenómenos: reactividad cruzada y reactividad compartida. La reactividad cruzada se refiere a los anticuerpos multiespecíficos, que muestran reactividad hacia antígenos estructuralmente muy diferentes sin que existan diferencias en cuanto a afinidad. La reactividad compartida ocurre con los anticuerpos denominados polifuncionales, capaces de unirse a epítopes estructuralmente relacionados, aunque con diferente fuerza (Varga et al. analizaron anticuerpos monoclonales con paneles de haptenos y mostraron que un por ciento relativamente alto de ellos mostraba afinidad,

aunque baja, por haptenos escogidos al azar, o sea, eran polifuncionales [2]).

En el caso de los métodos de diagnóstico con nucleicos, la afinidad está determinada por la secuencia (complementaridad y composición) y la longitud de los mismos. Un pequeño cambio en uno de estos parámetros provoca una variación comparativamente drástica en la afinidad, por lo que no existen los fenómenos de reactividad cruzada o compartida inherentes a los sistemas IAE.

La cinética de las reacciones inmunes está dictada en gran medida por la constante de disociación (k_d) de los complejos antígeno:anticuerpo. Las constantes de asociación (k_a) son muy similares para varios sistemas antígeno-anticuerpo y son del orden de 10^7 - 10^8 $M^{-1}seg^{-1}$ para muchos haptenos ó 10^4 - 10^5 $M^{-1}seg^{-1}$ para proteínas antigénicas (estando sólo ligeramente por debajo del límite que impone la difusión). Por el contrario, la k_d puede variar desde 10^{-4} seg^{-1} para anticuerpos de alta afinidad, hasta 10^3 seg^{-1} para anticuerpos de baja afinidad, esto es, en un rango de 7 órdenes de magnitud. La constante de afinidad de equilibrio ($K = k_a/k_d$) por lo tanto puede llegar a valores de 10^9 - 10^{10} M^{-1} como máximo.

El tiempo de vida media de los complejos ($t_{1/2} = (-\ln 0.5)/k_d$) varía desde las milésimas de segundo hasta los minutos para los anticuerpos de baja y muy alta afinidad respectivamente. La vida media de los complejos antígeno-anticuerpo es por tanto corta y resulta en un proceso continuo de asociación-disociación durante el cual sus componentes pueden verse separados. Esto revierte singular importancia ya que afecta negativamente la detectabilidad de ensayos no homogéneos que requieren lavados e incubaciones múltiples (como los de tipo ELISA).

En el caso de la interacción entre nucleicos, la constante de asociación es básicamente independiente de la longitud de la cadena y se encuentra en el orden de 10^5 - 10^7 $M^{-1}seg^{-1}$, también un poco por debajo de la constante de colisión controlada por difusión. La velocidad de disrupción del complejo por el contrario decrece dramáticamente con el incremento en la longitud de las cadenas. La constante de disociación puede ser expresada según la ecuación de Arrhenius como función de la energía de activación E_a ($k_d = A \cdot \exp(-E_a/RT)$), a la que cada par de bases en el complejo aporta entre 3 y 6 kilocalorías [3]. Por ejemplo, para un híbrido de 19 pb se ha determinado el factor pre-exponencial $A = 1.5 \cdot 10^{32}$ seg^{-1} y la $E_a = 52$ $kcal \cdot mol^{-1}$ [4]. La k_d determinada a 37°C según la ecuación de Arrhenius es de $2.4 \cdot 10^{-5}$ seg^{-1} . Para dímeros mayores, la k_d disminuye exponencialmente, siendo del orden de 10^{-20} seg^{-1} para 30-ámeros, 10^{-40} seg^{-1} para 40-ámeros, por ejemplo. La constante de afinidad K , para oligonucleótidos de longitud moderada puede por tanto sobrepasar fácilmente el valor de 10^{20} M^{-1} , por lo que la interacción es prácticamente irreversible, con $t_{1/2}$ desde varios días hasta varios años.

Es importante extender la comparación entre estos sistemas al caso de la detección de mutaciones puntuales. Las mutaciones puntuales genómicas que son traducidas a proteínas pueden ser de dos tipos: aquellas que modifican ligeramente la proteína, conservando básicamente intacta su antigenicidad y las que provocan un cambio drástico en la estructura proteica. En el primer caso, la mutación es prácticamente indetectable con un sistema de anticuerpos, debido al problema de la

reactividad compartida. En el segundo caso, el sistema inmune funciona adecuadamente. En el caso de los ácidos nucleicos la detección de mutaciones puntuales genera una contradicción entre afinidad y especificidad, ya que al aumentar el tamaño de las cadenas empleadas aumenta también la estabilidad del híbrido no perfectamente complementario, o sea disminuye la especificidad. Esto implica restricciones notables en el diseño de sistemas de detección de cambios puntuales basados en hibridación de ácidos nucleicos. Aún así, resulta relativamente fácil diseñar y probar una sonda que discrimine perfectamente las mutaciones puntuales en las condiciones requeridas.

Métodos de diagnóstico empleando ácidos nucleicos.

Los métodos corrientemente empleados en la detección de productos de PCR están basados en la separación post-PCR de los productos de amplificación de la mezcla de reacción y su detección según la longitud del amplicón (electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida) o su secuencia (métodos de hibridación con sondas).

La automatización de estos métodos es complicada debido a la naturaleza heterogénea de los ensayos y el número de transferencias de material que es necesario realizar. Algunos autores han propuesto fórmulas como el ADA (Amplified DNA Assay, [5]) en los cuales se aplican las ventajas del sistema ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, un sistema rápido, efectivo y de relativa facilidad instrumental) a la detección de nucleicos. Esta opción recurre a la generación de proteínas afines al DNA a través de las cuales la sonda es fijada a la placa de ELISA. Durante la reacción de PCR, en el blanco es introducido un ligando capaz de interactuar con el sistema revelador (por ejemplo biotina y avidina conjugada con peroxidasa, respectivamente) (figura 1). Este sistema tiene la desventaja de que es imprescindible realizar lavados para detectar los productos de amplificación, lo cual limita su automatización.

Otro de los métodos basados en el formato ELISA incluye la hibridación del producto de PCR desnaturalizado con sondas ligadas a enzimas reporteras y la captura de los productos de ligación a las placas de lectura (figura 2) [6]. En este caso los numerosos lavados dificultan la expansión o automatización del método.

Métodos más avanzados se consideran los ensayos AMPLICOR-PCR, PCR-EIA y SHARP™. En el primer caso la reacción de PCR se lleva a cabo utilizando un primer biotinilado y el producto de PCR desnaturalizado es capturado en una placa de microtitulación que tiene a la sonda inmovilizada. La detección se lleva a cabo mediante un conjugado streptavidina-enzima reportera [7, 8]. Este sistema ha demostrado ser efectivo, pero implica un elevado costo por ensayo, además de los ya recurrentes lavados múltiples. El segundo modelo se basa en la detección por quimeras de anticuerpos con enzimas reporteras de los híbridos DNA:RNA formados al hibridar el producto de PCR desnaturalizado con una sonda biotinilada de RNA (obtenida por transcripción del DNA con NTPs biotinilados). El sistema está reportado como altamente sensible [9], pero el

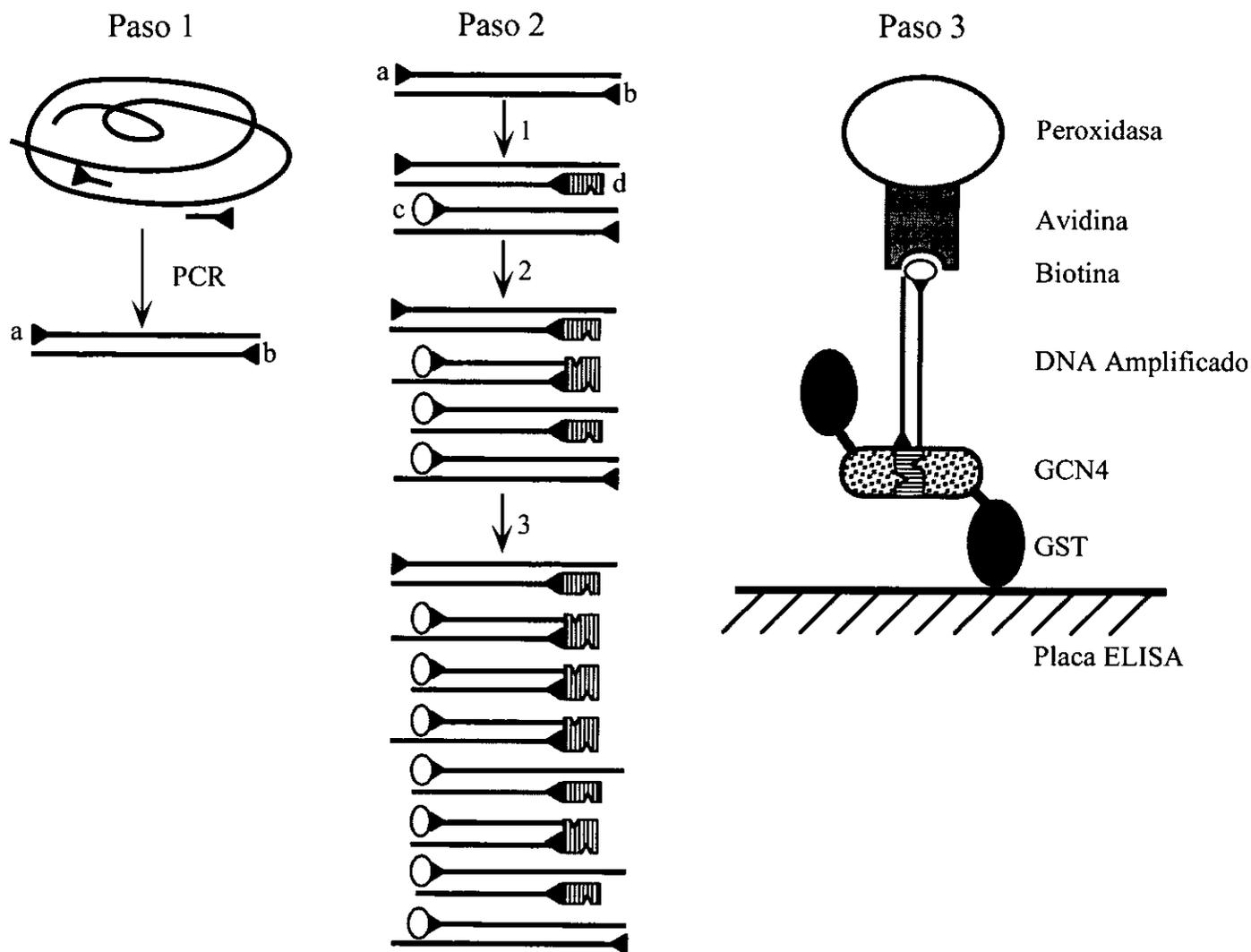


Figura 1. Amplified DNA Assay (ADA). El DNA es amplificado utilizando los oligos a y b como primers en el paso 1. La biotina y el sitio de unión a GCN4 (proteína reguladora de levadura) son incorporados en el primero de los tres ciclos del paso 2 (primers c y d respectivamente). La estructura del complejo de detección inmovilizado en el pozo de la placa de ELISA cubierta de GCN4-GST (Glutathione S-Transferasa) se muestra en el paso 3.

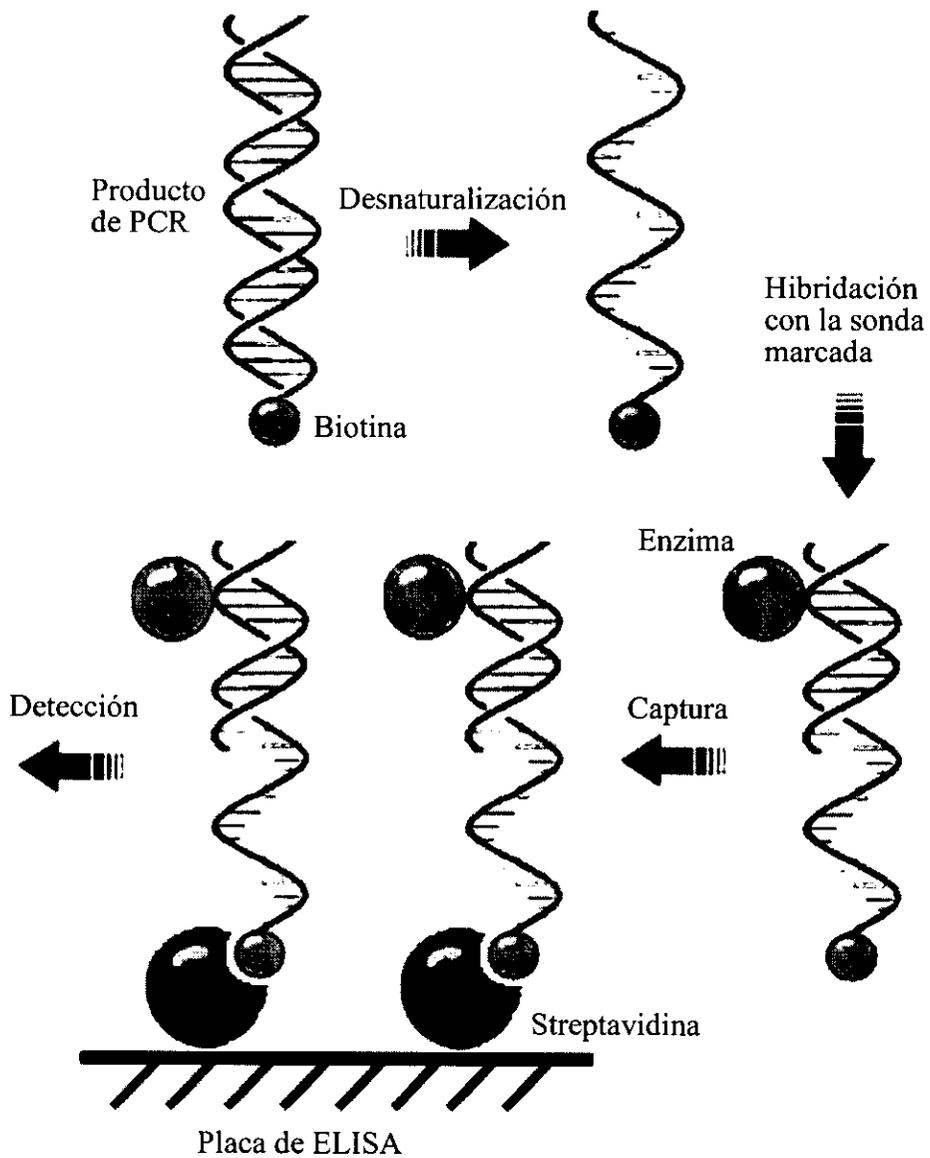


Figura 2. Formato de oligonucleótido sonda. Después de la amplificación, el producto de PCR se desnaturaliza y se hibrida a un oligonucleótido marcado. Los híbridos son capturados en una placa cubierta con streptavidina y la marca genera una señal detectable.

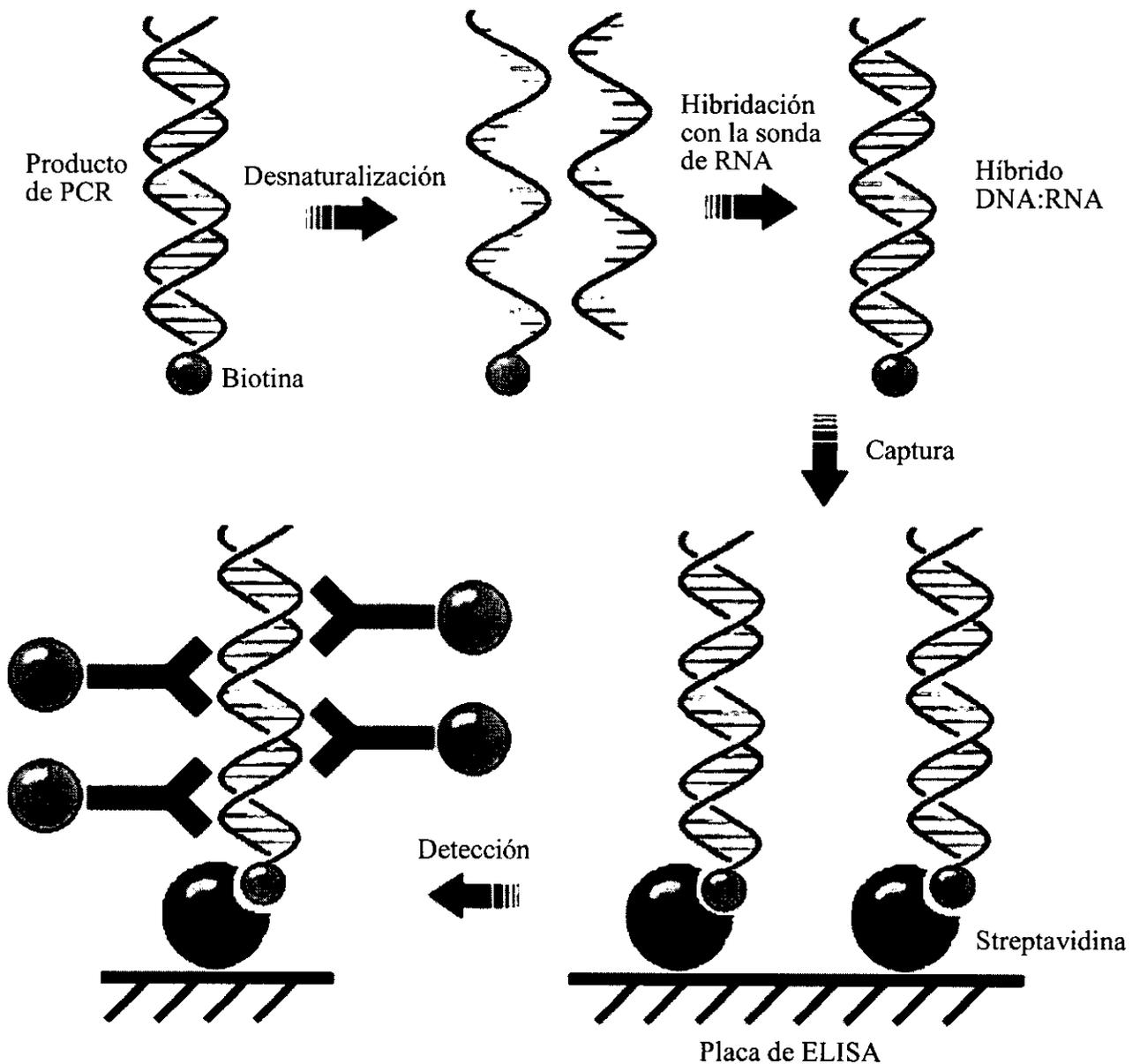


Figura 3. Sistema de señal SHARP™. Los productos de PCR son desnaturalizados e hibridados a una sonda RNA sin marca. Los híbridos DNA:RNA son capturados en una placa cubierta con estreptavidina. La detección se hace con un anticuerpo específico para híbridos DNA/RNA y conjugado con fosfatasa alcalina.

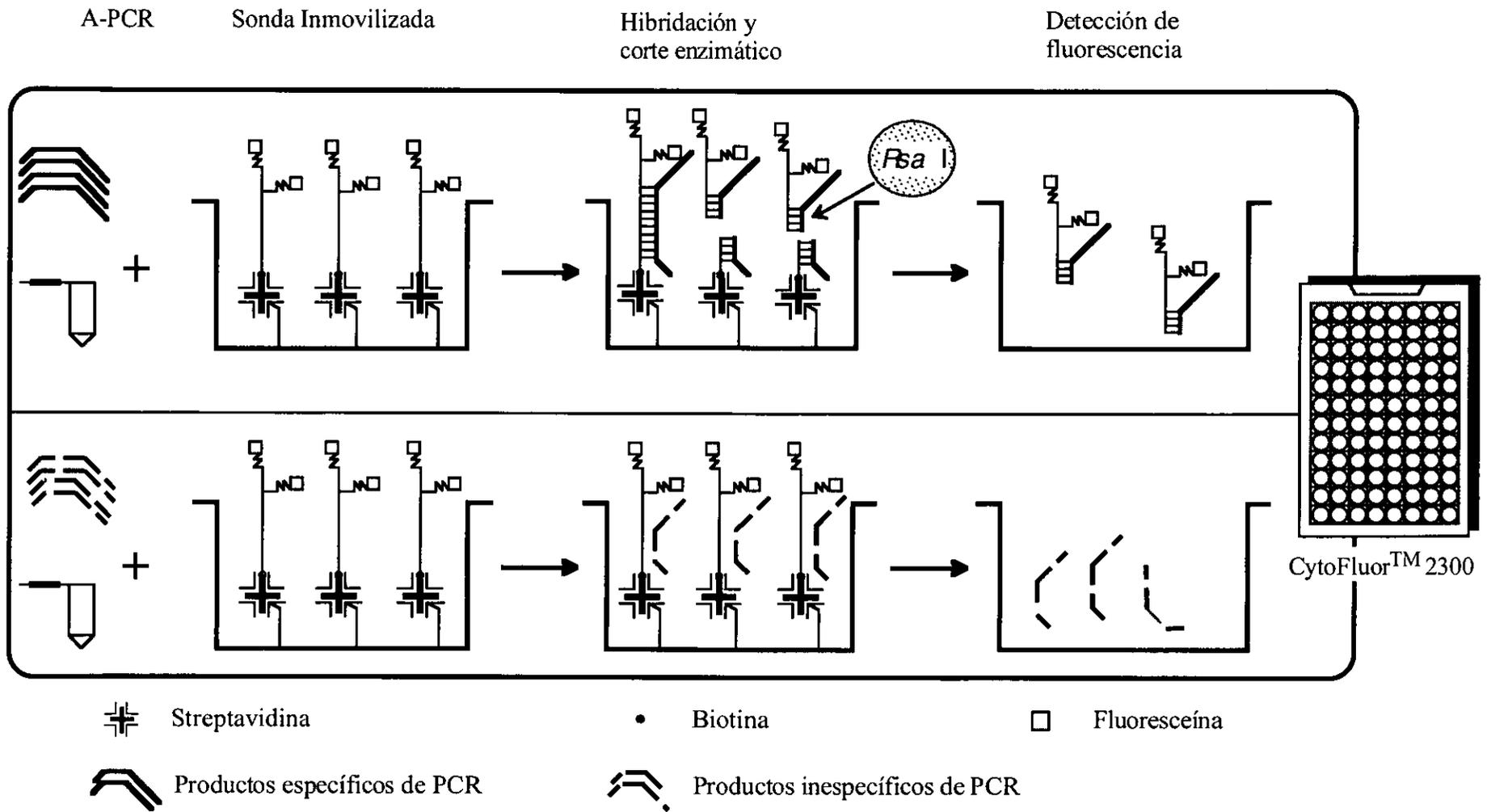
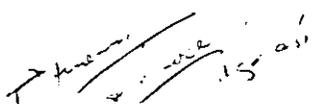


Figura 4. PCR-HERA



número de lavados parece ser proporcional al número de sus componentes (anticuerpos múltiples y varias enzimas de enlace al híbrido capturado). Finalmente el sistema SHARP™ (figura 3), similar en esquema al anterior, sólo que la biotina para la captura del híbrido DNA:RNA es introducida desde el paso de la amplificación del DNA y no durante la transcripción del RNA. Este método promete sensibilidades 100 veces mayores a las de la tinción con bromuro de etidio en geles de agarosa y es adaptable a cualquier blanco con sólo cambiar la sonda de RNA. Sin embargo el número de pasos del método (es necesario generar el RNA por transcripción de plásmidos y posteriormente purificarlo y además la detección incorpora numerosas incubaciones, transferencias y lavados) hacen que este método, aunque ha alcanzado niveles de comercialización, sea un poco engorroso. Para detectar un reducido número de moléculas, los tiempos de incubación se alargan en demasía [10].

Recientemente fue publicado por nuestro laboratorio un elegante sistema de diagnóstico del parásito *Entamoeba histolytica* con una buena eficiencia de detección, basado en el formato ELISA, en el cual no se realizan lavados y sólo se requiere una transferencia de material de la placa de reacción a la placa de detección (figura 4) [11]. El método consiste en la generación de un sitio de corte para una enzima de restricción por hibridación del blanco (producto de PCR de cadena sencilla) con una sonda fluoresceinada anclada a la superficie de la placa. Después del corte enzimático, los fragmentos fluoresceinados liberados son transferidos a otra placa y la emisión de fluorescencia registrada. Teniendo la placa de reacción, con la sonda de captura inmovilizada, previamente preparada y conservada en trealosa, el ensayo es sencillo, rápido y eficiente.

Sistemas Fluorescentes de Detección.

A pesar de que en 1987 Morrison *et al.* propusieron varios modelos de detección de nucleicos utilizando las ventajas de los sistemas homogéneos, en los cuales las propiedades medibles de la marca fluorescente cambian al hibridarse la sonda y el blanco (figura 5) [12], hasta la fecha de inicio de este proyecto no había sido publicado ningún ensayo concreto de detección de productos de PCR empleando esta opción. Esto podía ser debido a los problemas vinculados a cada una de las variantes propuestas por Morrison. Por ejemplo, el análisis no competitivo obliga a una detección negativa (disminución de la emisión, evadida por todos), el competitivo exige un largo intervalo de tiempo destinado a la hibridación y el formato con intercalador requiere de elevado gasto de reactivos, pues además de las especies fluorescente y quenchedora, se necesita el compuesto intercalador.

El fundamento teórico de los métodos de detección por fluorescencia radica en las propiedades de los compuestos fluorescentes de emitir intensa radiación luminosa como respuesta a una previa excitación. El hecho de que las longitudes de onda de excitación y emisión sean diferentes (una parte de la energía absorbida es disipada en forma de calor durante las transiciones de los electrones

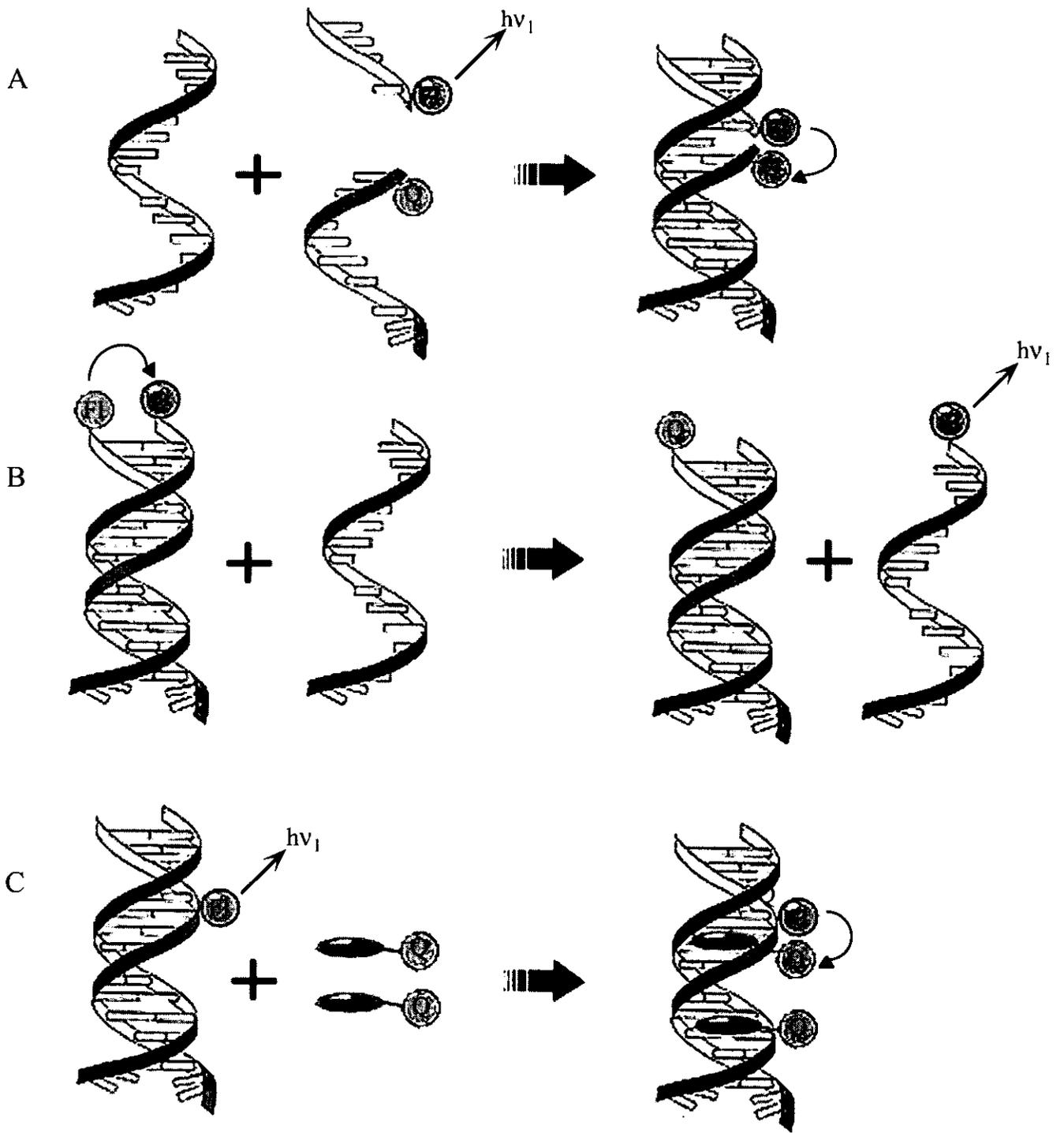


Figura 5. Detección de ácidos nucleicos por hibridación con sistemas fluorescentes.

A: formato no competitivo.

B: formato competitivo.

C: formato con intercalador.

excitados a niveles energéticos inferiores) permite de una manera prácticamente limpia detectar la componente de emisión de un número importante de fluoróforos.

Las propiedades de emisión de energía de estos compuestos están en estrecha relación con determinadas condiciones del alrededor químico, como son la polaridad del solvente, el pH del medio acuoso y/o la proximidad de especies extintoras (quenchers). Esta última propiedad es la más explotada a la hora de detectar interacciones moleculares, puesto que al acercar o alejar dos especies es mucho más fácil modificar el ambiente molecular que afectar a los otros componentes del ambiente químico.

De manera general el quenching puede ser definido como un proceso bimolecular (al menos) que reduce el rendimiento cuántico de la fluorescencia sin modificar el aspecto del espectro de emisión fluorescente. Las causas más comunes que originan el quenching son: las interacciones entre los estados excitados de transición (eximers), la formación de especies no fluorescentes de base (p.e. dímeros) y la transferencia de energía a especies no fluorescentes o con máximos de emisión a longitudes de onda mucho mayores que el máximo de la especie quencheada.

Dos cuestiones son exigidas del par fluoróforo-quencher a ser utilizado en un sistema de detección de productos de PCR. Primero, las dos especies tienen que ser espectralmente diferentes, esto es, sus máximos de emisión deben estar a longitudes de onda lo suficientemente separadas, que puedan ser fácilmente discriminadas sus emisiones (o alternativamente, se puede seleccionar un quencher no fluorescente). Segundo, el apagado de la fluorescencia por el quencher en la sonda original (antes de la interacción con el blanco) debe ser lo suficientemente completo como para permitir la detección de incrementos en la fluorescencia a las concentraciones de productos de PCR que son normalmente generadas.

El empleo de especies fluorescentes y sus quenchers permite de manera relativamente sencilla realizar análisis en los cuales la separación física entre las dos especies esté mecánicamente ligada a la hibridación de la sonda con el blanco. Resulta sorprendente que esta ventaja haya sido aprovechada en la práctica en sólo tres ocasiones (incluyendo la descrita como parte de este trabajo), que los tres sistemas sean posteriores a 1993 (siete años después de publicadas las propuestas de Morrison) y aún más, que los tres sistemas utilicen el mismo principio: el empleo de sondas estructuradas con especies fluorescentes incorporadas.

Moléculas estructuradas como sondas.

El primer reporte de un ensayo homogéneo para la detección específica de secuencias de ácidos nucleicos empleando el principio del quencheo en sondas estructuradas fue el de Bagwell *et al.* en 1994 [13]. Este grupo diseñó una molécula denominada sonda UniFluor consistente en un oligonucleótido con una doble estructura de tallo y asa que, al ponerse en contacto con determinadas secuencias, cambia su conformación con un consecuente incremento en la fluorescencia. Este

incremento es debido a una separación inducida de fluoresceínas conjugadas con la subsecuente ruptura de una geometría que favorecía el quencheo por la formación del dímero ó trímero no fluorescente (figura 6). La sensibilidad de esta sonda a temperatura de salón se reporta como de 10-40 fmoles de blanco, aunque su diseño fue dirigido hacia blancos poly-A/poly-dA y su efectividad para detectar secuencias aleatorias no ha sido demostrada.

En 1989, Kramer y Lizardi propusieron el diseño de moléculas capaces de efectuar cambios conformacionales predefinidos en respuesta a interacciones específicas con moléculas efectoras (switches moleculares) [14]. La idea es la siguiente: moléculas de DNA de cadena sencilla con estructura de tallo y asa (figura 7) son diseñadas de manera tal que la región del asa funciona como una sonda complementaria a una secuencia predeterminada en el ácido nucléico blanco, mientras que el tallo es formado por la hibridación de dos brazos complementarios, relativamente cortos, ubicados a ambos lados de la secuencia sonda (asa) y que son irrelevantes para la secuencia blanco. Cuando esta molécula encuentra a la molécula blanco, la región del asa forma un híbrido que es más largo y más estable que el híbrido formado por las secuencias del tallo. Debido a la relativa rigidez de la doble hélice de DNA, la formación del híbrido sonda:blanco excluye la existencia simultánea del tallo formado por la hibridación de los dos brazos. De esta manera, ante la presencia de la secuencia blanco, la sonda sufre un cambio conformacional espontáneo que fuerza la separación de los brazos.

El principio de funcionamiento de los switches moleculares fue utilizado en 1996 por Tyagi y Kramer para el diseño de sus faros moleculares (molecular beacons). En un switch molecular fueron introducidos un par fluoróforo/quencher conectados por separado al extremo de cada brazo del tallo empleando una molécula espaciadora. En este caso, al producirse el cambio conformacional de la sonda en interacción con el blanco y separarse los brazos del tallo, el fluoróforo y el quencher son alejados y por lo tanto el fluoróforo fluoresce al iluminarse con luz ultravioleta. La enorme ventaja de este sistema radica en que las moléculas de sonda no hibridadas se encuentran apagadas y por lo tanto no es necesario eliminarlas del medio (los molestos lavados) para detectar a las moléculas de sonda que sí han hibridado (figura 7) [15]. Esto permite diseñar un sistema de detección totalmente homogéneo. Tyagi y Kramer optimizaron su modelo para concentraciones de catión bivalente ($MgCl_2$) de $1mM$, en las cuales un tallo relativamente corto se ve altamente estabilizado (la T_m medida de un 13-mero en ausencia de magnesio fue de $27^\circ C$, mientras que en $1mM$ de $MgCl_2$ resultó ser de $56^\circ C$). Esta variante permite el uso de secuencias relativamente cortas para el diseño de las sondas.

El principio empleado por Tyagi y Kramer es exactamente el mismo principio planteado al comienzo de nuestro trabajo.

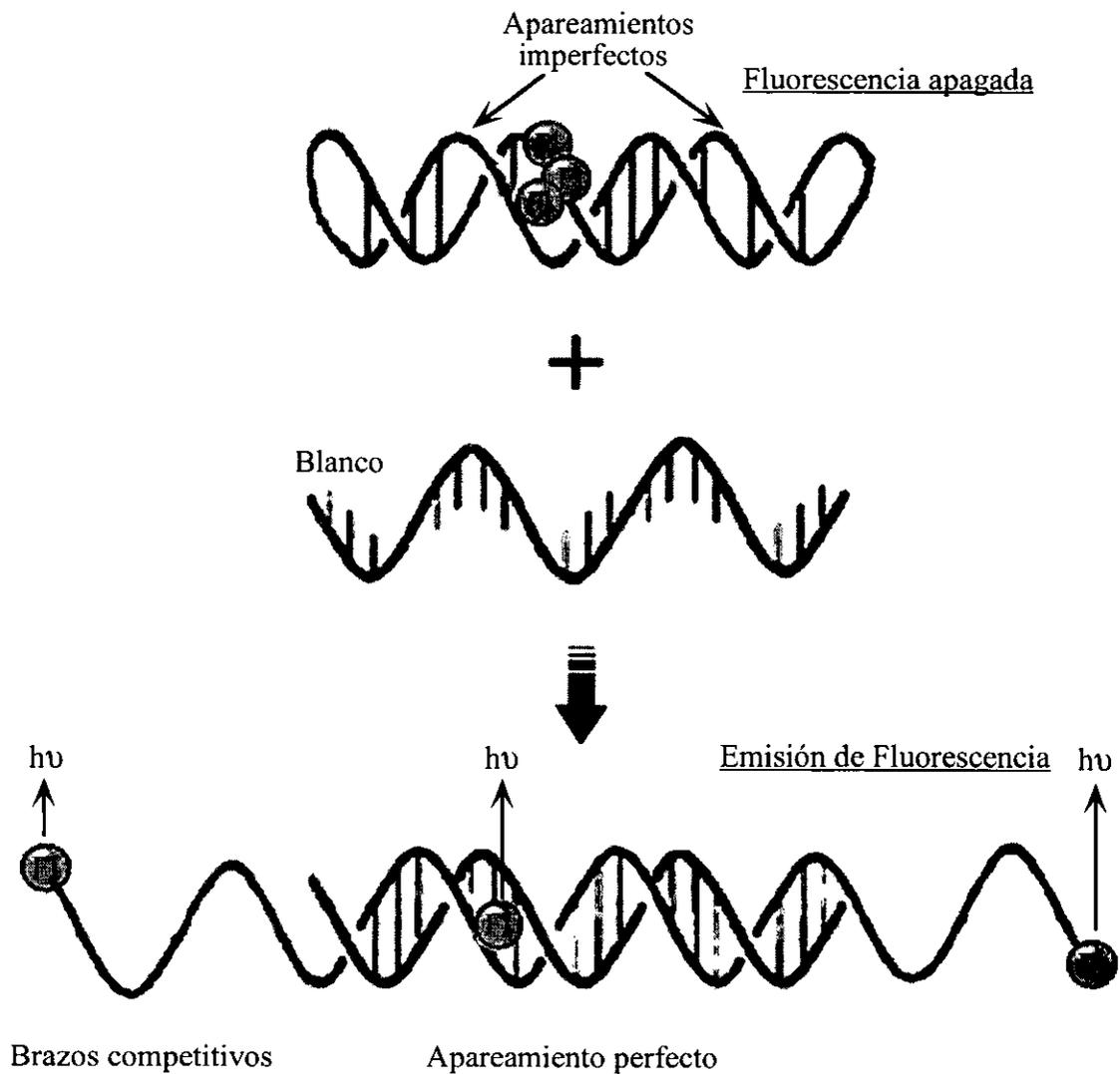


Figura 6. Estructura y funcionamiento de la sonda UniFluor.

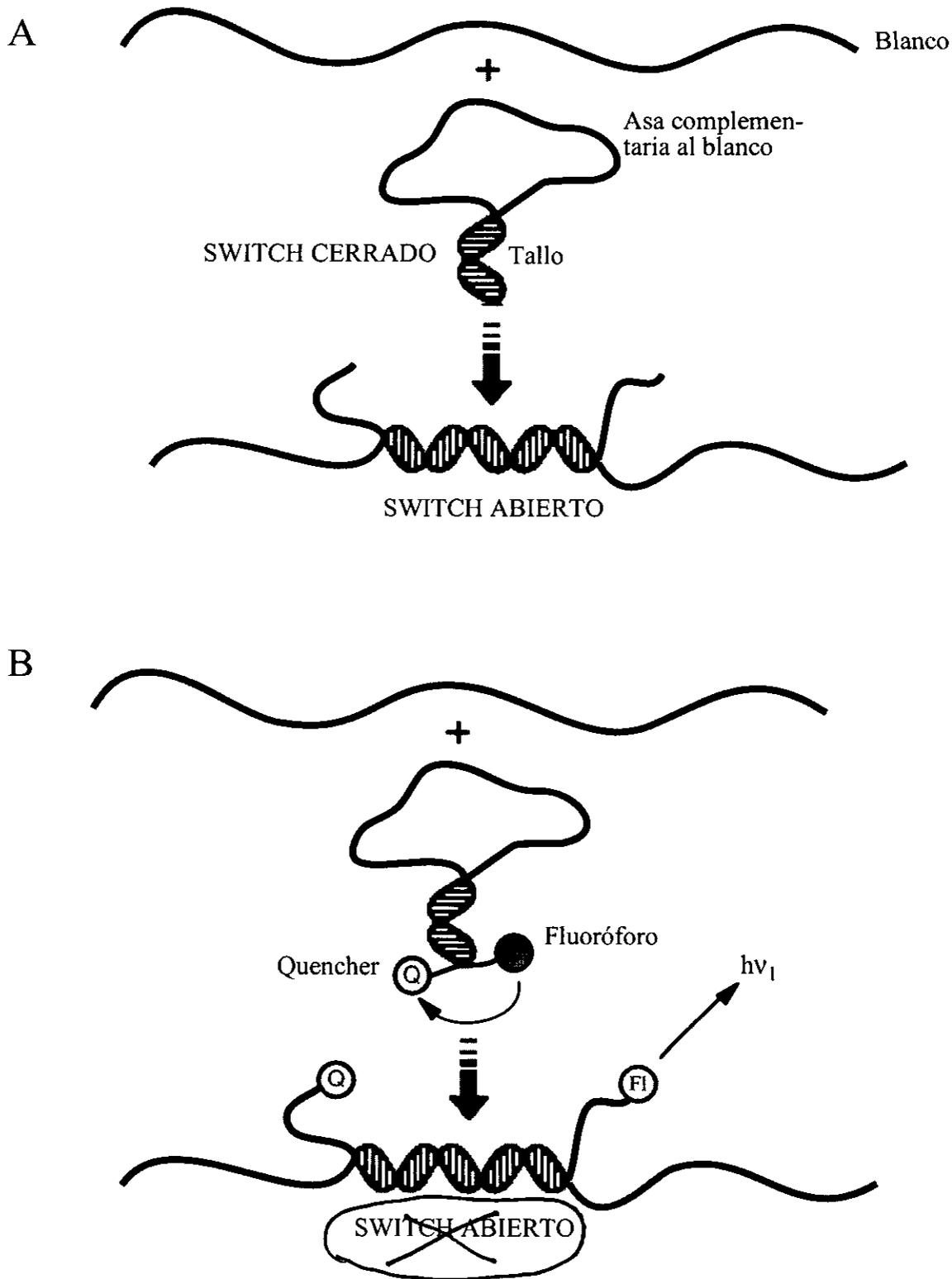


Figura 7. Cambios conformacionales en los DNAs con estructura de tallo y asa.

A: Esquema de funcionamiento del switch molecular.

B: Esquema de funcionamiento del faro molecular.

PNA.

Resulta paradójico pensar que el DNA o el RNA necesitasen ser reemplazados o mejorados. Después de todo, estos dos ácidos nucleicos han desempeñado una labor excepcional durante miles de millones de años en sus roles tradicionales de codificación y transmisión de la información genética. Sin embargo, con el advenimiento de la biomedicina moderna y su enfoque de utilizar fragmentos de DNA o RNA para bloquear o combatir genes nocivos, se ha visto que los compuestos naturales no siempre dan los resultados deseados, ya que son degradados rápidamente en el cuerpo y además no se unen a sus blancos tan eficientemente como sería deseable. El primer reporte de que los oligonucleótidos pueden suprimir significativamente la expresión de genes de forma específica al unirse como antisentido a una secuencia complementaria de RNA mensajero [16] implicó un enorme reto para los químicos que vieron la necesidad de enfocarse a la síntesis de análogos de DNA más eficientes. El objetivo era (y sigue siendo) la construcción de análogos adecuados para el desarrollo de drogas antisentido. El paso inicial consistía en el diseño de análogos biológicamente estables (resistentes a nucleasas) que mantuvieran las características de unión por hibridación a RNA, propias del DNA natural, y que además pudieran ser internalizados por las células.

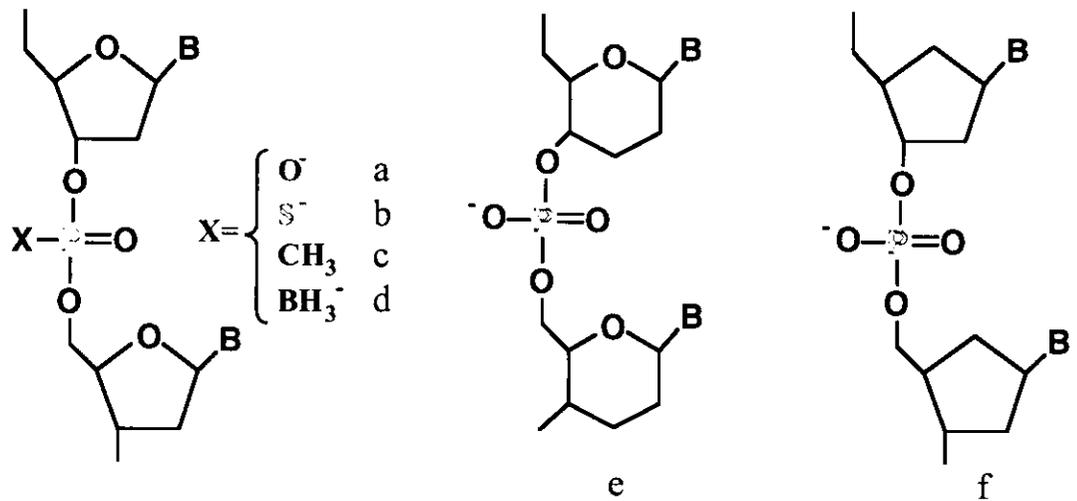
Químicamente hablando, el DNA consta de subunidades, cada una de las cuales está formada por una nucleobase (adenina, citosina, guanina y timina) unida a una pentosa (desoxiribosa) por un enlace glicosídico. Las subunidades están ligadas entre sí a través de los anillos del azúcar mediante consecutivos enlaces tipo éster formados con grupos fosfatos. De aquí que las modificaciones hasta ahora generadas en los análogos de DNA se dividan en tres grupos según la zona que involucran: la nucleobase, el azúcar o el fosfato diéster.

Durante los últimos 20 años, numerosos análogos de DNA han sido sintetizados. Esta es aún un área intensamente activa. Sin embargo, en la gran mayoría de los casos, los esfuerzos se han dirigido a la generalmente engorrosa tarea de la síntesis química de estos compuestos. Sólo en contadas ocasiones se ha alcanzado el nivel que permite una evaluación más exhaustiva de las propiedades bioquímicas, biológicas y farmacocinéticas de los análogos generados.

De los análogos generados por modificaciones del grupo fosfato, los más estudiados son los metilfosfonatos (figura 8 Ac) y muy especialmente los fosfortioatos (figura 8 Ab). Las primeras drogas que alcanzaron pruebas clínicas fueron desarrolladas a partir de estas moléculas. Otras modificaciones menos efectivas incluyen los fosforamidatos, los fosforoditioatos y los fosforotriéteres. De los análogos descritos recientemente, los boranofosfatos (figura 8 Ad) parecen llamar la atención por sus propiedades interesantes, aplicables a la tecnología de DNA. También ha sido reportada la síntesis enzimática de un análogo en el cual el oxígeno 5' es reemplazado por un grupo metileno. Al ser resistente a nucleasas posee un buen potencial como antisentido.

Varios laboratorios se han propuesto estrategias que involucran la substitución de la ribosa del esqueleto. Estas modificaciones incluyen por ejemplo el cambio por hexosas (homo-DNA) y

A



B

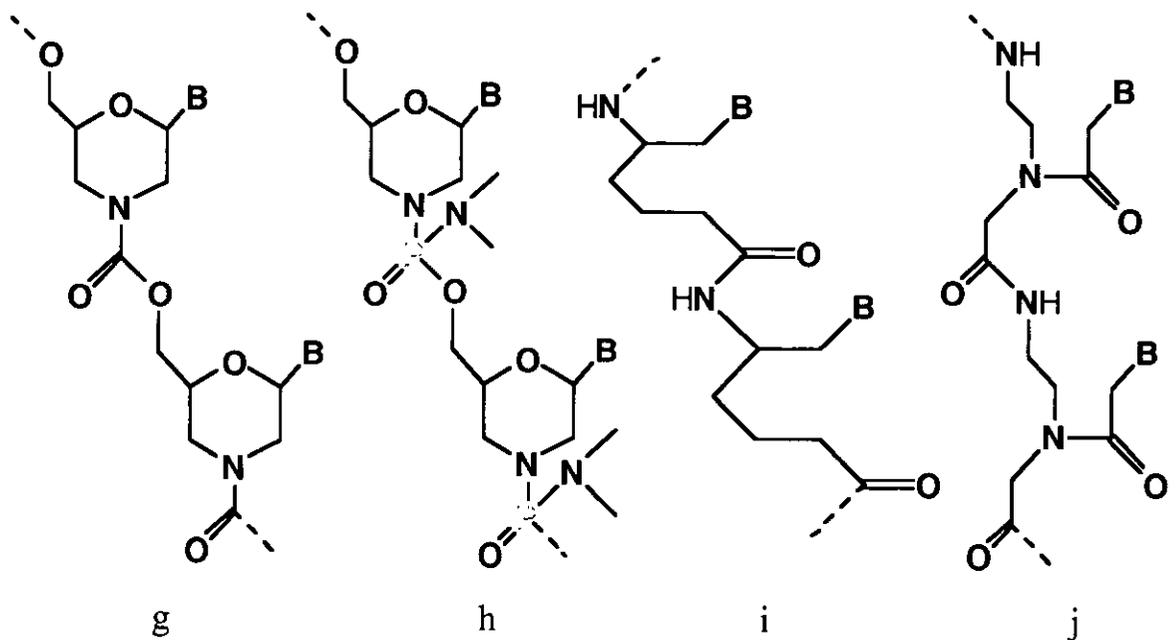


Figura 8. Análogos de DNA I.

A: Modificaciones del grupo fosfato: a=DNA con fosfodiéster normal; b=fosforotioato; c=metilfosfonato; d=boranofosfonato; e=homo-DNA; f=DNA pentacarbocíclico.

B: Substituciones del esqueleto de desoxiribosofosfato: g,h=derivados morfolinicos; i=esqueleto amídico; j=ácido péptido nucleico (PNA).

otros esqueletos fosfodiésteres derivados de carboxiciclos (figura 8 Ae y Af). Los resultados han mostrado que aunque algunos de estos compuestos mantienen la propiedad de hibridar con DNA, su comportamiento a nivel estructural es muy diferente al del DNA, ya que forman híbridos lineales. Otros exhiben apareamientos entre las bases totalmente alterados.

La mayor parte de los esfuerzos sintéticos de muchos laboratorios están dirigidos a la imitación de toda la cadena fosfodiéster (incluyendo al grupo 5' metileno de la desoxiribosa) con el objetivo de crear un esqueleto de carga neutral (para incrementar la estabilidad de complejo híbrido con el DNA), relativamente hidrofóbico (para mejorar el transporte a las células) y aciclico (para lograr la pureza química). Se habla aquí de la sustitución de cuatro átomos en cadena que puede ser obtenida de muy diversas maneras, dependiendo del ingenio y la habilidad del químico. Las modificaciones reportadas al presente incluyen alcanos, éteres, tioéteres, aminas, cetonas, formacetales, tioformacetales, amidas, carbamatos, ureas, hidroxilaminas, sulfamatos, sulfamidas, sulfonas, glicinilamidas y otras (figura 9). A pesar de la gran variedad de grupos empleados, sólo una pequeña parte de los arriba mencionados imitan de manera adecuada a la unión fosfodiéster.

La gran cantidad de información generada con estos compuestos ha permitido deducir una serie de reglas o parámetros a ser considerados a la hora de diseñar análogos de DNA: geometría, flexibilidad e hidrofobicidad. La geometría correcta es obviamente esencial, ya que los parámetros helicoidales del apareamiento entre bases están determinados por el tipo de doble hélice, A, B o cualquier otra forma intermedia; siendo así que la flexibilidad conformacional de dos azúcares conectados es limitada. Esto permite en un momento inicial descartar cualquier estructura que no sea estéricamente razonable. Por otro lado, el esqueleto debe ser flexible para poder adoptar la conformación adecuada. Finalmente, la hidrofobicidad de la unión juega un papel importante, ya que la solubilidad del análogo depende totalmente de la solubilidad del esqueleto, en vista de que las bases son en sí de naturaleza bastante hidrofóbica.

Sólo unos pocos intentos de substituir el esqueleto de (desoxi)ribosofosfatos completamente, manteniendo exclusivamente las nucleobases, han tenido éxito. Uno de ellos involucra la conversión de los ribonucleósidos en los correspondientes compuestos morfolínicos y su oligomerización mediante uniones de tipo carbamato (figura 8 Bg y Bh). Estos compuestos han demostrado un buen potencial como antisentido, pues forman híbridos estables con oligonucleótidos complementarios en ensayos *in vitro*.

Análogos con esqueletos amídicos o peptídicos han sido también diseñados (figura 8 Bi y Bj). El de mayor relevancia hasta la fecha, ha sido sin duda alguna el PNA (ácido péptido nucleico), creación de los químicos Peter Nielsen, Michael Egholm, Ole Buchardt y Rolf Berg de la Universidad de Copenhague en Dinamarca. Este grupo experimentaba con análogos de DNA sintetizados a partir de monómeros con esqueleto de tipo aminocarboxílico, que les permitían aprovechar la versatilidad de la síntesis de péptidos (diseños relativamente fáciles de esqueletos aciclicos y producción en gran escala). De esta manera diseñaron los PNAs, moléculas en las que

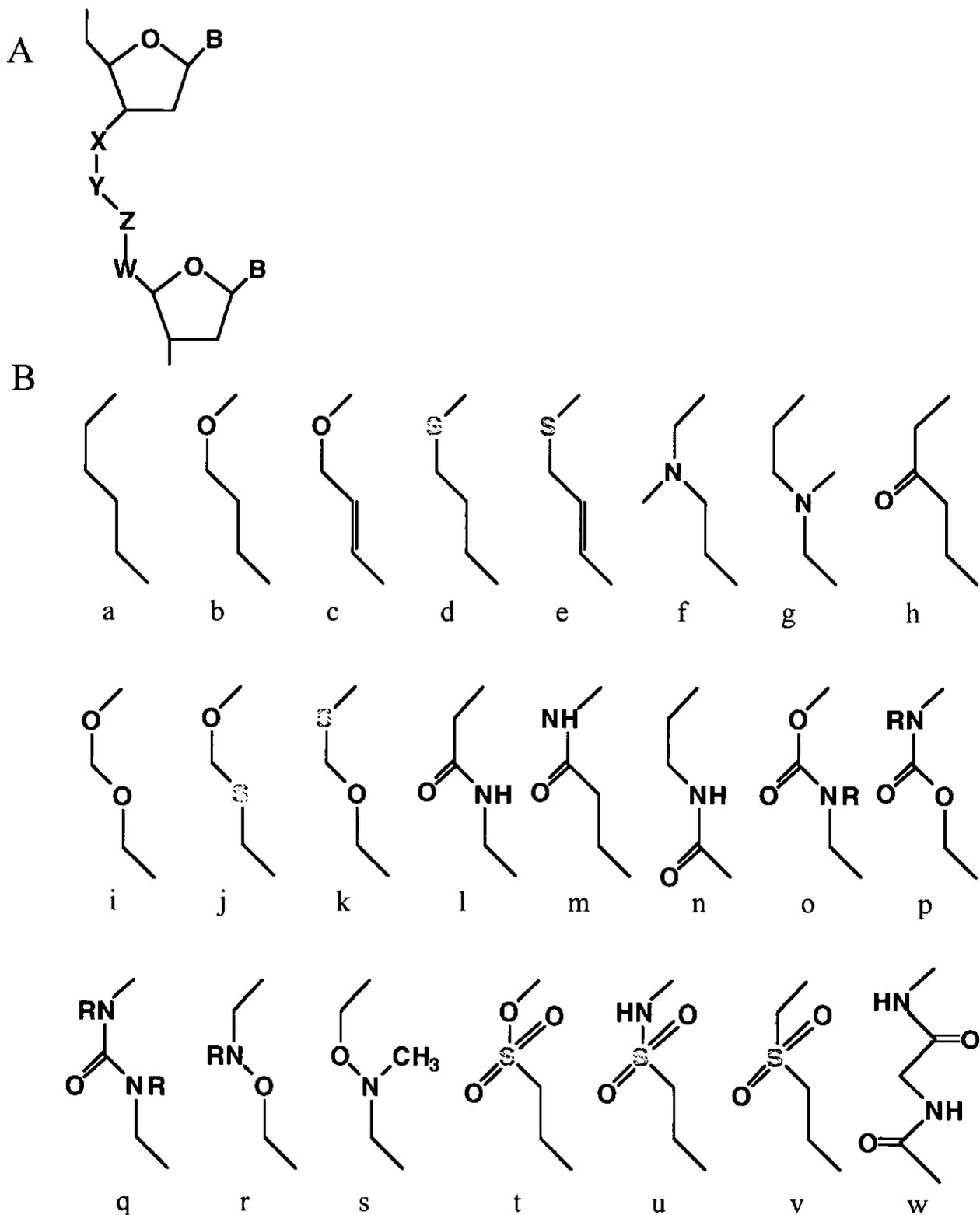


Figura 9. Análogos de DNA II.

A: La unión fosfodiéster (incluyendo al metileno 5' de la ribosa) consiste de cuatro átomos (indicados como X, Y, Z y W).

B: Modificaciones: a=alcano; b,c=éteres; d,e=tioéteres; f,g=aminas; h=cetona; i=formacetal; j,k=tioformacetales; l-n=amidas; o,p=carbamatos; q=urea; r,s=hidroxilaminas; t=sulfamato; u=sulfamida; v=sulfona; w=glicinilamida

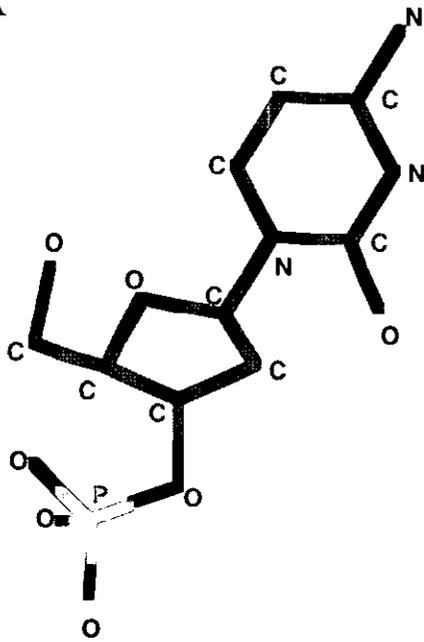
las nucleobases individuales eran interconectadas a un esqueleto aciral de tipo peptídico [17]. La distancia adecuada entre las bases fue estimada mediante la desarticulación del esqueleto de una de las hebras de un duplex de B-DNA en un modelo computacional, y reemplazándolo con diferentes aminoácidos. Así encontraron que la distancia óptima entre las nucleobases era de 6 enlaces (la misma que existe en el DNA) y que el número de enlaces óptimo entre la base y el esqueleto era de 2 ó 3 [18]. Esto indicaba que un esqueleto de (2-aminoetil)glicina unido a la base por un mediador metilencarbonílico podía ser usado. Este esqueleto sería homomorfo con el de desoxiribosofosfato del DNA y tendría un alto grado de flexibilidad conformacional restringida debido a los dos grupos amido por subunidad (figura 10). En un principio fue sintetizada una molécula polyT y pronto fueron incluidas las otras tres bases. Nació así el Acido Péptido Nucleico.

Los primeros estudios realizados con moléculas de PNA revelaron propiedades sin precedentes de estos análogos de DNA. Fue demostrado que el PNA es capaz de reconocer una secuencia específica (complementaria) de DNA e interactuar con ésta, desplazando la cadena homóloga, formando lo que se conoce como asa tipo D (figura 11 A). Este fenómeno es conocido como invasión de DNA. Los trabajos iniciales en este sentido se restringían al uso de cadenas con regiones de polipurinas-polipirimidinas. Más tarde se comprobó que secuencias con tendencia a la formación de estructuras diferentes a la forma B del DNA (repetidos invertidos [19] y repetidos de tripletes [20] son blancos de reconocimiento particularmente adecuados, por lo que se demostró que la invasión de cadenas de DNA no está restringida a secuencias homopirimidínicas-homopurínicas. Estudios recientes han indicado que PNAs de secuencia mixta pueden invadir cadenas de DNA carentes de estructura secundaria, aunque con una cinética más lenta [21, 22]. Se ha establecido que las condiciones que favorecen el evento de invasión *in vivo* son la presencia de estructura secundaria en el blanco, el superenroscamiento, la transcripción y una baja fuerza iónica [23]. Este último parámetro es de singular importancia puesto que se determinó que concentraciones milimolares de cationes divalentes evitan la invasión de PNA *in vitro*, aunque, como referiremos más adelante, se ha reportado que la invasión puede ocurrir en condiciones cercanas a las fisiológicas [24].

Determinadas secuencias de PNA, capaces de formar triple hélice, pueden añadir dos cadenas al duplex de DNA: una en dirección antiparalela (el extremo aminoterminal del PNA complementario al 3' del DNA) con hibridación de tipo Watson-Crick y la otra en dirección paralela (el extremo aminoterminal del PNA complementario al 5' del DNA) a la hebra de DNA, mostrando interacciones de tipo Hoogsteen (figura 11 B) [25]. También en este caso una de las hebras de DNA es desplazada.

Recientemente se extendió el repertorio de reconocimiento de los ácidos péptido nucleicos. Se comprobó la formación de un triplex con un PNA homopirimidínico rico en citosinas con características diferentes a las de los anteriores [26]. Las propiedades de reconocimiento del PNA fueron enmarcadas en las siguientes reglas de unión a DNA de cadena doble: 1.- los PNAs homopirimidínicos invaden al dsDNA para formar PNA₂-DNA triplexes; 2.- los PNAs ricos en

A



B

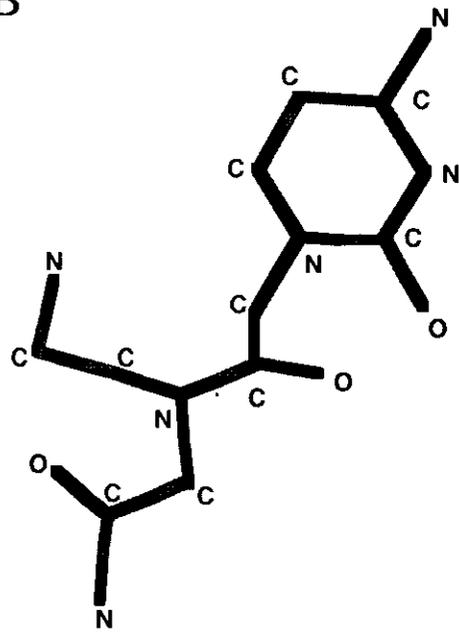
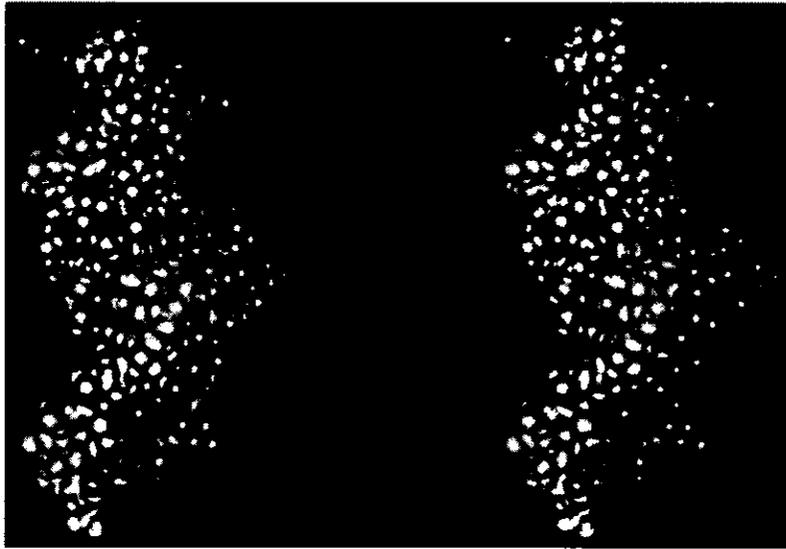


Figura 10. Resultado de la minimización de energía para un nucleótido de DNA (A) y un monómero de PNA (B) con el programa Alchemy (TRIPOS Associates, Inc.). La geometría de ambas especies es sorprendentemente similar.

A



B



Figura 11. Complejos de PNA con DNA.

A: Vista estereoscópica de un 16-ámero de DNA de cadena doble después de la invasión de un 10-ámero de PNA. La cadena de PNA es antiparalela a su complementaria de DNA.

B: Una segunda cadena de PNA se une al complejo anterior para formar una triple hélice. El nuevo PNA es antiparalelo con respecto al primero.

purinas pueden invadir el dsDNA formando duplexes PNA-DNA; y 3.- los PNAs pirimidínicos ricos en citosina se pueden añadir directamente al dsDNA para formar PNA-DNA₂ triplexes.

El hecho de que el PNA sea capaz de desplazar al DNA homólogo para hibridar con su complementario, evidencia que la interacción del PNA con el DNA es significativamente más fuerte que la propia interacción DNA:DNA, propiedad que se justifica por el hecho de que en el híbrido PNA:DNA no existe repulsión electrostática entre las dos cadenas (el PNA es una molécula neutra), por la existencia de enlaces por puente de hidrógeno interresiduales que añaden estabilidad (figura 12), y por la elevada flexibilidad del esqueleto poliamídico. La diferencia es notoria: en un híbrido aleatorio PNA:DNA el incremento en la estabilidad térmica sobre la del DNA:DNA correspondiente es de aproximadamente 1.0-1.5°C por par de bases en condiciones fisiológicas de fuerza iónica, lo que representa una afinidad por el DNA (y el RNA) unas 50-100 veces mayor que la del DNA [17]. Aún más, se ha demostrado que dos hebras complementarias de PNA pueden hibridar entre sí y formar un duplex helicoidal de una estabilidad sin precedentes: la T_m es de 67°C para un decámero, contrastando con la T_m del híbrido PNA:DNA correspondiente (51°C) y más aún con la del duplex DNA:DNA (33.5°C) [27]. Es necesario hacer notar que no se requiere de la presencia de sales para que se establezca la interacción entre el PNA y su complementario, ni aún para estabilizarla, al contrario de lo que sucede con los nucleicos naturales. La T_m de un dúplex de PNA:DNA varía muy poco al aumentar la fuerza iónica del medio hasta valores equivalentes a 1 M de NaCl (figura 13 A) [28]. Esta cualidad permite hibridar un oligómero de PNA con un blanco complementario en condiciones de fuerza iónica en las que la formación de híbridos DNA:DNA no es posible.

Otra de las propiedades de relevante importancia encontradas en este nuevo análogo de DNA es su alta capacidad de discriminar secuencias que no sean perfectamente complementarias de las que si lo son. La introducción de un cambio único en la región central de un oligonucleótido complementario de 15 bases provoca una disminución en la temperatura de fusión (T_m) de entre 8 y 20°C. Para todos los posibles pares de bases con apareamiento imperfecto, la disminución de la estabilidad térmica del complejo PNA:DNA es mayor que para la del par DNA:DNA, lo cual indica que la discriminación de secuencia del PNA reconociendo DNA es mayor que la del propio DNA reconociendo DNA (figura 13 B) [29].

La flexibilidad conformacional del PNA es tal que se ha determinado que los híbridos PNA:RNA adoptan una estructura de doble hélice con vuelta hacia la derecha y con apareamiento Watson-Crick muy similar al de la forma A de los híbridos RNA:RNA [30], mientras que el híbrido PNA:DNA adopta la conformación de la forma B, típica de los híbridos DNA:DNA [31].

Estas características del PNA han avalado su uso en numerosas aplicaciones. Una de las primeras y más elegantes fue su utilización en el denominado PCR clamping [32]. Esta técnica se basa en el hecho de que el PNA reconoce y se une a su secuencia complementaria de DNA con mayor estabilidad y especificidad que los desoxiribooligonucleótidos y, a diferencia de éstos, no

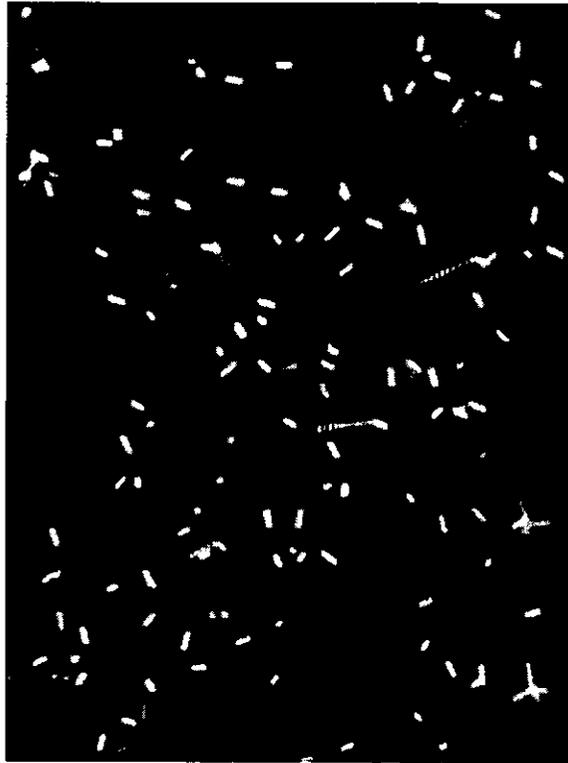
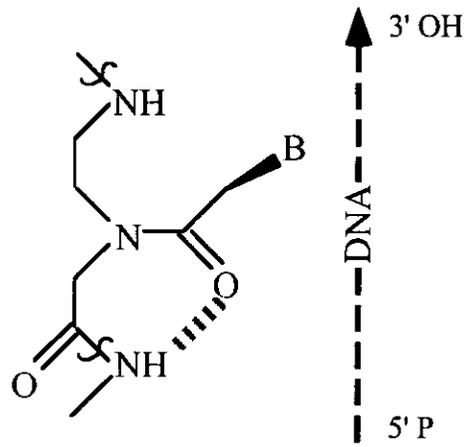
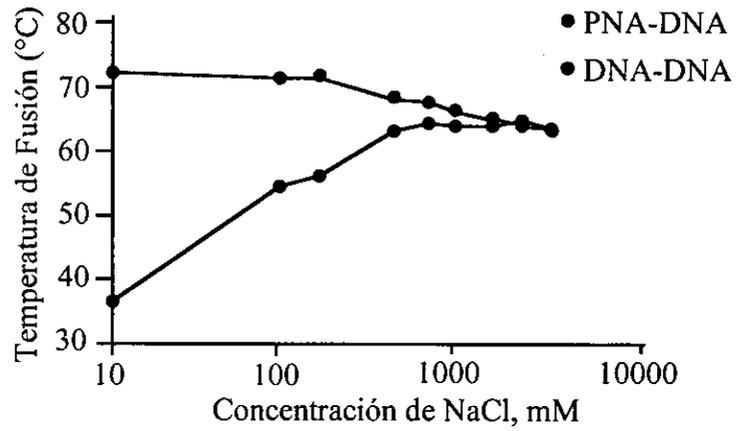


Figura 12. La formación de enlaces de hidrógeno interresiduales aumenta la estabilidad inherente a las estructuras helicoidales de PNA.

A



B

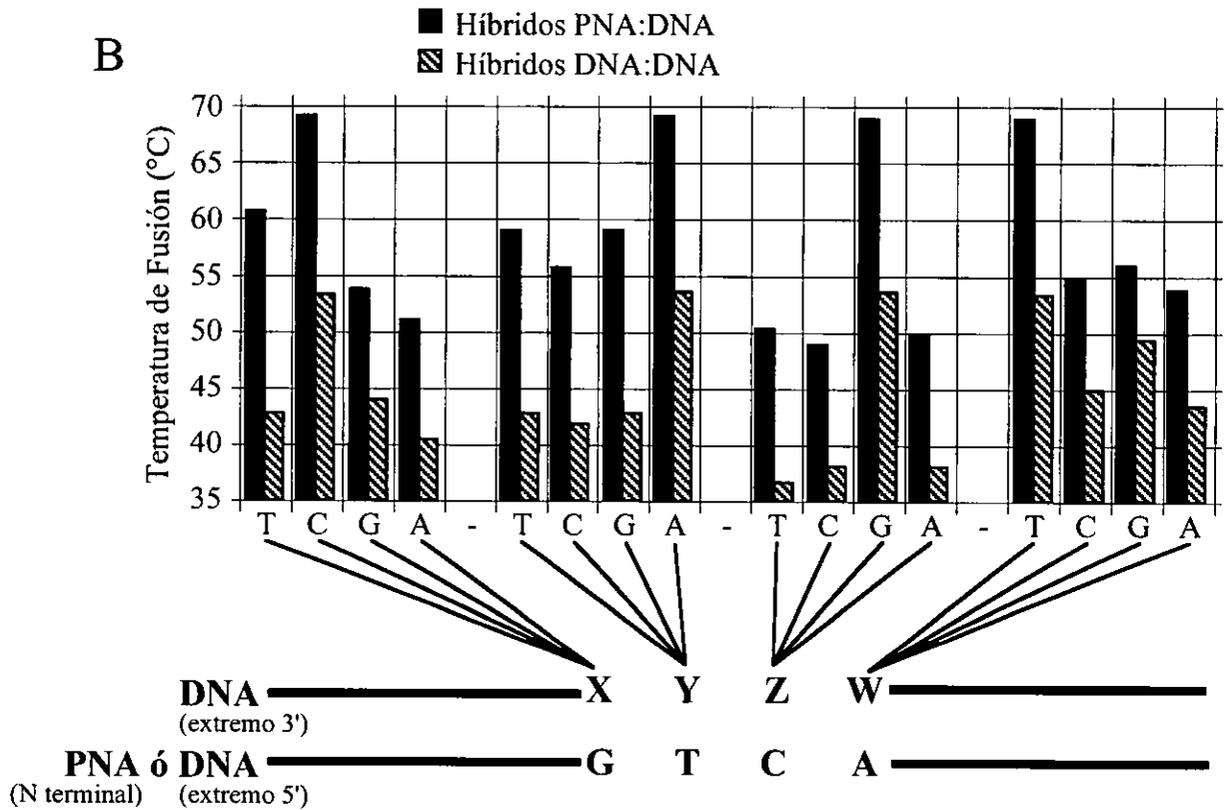


Figura 13. Propiedades del PNA.

A: Dependencia de la temperatura de fusión de la concentración de sal.

B: Comparación de la estabilidad de los híbridos PNA:DNA y DNA:DNA.

puede funcionar como primer para las DNA polimerasas. En este trabajo se mostró que el complejo PNA:DNA bloquea de manera efectiva la formación del producto de PCR y que este bloqueo permite la amplificación/supresión selectiva de secuencias que difieren en un solo par de bases (figura 14).

Otras tres aplicaciones interesantes reflejan el uso de moléculas de PNA durante el evento de transcripción *in vitro*. En el primer caso, el PNA al interactuar con la secuencia blanco (DNA de doble cadena) provoca el desplazamiento de la cadena homóloga y el asa generada es reconocida por la RNA polimerasa de *E. coli*, la cual inicia la transcripción desde el complejo PNA:DNA con una eficiencia comparable a la de un promotor fuerte. Esto implica que los blancos de PNA pueden ser considerados como promotores artificiales controlados positivamente por el PNA correspondiente, el cual funciona como un factor de transcripción (figura 15 I) [33]. En el segundo caso el PNA fue diseñado para hibridar en una región localizada por debajo de los promotores de los fagos T3 o T7 en la dirección de la transcripción. En este caso se demostró que la transcripción con T3 o T7 RNA Polimerasa era detenida (transcription arrest) en el sitio de unión al PNA si éste era dirigido a la hebra templado, cosa que no ocurría si se diseñaba el PNA para unirse a la hebra que no funciona como templado. Este trabajo mostraba un resultado inverso al del caso anterior: el PNA diseñado contra la hebra codificante funciona como un eficiente bloqueador de la transcripción (figura 15 II) [34]. La tercera aplicación del PNA en la transcripción involucraba su empleo para bloquear la interacción de factores de transcripción con secuencias regulatorias 5' y de esta manera regular específicamente la actividad de genes. Fue demostrado que la interacción del PNA con regiones regulatorias es suficiente para prevenir la transactivación transcripcional, tanto *in vitro*, como en células en cultivo transfectadas [35].

La observación de que el PNA no es reconocido por enzimas, ha sido eficientemente aprovechada para desarrollar un nuevo esquema de corte de genomas que permite generar fragmentos desde varios kilopares de bases (kpb) hasta unos pocos megapares de bases (Mpb), una necesidad constante desde que se hizo posible la clonación de fragmentos grandes de DNA. La técnica consiste en el diseño de grapas formadas por dos moléculas prediseñadas de PNA, unidas entre sí por un brazo (bis-PNA), que son capaces de unirse al DNA (formando una triple hélice) y proteger las regiones de unión de la acción de las metilasas. Después de la remoción del bis-PNA, el DNA metilado puede ser cortado cuantitativamente por enzimas de restricción en los sitios protegidos por las grapas. Este método recibió el nombre de PARC (PNA Assisted Rare Cleavage) (figura 16) [36].

Las propiedades antigénicas o antisentido del PNA *in vivo* han sido evaluadas desde su salida a la luz. En 1992 el grupo de Babiss demostró que al microinyectar el núcleo de células que expresan constitutivamente el antígeno T de SV40 (T-Ag) con PNAs de 15 o 20 bases dirigidos contra el mRNA del T-Ag, se suprime la expresión del mismo, siendo este un efecto específico [37]. Este mismo grupo determinó posteriormente que los PNAs inhiben la expresión del antígeno

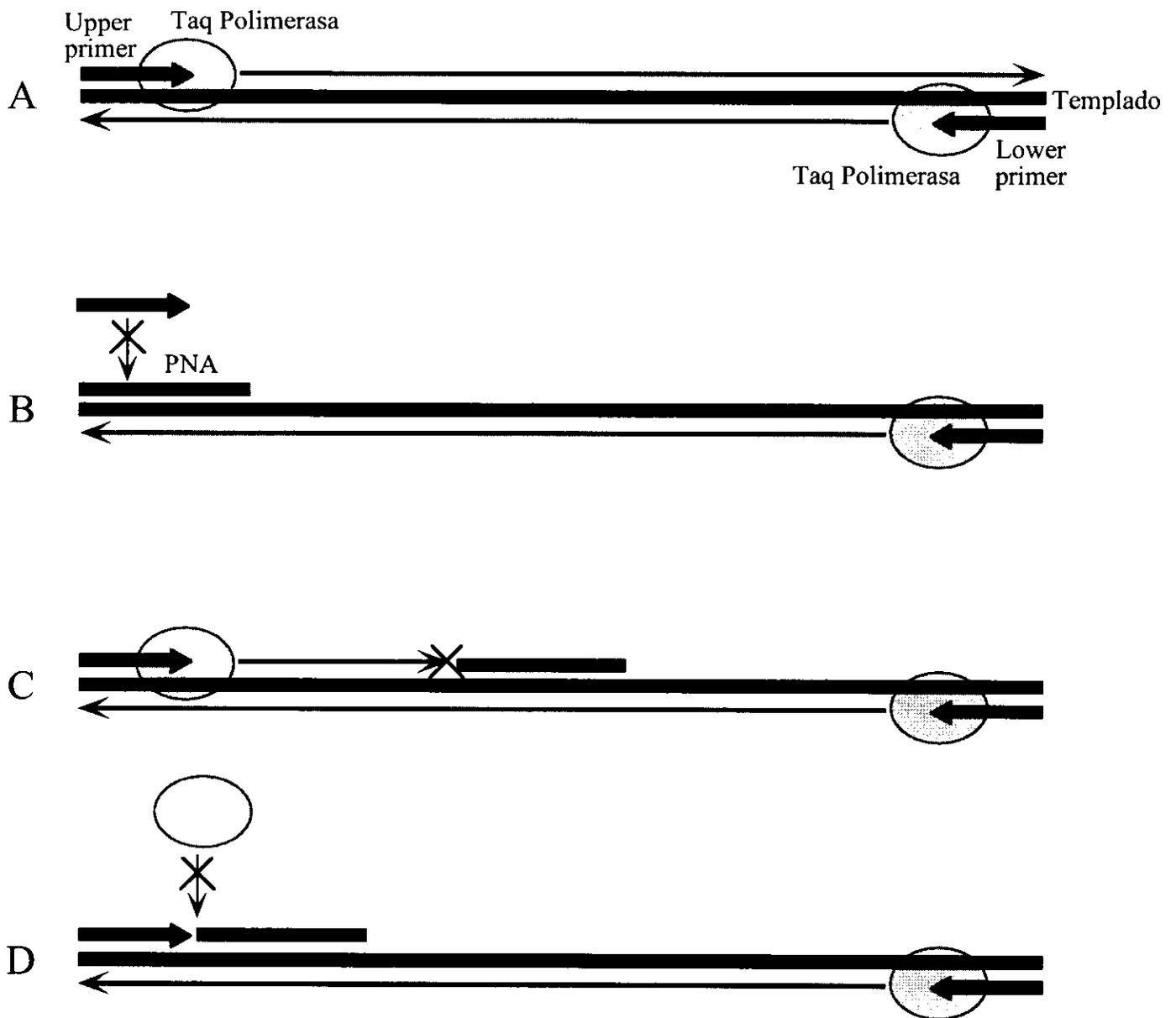


Figura 14. PCR "clamping".

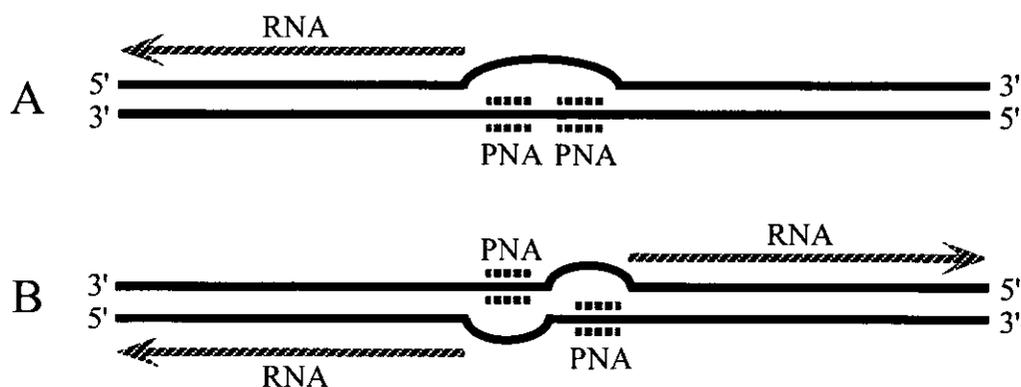
A: Reacción normal de PCR.

B: "clamping" por exclusión del primer.

C: "clamping" por obstrucción de la elongación.

D: "clamping" por bloqueo al acceso a la polimerasa y el inicio de la elongación.

I



II

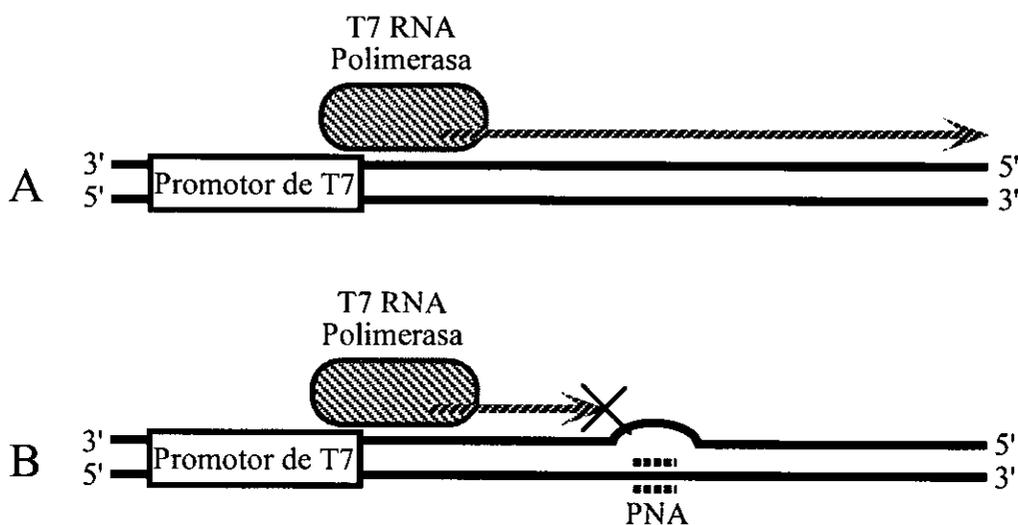


Figura 15. Aplicaciones contrarias del PNA en la transcripción.

I. Promotores artificiales de transcripción creados por desplazamiento de cadena con PNA.

A: Activación de la transcripción en un sentido.

B: Activación de la transcripción en los dos sentidos.

II. Bloqueo de la elongación por PNAs hibridados por debajo del promotor.

A: Transcripción normal.

B: Transcripción abortada.

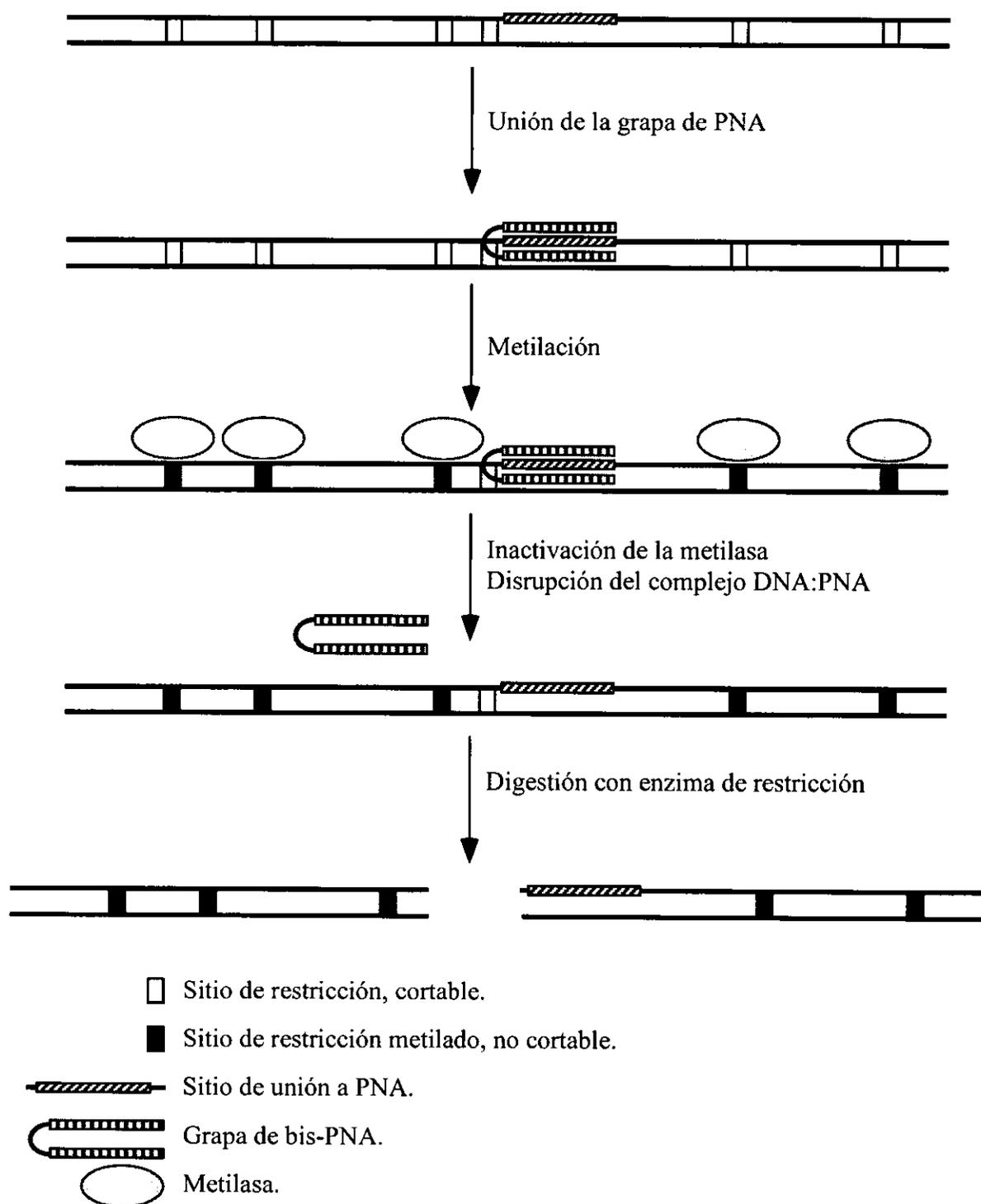


Figura 16. PARC (PNA Assisted Rare Cleavage), Cortes aislados asistidos por PNA.

T a través de un mecanismo antisentido. La concentración intranuclear de sales restringe la acción antigénica del PNA, ya que a alta sal se ve afectada la invasión del blanco de cadena doble de SV40 por los PNAs [38].

Recientemente fue corroborado que el PNA puede penetrar en los núcleos de células de cáncer prostático humano permeabilizadas con lisolecitina e inhibir de manera efectiva la transcripción de secuencias únicas localizadas por debajo del sitio de unión del PNA en el sentido de la transcripción, correspondientes al receptor de andrógeno (AR) y a la proteína de unión a cajas TATA (TATA-binding protein, TBP) [24]. Se mostró que el PNA no impide la transcripción de secuencias ubicadas por encima de su sitio de unión ni de otras secuencias contra las que no estaba diseñado. Este trabajo revela de manera clara el potencial del PNA como droga antigénica específica. La barrera que representa la internalización del PNA a las células intactas [39] comienza a ser superada mediante el uso de transportadores, secuencias peptídicas que funcionan como señales de translocación a través de membranas.

De singular importancia resulta la confirmación de que los ácidos péptido nucleicos, inmovilizados en superficies, conservan sus únicas y eficientes propiedades de hibridación, reportadas en estudios en solución. Los arreglos de PNA resultan por tanto potencialmente más ventajosos para el desarrollo de biosensores secuencia-específicos que sus contrapartes de DNA. Las ventajas incluyen una mayor sensibilidad y especificidad (además de una mejor discriminación de cambios puntuales en la secuencia), una hibridación más rápida (a temperatura ambiente y a altas temperaturas), una dependencia mínima de la fuerza iónica y la posibilidad de utilizar sondas relativamente cortas (10-15 bases) [40].

En 1997, Weiler et al. construyeron arreglos de hasta 1000 oligómeros de PNA de diferente secuencia inmovilizados en membranas empleando un equipo robótico diseñado originalmente para la síntesis de péptidos [41]. El análisis con productos de PCR generó una discriminación efectiva entre secuencias de DNA perfectamente complementarias y otras truncadas o con bases mal apareadas, con muy pocas excepciones. Este sistema permite perfilar aplicaciones importantes como la detección de mutaciones puntuales o el análisis de los patrones de expresión de genes mediante la hibridación de blancos muy complejos (como mRNA total) a arreglos de PNAs. Arreglos de más de 6000 secuencias podrían ser generados con esta misma tecnología, permitiendo, por ejemplo, analizar el set completo de genes de levadura.

Resulta muy tentador concluir que cualquier cosa que pueda el DNA hacer, el PNA lo hace mejor. Esto significaría sin embargo una simplificación, ya que los PNAs no pueden actuar como primers ni como templado de polimerasas y además no parece que tengan mucho potencial de interacción con las proteínas que reconocen a los ácidos nucleicos. Sin embargo, el creciente número de aplicaciones que esta novedosa molécula ha encontrado (figura 17), es un indicador de sus innegables ventajas en el reconocimiento de secuencias complementarias de DNA o RNA. Sin lugar a dudas, el empleo de los PNAs significa un importante avance en la rama del reconocimiento

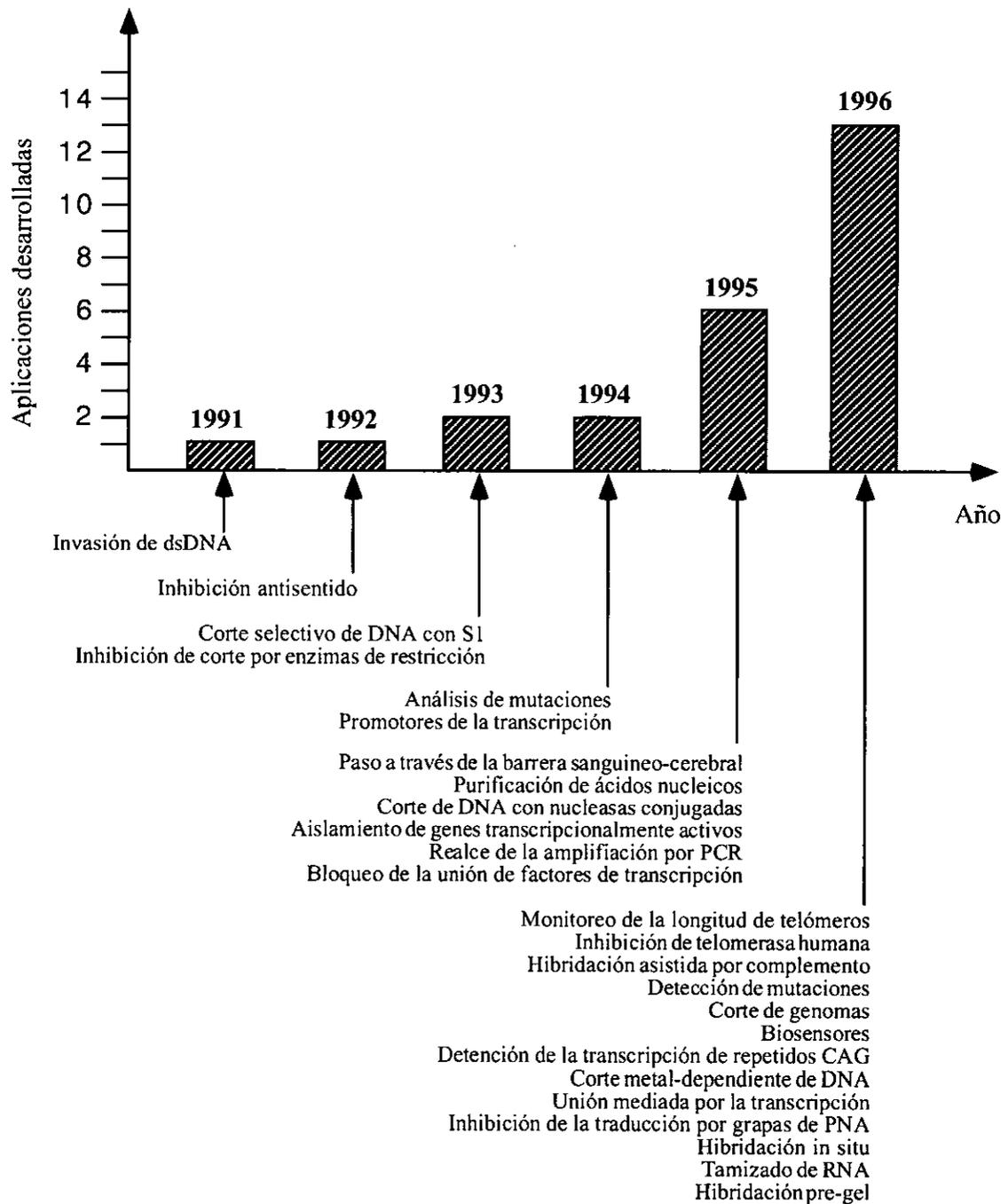


Figura 17. Evolución del desarrollo de aplicaciones que involucran el uso de PNAs

molecular.

Modelo biológico N° 1: *Entamoeba histolytica*.

La afección intestinal causada por el parasitismo hístico de la *E. histolytica* se conoce bajo el nombre de disentería amibiana o amibiasis. Esta enfermedad está caracterizada por frecuentes y dolorosas evacuaciones de heces diarreicas mucoso-sanguinolentas, en las que se descubren las formas trofozoicas hematófagas del parásito.

El hombre adquiere la infección como consecuencia de la ingestión de quistes maduros contenidos en el agua o en alimentos (verduras, etc) que han sufrido una contaminación fecal. Estos quistes, eliminados con las heces, formes o pastosas, de los individuos parasitados (muchas veces aparentemente sanos), pueden resistir indemnes y durante varios días en el medio ambiente y salvan, también incólumes, la barrera gástrica.

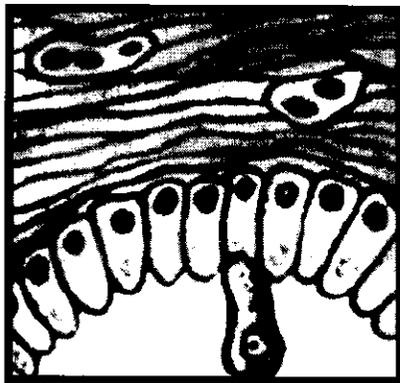
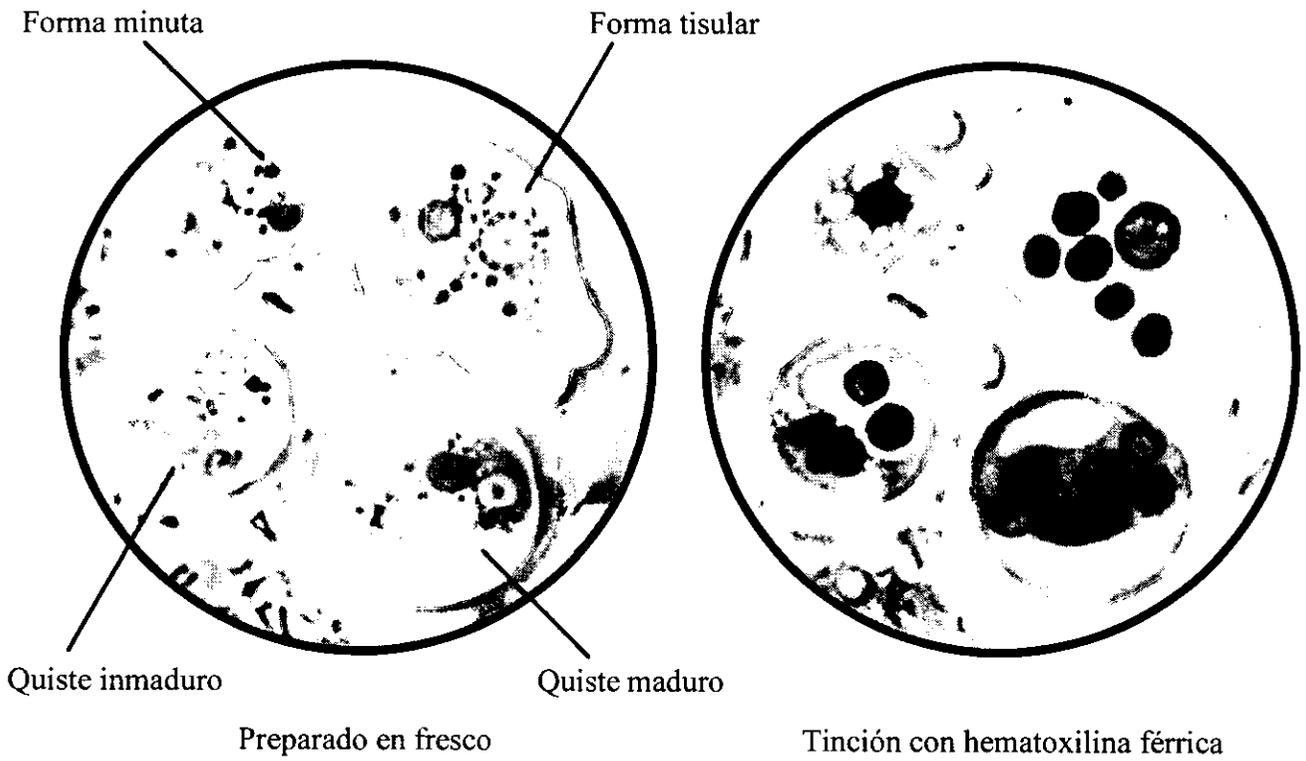
Una vez en el intestino, la acción de la tripsina provoca el desenquistamiento y la liberación de las cuatro amíbulas o trofozoítos metaquisticos. Arrastrados por el flujo intestinal, alcanzan el intestino grueso, a cuya luz se multiplican como trofozoítos de la forma minuta, liberando de cuando en cuando formas quísticas, únicas que salen al exterior con las heces formes.

El paso de la forma minuta a la tisular o hematófaga es el que originará la aparición de la disentería amibiana, de carácter leve o severo, según la gravedad de las lesiones, la virulencia del parásito y la resistencia del huésped (figura 18).

Aparte de su parasitismo intestinal, las amibas de las úlceras entéricas pueden ser arrastradas por la corriente sanguínea a otros órganos, provocando por estas metástasis, la aparición de graves abscesos amibianos, principalmente hepáticos y pulmonares.

La proliferación a gran escala de la amibiasis está estrechamente vinculada con los serios problemas de alimentación e higiene inherentes a los habitantes de los países más pobres, ocupando el tercer lugar entre las enfermedades parasitarias a nivel mundial por su índice de mortalidad. Hace diez años, por ejemplo, se calculó que unos quinientos millones de personas eran portadores de amibas [42]. La mayoría de los infectados son portadores asintomáticos que erradican el parásito espontáneamente después de varios meses [43]. Sin embargo, una décima parte de los portadores (¡hablamos aquí de cincuenta millones de personas...!) desarrolla amibiasis invasiva. De ellos, más de cuarenta mil se convierten en víctimas letales de la enfermedad cada año.

En 1989 se reportó que los genes que codifican para los RNAs ribosomales de *E. histolytica* (rDNA) se localizan en una molécula extracromosomal, de tipo circular, de 24.6 Kb [44, 45]. Este tipo de organización poco común del rDNA ha sido reportado para especies tan diferentes entre sí como la rana *Xenopus* (un anfibio), el grillo *Acheta* (un insecto), varios tipos de levaduras (hongos) e incluso el alga *Euglena gracilis* (un protozoario). En el caso de *E. histolytica* no se ha encontrado ninguna copia cromosomal del rDNA.



Trofozoíto de *E. histolytica* adosado a las células de la mucosa intestinal



Comienzo de la lesión



Lesión ya desarrollada en forma de matraz invertido (Ampliación menor que las anteriores)

Figura 18. *Entamoeba histolytica*. Estadios del ciclo de vida y desarrollo de la lesión intestinal.

El rDNA de *E. histolytica* parece ser una unidad de replicación autónoma (replicón), con unas 200 copias por célula (cepa HM1:IMSS). En cada episoma, dos unidades de transcripción de rRNA repetidas e invertidas, de 5.9 Kb cada una, contienen aproximadamente la mitad del DNA total. Otras familias de secuencias repetidas funcionan como espaciadoras entre los genes ribosomales y no son transcritas. Por analogía con secuencias de este tipo en otros organismos, se estima que juegan un papel importante en la transcripción del rRNA.

La organización de las secuencias repetidas de *E. histolytica*, cepa HM1:IMSS, ha sido ya exhaustivamente descrita con anterioridad [46]. De relevante importancia para este trabajo son las secuencias repetidas tipo *Sca* I, contenidas en la clona denominada D5, empleada para la generación de blancos de diagnóstico.

En el mapa episomal del rDNA de *E. histolytica* (figura 19) se puede observar que una parte de las secuencias repetidas del tipo *Sca* I se localizan en un fragmento *Hind* III ubicado hacia los extremos 3' de los DNAs codificantes para la subunidad mayor del rRNA. El fragmento *Hind* III está formado, desde ambos extremos hacia el centro, por 75 pb del rDNA, seguidos de secuencias S1, y de dos familias *Dra* I, separadas de siete repetidos *Sca* I por la secuencia S2 de un lado y S3 del otro. Otras secuencias del tipo *Sca* I se localizan hacia la región 5' del rDNA, hasta completar el total de trece. Doce de ellas son de 114 pb y una de 118 pb. Las secuencias *Sca* I no son estrictamente idénticas entre sí y son específicas de la ameba patógena, según datos de ensayos de Southern blots e hibridaciones dot blot con cepas patógenas y no patógenas. Esta característica convierte a las secuencias repetidas tipo *Sca* I en un blanco ideal para el desarrollo de sistemas de diagnóstico de amebas patógenas, por su especificidad y su alto número de copias (13 copias/episoma * 200 episomas/trofozoíto = 2600 copias/trofozoíto).

Modelo biológico N° 2: Factor V de Coagulación Sanguínea.

Si se observa la evolución del cuadro de causas de muerte en México (aunque estos valores nacionales son extrapolables a escala global), vemos que en unas cuantas décadas las afectaciones del sistema circulatorio han crecido de manera importante, desplazando al resto de las enfermedades por su morbilidad (figura 20). La trombosis venosa representa sin duda alguna un serio problema de salud que afecta a una de cada mil personas anualmente. Las principales manifestaciones de la trombosis son la tromboflebitis de las extremidades inferiores y el embolismo pulmonar. Ambas provocan considerable dolor y finalmente, la muerte.

Los mecanismos coagulante y anticoagulante están delicadamente balanceados y regulados en humanos por un complejo sistema de cofactores e inhibidores. El rol de la vía trombomodulina/proteína C tomó diez años en ser definido [47]. Este es un sistema retroalimentado en el que algunos de los componentes son derivados de elementos sanguíneos y otros son productos del propio proceso de coagulación (figura 21). La trombina, a medida que es generada en los sitios

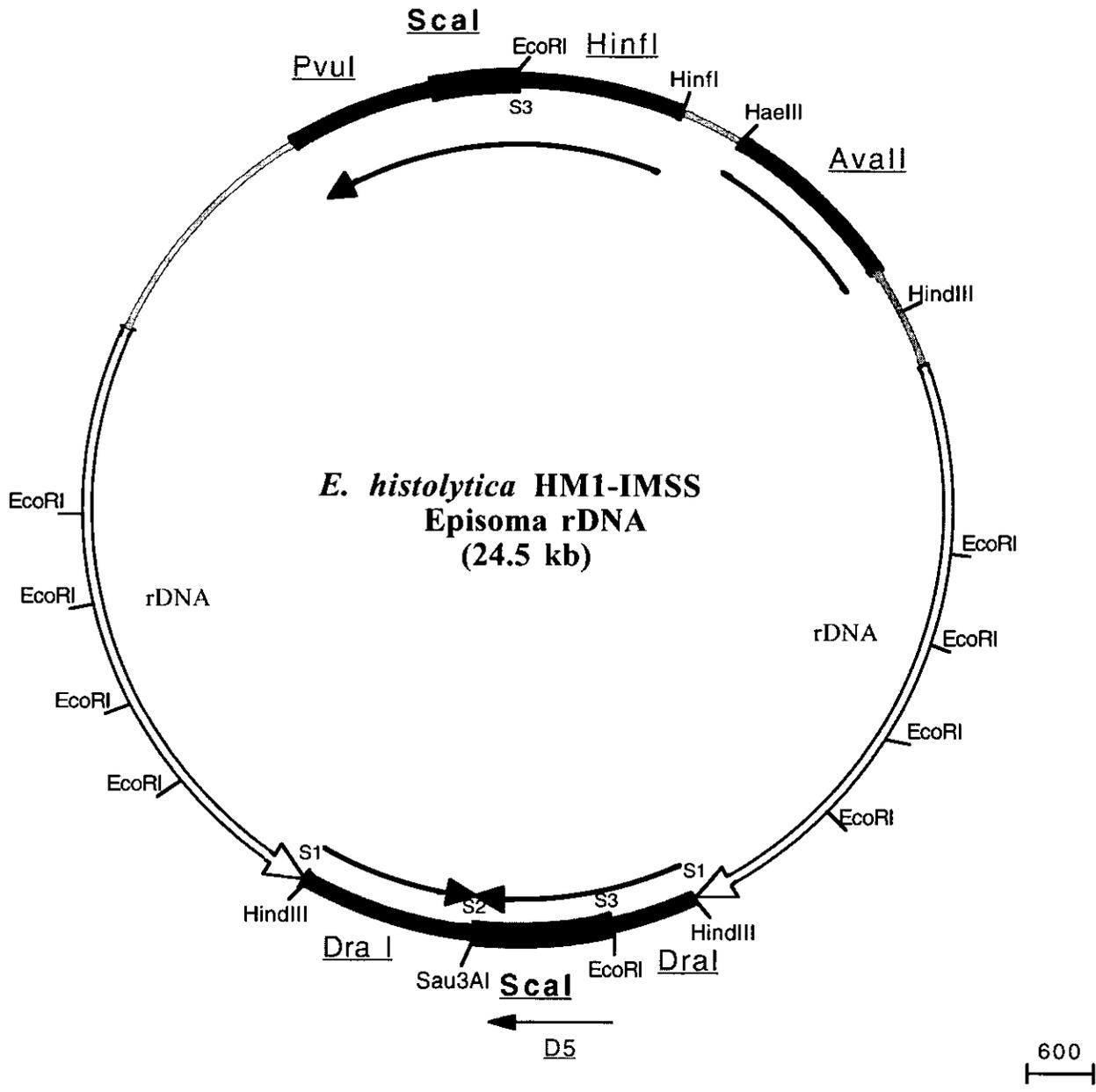


Figura 19. Mapa ribosomal de *Entamoeba histolytica* (HM1-IMSS).

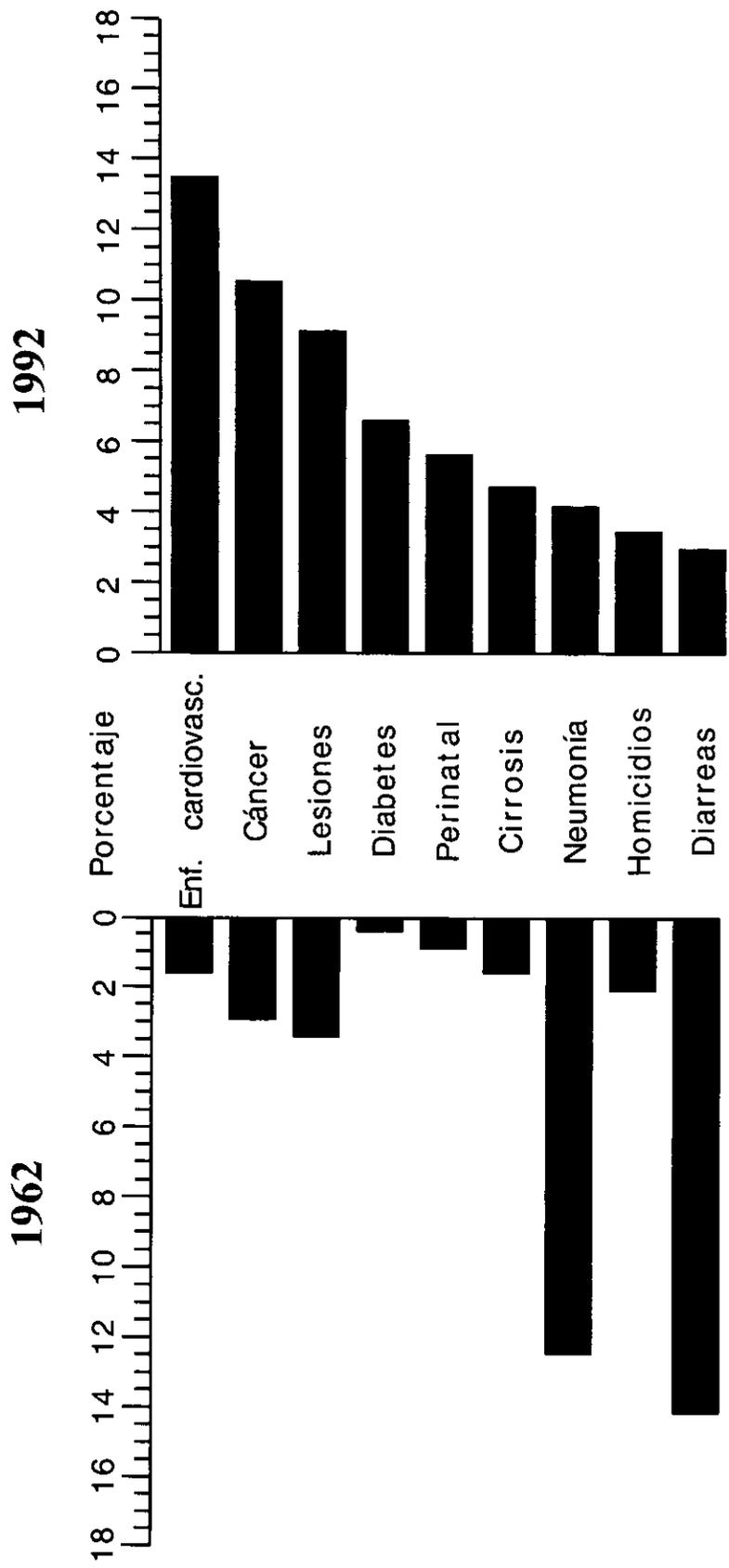


Figura 20. Transición epidemiológica. Causas de muerte en 1962 y 1992

FUENTE: Dirección General de Estadística. Secretaría de Salud

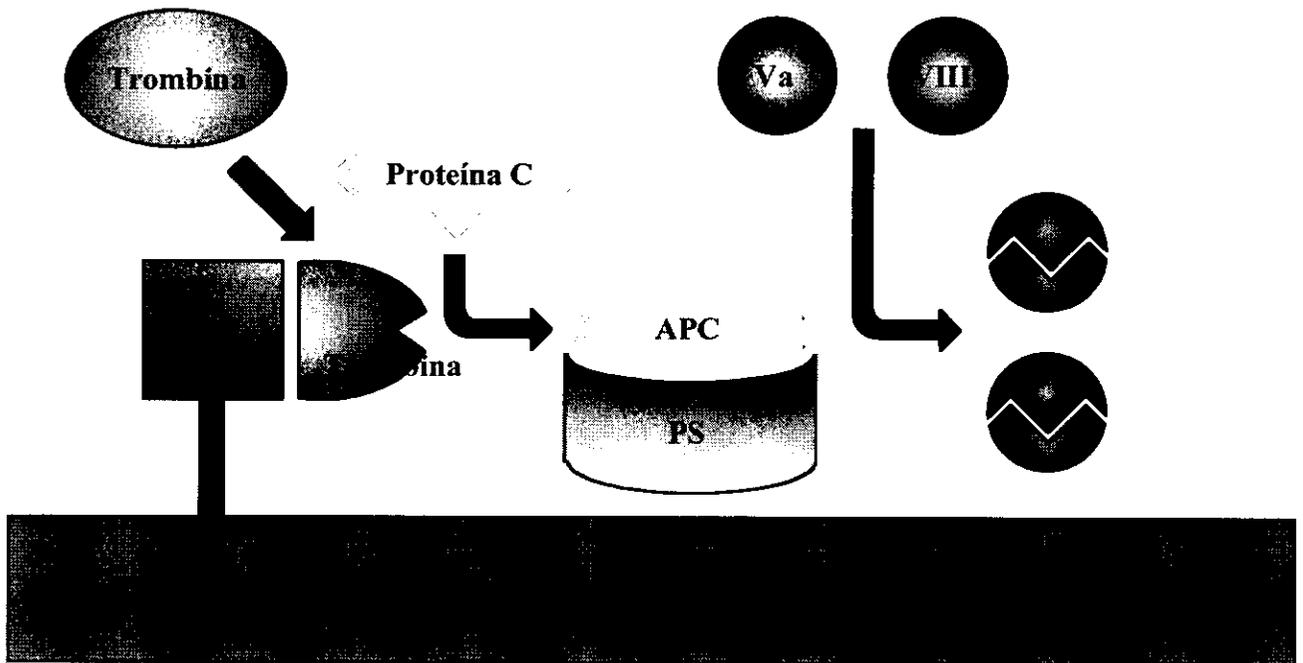


Figura 21. Vía anticoagulante de la Proteína C. La trombina procoagulante se une a la trombomodulina (TM) y se convierte en un anticoagulante que activa a la proteína C transformándola en proteína C activada (APC). Junto a su cofactor proteína S (PS), la APC inactiva a los factores Va y VIIIa.

de daño del tejido vascular, activa y agrega a las plaquetas y coagula al fibrinógeno o, alternativamente, se une a la proteína de la membrana endotelial trombomodulina. Este evento transforma la trombina de una proteasa procoagulante a una anticoagulante, que activa a la proteasa plasmática proteína C. La proteína C activada (activated protein C, APC) corta e inactiva a los factores de coagulación Va (acelerina, eleva 10,000 veces la velocidad de transformación de la protrombina en trombina bajo la acción de la proteinasa Xa) y VIIIa (interviene en la activación del factor X, prendiendo la vía general de coagulación), en presencia de un cofactor denominado proteína S.

Este elegante sistema permite que la sangre extravascular se coagule, manteniendo la fluidez intravascular.

Es evidente que defectos en esta vía pueden provocar trombosis. De hecho, deficiencias en las proteínas C ó S se encuentran asociadas con un incremento en el riesgo de trombosis (de 5 a 10 veces) en heterocigotos. Otro defecto que provoca predisposición a trombosis es el que resulta en una deficiencia de antitrombina III, una proteína plasmática que funciona como un inhibidor, dependiente de heparina, de la trombina y otras proteasas procoagulantes. Hasta la fecha no han sido encontradas mutaciones protrombóticas en la trombina o la trombomodulina. Las mutaciones en los locus de las proteínas C, S, y la antitrombina III, son responsables de no más del 5% de los casos de trombosis familiar. Esta es una cantidad pequeña si se considera que la enfermedad es hereditaria en cerca de la mitad de los casos.

En 1993 Dahlbäck *et al.* reportaron un sistema de detección de defectos en la acción de la APC [48]. Este grupo postuló que un defecto en la vía de la proteína C interfiere con la acción anticoagulante de la APC y encontró que esta resistencia a la APC era el resultado de un rasgo autosómico dominante asociado con la trombosis. Dahlbäck purificó un factor del plasma humano que corregía este defecto, el cual resultó ser el factor de coagulación sanguínea V.

En 1994, el grupo de Bertina definió la base molecular del fenotipo observado en los ensayos de Dahlbäck [49]. Se determinó que los pacientes que mostraban resistencia a la acción de la APC tenían una mutación puntual en el gen del factor V: una transición de G por A en la posición 1691 que convierte a la arginina 506 del factor V en glutamina, modificando el sitio de corte de la APC. Al no ser el factor V accesible para la APC, aparece el riesgo de trombosis, ya que el factor mutado conserva las propiedades procoagulantes del factor V normal. La mutación en el gen del factor V fue denominada factor V Leiden.

La importancia de este descubrimiento radica en el hecho de que la mutación en cuestión es muy común. Bertina ha estimado que del 2 al 4% de la población alemana es portadora del alelo mutante, mientras que Dahlbäck calcula que un 7% de la población sueca tiene el defecto. Ha sido además reportado que la misma mutación está presente en los Estados Unidos y en varios grupos étnicos a nivel mundial en similares proporciones.

Al igual que sucede en el caso de las mutaciones asociadas con trombosis reportadas previamente, el defecto en el gen del factor V es sólo un factor de riesgo: sólo una pequeña parte de

los portadores desarrolla la enfermedad. Para los portadores, el riesgo de trombosis es de 5 a 10 veces mayor que para la población en general. Los homocigotos se encuentran bajo un mayor riesgo que los heterocigotos, siendo la predisposición de los primeros unas 25 veces mayor que el de la población media. Los individuos que a la vez presentan mutaciones en la proteína C y el factor V ven aumentada su probabilidad de padecer trombosis en más de un 70%.

Resulta desconcertante descubrir que una mutación de este tipo se encuentre con tan alta frecuencia en diversos grupos poblacionales. Por este motivo ha surgido la pregunta de si existe algún tipo de presión selectiva positiva involucrada en la conservación de la mutación en la población. Al respecto se ha especulado que una tendencia ligeramente trombótica podría conferir ciertas ventajas durante la implantación fetal.

Desde la salida a la luz en 1961 del primer reporte concerniente al riesgo de trombosis venosa en mujeres que emplean anticonceptivos orales [50], la peligrosidad de los mismos ha sido reducida de manera extraordinaria con el empleo de nuevas generaciones de fármacos que permiten el manejo de bajas dosis [51]. Estos, sin embargo, no han sido capaces de eliminar el peligro de que la enfermedad se manifieste. Estudios realizados recientemente han demostrado que el uso de anticonceptivos orales en mujeres portadoras de la mutación de factor V Leiden conlleva a un notable incremento en el riesgo de trombosis venosa [52-54]. No está claro todavía el por qué los anticonceptivos orales causan trombosis, ni por qué lo hacen sólo en una pequeña parte de las mujeres. El hecho es que el riesgo de trombosis entre las mujeres que usan anticonceptivos orales se incrementa 4 veces y si las mujeres son portadoras del factor V Leiden, el riesgo es 8 veces mayor. Comparadas con mujeres que no usan píldoras anticonceptivas y no portan la mutación, la probabilidad de incidencia de la enfermedad es más de 30 veces mayor para las que tienen ambos factores de riesgo. Es por ello que se ha planteado la necesidad de verificar el estatus del factor V (conjuntamente con el de las proteínas C y S, así como de la antitrombina) en las mujeres, antes de indicarles el uso de anticonceptivos orales, lo cual se ha visto reflejado en el interés por desarrollar un sistema de diagnóstico efectivo de estas modificaciones congénitas.

OBJETIVOS

Objetivo general 1

En el presente proyecto se propuso diseñar y conformar un ensayo modelo para la detección del parásito patógeno de humanos *Entamoeba histolytica* basado en el uso de sondas moleculares que incorporan un sistema fluorescente (figura 22).

Objetivos particulares

1. Diseñar un aducto de PNA/DNA con estructura de tallo y asa (switch molecular) para ser empleado como sonda de detección.
2. Comprobar las cualidades de los componentes del diseño.
3. Sintetizar y ensamblar la construcción.
4. Estudiar las propiedades físico-químicas del sistema.
5. Comprobar el funcionamiento del switch con diversos efectores en solución.
6. Corroborar el funcionamiento del switch inmovilizado en placas de microtitulación.
7. Ensamblar y poner a punto el ensayo diagnóstico con blancos reales.

Objetivo general 2

Como proyecto paralelo al anterior, nos propusimos diseñar un sistema para la detección de la mutación puntual del Factor V de coagulación sanguínea Leiden, basado en el uso de moléculas de PNA estructuradas.

Objetivos particulares

1. Diseño de las sondas estructurada y no estructurada de PNA, así como de los blancos artificiales.
2. Poner a punto un sistema electroforético isotérmico para estudiar la interacción de las dos sondas con los diferentes blancos en una amplia gama de temperaturas.
3. Demostrar las ventajas del empleo de moléculas estructuradas de PNA en la detección de mutaciones puntuales.

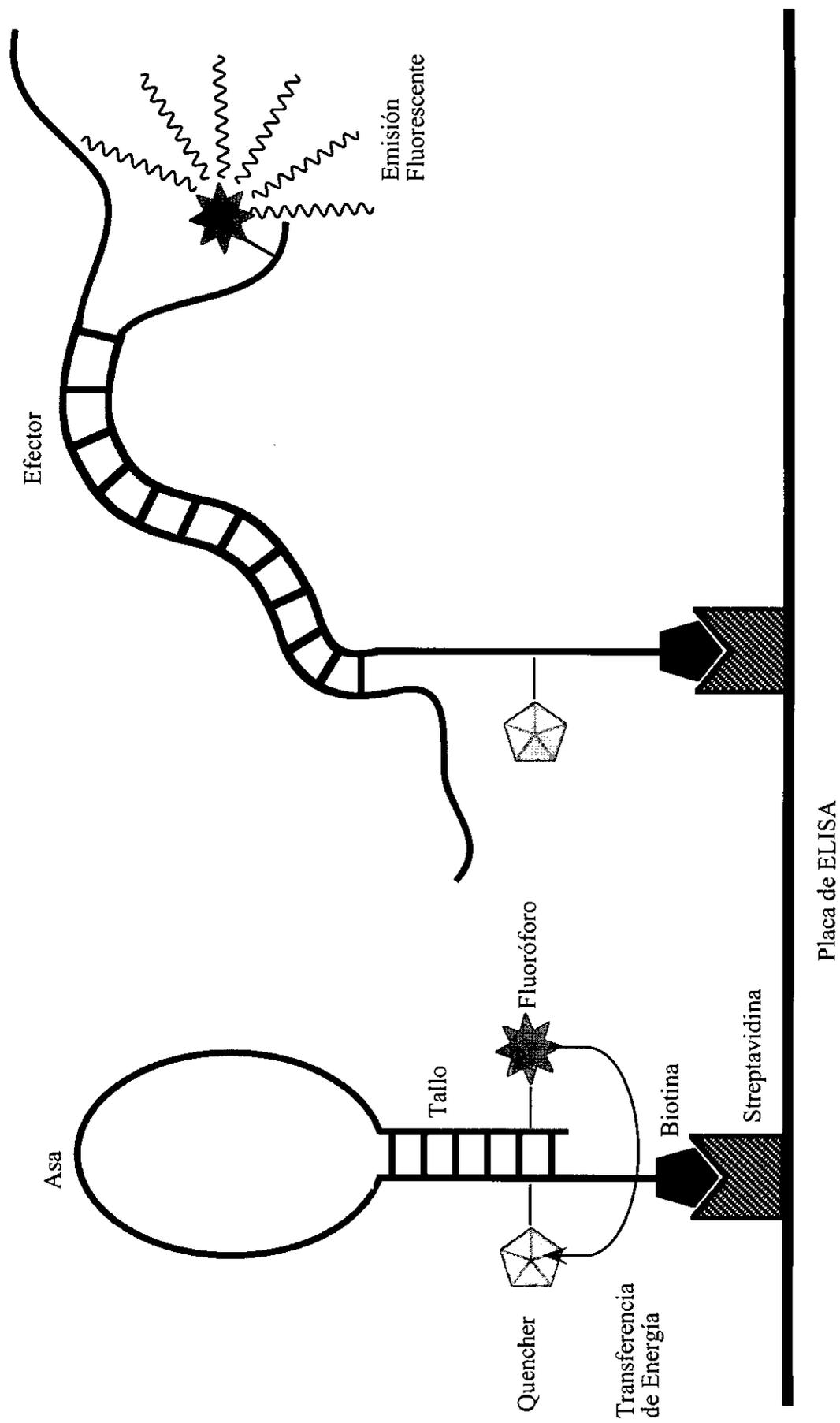


Figura 22. Esquema del funcionamiento del switch molecular híbrido PNA-DNA en las placas de microtitulación.

MATERIALES Y METODOS

BUFFERS Y SOLUCIONES

Buffer de Acetato:

50 ml de agua bidestilada

40.81 g de NaOAc*3H₂O

Se ajusta el pH a 5.2 con ácido acético glacial.

Se afora a 100 ml con agua bidestilada

Buffer de fosfatos 1 M:

40 ml de agua bidestilada

6.52 g de KH₂PO₄

0.30 g de Na₂HPO₄

Se ajusta el pH a 5.5 con Na₂HPO₄ y se afora a 50 ml.

La solución se filtra al vacío por un filtro de 0.45 µm.

PBS 1X:

Volumen	200 ml	1000 ml
---------	--------	---------

NaCl	1.6 g	8 g
------	-------	-----

KCl	40 mg	200 mg
-----	-------	--------

Na ₂ HPO ₄	288 mg	1.44 g
----------------------------------	--------	--------

KH ₂ PO ₄	48 mg	240 mg
---------------------------------	-------	--------

TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA):

40 ml de agua bidestilada

60.55 mg de Tris base

10 µl de solución de EDTA 0.5 M (9.3 g de EDTA)

Se ajusta el pH al valor deseado con ácido clorhídrico.

Se afora a 50 ml con agua bidestilada

TBE (Tris-borato 89 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0):

10X: 108 g Tris base

55 g Acido bórico

20 ml 0.5 M EDTA pH 8.0

Aforar a 1 L con agua bidestilada

Buffer de TEAA (Acetato de Trietilamonio) 1 M:

En un matraz de 500 ml, colocado en un baño de agua con hielo, se mezclan los siguientes reactivos en el orden indicado y agitando:

400 ml de agua bidestilada

28.62 ml de ácido acético glacial

69.69 ml de trietilamina

Se ajusta el pH a 7.5 y se afora a 500 ml con agua bidestilada.

Buffer de bicarbonato 1 M:

Se prepara una solución 1 M de carbonato de sodio anhidro (5.3 g en 50 ml de agua bidestilada) y una solución de bicarbonato de sodio (8.4 g en 100 ml de agua bidestilada). A 92 ml del stock de bicarbonato se añade carbonato de sodio hasta que el pH llegue a 9.0 (aproximadamente 8 ml de la solución stock de carbonato de sodio).

SSC 20X:

0.3 M citrato de sodio

3 M NaCl

pH 7.0

Aldritiol:

1.5 mg de 4,4-ditiopiridina (1 mg/ml final)

300 µl de acetonitrilo (20% final)

150 µl de buffer de fosfatos 1 M, pH 5.5 (100 mM final)

1050 µl de agua bidestilada.

$\Sigma = 1500 \mu\text{l}$

Desoxiribooligonucleótidos

Los oligos de DNA utilizados en este trabajo fueron todos obtenidos en su forma liofilizada del proveedor, resuspendidos en agua amoniacada al 5% y purificados por precipitación con 20 volúmenes de 1-butanol a 10°C, 8000 rpm, 45 min. en un rotor SV13 (Beckman Instruments). Todos los oligos fueron cuantificados por medición de la absorbancia de sus soluciones a 260 nm, empleando el coeficiente de extinción molar reportado por el proveedor (o en su defecto la fórmula general de 1 OD = 33 µg/ml para los oligos de cadena sencilla) en un espectrofotómetro DU 650i (Beckman Instruments).

EO19 (Operon Technologies), 5'-GTG TAA AAT AGT AAA AAA T-3', 19-ámero, oligo

complementario al asa de PNA y efector sintético del switch de PNA-DNA. MW = 5865 g/mol, $E_{260} = 216500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Recibido: 83 OD $\approx 2.3 \cdot 10^{17}$ molec. La pureza del oligo precipitado con 1-butanol fue estimada por electroforesis en gel nativo de poliacrilamida al 20% con tinción con plata (figura 23).

EOstem10 (Operon Technologies), 5'-(HS)AGA CAG AAT(NH₂) A(Biotina)-3', 10-ámero modificado, brazo de DNA del tallo del switch PNA-DNA y ancla del switch en las placas cubiertas con streptavidina. MW = 3387 g/mol, $E_{260} = 110174 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Recibido: 39.7 OD $\approx 2.2 \cdot 10^{17}$ molec. La pureza del oligo precipitado con 1-butanol fue estimada por electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida al 20% con tinción con plata y por cromatografía de HPLC de fase reversa del oligo reducido con DTT (figura 24 A). El contenido de biotina fue verificado preincubando el oligo en una solución 50X molar de streptavidina y observando el retardamiento de la banda correspondiente al oligo en el gel (figura 24 B).

RER1 (Operon Technologies), 5'-CAA AAC ATT TCA ATT CTT TCA TC-3', 23-ámero. Primer utilizado para generar productos de PCR de doble cadena de amibas.

S-RER1 (Genosys), 5'-CpsApsAps ApsAC ATT TCA ATT CTT TCA TC-3', 23-ámero con 4 fosforotioatos en el extremo 5', primer resistente a digestión con T7 Gene VI Exonucleasa, empleado en la obtención de productos de PCR de cadena sencilla de amibas. MW = 6894.6 g/mol, $T_m = 59.0^\circ\text{C}$, 31.8 $\mu\text{g}/\text{OD}$. Recibido: 50.5 OD = 606.2 μg .

RER-D5 (Operon Technologies), 5'-GAT TTC ATA AGA ACC TTT TGG-3', 21-ámero, primer reverso en la amplificación de la clona D5.

GM.LR74 (Operon Technologies), 5'-GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAC TGG TGA AAT TGC TGC CAT TGT CTA ATT AAG AAT GCC ATA GAC CCA TCA AT-3', 74-ámero, secuencia inespecífica aleatoria. MW = 23715 g/mol. Stock 3.9 $\mu\text{g}/\mu\text{l} = 9.9 \cdot 10^{13}$ molec/ μl .

F5WT.34 (Operon Technologies), 5'-CAG ATC CCT GGA CAG GCG AGG AAT ACA GAG GGC A-3', 34-ámero, blanco correspondiente al Factor V no mutado. MW = 10640 g/mol. Stock 3.38 $\mu\text{g}/\mu\text{l} = 1.91 \cdot 10^{14}$ molec/ μl .

F5MU.A.34 (Operon Technologies), 5'-CAG ATC CCT GGA CAG GCA AGG AAT ACA GAG GGC A-3', 34-ámero, blanco correspondiente al Factor V Leiden. MW = 10624 g/mol. Stock 2.97 $\mu\text{g}/\mu\text{l} = 1.68 \cdot 10^{14}$ molec/ μl .

F5MU.T.34 (Operon Technologies), 5'-CAG ATC CCT GGA CAG GCT AGG AAT ACA GAG GGC A-3', 34-ámero, blanco correspondiente al cambio de G por T en el Factor V. MW = 10600 g/mol. Stock 3.82 $\mu\text{g}/\mu\text{l} = 2.17 \cdot 10^{14}$ molec/ μl .

F5MU.C.34 (Operon Technologies), 5'-CAG ATC CCT GGA CAG GCC AGG AAT ACA GAG GGC A-3', 34-ámero, blanco correspondiente al cambio de G por C en el Factor V. MW = 10615 g/mol. Stock 3.73 $\mu\text{g}/\mu\text{l} = 2.12 \cdot 10^{14}$ molec/ μl .



Figura 23. Análisis del oligo EO19 precipitado con 1-butanol.
Gel nativo de poliacrilamida al 20% teñido con nitrato de plata.
Carril 1: 51 ng , carril 3: 85 ng y carril 5: 112 ng del oligo.

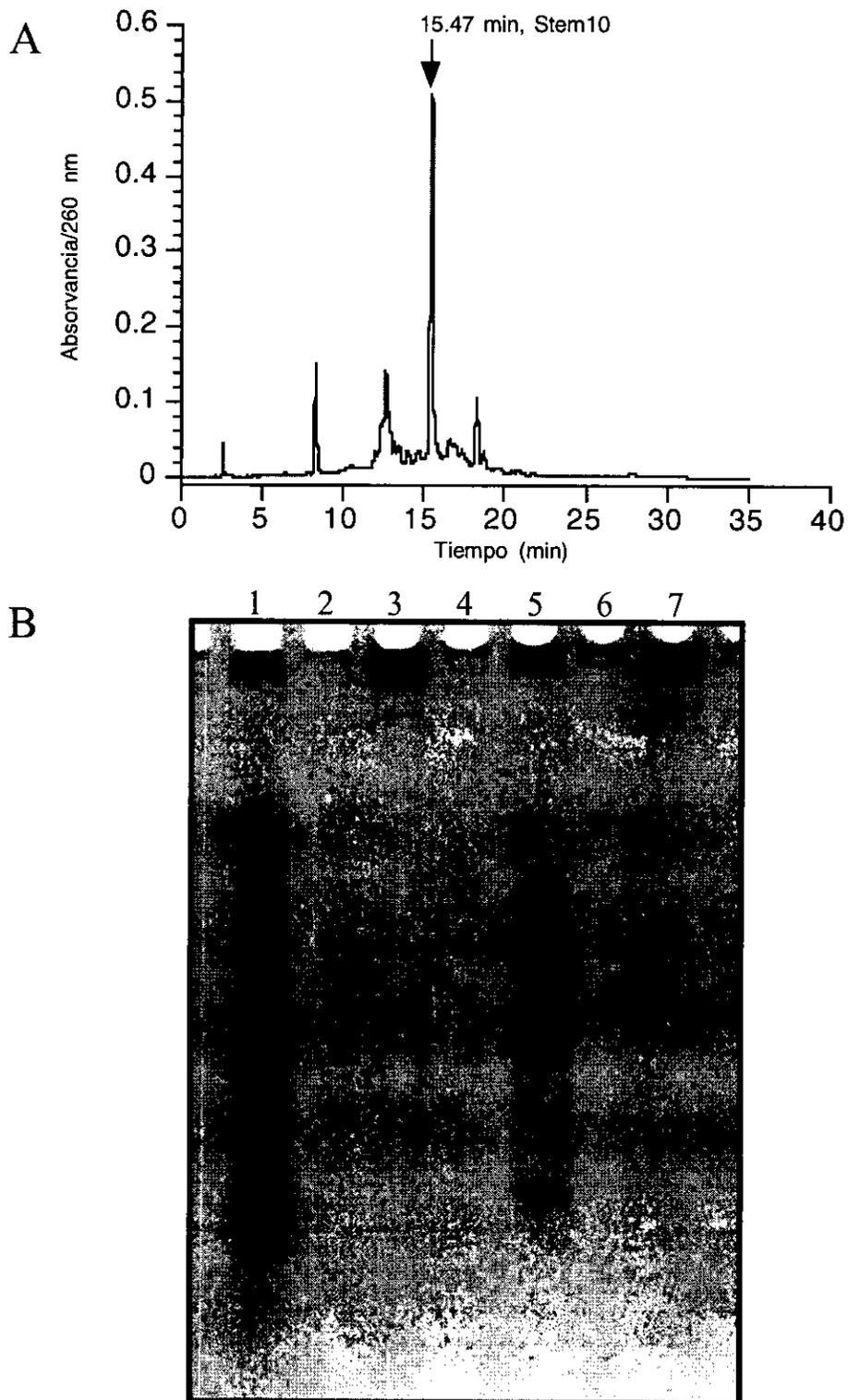


Figura 24. Análisis del oligonucleótido biotinilado y tiolado EOstem10.

A: Cromatografía del oligo EOstem10 reducido con DTT.

B: Retardamiento del oligo EOstem10 con streptavidina en gel desnaturante de poliacrilamida al 20%. Tinción con nitrato de plata. Carril 1: oligo purificado con 1-butanol; carril 3: oligo purificado e incubado con un exceso de 50X molar de streptavidina; carril 5: oligo sin purificar; carril 7: oligo sin purificar con exceso 50X molar de streptavidina. En todos los casos la cantidad de oligo cargada corresponde a 70 ng medidos por Abs_{260nm} de sus soluciones.

Acidos Péptido Nucleicos

Los oligos de PNA utilizados en este trabajo fueron todos obtenidos en su forma liofilizada del proveedor y su cuantificación se efectuó por medición de la absorbancia de sus soluciones a 260 nm, 50°C, empleando la fórmula general de 1 OD = 25 µg/ml (comunicación personal de PerSeptive Biosystems) en el espectrofotómetro.

EO24 (Millipore), NH₂-Gly-TAT TCT GTC TTT TTA CTA ATT TAC-Cys-CONH₂, 24-ámero, asa y uno de los brazos del tallo del switch PNA-DNA. MW = 6477.7 g/mol. Recibido: 37 nmol = 2.2*10¹⁶ moléc. La pureza del oligómero de PNA fue verificada por HPLC de fase reversa. El pico principal sale aproximadamente a los 12 minutos de la corrida (figura 27 A).

EO12Li (PerSeptive Biosystems), H₂N-Gly-ATT CCT TGC CTG-CONH₂, 12-ámero, sonda no estructurada complementaria al Factor V Leiden. MW = 3271 g/mol. Recibido: 13.5 OD = 6*10¹⁶ moléc.

EO19Sw (PerSeptive Biosystems), H₂N-Gly-GCG CAT TCC TTG CCT GCG C-CONH₂, 19-ámero, sonda con estructura de tallo y asa, complementaria al Factor V Leiden. MW = 5148 g/mol. Recibido: 18.3 OD = 5.3*10¹⁶ moléc.

Productos de PCR

nPCR D5 de amibas:

a) Mezcla de reacción:

2 µl de DNA de lisado de trofozoítos de *E. histolytica* como templado

200 µM final de cada dNTP

30 pmolas de cada uno de los primers RER1 y RER-D5 (figura 25)

2.5 U de enzima *Taq* DNA polimerasa

1X Buffer de amplificación (Tris-HCl 10 mM pH 8.3, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 50 mM, gelatina 0.001%) hasta 50 µl

b) Reacción:

Sistema PCR GeneAmp 9600 (Perkin Elmer)

94°C, 5 min desnaturalización inicial

30 ciclos de:

94°C, 30 seg desnaturalización

42°C, 30 seg apareamiento

72°C, 45 seg extensión

72°C, 7 min completado de la extensión

A**Sitio de unión al switch PNA:DNA****← Oligo RER-D5**

GGTTTTCCAA GAATACTTTA G

AATCAACGGT GTAAATTAGT AAAAAATTAT TTCATCTATA CAATGACCAT TTTGAATAAT TCCTTTGATT TTCCCAGTTA GAAATTATTG TACTTTGTAT TTAGTACTTT TCATTAATAAT CCAAAGGTT CTTATGAAAT C-GAA
rep D5-1 144

AATCAACGGT GTA AATTAGT AAAAAATTAT TTCATCTATA CAATGACCAT TTTGAATAAT -CCTTTGATT TTCACAATTA GGAATTATTG TACTTTGTAC TTAGTACTTT TCATTAATAAT CCAAAGGTT CTTATGAAAT CAGAA
rep D5-2 144

AATCAAC-GT GTAAATTAGT AAAAAATTAT TTCATCTATA CAATGACCAT TTTGAATAAT TCCTTTGATT TTCCCAGTTA GAAATTATTG TACTTTGTAT TTAGTACTTT T-AFTAATAAT CCAAAGGTT CTTATGAAAT C-GAA
rep D5-3 142

AATCAACGGT GTAAATTAGT AAAAAATTAT TTCATCTATA CGACGACCAT TTTGAATAAT TCCTTTGATT TTCACAATTA GGAATTATTG TACTTTGTAT TTAGTACTTT TCATTAATAAT CCAAAGGTT CTTATGAAAT C-GAA
rep D5-4 144

B

CAAAACATTT CAATTCITTC ATCAATCAAC GGTGTAAATT AGTAAAAAAT TATTTTCATCT ATACAATGAC CATTTTGAAT AATTCCTTTG ATTTTCCCAG TTAGAAATTA TTGTACTTTG TATTTAGTAC TTTTCATTAA
AATCCAAAAG GTTCTTATGA AATC
164 bases.

CAAAACATTT CAATTCITTC ATCAATCAAC GGTGTAAATT AGTAAAAAAT TATTTTCATCT ATACAATGAC CATTTTGAAT AATTCCTTTG ATTTTCCCAG TTAGAAATTA TTGTACTTTG TATTTAGTAC TTTTCATTAA
AATCCAAAAG GTTCTTATGA AATCGAAAAT CAACGGTGT AATTAGTAAA AAATTATTTT ATCTATACAA TGACCATTTT GAATAATCCT TTGATTTTCA CAATTAGGAA TTATTGTACT TTGTACTTAG TACTTTTCAT
TAAAATCCAA AAGGTCTTA TGAAATC
307 bases.

CAAAACATTT CAATTCITTC ATCAATCAAC GGTGTAAATT AGTAAAAAAT TATTTTCATCT ATACAATGAC CATTTTGAAT AATTCCTTTG ATTTTCCCAG TTAGAAATTA TTGTACTTTG TATTTAGTAC TTTTCATTAA
AATCCAAAAG GTTCTTATGA AATCGAAAAT CAACGGTGT AATTAGTAAA AAATTATTTT ATCTATACAA TGACCATTTT GAATAATCCT TTGATTTTCA CAATTAGGAA TTATTGTACT TTGTACTTAG TACTTTTCAT
TAAAATCCAA AAGGTCTTA TGAAATCAGA AAATCAACGT GTAAATTAGT AAAAAATTAT TTCATCTATA CAATGACCAT TTTGAATAAT TCCTTTGATT TTCCCAGTTA GAAATTATTG TACTTTGTAT TTAGTACTTT
TATTAATAATC CAAAAGGTTT TTATGAAATC
450 bases.

CAAAACATTT CAATTCITTC ATCAATCAAC GGTGTAAATT AGTAAAAAAT TATTTTCATCT ATACAATGAC CATTTTGAAT AATTCCTTTG ATTTTCCCAG TTAGAAATTA TTGTACTTTG TATTTAGTAC TTTTCATTAA
AATCCAAAAG GTTCTTATGA AATCGAAAAT CAACGGTGT AATTAGTAAA AAATTATTTT ATCTATACAA TGACCATTTT GAATAATCCT TTGATTTTCA CAATTAGGAA TTATTGTACT TTGTACTTAG TACTTTTCAT
TAAAATCCAA AAGGTCTTA TGAAATCAGA AAATCAACGT GTAAATTAGT AAAAAATTAT TTCATCTATA CAATGACCAT TTTGAATAAT TCCTTTGATT TTCCCAGTTA GAAATTATTG TACTTTGTAT TTAGTACTTT
TATTAATAATC CAAAAGGTTT TTATGAAATC GAAAATCAAC GGTGTAAATT AGTAAAAAAT TATTTTCATCT ATACGACGAC CATTTTGAAT AATTCCTTTG ATTTTCCAAA TTAGGAATTA TTGTACTTTG TATTTAGTAC
TTTTATTAA AATCCAAAAG GTTCTTATGA AATC
594 bases

Figura 25. Secuencias repetidas de la clona D5 de *E. histolytica*.

A: Alineamiento de las secuencias repetidas tipo Scal amplificadas por PCR. Se indica la región blanco de la sonda de PNA-DNA y el lugar de hibridación del primer RER-D5. El segundo primer, ya sea RER-1 o SRER1, hibrida fuera de la familia de secuencias repetidas.

B: Secuencias amplificadas por nPCR y tratamiento con T7 Gene VI Exonucleasa. Subrayados se muestran los blancos de la región de PNA de la sonda.

sPCR D5 de amibas

Para obtener este producto se realiza una reacción de PCR como la anterior, substituyendo el primer RER1 por S-RER1. El producto obtenido es incubado con 0.4 U/ μ l de enzima T7 Gene VI Exonucleasa (USB-Amersham) 1 hora a 25°C.

aPCR rotavirus

Producto de PCR asimétrico del gen 4RRV de *Rotavirus* de 234 bases [11].

PROTOCOLOS

Cromatografía de alta presión en fase reversa (RP-HPLC)

Las cromatografías de HPLC de fase reversa se corrieron en el cromatógrafo de gradientes System Gold (Beckman Instruments), empleando una columna C18 Ultrasphere (Beckman Instruments), a temperatura ambiente, con el siguiente programa:

Tiempo: (min)	Flujo (ml/min)	% TEAA	% CH ₃ CN	Duración (min)
INIT	1.00	93.0	7.0	-
0.00	1.00	75.0	25.0	18.00
22.00	1.00	60.0	40.0	5.00
33.00	1.00	93.0	7.0	5.00
40.00	END			

Este programa consiste en un gradiente de acetonitrilo de dos pasos (de 7 a 25% en 18 min. y de 25 a 40% en 5 min.) y fue el empleado en la purificación de los productos de cada reacción. Siempre que la Coumarina formaba parte del producto a purificar, un detector de fluorescencia en línea con el cromatógrafo (FluoroMonitor, Milton Roy) fue empleado para detectar la emisión a 450 nm.

Retardamiento de oligos biotinilados con streptavidina en gels de Poliacrilamida-Urea

Streptavidina S4762 (Sigma) MW \approx 60000 g/mol (1 μ g = 16.6 pmoles)

Actividad \approx 14 U/mg. (1 U enlaza 1 μ g de Biotina)

Stock de 10 μ g/ μ l (0.14 U/ μ l) en PBS pH 7.4, 0.1% BSA.

1. El oligo biotinilado y la solución de streptavidina (en un exceso de 50X molar) fueron mezclados, ajustando el volumen final a 10 μ l con PBS.

2. El tubo de microcentrifugación con la mezcla fue incubado 30 min. a 37°C con agitación.
3. 3 µl del buffer de carga desnaturante, conteniendo 5% de formamida, 5% de Xylene Cyanol FF y 5% de Azul de Bromofenol en 0.5 M EDTA pH 8.0, fueron añadidos a cada una de las muestras para ser cargadas en un gel de poli(acrilamida/urea) al 20%. El retardamiento en el gel fue observado, empleando al oligo biotinilado sin streptavidina como control de migración.

Marcado del oligo EOstem10 con DABCYL-NHS

En un tubo de microcentrifugación se mezclan por agitación con vortex: 3 OD del oligo EOstem10, 30 µl Buffer NaHCO₃ 1 M pH 9.0, 100 µl solución 10 µg/ml DABCYL-NHS (Molecular Probes) en DMF y 20 µl N-metilimidazol. El tubo se aísla de la luz con papel de aluminio y se coloca a temperatura de salón, con agitación (Nutator, CLAY ADAMS Brand), durante la noche. El tubo de reacción se centrifuga 10 min a 12000 g y se carga el sobrenadante a una columna de exclusión fabricada con una pipeta desechable de 10 ml y 8 ml de resina Biogel P4 (BioRad) hidratada. Se colectan las fracciones hasta que comienza a salir el DABCYL que no reaccionó (anillo de color naranja en la columna) y se mide su absorbancia a 260 nm (DNA) y 470 nm (DABCYL). Las fracciones que absorben a ambas longitudes de onda, correspondientes al oligo marcado, son puestas a reaccionar con 10 mM DTT a 37°C, con agitación, durante la noche. La mezcla de reacción se inyecta al cromatógrafo de HPLC, se colectan los picos por separado y se determina el correspondiente al producto EOstem10-DABCYL por comparación de la migración de las fracciones con la del oligo sin reaccionar (figura 26). Se determina que el producto EOstem10-DABCYL sale aproximadamente a los 27 minutos de la corrida de HPLC.

Después de verificar la eficiencia de la reacción analítica, la reacción semipreparativa se lleva a cabo con $1 \cdot 10^{17}$ molec. del oligo EOstem10 (300 µl sol. 2 µg/µl = 600 µg), $9 \cdot 10^{18}$ molec. de DABCYL-NHS (90X, 500 µl sol. 10 mg/ml en DMF = 5 mg) en buffer de bicarbonato 0.1 M (88.8 µl NaHCO₃/ Na₂CO₃ buffer 1 M, pH 9.0), durante 36 horas a 37°C con agitación suave. Después de purificado por precipitación con 2.5 volúmenes de etanol mas 0.1 volumen de NaOAc 3 M, pH 5.2, el oligo marcado fue cuantificado por absorbancia a 260 nm. Las $9.21 \cdot 10^{16}$ moléculas obtenidas indican que el rendimiento de la reacción de marcaje del oligo EOstem10 con DABCYL-NHS es superior al 90%.

Marcado del PNA EO24 con AMCA-NHS

La obtención del PNA marcado con Coumarina se realizó en tres reacciones semipreparativas para cada una de las cuales se colocó en un tubo de microcentrifugación 200µl de sol. de PNA EO24 conteniendo $4.4 \cdot 10^{15}$ molec., 100 µl sol. 10 mg/ml AMCA-NHS (Molecular Probes Inc., A-1418) (400X molar) y 33.3 µl NaHCO₃/ Na₂CO₃ buffer 1 M, pH 9.0. El tubo fue cubierto con

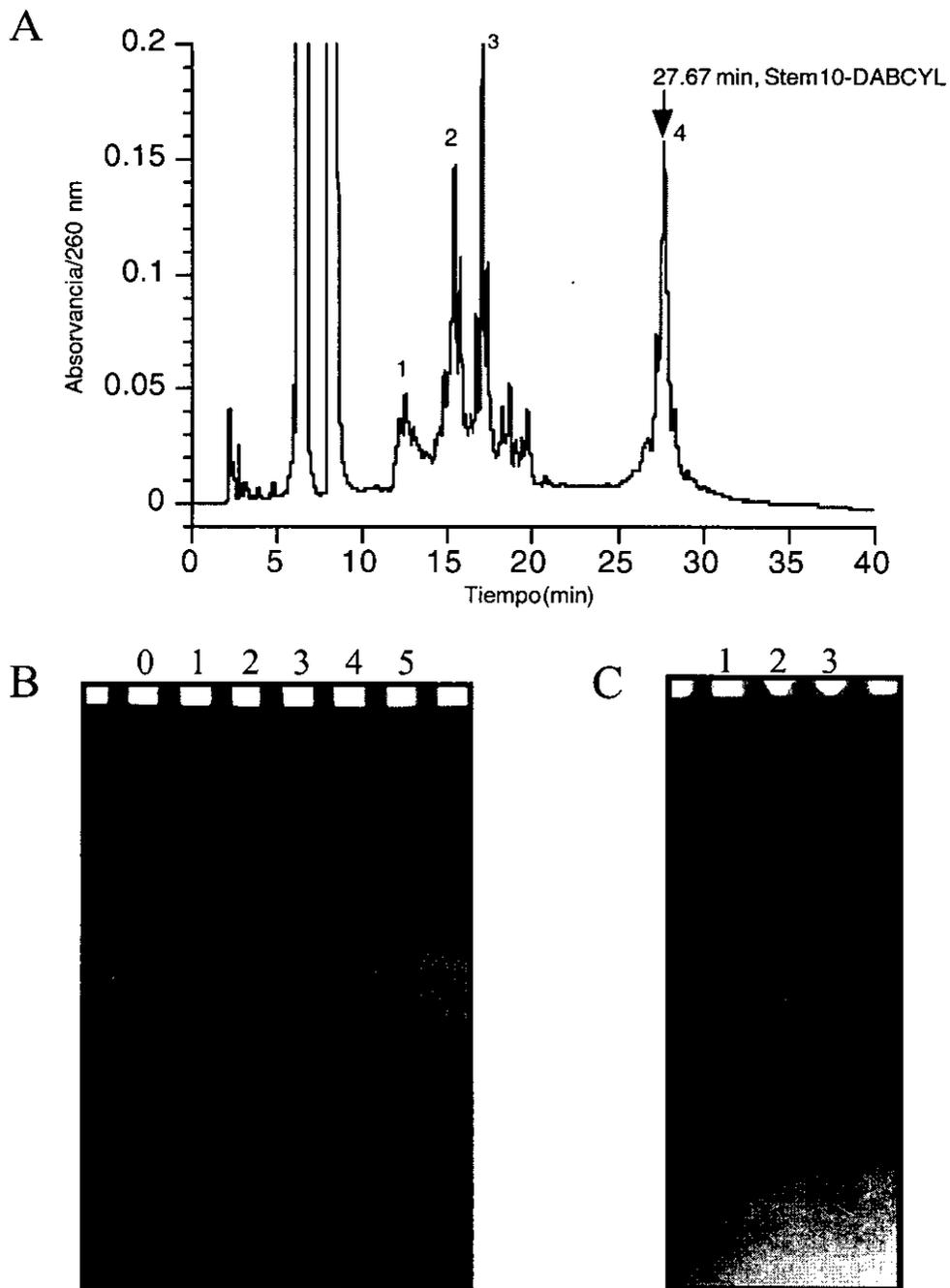


Figura 26. Marcaje del oligo EOstem10 con DABCYL-NHS.

A: Cromatografía de la mezcla de reacción. Los números indican los picos correspondientes a las fracciones colectadas.

B: Análisis de las fracciones en gel de poliacrilamida al 20%. Los carriles 0 y 5 corresponden al oligo sin marcar. Los carriles 1 al 4 corresponden a las fracciones del mismo número en el cromatograma anterior.

C: Gel de poliacrilamida al 20% en el que se observa el retardamiento debido al incremento de tamaño del oligo con DABCYL (carril 3) con respecto al oligo sin marcar (carril 1).

papel de aluminio y la reacción se llevó a cabo durante 4 horas a 37°C con agitación. Después de esto, al tubo se añadieron 20 µl de sol. 10 mM de DTT y se continuó la incubación durante la noche a temperatura de salón y con agitación. La mezcla de reacción fue inyectada a la columna C18 y el PNA marcado con Coumarina y reducido fue purificado por HPLC de fase reversa, saliendo el pico a los 13.5 minutos aproximadamente (figura 27 B). Como resultado de las reacciones de marcaje y de la purificación del producto, se obtuvieron $8.9 \cdot 10^{15}$ moléculas de PNA coumarinado puro (medidos por la absorvancia de la Coumarina a 354 nm), lo que indica que el rendimiento de esta reacción fue del 67.4%.

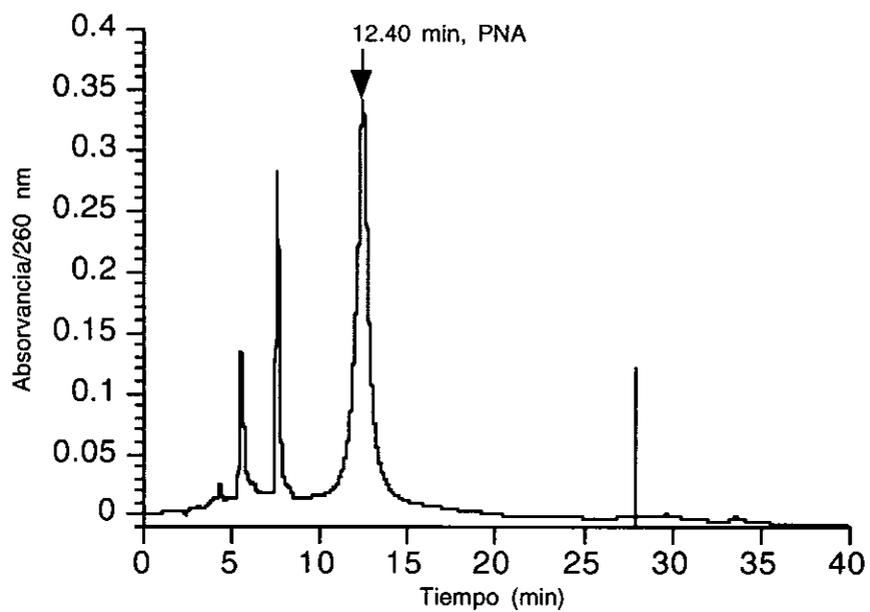
Activación del sulfidrilo del PNA-Coumarina con Aldritiol

El PNA coumarinado es tratado con solución 10 mM de DTT durante 18 horas, 37°C, con agitación, para reducir los posibles dímeros formados. La mezcla de reacción es inyectada al HPLC para eliminar el DTT y el pico del monómero es colectado directamente sobre 100 µl de solución de Aldritiol. La mezcla se agita por vortex y se deja reaccionar durante la noche a temperatura de salón con agitación. El producto es purificado por HPLC, saliendo el pico principal a los 17.8 min. aproximadamente (figura 28 A). Las fracciones colectadas son unificadas, secadas al vacío (SpeedVac, Savant) y la pastilla resuspendida en 300 µl de buffer TEAA 0.1 M, pH 7.5 conteniendo 20% de acetonitrilo. La muestra fue cuantificada por absorvancia de la Coumarina a 354 nm. El resultado obtenido de $5 \cdot 10^{15}$ moléculas de tiopiridil-PNA coumarinado indica que el rendimiento de esta etapa fue del 56.2%.

Reacción de acoplamiento del Tiopiridil-PNA-Coumarina con el aducto EOstem10-DABCYL. Síntesis del switch PNA-DNA

$6 \cdot 10^{15}$ moléculas de EOstem10-DABCYL fueron tratadas con solución 10 mM de DTT durante 4 horas a 37°C, con agitación, para descartar la presencia de dímeros no reactivos. La mezcla de reacción fue inyectada al HPLC y el pico principal fue colectado directamente sobre la solución de tiopiridil-PNA-Coumarina obtenida en el paso anterior. La mezcla se dejó reaccionar durante la noche a temperatura de salón, con agitación, y después fue inyectada a la columna C18 del HPLC para separar el producto, el cual mostró un tiempo de retención de cerca de 19 min., siendo mayor que el del PNA activado del paso anterior (figura 28 A y B). La integral de las áreas bajo los picos de reactivos y producto en el cromatograma indican que la reacción ocurrió con un 80.4% de efectividad, generando $4 \cdot 10^{14}$ moléculas de switch PNA-DNA.

A



B

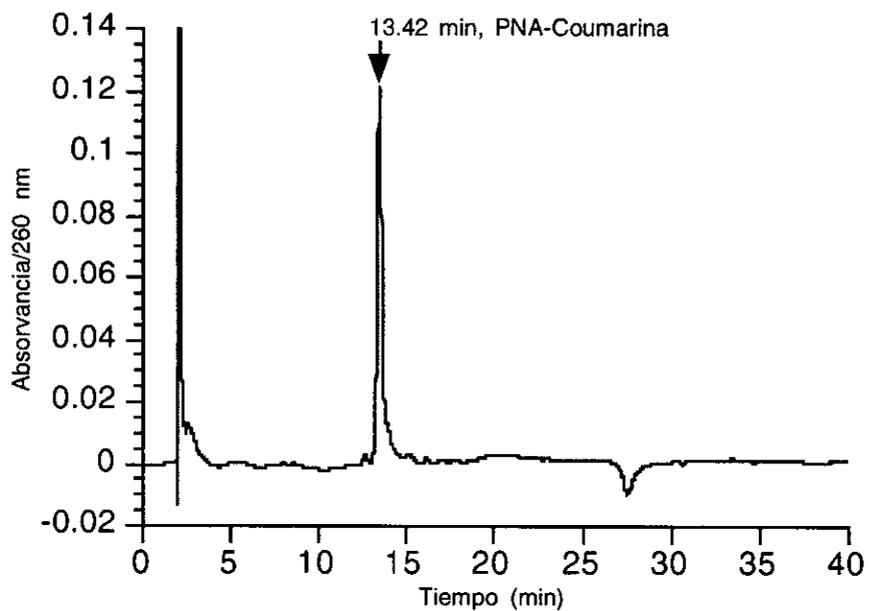
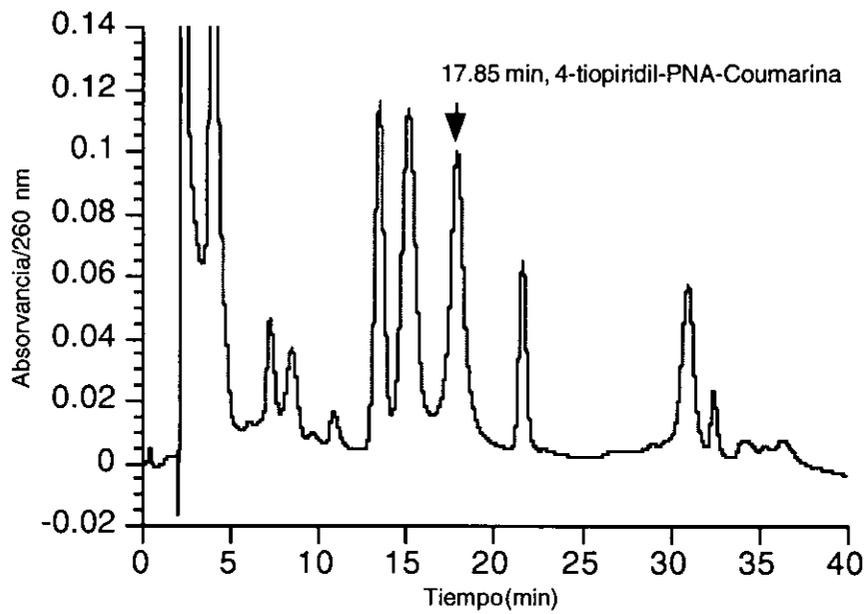


Figura 27.

A: Cromatografía del PNA EO24 reducido con DTT.

B: Cromatografía del aducto PNA EO24-Coumarina puro después de tratado con DTT.

A



B

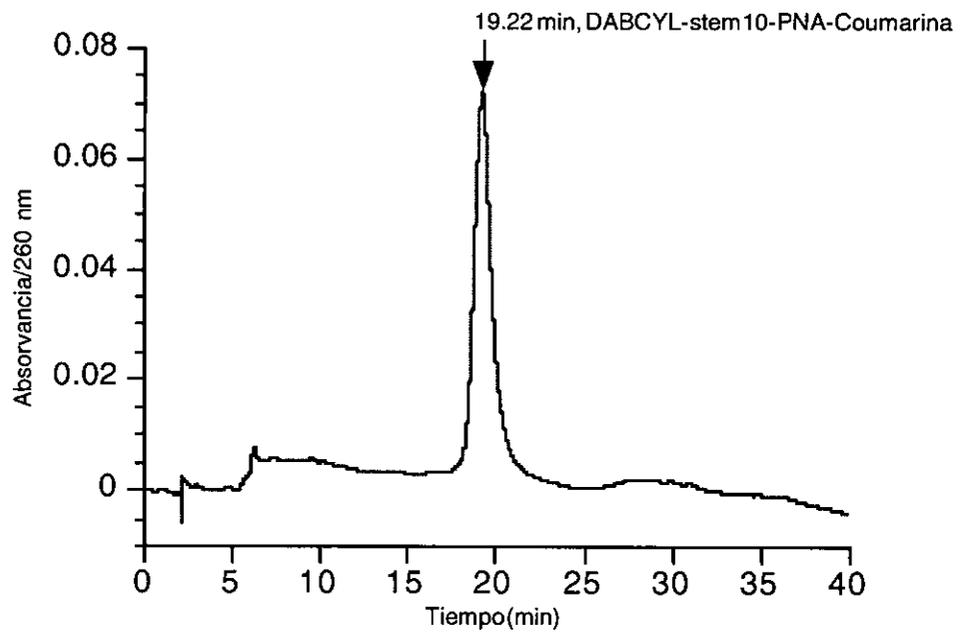


Figura 28.

A: Cromatografía de la mezcla de reacción en la activación del grupo sulfidrilo del PNA-Coumarina con Aldrithiol.

B: Cromatografía del switch PNA-DNA purificado.

Determinación de la cinética de calentamiento y enfriamiento del sistema de baños de agua conectados al espectrofluorímetro LS-50 (Perkin Elmer)

Para el calentamiento gradual se emplea únicamente el baño frigomix 1495 (B. Braun), lleno de agua destilada hasta 2.5 cm del borde superior. La temperatura se sube de 14°C a 70°C. El tiempo se cronometra en intervalos de 2°C.

Para el enfriamiento, el frigomix 1495 a 70°C se conecta a un baño thermomix (B. Braun) con agua e hielo, se enciende la refrigeración del frigomix, se pone el control de temperatura del frigomix a 10°C y se pone el thermomix a circular agua a través del frigomix. Se mide el tiempo en intervalos de 2°C.

Las curvas obtenidas son ajustadas a ecuaciones de temperatura como función del tiempo, las cuales se emplean en los experimentos de fusión del switch PNA-DNA (figura 29).

Curvas de fusión

Los experimentos de fusión del switch PNA-DNA se llevaron a cabo con $2 \cdot 10^{12}$ moléculas de switch en 300 μ l de buffer TE pH 7.5, conteniendo 20 mM KCl. Los experimentos de fusión con el switch desnaturalizado se realizaron con previa incubación de las $2 \cdot 10^{12}$ moléculas de switch con 40 mM de DTT por 4 horas, con agitación, llevando después el volumen a 300 μ l con buffer TE pH 7.5, 20 mM KCl. Las curvas de fusión se registraron en el espectrofluorímetro LS-50 (Perkin Elmer), midiendo la emisión de fluorescencia de la Coumarina no quencheada a 450 nm. Los datos cinéticos obtenidos fueron convertidos a datos dependientes de temperatura mediante las fórmulas determinadas en el paso anterior. La T_m exacta se determinó como la temperatura a la cual la primera derivada de la intensidad de la fluorescencia con respecto al inverso de la temperatura alcanza su valor mínimo (punto de inflexión de la curva $INT = f(\text{Temp.})$). El análisis termodinámico de los valores de T_m obtenidos se realizó empleando la fórmula de Freier [55]:

$$T_m = \frac{\Delta H^\circ}{\Delta S^\circ + R \cdot \ln(C/4)} - 273.15 \text{ K} \quad \Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ}{T_m + 273.15 \text{ K}} - R \cdot \ln(C/4)$$

ΔS° = entropía de formación de la hélice

ΔH° = entalpía de formación de la hélice

C = concentración de las especies

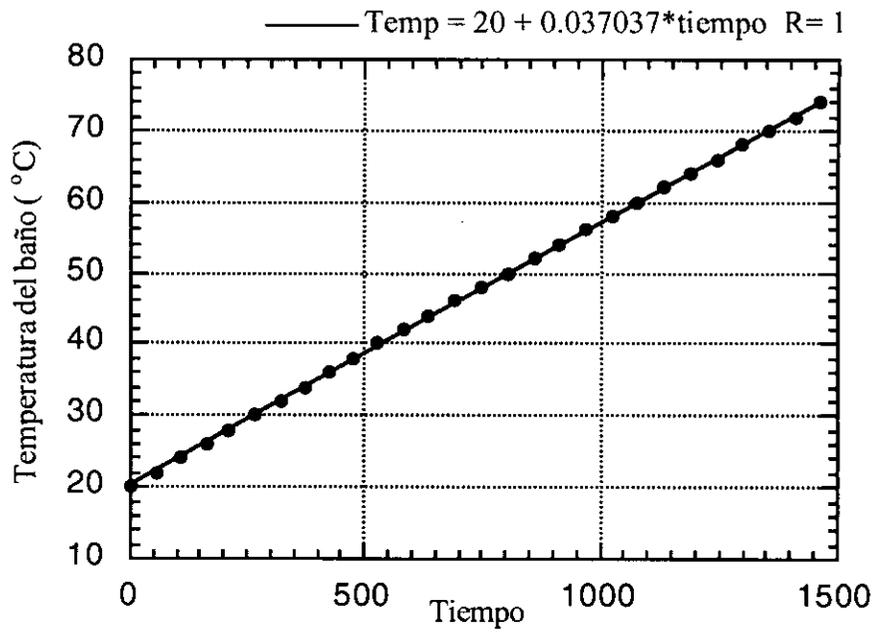
R = 1.987 cal*K⁻¹*mol⁻¹

273.15 K = 0°C

La diferencia de entropía entre la disociación y la reasociación de las hélices (despejadas en

Cinética del baño Thermomix:				
Temp. (°C)	Calentamiento		Enfriamiento	
	tiempo (min)	tiempo (seg)	tiempo (min)	tiempo (seg)
14	0.00	0	17.39	1059
16	0.53	53	16.11	971
18	1.46	106	14.54	894
20	2.37	157	13.44	824
22	3.33	213	12.41	761
24	4.24	264	11.44	704
26	5.20	320	10.52	652
28	6.08	368	10.03	603
30	7.01	421	9.17	557
32	7.57	477	8.35	515
34	8.48	528	7.55	475
36	9.43	583	7.17	437
38	10.33	633	6.42	402
40	11.23	683	6.08	368
42	12.23	743	5.36	336
44	13.13	793	5.05	305
46	14.10	850	4.36	276
48	15.03	903	4.08	248
50	15.59	959	3.41	221
52	16.56	1016	3.16	196
54	17.48	1068	2.51	171
56	18.46	1126	2.27	147
58	19.39	1179	2.04	124
60	20.35	1235	1.41	101
62	21.31	1291	1.20	80
64	22.26	1346	0.59	59
66	23.23	1403	0.39	39
68	24.15	1455	0.19	19
70	25.12	1512	0.00	0
72	26.06	1566		
74	27.00	1620		

Calentamiento:



Enfriamiento:

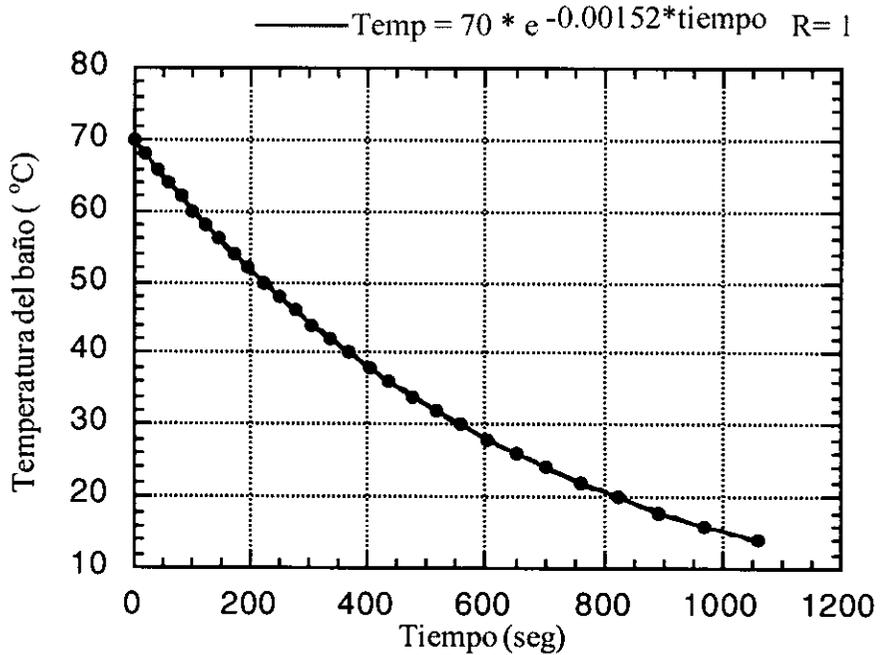


Figura 29. Determinación de las cinéticas de calentamiento y enfriamiento del sistema de baños de agua conectados al espectrofluorímetro.

función de la entalpía), así como la relación entre estas diferencias de entropía para el switch y sus componentes por separado, fueron determinadas.

Interacción del switch PNA-DNA con el efector sintético EO19.

2×10^{12} moléculas de switch PNA-DNA en 290 μl de buffer TE pH 7.5, 20 mM KCl fueron colocadas en la cubeta del espectrofluorímetro. La temperatura fue fijada con el baño Lauda RM3 (Brinkmann) al valor deseado (30°C, 35°C y 40°C). 5 min. después de iniciada la medición de la fluorescencia, se inyectaron enérgicamente a la cubeta 1×10^{13} moléculas del oligo EO19 (5X molar) en 10 μl de TE. La emisión de fluorescencia a 450 nm se registró durante 1500 segundos (25 min.) para cada temperatura.

Para rastrear la posible formación de multímeros de switches abiertos (figura 30) se repitió uno de los experimentos anteriores (40°C), añadiendo a la cubeta junto con el switch de PNA-DNA, 1×10^{13} moléculas del oligo EOstem10 sin DABCYLar (5X molar con respecto al switch).

Para determinar la especificidad del switch PNA-DNA se realizó un experimento de hibridación con secuencias inespecíficas seguido de la inyección del oligo EO19, efector específico. Para esto se preparó un coctail que contenía las siguientes secuencias inespecíficas:

a) 10 μl de solución de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de DNA de esperma de salmón desnaturalizado. Considerando que el genoma de salmón es de aprox. 5 Gbases, esta cantidad es equivalente a 3.7×10^8 copias del genoma.

b) 1.5×10^{12} moléculas de cadena sencilla obtenidas por PCR asimétrico del gen 4 RRV de *Rotavirus*.

c) 1×10^{14} moléculas del 34-ámero F5MU.T.34.

d) 1×10^{14} moléculas del 74-ámero GM.LR74.

El coctail se inyectó a la cubeta con 2×10^{12} moléculas de switch PNA-DNA a los 300 seg. (5 min) de iniciado el registro de la emisión fluorescente. A los 1000 seg. se inyectaron 1×10^{13} moléculas del oligo EO19 (5X molar) y se continuó el registro de la emisión hasta los 2500 seg.

Titulación del efector sintético EO19 con el switch de PNA-DNA en solución.

2×10^{12} moléculas de switch PNA-DNA fueron mezcladas con diferentes cantidades (desde 1×10^{10} hasta 1×10^{13} moléculas, por triplicado) del efector EO19 en 300 μl de buffer TE pH 7.5, 20 mM KCl en tubos de microcentrifugación. Los tubos fueron calentados hasta 60°C en un baño seco y puestos a temperatura de salón durante 30 min. con agitación suave. Su fluorescencia fue registrada en el espectrofluorímetro. Como control negativo se añadieron al switch PNA-DNA, 10 μl de solución 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de DNA de esperma de salmón desnaturalizado.

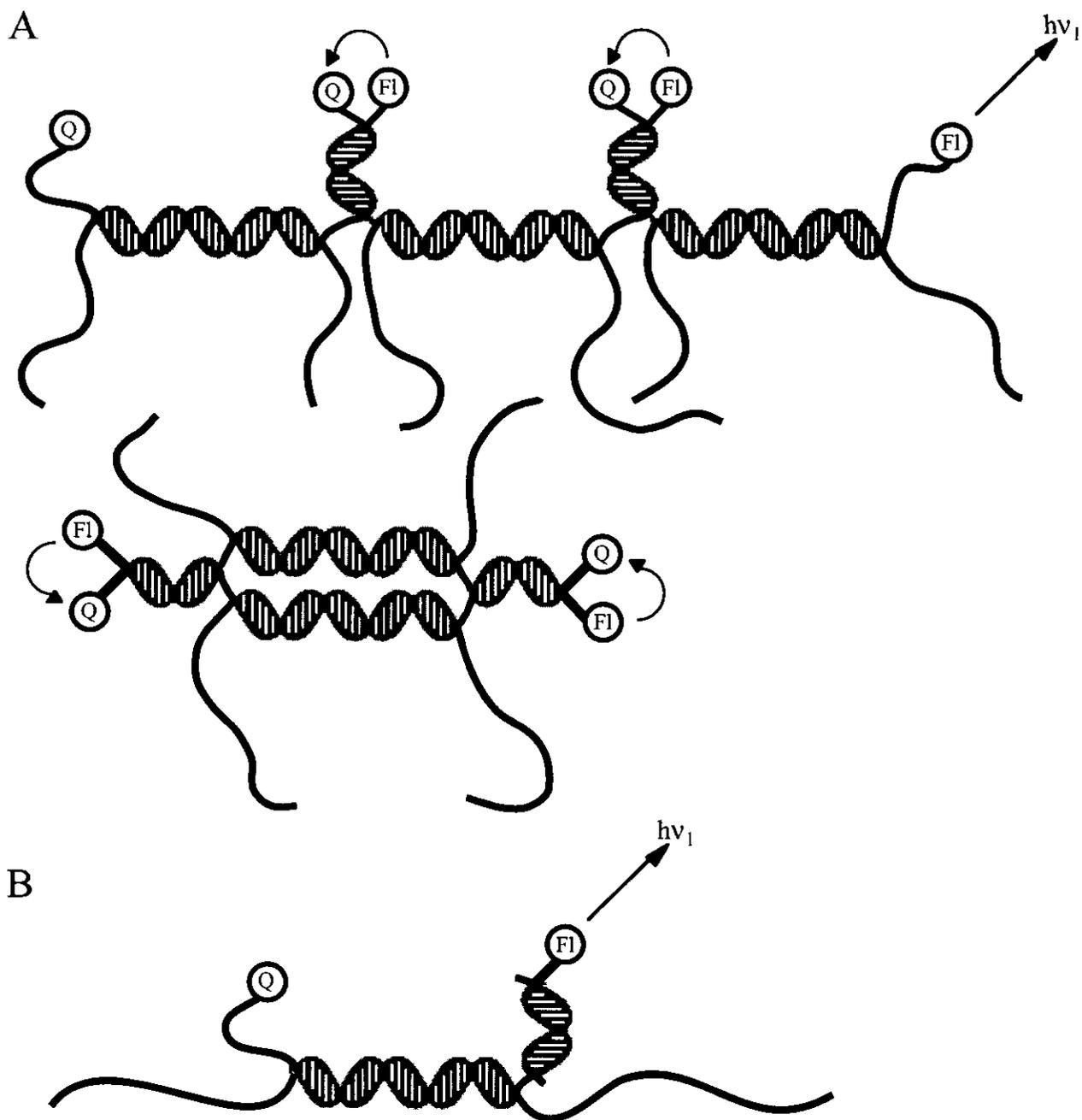


Figura 30. Multímeros.

A: La formación de multímeros entre varias moléculas de switch abierto puede llevar a una disminución de la emisión registrada.

B: Un exceso en el medio de la secuencia brazo del tallo, complementaria a la que lleva el fluoróforo pero sin quencher, puede evitar que estas especies se formen.

Comparación de la cinética de hibridación del switch PNA-DNA con la del faro molecular.

Para efectuar esta comparación fue escrito un diagrama de ecuaciones utilizando como herramienta el programa Theorist® (Waterloo Maple Software). La ecuación original que describe la velocidad de una reacción bimolecular, para el caso especial en que ninguno de los componentes se encuentra en un gran exceso sobre el otro, fue transformada para resolver la dependencia del porcentaje de hibridación con relación al tiempo de incubación. La ecuación obtenida fue la siguiente:

$$\text{Hyb} = \frac{T_0(e^{[-P_0+T_0]kt} - 1)}{T_0 e^{(-P_0+T_0)kt} - P_0} * 100$$

donde:

Hyb = porcentaje de hibridación

T₀ = concentración inicial de blanco (Target)

P₀ = concentración inicial de sonda (Probe)

k = constante de velocidad de reacción

t = tiempo

Por otro lado, se determinó la ecuación que describe el tiempo de incubación necesario para llegar a un determinado porcentaje de hibridación. Esta quedó como sigue:

$$t = \frac{\ln \left(\frac{P_0 \left[\frac{-1}{100} P_0 * \text{Hyb} + T_0 \right]}{T_0 \left[\frac{-1}{100} P_0 * \text{Hyb} + P_0 \right]} \right)}{(-P_0 + T_0)k}$$

Con estas dos ecuaciones fueron graficadas y comparadas las cinéticas teóricas para el faro molecular de Tyagi [15] y para nuestro switch híbrido PNA-DNA. Basándonos en los datos reales obtenidos por Tyagi, se modeló el comportamiento de su beacon en las condiciones en que trabaja nuestro switch.

Titulación del producto de sPCR D5 de cadena sencilla de *E. histolytica* con el switch de PNA-DNA en solución.

El producto de las reacciones de sPCR fue concentrado empleando Microcon 30 (Amicon, tamaño de corte de 60 nucleótidos para DNA de cadena sencilla) para eliminar el exceso de primer

que no intervino en la amplificación. En el PCR se obtienen 4 fragmentos de 164, 307, 450 y 594 bases (figura 25). A partir de un gel de poliacrilamida teñido con plata, se estimó la abundancia relativa de estos fragmentos, considerando que la intensidad de las bandas es proporcional al tamaño del producto de PCR y a su cantidad (los cálculos realizados son equivalentes a la determinación de una fórmula empírica). Se calculó así que el fragmento promedio tenía una longitud de 315 bases, por lo que contenía dos sitios de unión del switch PNA-DNA. La concentración másica del producto de PCR purificado por Microcon se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm. De aquí se calculó la concentración teórica de sitios de unión al switch PNA-DNA.

$2 \cdot 10^{12}$ moléculas de switch PNA-DNA fueron mezcladas con diferentes cantidades (desde $1 \cdot 10^{10}$ hasta $1 \cdot 10^{13}$ sitios de unión, por triplicado) del producto de PCR purificado en 300 μ l de buffer TE pH 7.5, 20 mM KCl en tubos de microcentrifugación. Los tubos fueron calentados hasta 60°C en un baño seco y puestos a temperatura de salón durante 30 min. con agitación suave. Su fluorescencia fue registrada en el espectrofluorímetro. Como control negativo se añadieron al switch PNA-DNA, 10 μ l de solución 10 μ g/ μ l de DNA de esperma de salmón desnaturalizado.

Retardamiento del producto de nPCR de *E. histolytica* con PNA en geles de PAA.

A 100 ng de cada una de las muestras (aPCR de amibas, aPCR de rotavirus y nPCR de amibas) se añaden 4 μ l de PNA EO24 c = 0.37 pmol/ μ l (aproximadamente un exceso de 2.5X a 5X para los PCRs asimétricos y normal respectivamente) y agua hasta un volumen de 17 μ l y se incuban 30 min. a 60°C en tubos de microcentrifugación. Los tubos se enfrían a temperatura ambiente y se les añade 3 μ l de buffer de carga nativo (azul de bromophenol al 0.25%, Xylene Cyanol FF al 0.25%, Ficoll Type 400 al 15% y Glycerol al 30% en agua). Como controles se preparan tubos con los productos de PCR sin calentar y calentados a 60°C, a los que no se adiciona PNA.

Las muestras se cargan en un gel de poliacrilamida nativo al 8% y se corre la electroforesis a 250 V hasta que esté por salir el Xylene Cyanol. La tinción se hace con plata.

Titulación de muestras en microplacas. Coeficiente de decremento.

Para la titulación de las muestras en las microplacas, con decrementos proporcionales, se dedujo la siguiente fórmula:

$$n_i = n_0 * \frac{V_1}{V_0} * \frac{(V_{\text{titr}} - V_1)}{V_{\text{titr}}} * \left(\frac{V_{\text{titr}}}{V_1}\right)^i$$

i = número de pozo

n_i = N° de moléculas en el pozo i

n_0 = N° inicial de moléculas

V_0 = volumen inicial de muestra

V_1 = volumen colocado en el primer pozo para comenzar a titular

V_{titr} = volumen de titulación

V_{titr}/V_1 = coeficiente de decremento

Ensayo de detección del efector sintético EO19 con el switch PNA-DNA en placas de microtitulación.

0.- Se utilizan placas de microtitulación Reacti-Bind (Pierce), cubiertas con streptavidina. En el ensayo se colocan tres tipos de control negativo: pozos con buffer solamente (Ctrl1), pozos con buffer + PNA (Ctrl2) y pozos con buffer + PNA + DNAs heterólogos (Ctrl3). Todas las mediciones se realizan por duplicado.

1.- Se añade a cada pozo (a excepción del Ctrl1) 50 μl de solución:

3*10¹⁴ molec/ml de switch PNA-DNA

100 $\mu\text{g/ml}$ DNA de esperma de salmón desnaturalizado

0.1% gelatina

buffer de pegado de biotina a streptavidina (SSC 1X)

2.- Se cubre la placa con papel de aluminio y se incuba 1 hora a 50°C con agitación de 150 rpm.

3.- Se enfría la placa a temperatura ambiente y se realizan dos lavados con buffer de fosfatos/Tween (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0.1 M, Tween 20 al 0.05%, pH 7.5)

4.- Se enjuaga la placa con buffer TE 5X/NaCl (50 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH 7.5)

5.- Se añade a cada pozo (a excepción del primer pozo y del Ctrl3) 50 μl de buffer TE 5X/NaCl.

6.- Se titula la solución del efector EO19 (4*10¹⁴ molec/ml en TE). Para esto se toman 250 μl de la solución inicial de efector y se colocan en el pozo 1. Se toman entonces 200 μl del pozo 1 y se mezclan con los 50 μl del pozo 2. Se retiran 200 μl del pozo 2 y se mezclan con los 50 μl del pozo 3.

Este procedimiento se repite hasta el último pozo, tomando 200 μl del pozo i y mezclándolos con los 50 μl del pozo $(i+1)$, en el orden creciente de i .

El coeficiente de decremento para este caso se determina como:

$n_0 = 4*10^{14}$ molec

$$V_0 = 1000 \mu\text{l}$$

$$V_1 = 250 \mu\text{l}$$

$$V_{\text{titr}} = 200 \mu\text{l}$$

$$n_1 = 2 \cdot 10^{13} \text{ molec}, n_2 = 1.6 \cdot 10^{13} \text{ molec}, n_3 = 1.3 \cdot 10^{13} \text{ molec} \dots$$

$$V_{\text{titr}}/V_1 = 4/5$$

7.- En el pozo del Ctrl3 se añaden (en buffer TE):

a) 30 μl aPCR de rotavirus $c = 3.75 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3 \cdot 10^{10} \text{ molec}/\mu\text{l}$
 $9 \cdot 10^{11} \text{ molec}$

b) 10 μl F5MU.T.34 $c = 1.07 \cdot 10^{12} \text{ molec}/\mu\text{l}$
 $1 \cdot 10^{13} \text{ molec}$

c) 10 μl GM.LR.74 $c = 9.9 \cdot 10^{11} \text{ molec}/\mu\text{l}$
 $1 \cdot 10^{11} \text{ molec}$

8.- Se cubre la placa con papel de aluminio y se incuba 1 hora a 37°C con agitación de 150 rpm.

9.- Se lee la placa de microtitulación en el CytoFluor® 2300 (Millipore) con los siguientes parámetros:

Filtro de excitación: EX centro 360 nm, ventana 40 nm

Filtro de emisión: EM centro 460 nm, ventana 40 nm

Sensibilidad: 4

Nº de pases: 3

10.- Se promedian los valores de cada pozo en los tres pases y los valores de los duplicados, se les resta el valor obtenido para el Ctrl2 y se grafica el resultado.

Ensayo de detección del nPCR de *E. histolytica* con el switch PNA-DNA en placas de microtitulación.

0.- Se utilizan placas de microtitulación Reacti-Bind (Pierce), cubiertas con streptavidina. En el ensayo se colocan tres tipos de control negativo: pozos con buffer solamente (Ctrl1), pozos con buffer + PNA (Ctrl2) y pozos con buffer + PNA + DNAs heterólogos (Ctrl3). Como controles positivos se utilizan $1 \cdot 10^{12}$, $5 \cdot 10^{11}$ y $2.5 \cdot 10^{11}$ moléculas del efector sintético EO19 (Ctrl4-Ctrl6). Todos los pozos se preparan por duplicado.

1.- Se añade a cada pozo (a excepción del Ctrl1) 50 μl de solución:

$3 \cdot 10^{14} \text{ molec/ml}$ de switch PNA-DNA

100 $\mu\text{g/ml}$ DNA de esperma de salmón desnaturalizado

0.1% gelatina

buffer de pegado de biotina a streptavidina (SSC 1X)

2.- Se cubre la placa con papel de aluminio y se incuba 1 hora a 50°C con agitación de 150 rpm.

3.- Se enfría la placa a temperatura ambiente y se realizan dos lavados con buffer de fosfatos/Tween ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.1 M, Tween 20 al 0.05%, pH 7.5)

4.- Se enjuaga la placa con buffer TE 1X/KCl (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, KCl 12.5 mM, pH 8.3)

5.- Se añade a cada pozo (a excepción del primer pozo y de los controles Ctrl3 al Ctrl6) 50 µl de buffer TE 1X/KCl (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, KCl 50 mM, pH 8.3).

6.- Se hierve durante 3 min el producto de nPCR de amibas.

7.- Se titula el producto de nPCR en la placa de microtitulación ($1 \cdot 10^{14}$ sitios/ml estimados por gel). Para esto se toman 300 µl de la solución inicial del nPCR y se colocan en el pozo 1. Se toman entonces 250 µl del pozo i y se mezclan con los 50 µl del pozo (i+1) en el orden creciente de i.

El coeficiente de decremento para este caso se determina como:

$$n_0 = 1 \cdot 10^{14} \text{ molec}$$

$$V_0 = 1000 \mu\text{l}$$

$$V_1 = 300 \mu\text{l}$$

$$V_{\text{tir}} = 250 \mu\text{l}$$

$$n_1 = 5 \cdot 10^{12} \text{ molec}, n_2 = 4.2 \cdot 10^{12} \text{ molec}, n_3 = 3.5 \cdot 10^{12} \text{ molec} \dots$$

$$V_{\text{tir}}/V_1 = 5/6$$

8.- En el pozo del Ctrl3 se añaden (en buffer TE):

a) 30 µl aPCR de rotavirus $c = 3.75 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3 \cdot 10^{10} \text{ molec}/\mu\text{l}$
 $9 \cdot 10^{11} \text{ molec}$

b) 10 µl F5MU.T.34 $c = 1.07 \cdot 10^{12} \text{ molec}/\mu\text{l}$
 $1 \cdot 10^{13} \text{ molec}$

c) 10 µl GM.LR.74 $c = 9.9 \cdot 10^{11} \text{ molec}/\mu\text{l}$
 $1 \cdot 10^{11} \text{ molec}$

9.- En el pozo del Ctrl4 se añaden 50 µl de solución del efector EO19 de $2 \cdot 10^{10} \text{ molec}/\mu\text{l}$.

10.- En el pozo del Ctrl5 se añaden 25 µl de solución del efector EO19 de $2 \cdot 10^{10} \text{ molec}/\mu\text{l}$ y 25 µl de buffer TE 1X/KCl (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, KCl 50 mM, pH 8.3).

11.- En el pozo del Ctrl5 se añaden 12.5 µl de solución del efector EO19 de $2 \cdot 10^{10} \text{ molec}/\mu\text{l}$ y 37.5 µl de buffer TE 1X/KCl (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, KCl 50 mM, pH 8.3).

12.- Se añade a todos los pozos 150 µl de buffer TE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8.3) sin KCl (concentración final de KCl = 12.5 mM, concentración final máxima de $\text{MgCl}_2 = 375 \mu\text{M}$ en el pozo N° 1).

13.- Se cubre la placa con papel de aluminio y se incuba 1 hora a 37°C con agitación de 150 rpm.

14.- Se lee la placa de microtitulación en el CytoFluor® 2300 (Millipore) con los siguientes parámetros:

Filtro de excitación: EX centro 360 nm, ventana 40 nm

Filtro de emisión: EM centro 460 nm, ventana 40 nm

Sensibilidad: 4

N° de pases: 3

15.- Se promedian los valores de cada pozo en los tres pases y a los valores de los duplicados o triplicados (para el efector y los controles respectivamente), se les resta el valor obtenido para el Ctrl2 y se grafica el resultado.

Purificación de oligos a través de la columna de intercambio aniónico Mono-Q (FPLC)

A. Soluciones

BUFFER A: 15 mM NaOH, 0.5 M NaCl.

BUFFER B: 15 mM NaOH, 1 M NaCl.

Las soluciones son filtradas (0.45 μ m) bajo succión.

B. Programa (METHOD 1; BANK 5)

0.00	Conc % B	0.0
0.00	mL/min	0.6
1.00	valve. pos	1.2
3.00	Conc % B	0.0
3.10	valve. pos	1.1
25.0	Conc % B	100
29.0	Conc % B	0.0
34.0	Conc % B	0.0

C. Corrida analítica

0. Escala de síntesis: 0.2 μ moles.

1. Analizar aproximadamente 2% del total de la muestra (aprox. 5 μ g).

2. Diluir los microlitros correspondientes con BUFFER A a un volumen total de 530 μ L.

3. Aplicar en el loop.

4. Correr el programa con las siguientes especificaciones:

Rango AU	0.2
Pluma-Registrador	10 mV
Pluma-Gradiente	1.0 V
Vel. del Papel	15 cm/hr

Normalmente el último pico (el más alto) es el deseado.

D. Corrida preparativa

1. Diluir el volumen restante (aproximadamente 250 μ g) a 530 μ L con BUFFER A. El BUFFER A debe representar al menos el 20% del volumen final, es decir 100 μ L.

2. Aplicar y correr la muestra con las siguientes especificaciones:

Rango AU	0.2 a 0.5
Pluma-Registrador	0.2 V

Pluma-Gradiente	1.0 V
Vel. del Papel	15 cm/hr

Estar al pendiente con 2 o 3 tubos Corex 15, para coleccionar el pico deseado. Dejar pasar unos 10 segundos del punto del que se quiere coleccionar. El pico sale en aproximadamente 1.0 a 1.5 mL.

E. Precipitación

1. Añadir 2 volúmenes de agua.
2. Añadir 10 % del volumen final de 3 M NaOAc pH 4.7 a 5.2. Mezclar.
3. Añadir 2.5 volúmenes de etanol frío. Mezclar.
4. Mantener a -20°C por lo menos 4 horas (de preferencia toda la noche).
5. Centrifugar a 8000 rpm (10000 g, en rotor JS13) durante 15 min. a 4°C.
6. Lavar con etanol al 95 %.
7. Centrifugar a 8000 rpm (10000 g, en rotor JS13) durante 5 min. a 4°C.
8. Remover etanol. Secar a temperatura de salón.

Hibridación y geles de retardamiento de DNAs con PNAs.

100 ng de cada uno de los blancos de DNA fueron mezclados con 583.0 ng ó 917.6 ng de los PNAs EO12Li (no estructurado) y EO19Sw (con estructura de tallo y asa) respectivamente. Esto representa un exceso molar del PNA de 20X. Las muestras fueron incubadas a una determinada temperatura constante durante 30 min. en un baño seco. 3 µl del buffer de carga conteniendo 0.25% de Azul de Bromofenol y 15% Ficoll Tipo 400 fueron añadidos a cada una de las muestras para ser cargadas en un gel de poliacrilamida al 12.5%, precorrido con buffer TBE y precalentado a la misma temperatura que la utilizada en el paso de hibridación.

Después de cargado el gel, la electroforesis (Tall Mighty Small, Hoeffer Scientific Instruments) se llevó a cabo por unos minutos (manteniendo la misma temperatura que en los pasos anteriores) a 100 mV hasta que las muestras entraron completamente en el gel. Seguidamente se continuó la electroforesis a 4°C hasta que el Azul de Bromofenol migró a una posición que distaba 3 cm aproximadamente del borde inferior del gel.

Los geles fueron teñidos por 5 min. con una solución de Bromuro de Etidio (1µg/ml) en buffer TBE y sumergidos en solución 1 mM de MgSO₄ en buffer TBE por otros 5 min. con el objetivo de disminuir la fluorescencia de fondo. Los geles fueron revelados sobre un transiluminador de UV de onda larga y fotografiados en un Eagle Eye (Stratagene).

RESULTADOS Y DISCUSION

Criterios para el diseño de un switch molecular fluorescente:

A. Diseño de la región sonda.

1. La región sonda, localizada en el asa del switch puede en principio construirse con DNA o PNA. Se decidió utilizar el PNA con el objetivo de maximizar su potencial para la discriminación de alelos que difieren en un único cambio puntual (véase en la introducción la sección concerniente al uso de PNA en la discriminación de alelos)

2. Un criterio adicional para preferir el uso del PNA en la región sonda es la atractiva posibilidad de aprovechar la capacidad del PNA de invadir un producto de PCR de cadena doble al realizar la hibridación a bajas concentraciones de sal (10-15 mM NaCl), condiciones bajo las cuales se desestabiliza la doble cadena de DNA sin afectar de forma significativa la interacción del PNA con el DNA (véase figura 13: dependencia de la T_m de la concentración de iones monovalentes).

3. Otra ventaja del uso del PNA como sonda radica en la relativa independencia de la estabilidad de los híbridos de PNA:DNA de la concentración de magnesio. Este punto se presentará en detalle más adelante.

B. Criterios para el diseño de la región tallo:

1. El tallo de un switch molecular consiste de dos elementos o brazos, cada uno de los cuales puede ser construido de DNA o PNA. En nuestro diseño elegimos que uno de los brazos fuera de DNA y el otro de PNA por las siguientes razones: Primero, un tallo DNA:DNA estaría sujeto a efectos de estabilidad dependientes de la concentración de sales monovalentes y magnesio, lo cual se consideró poco deseable ya que afectaría el funcionamiento inequívoco del switch en diferentes ambientes. Segundo, al ser uno de los brazos del switch de tipo péptido nucleico, su síntesis se realizaría en una sola etapa, conjuntamente con la región sonda. Esto permite evadir un nuevo paso de síntesis y elimina la necesidad de introducir otra reacción de acoplamiento.

2. El segundo elemento del tallo, al formar un híbrido con el primero, genera una estructura que competirá termodinámicamente con el híbrido entre la sonda y el blanco. Debido a la imposibilidad de predecir de manera exacta la estabilidad térmica de un híbrido, consideramos esencial el disponer de un sistema que nos permitiese afinar el delicado balance que se requiere para poner en funcionamiento este sistema de stringency clamping basado en dicha competencia (este término se refiere a la existencia de una estructura de estabilidad intermedia entre los complejos perfecto e imperfecto, que compite por su formación con los mismos, impidiendo de manera efectiva la formación del complejo imperfecto aún a temperaturas muy inferiores a la t_m de éste [56]). La

mejor opción es sin duda, la creación de un sistema flexible que permita ensayar diseños en los que el largo del tallo se cambie en incrementos o decrementos de un par de bases mediante el uso de un brazo intercambiable.

Decidimos que era ventajoso que el brazo potencialmente intercambiable fuese de DNA, debido a que resulta muy barato generar tallos de diferente longitud, simplemente utilizando oligonucleótidos de DNA con tamaños que varíen desde 8 hasta 10 nucleótidos, por ejemplo. Para que el brazo fuese en principio intercambiable, decidimos unirlo al resto de la molécula (la parte péptido nucleica) por una unión covalente de tipo disulfuro. Este enlace tiene la ventaja de que se genera con facilidad y efectividad y además se puede romper a conveniencia en presencia de agentes reductores como el DTT, perfectamente compatibles con el DNA o el PNA. Más adelante mostraremos el uso de este enlace para demostrar el aporte entrópico de la interacción intramolecular a la estabilidad del tallo.

C. Arquitectura del switch:

Debido a que los híbridos formados entre el PNA y el DNA son preferentemente antiparalelos (con el extremo 3' del DNA interactuando con el extremo amino terminal del PNA), sólo hay dos posibles estructuras finales para el switch quimérico: una, en la que la unión covalente es entre el extremo 3' del DNA y el extremo amino terminal del PNA (quedando libres el extremo 5' del DNA y el carboxilo terminal del PNA) y la otra, en la que el enlace de disulfuro se establece entre el extremo 5' del DNA y el carboxilo del PNA (quedando entonces libres el extremo 3' del DNA y el amino del PNA). Consideramos que el diseño de mayores perspectivas era el segundo, en el que la polaridad de la molécula determina que el switch presente el 3'-OH de la ribosa libre. Esta elección se basa en los siguientes criterios:

1. A través del grupo 3'-OH se puede introducir, mediante síntesis química, una biotina. Es precisamente en la interacción de la biotina con la streptavidina que está basado el sistema de inmovilización aplicado en nuestro trabajo.

2. Debido a que la síntesis química de oligonucleótidos avanza en la dirección 3' -> 5', resulta sencillo generar un oligonucleótido cuya inmovilización (a través del 3') se obtenga de manera automática en el proceso de síntesis, empleando como soporte la propia resina de dicho proceso. En esquemas de este tipo, el PNA se introduciría posteriormente en el soporte sólido que contiene oligos con un 5'-SH libre. Este sería un modelo atractivo para la generación de switches sobre superficies derivatizadas con oligos cortos de 8 a 10 bases de DNA.

3. La polaridad elegida provee una tercera ventaja. El 3'-OH libre permite concebir el empleo de un switch molecular en el cual éste extremo 3' del DNA actúa como un primer en una reacción de extensión con DNA polimerasa. En la sección de perspectivas presentaremos el diseño de un switch PNA-DNA similar al descrito en esta tesis, pero con la adición de 20 nucleótidos en el

extremo 3' que permiten al switch funcionar como un primer de PCR. En el diseño de este switch, se considera que la inmovilización se logra más tarde en el ensayo, mediante la captura del producto de PCR de cadena sencilla, generado por la acción de la endonucleasa del Gene VI del fago T7.

D. Diseño del switch:

Para el diseño de la parte péptido nucleica del switch se consideraron dos factores: su longitud y su secuencia. El asa debe ser suficientemente larga para permitir una adecuada especificidad por los blancos de amiba y para que la estabilidad de su duplex con el blanco sea mayor que la del híbrido formado por la interacción de los brazos del switch (tallo), de manera que la competencia por la hibridación se vea energéticamente favorecida en el caso de la hélice asa:blanco. Debido a que la síntesis de oligos de PNA muy largos es técnicamente difícil, existe también un límite para la longitud de la secuencia a diseñar, aún más si se tiene en cuenta que una parte de esta secuencia debe ser destinada a uno de los brazos del tallo. Se determinó así sintetizar una molécula de PNA con 15 bases correspondientes al asa y 10 bases correspondientes al brazo. En cuanto a la secuencia, el criterio más importante fue el de estabilidad, ya que se conoce que los duplex de PNA:DNA en los cuales el oligómero de PNA contiene al menos 20-25% de purinas es más estable que los formados por PNAs completamente pirimidínicos. Un análisis de la secuencia blanco indicó el lugar adecuado, según los criterios señalados, para la unión de la sonda:

5'-AAT CAA CGG TGT AAA TTA GTA AAA AAT TAT TTC ATC TAT ACG ACG ACC ATT
TTG AAT AAT TCC TTT GAT TTT CCC AGT TAG AAA TTA TTG TAC TTT GTA TTT AGT
ACT TTT CAT TAA AAT CCA AAA GGT TCT TAT GAA ATC G-3'

El complemento de esta secuencia, -CO-CA TTT AAT CAT TTT T-NH- posee una composición del 26.6% de purinas y constituye la sonda de 15 bases.

Con el fin de reducir aún más el tamaño de la molécula de PNA se decidió que la última base del brazo péptido nucleico fuese una T, para que coincidiera con la primera del asa y así eliminar una base del diseño. De este modo, la T de transición entre el brazo y el asa participa en la formación de dos híbridos: el tallo y el asa:blanco.

Para el brazo de PNA se escogió una secuencia mixta, con un 25% de purinas, no complementaria al blanco: -NH-TAT TCT GTC T-CO-.

En el extremo amino terminal de la molécula de PNA se colocó una glicina, con la doble función de proteger al PNA, impidiendo su gradual degradación (por fenómenos intramoleculares de rearreglo N-acílico o ciclización seguida de eliminación de cetopiperazina), y servir de donante del grupo amino en la reacción de acoplamiento del PNA al fluoróforo. En el extremo carboxilo se colocó una cisteína para servir de conexión con el brazo de DNA, que es un oligo tiolado. La secuencia completa de la molécula de PNA es la siguiente:

$\text{NH}_2\text{-Gly-TAT TCT GTC TTT TTA CTA ATT TAC-Cys(SH)-CONH}_2$

El brazo se indica con bases suprarayadas y las del asa subrayadas. La longitud total es de 24 bases más dos aminoácidos.

El brazo de DNA se diseñó antiparalelo y complementario al de PNA. La síntesis se realizó utilizando la resina BioTEG CPG (1-Dimetoxitritiloxi-3-O-(N-biotinil-3-aminopropil)-trietilenglicolil-gliceril-2-O-succinil-cadena larga alquilaminada-Vidrio de Poro Controlado, Glen Research), por lo que su extremo 3' se encuentra biotinilado. La biotina funciona como ancla para las placas de microtitulación derivatizadas con streptavidina. Esto representa una doble ventaja pues permite un formato del ensayo cómodo y automatizable, del tipo ELISA, y evita la posible formación de multímeros de switches abiertos al aislar las moléculas de switch en la superficie sólida. Una extensión del aprovechamiento de las posibilidades de este sistema en fase sólida consiste en la implementación de ensayos en los que se puedan detectar varios analitos a la misma vez (ensayos multiplex) utilizando para ello switches de diferente secuencia y/o pares fluoróforo-quencher inmovilizados en determinadas regiones del soporte. Un esquema de este tipo se propone dentro de las perspectivas de nuestro trabajo.

La segunda base del oligo es una T modificada con un espaciador C6 terminado en un grupo amino (empleando en la síntesis el 5'-Dimetoxitritil-5-[N-(trifluoroacetilaminohexil)-3-acrilamido]-2-deoxiUridina, 3-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidito, Glen Research), necesario para la introducción de la especie quencheadora. El último fosforamidito empleado en la síntesis del oligo (1-O-Dimetoxitritil-hexil-disulfuro, 1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidito, Glen Research) permite el acoplamiento de un grupo tiol, empleado posteriormente para formar el aducto con el PNA a través de un enlace disulfuro. La secuencia completa del brazo de DNA es la siguiente:

5'-HS-AGA CAG AAT(NH₂) A-Biotina-3'.

El diseño completo, con todos sus componentes se muestra en la figura 31.

El blanco artificial fue diseñado para ser complementario al asa del switch PNA-DNA y se le colocaron dos bases no significativas a cada lado, siendo su longitud total de 19 bases. EO19 es un oligo normal, sin modificaciones.

Ensamblaje del switch PNA-DNA y acoplamiento del par fluoróforo:quencher:

El esquema de ensamblaje seleccionado se muestra en la figura 32. Se incluyen dos tipos de reacción: dos ataques nucleofílicos de grupos amino a ésteres N-hidroxisuccinimidílicos (reacciones de introducción del DABCYL y la Coumarina al DNA y PNA respectivamente) y dos reacciones de intercambio de disulfuros (la activación del sulfidrilo del PNA y el acoplamiento de éste al sulfidrilo del DNA). Es importante destacar que ambos tipos de reacción pueden ser llevados a cabo con una gran especificidad debido a la alta nucleofilicidad de los grupos amino y tiol, además de realizarse

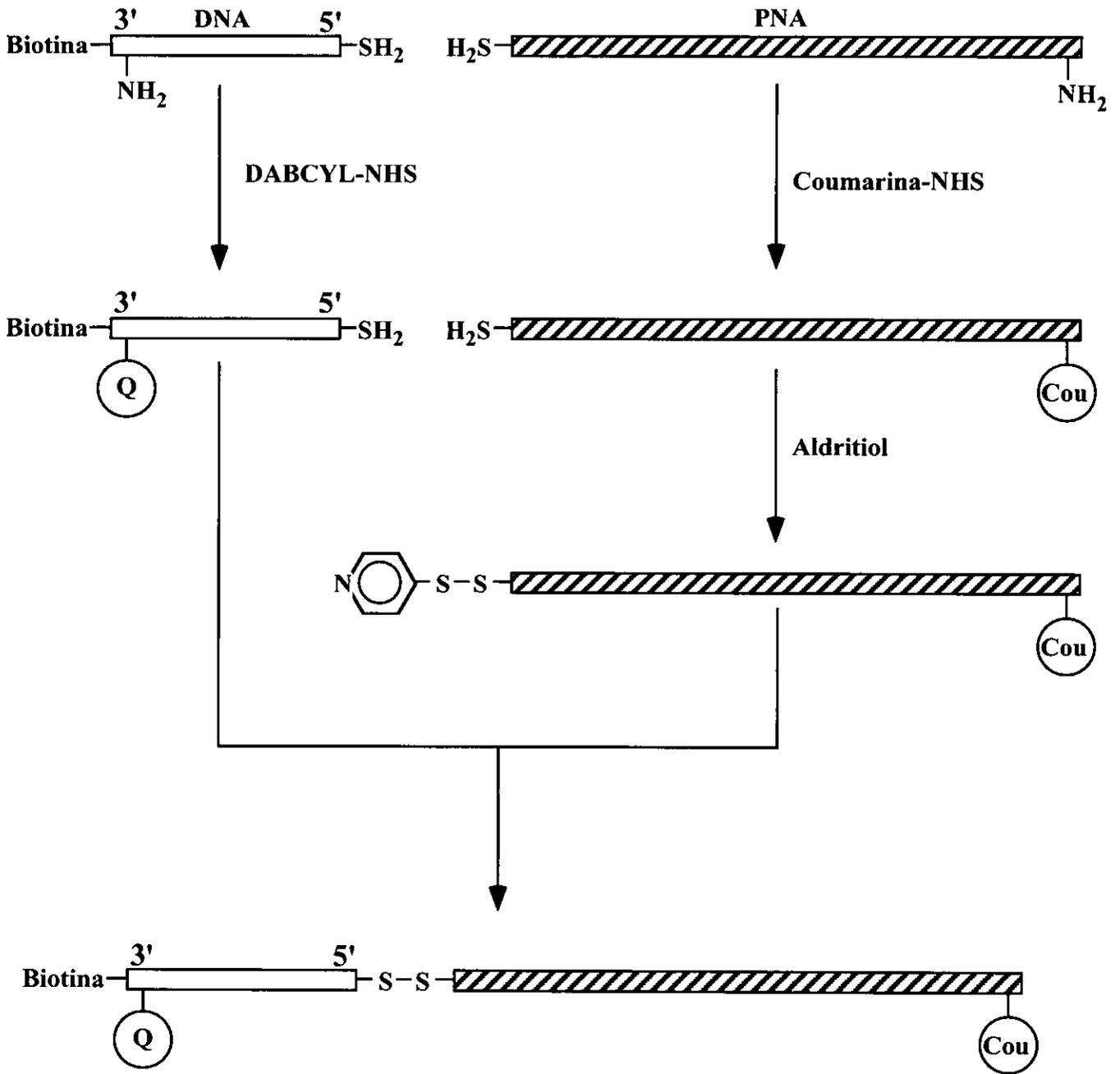


Figura 32. Esquema de la síntesis del switch PNA:DNA

en condiciones suaves de temperatura y pH, compatibles con las especies químicas utilizadas en este trabajo.

Cada una de las etapas de la síntesis fue monitoreada mediante el fraccionamiento de las especies por HPLC de fase reversa. La derivatización del DNA fue verificada además por retardamiento de bandas en geles nativos de poliacrilamida. En el caso del PNA esto no fue posible debido a que, al ser el PNA una especie no cargada, no migra bajo el campo eléctrico. La extensión de la reacción del paso de la activación del sulfidrilo del PNA con Aldritiol se determinó monitoreando la liberación de 4-tiopiridona ($\lambda_{\text{max}} = 324 \text{ nm}$, $\epsilon = 1.98 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ [57]).

Determinación de la temperatura de fusión del switch PNA-DNA:

Las curvas de fusión con las componentes correspondientes al calentamiento y el enfriamiento de la solución del switch se muestran en la figura 33. También se muestra la determinación gráfica de la temperatura de fusión para cada componente. Estos datos son mostrados en la figura 34 para el switch desnaturalizado con DTT. Como se puede apreciar, en el caso del switch nativo, la fusión es más cooperativa, la T_m es mayor y la histéresis de la curva menor que en el caso en que sólo existen los componentes del switch no ligados. La temperatura de fusión (determinada como temperatura de disociación) del switch PNA-DNA fue de 52.11°C (la T_m de reasociación fue de 50.40°C), mientras que para sus componentes por separado fue de 46.11°C (siendo la de reasociación para éstos de 37.47°C), lo que indica una diferencia en estabilidad equivalente a 6°C . El cambio entrópico que sufren los oligos de DNA y PNA al disociarse es más de 5 veces mayor que el de estos mismos componentes enlazados por el asa del switch.

Una cuestión de relevante importancia, que fue puesta en evidencia al determinar las temperaturas de fusión, es la relativa independencia de la interacción PNA:DNA de la presencia de iones bivalentes como el magnesio. En experimentos de fusión sin magnesio y en presencia de concentraciones 5 mM del mismo, la T_m obtenida para nuestro switch se mantuvo prácticamente constante. A modo de comparación ofrecemos los resultados obtenidos por Tyagi y Kramer: su faro molecular con un tallo de 13 p.b. posee una T_m de 27°C en ausencia de magnesio y de 56°C a concentraciones 1 mM del ion [15]. Un estudio a profundidad concerniente al efecto de los iones sobre la estabilidad de los complejos con PNA fue publicado posteriormente por el grupo de Nielsen [58] con resultados muy similares a los nuestros. En general, la relativa independencia de la interacción PNA:DNA (y PNA:PNA) de la concentración de sales en el medio es otra ventaja que avala el uso de PNA como sondas para el diagnóstico, ya que en principio permite estandarizar ensayos para blancos de cualquier procedencia.

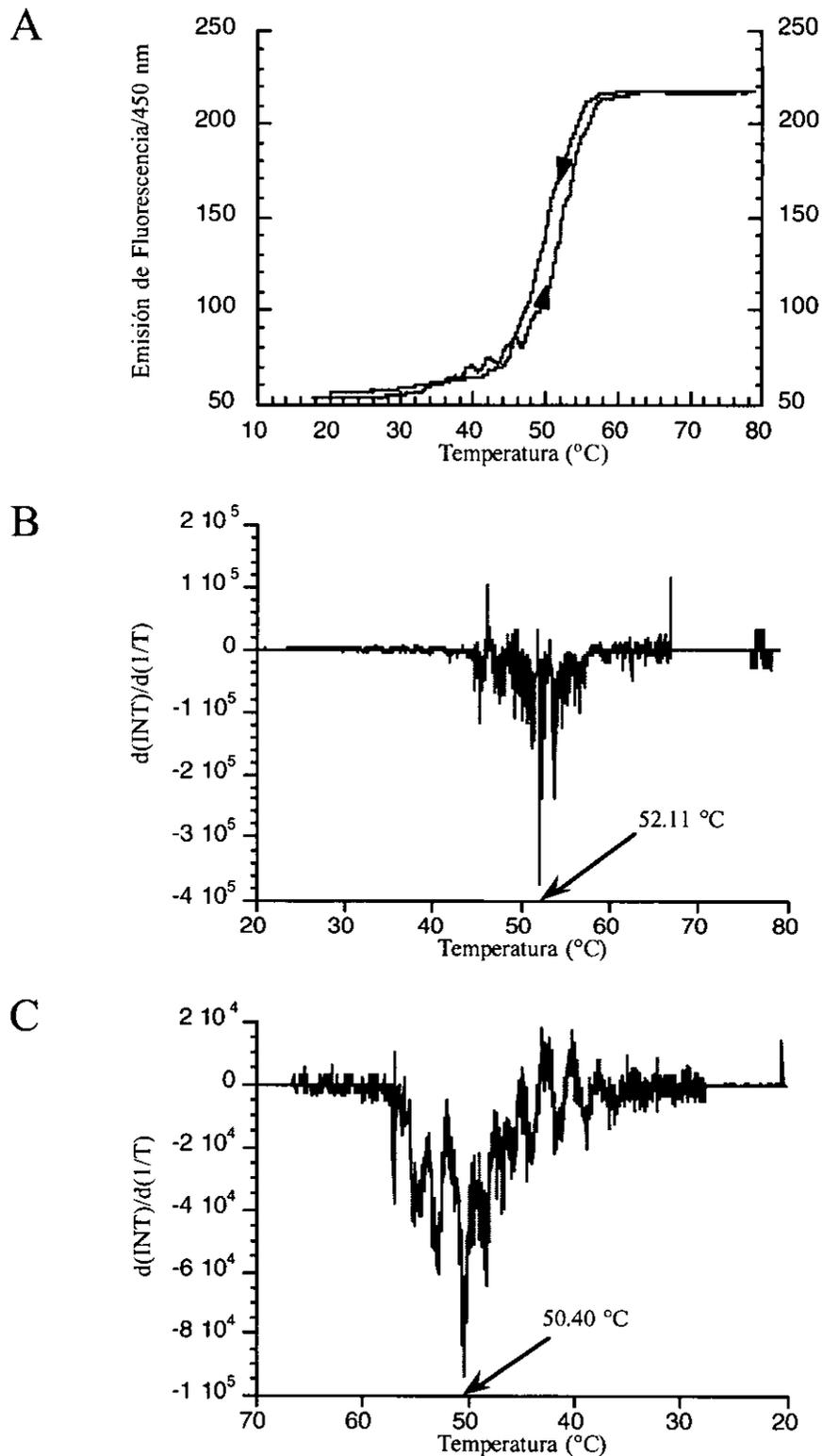


Figura 33. Determinación de la temperatura de fusión del switch PNA-DNA.

A: Curva de disociación y reasociación del switch PNA:DNA por calentamiento y enfriamiento de su solución.

B: Determinación de la T_m de disociación.

C: Determinación de la T_m de reasociación.

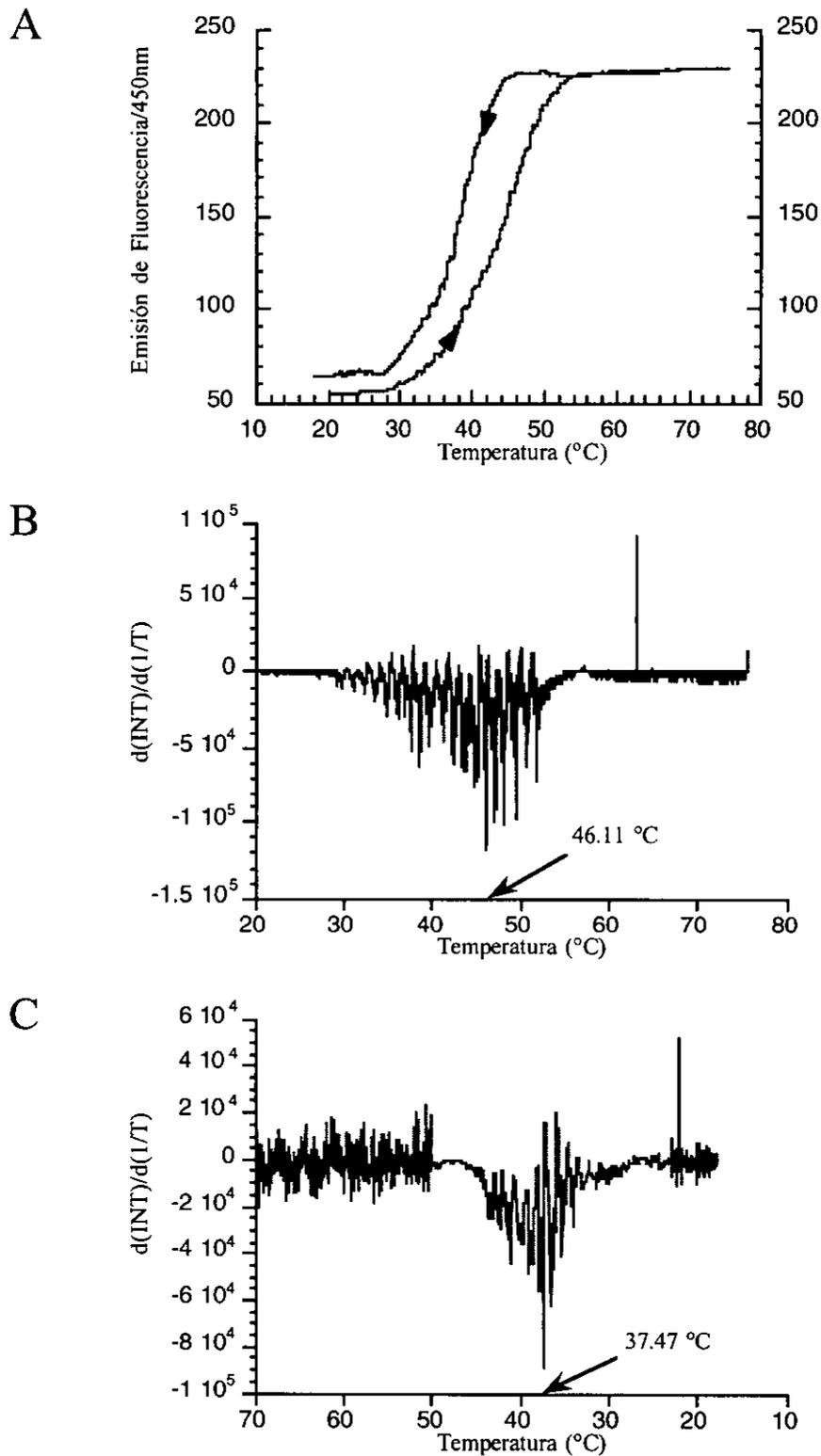


Figura 34. Determinación de la temperatura de fusión del híbrido PNA:DNA resultante de la desnaturalización del switch con DTT.

A: Curva de disociación y reasociación del híbrido al calentar y enfriar de su solución.

B: Determinación de la T_m de disociación.

C: Determinación de la T_m de reasociación.

Interacción del switch PNA-DNA con el oligo efector sintético:

Al entrar en contacto con el efector, el switch sufre el cambio conformacional esperado (figura 35 A). Al separarse los brazos del tallo, debido a la formación del nuevo duplex asa:blanco, la Coumarina y el DABCYL son físicamente separados y se registra un incremento de la fluorescencia emitida por el fluoróforo no quencheado. Es de destacar que la velocidad a la que el híbrido del tallo es disgregado aumenta al incrementarse la temperatura del medio, lo cual está en correspondencia con el efecto desestabilizador de la temperatura sobre el tallo, facilitando la transición de un duplex a otro.

Una de las cuestiones a las que se prestó gran importancia en las etapas de diseño de nuestro sistema de diagnóstico fue la posible formación de multímeros entre dos o más moléculas de switch en solución. La demostración de que este fenómeno tiene lugar se muestra en la figura 35 B. A 40°C, aproximadamente un 15% de la fluorescencia total es apagada por este efecto.

La especificidad de la sonda construida fue comprobada (figura 35 C). Cantidades elevadas de blancos no significativos no fueron capaces de abrir el switch. Se probaron diferentes clases de secuencias: DNA genómico, un producto de PCR de cadena sencilla y oligonucleótidos de diversas longitudes. Sólo el blanco específico fue capaz de desencadenar el cambio de conformación funcional en el switch.

Los experimentos de interacción del switch PNA-DNA con el efector sintético nos permitieron estimar el comportamiento cinético de la interacción de un PNA con un DNA, comparado con la de la interacción DNA:DNA. Partiendo de los datos generados en el trabajo realizado con los faros moleculares [15] simulamos una cinética teórica de hibridación para el switch de DNA con su blanco artificial. Para las concentraciones empleadas en los experimentos de Tyagi y Kramer (170 nM de sonda y 850 nM de blanco, en buffer 100 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, pH 8.0) se determinó que el tiempo teórico de un 99% de apertura de la sonda debería ser de aproximadamente 1.2 minutos. El tiempo observado en los experimentos fue de aproximadamente 12 min, unas 10 veces más lenta la cinética experimental que la teórica. Por extrapolación determinamos que, a las concentraciones empleadas en nuestro trabajo (9 nM de sonda y 45 nM de blanco, en buffer 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM KCl, pH 7.0) un 99% de los faros tipo Tyagi y Kramer se abrirían en unas 3 horas. Si comparamos esto con nuestro switch PNA-DNA, el cual se abre en 10 minutos, podemos llegar a la conclusión de que nuestro sistema es unas 18 veces más rápido que el del faro molecular.

Titulación de los efectores con el switch PNA-DNA

Después de comprobar que la apertura del switch es específica, se verificó que el producto de PCR de cadena sencilla de amiba tuviera también una acción efectora. Al mismo tiempo,

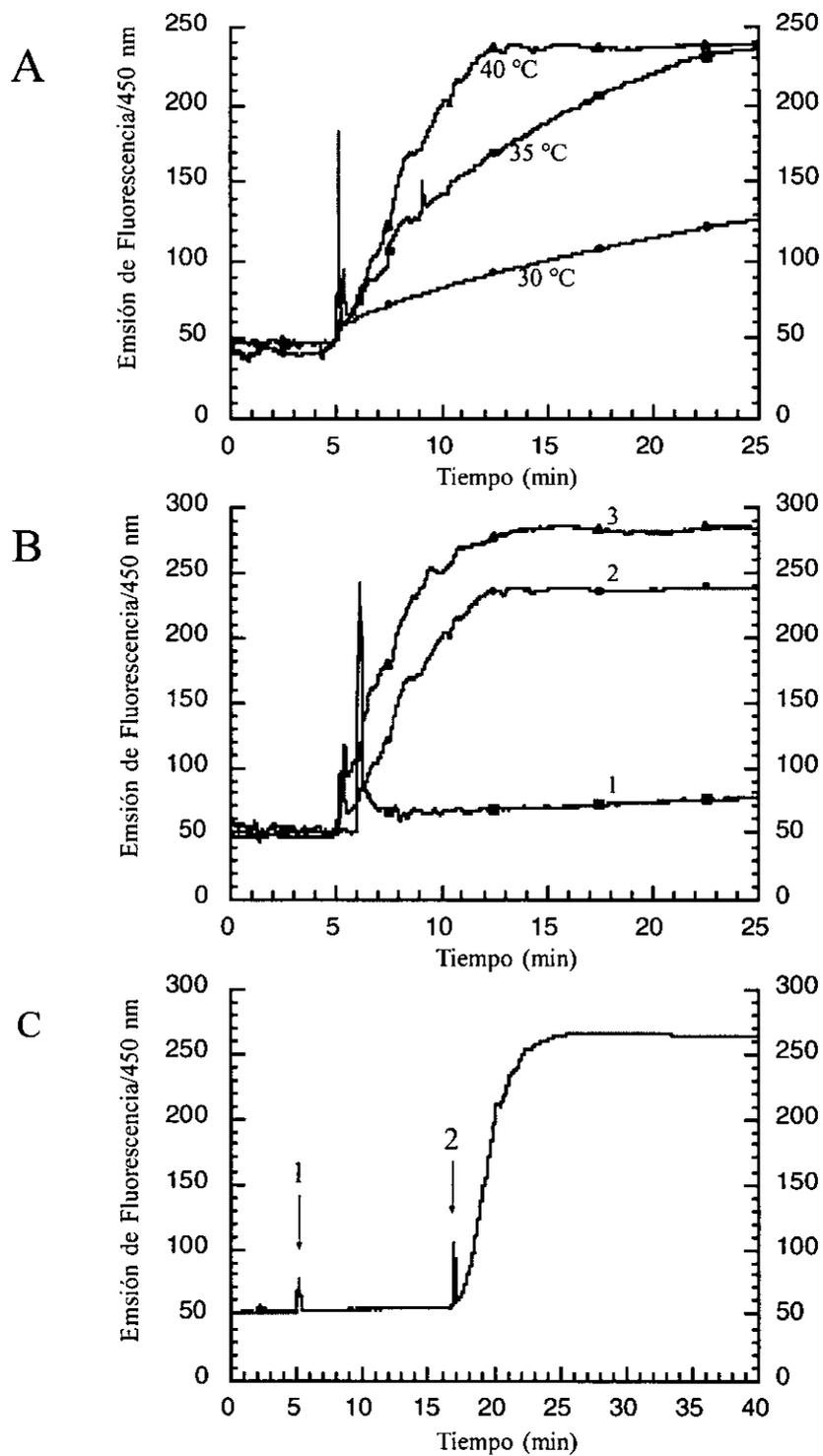


Figura 35.

A: Interacción del switch PNA-DNA con el blanco artificial a diferentes temperaturas.

B: Determinación de la formación de multímeros de switches abiertos a 40 °C:

1. Switch PNA:DNA + EOstem10.
2. Switch PNA:DNA + EO19.
3. Switch PNA:DNA + EOstem10 + EO19.

C: Determinación de la especificidad del switch PNA-DNA:

1. Coctail de secuencias inespecíficas.
2. Efactor sintético EO19.

evaluamos la capacidad de nuestro sistema de reportar una lectura con una intensidad relativa al número de blancos en el medio, esto es, una lectura cuantitativa.

A tal efecto, se hizo interaccionar una cantidad constante de sonda con un número variable de los blancos sintético y producto de PCR asimétrico. Para la cuantificación del producto de PCR (referida como número de blancos) se utilizaron la estimación empírica de la longitud del fragmento promedio y la medición de la concentración total de ácido nucleico por absorbancia a 260 nm.

El resultado obtenido se muestra en la figura 36. De esta gráfica se pueden sacar varias conclusiones. Los valores obtenidos para cada concentración de blanco son reproducibles (los experimentos se realizaron por triplicado), lo cual indica que el sistema es confiable. La estimación de la concentración de blancos en el producto de PCR se acerca significativamente a la concentración determinada del blanco artificial, validando la aproximación semiempírica empleada en su determinación. Cabe señalar que al parecer la concentración de blancos en el producto de PCR purificado fue sobrestimada, ya que en los últimos tres valores de concentración empleados, la determinación del efector sintético alcanza un plateau, lo cual no ocurre con el producto de PCR. Finalmente se puede concluir que el switch PNA-DNA responde de manera cuantitativa a los cambios de concentración de blancos en el medio.

Ensayos en formato de microtitulación.

Detección del efector sintético EO19.

Como habíamos indicado, en el caso de los experimentos realizados en solución, una parte significativa de los switches abiertos por su interacción con moléculas blanco interacciona entre sí provocando una disminución en la fluorescencia neta emitida. Este efecto es suprimible si se diseña un sistema que funcione con el switch inmovilizado por uno de sus extremos. Para demostrar el funcionamiento de los switches inmovilizados en placas de microtitulación, empleamos placas recubiertas de streptavidina, en las que se incubó el switch PNA-DNA que posee una biotina en el extremo 3' del brazo de DNA.

El resultado de la interacción entre el efector sintético y el switch inmovilizado se muestra en la figura 37.

Como se puede observar, la interacción del switch con el efector sigue siendo específica en la placa. Es interesante destacar que la cantidad de switch pegada a la placa cubierta de streptavidina es de unas $1.4 \cdot 10^{12}$ moléculas por pozo, lo cual está realmente cerca a la máxima cantidad pegable ($1.5 \cdot 10^{12}$ moléculas por pozo, determinada con un oligonucleótido corto biotinilado y marcado radioactivamente), por lo que se puede concluir que la presencia de la estructura molecular del switch no afecta la interacción biotina-streptavidina, al menos no más de lo que la afecta un oligo normal.

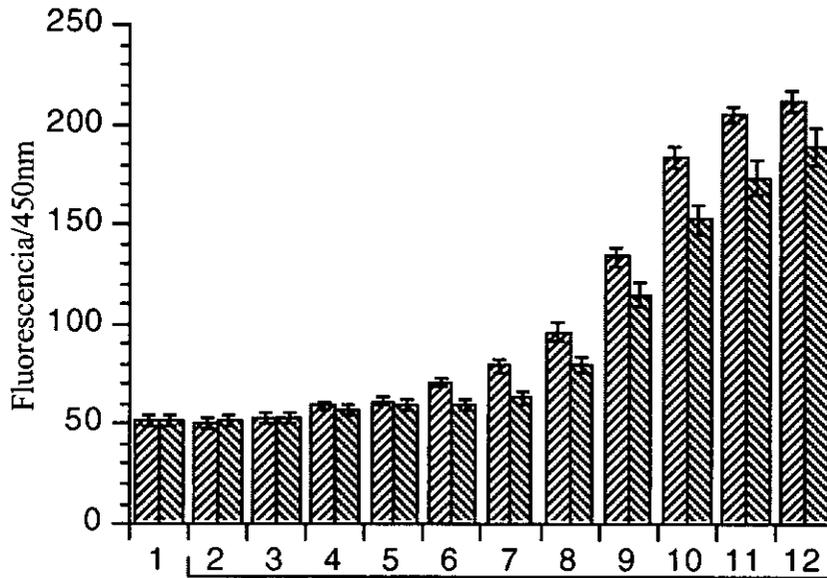


Figura 36. Titulación de los efectores con el switch PNA-DNA:

▨ EO19

▩ PCR-d5

1: DNA de esperma de salmón desnaturalizado

2: $1.00 \cdot 10^{10}$ sitios de unión a la sonda

3: $2.00 \cdot 10^{10}$ sitios de unión a la sonda

4: $4.00 \cdot 10^{10}$ sitios de unión a la sonda

5: $8.00 \cdot 10^{10}$ sitios de unión a la sonda

6: $1.60 \cdot 10^{11}$ sitios de unión a la sonda

7: $3.20 \cdot 10^{11}$ sitios de unión a la sonda

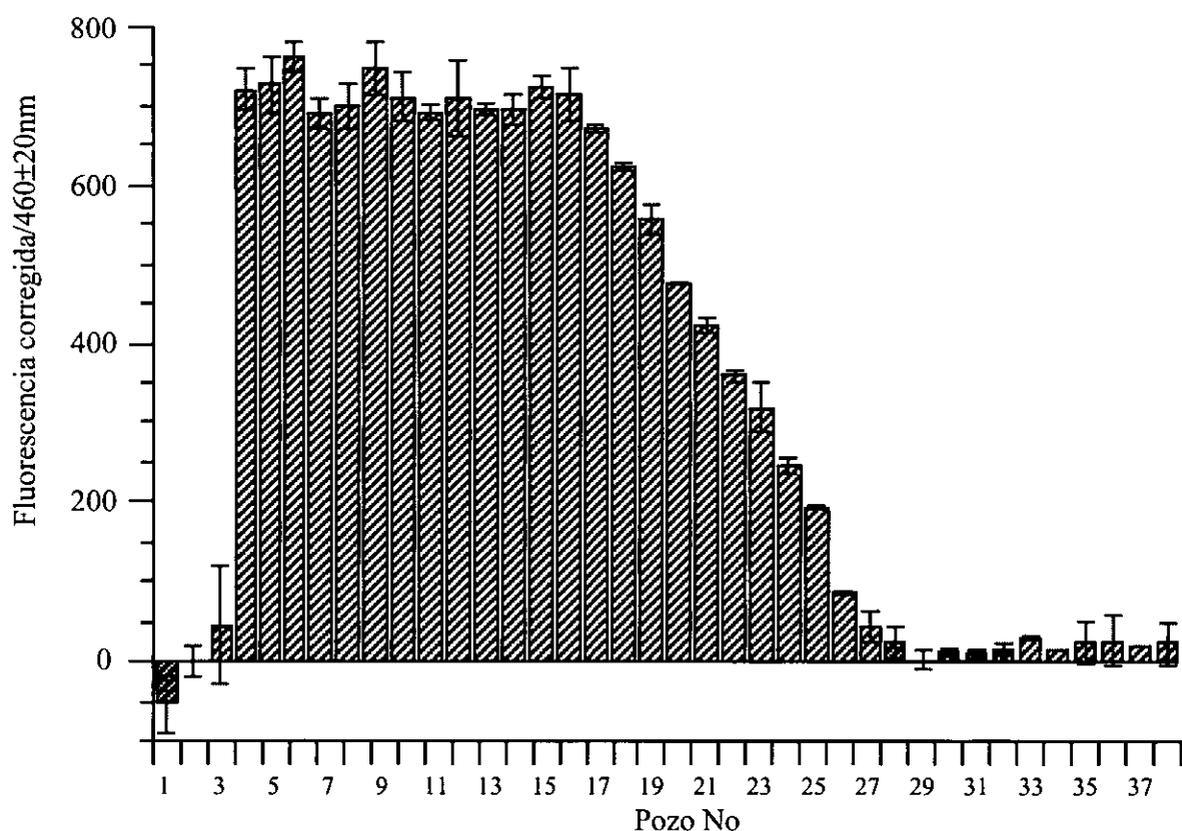
8: $6.40 \cdot 10^{11}$ sitios de unión a la sonda

9: $1.28 \cdot 10^{12}$ sitios de unión a la sonda

10: $2.56 \cdot 10^{12}$ sitios de unión a la sonda

11: $5.12 \cdot 10^{12}$ sitios de unión a la sonda

12: $1.02 \cdot 10^{13}$ sitios de unión a la sonda



No de moléculas de efector:

1. Buffer	14. $2.15 \cdot 10^{12}$ molec.	27. $1.18 \cdot 10^{11}$ molec.
2. Buf.+Switch	15. $1.72 \cdot 10^{12}$ molec.	28. $9.44 \cdot 10^{10}$ molec.
3. Buf.+Sw.+DNA heter.	16. $1.37 \cdot 10^{12}$ molec.	29. $7.56 \cdot 10^{10}$ molec.
4. $2.00 \cdot 10^{13}$ molec.	17. $1.10 \cdot 10^{12}$ molec.	30. $6.04 \cdot 10^{10}$ molec.
5. $1.60 \cdot 10^{13}$ molec.	18. $8.80 \cdot 10^{11}$ molec.	31. $4.84 \cdot 10^{10}$ molec.
6. $1.28 \cdot 10^{13}$ molec.	19. $7.04 \cdot 10^{11}$ molec.	32. $3.87 \cdot 10^{10}$ molec.
7. $1.02 \cdot 10^{13}$ molec.	20. $5.63 \cdot 10^{11}$ molec.	33. $3.09 \cdot 10^{10}$ molec.
8. $8.19 \cdot 10^{12}$ molec.	21. $4.50 \cdot 10^{11}$ molec.	34. $2.48 \cdot 10^{10}$ molec.
9. $6.55 \cdot 10^{12}$ molec.	22. $3.60 \cdot 10^{11}$ molec.	35. $1.98 \cdot 10^{10}$ molec.
10. $5.24 \cdot 10^{12}$ molec.	23. $2.88 \cdot 10^{11}$ molec.	36. $1.58 \cdot 10^{10}$ molec.
11. $4.19 \cdot 10^{12}$ molec.	24. $2.31 \cdot 10^{11}$ molec.	37. $1.27 \cdot 10^{10}$ molec.
12. $3.36 \cdot 10^{12}$ molec.	25. $1.84 \cdot 10^{11}$ molec.	38. $1.01 \cdot 10^{10}$ molec.
13. $2.68 \cdot 10^{12}$ molec.	26. $1.48 \cdot 10^{11}$ molec.	

Figura 37. Ensayo de detección del efector sintético EO19 con el switch PNA-DNA en placas de microtitulación.

La menor cantidad detectable de blanco en este ensayo es de aproximadamente $1 \cdot 10^{11}$ moléculas, y desde este valor hasta el mencionado de $1.4 \cdot 10^{12}$ moléculas de blanco, la gráfica presenta un comportamiento lineal, lo que indica que este ensayo es cuantitativo y reproducible para estos valores. Con respecto al mínimo detectable, es necesario hacer notar que coincide con el límite de sensibilidad del detector (CytoFluor™ 2300) para este fluoróforo (Coumarina). Esto indica que el empleo de un fluoróforo más eficiente (como la Fluoresceína) permitiría bajar significativamente el límite de detección.

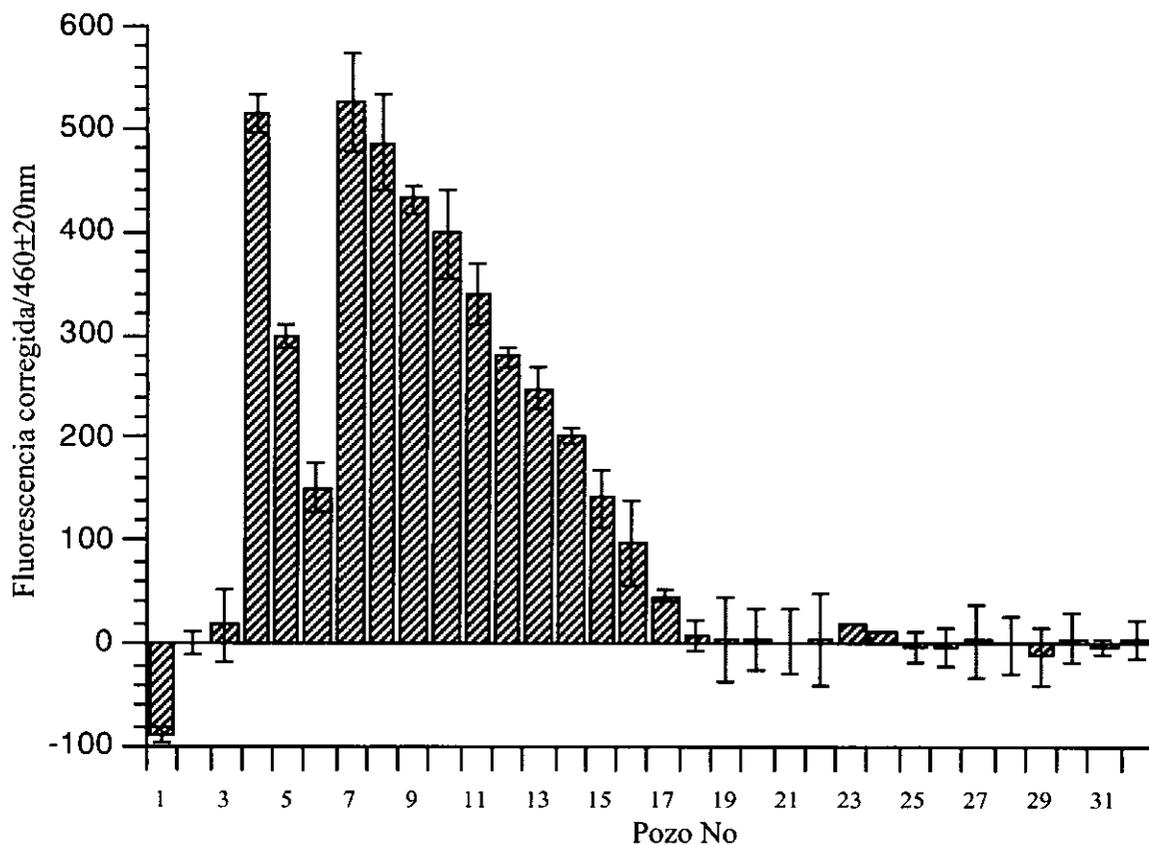
Detección de productos de PCR normal de *E. histolytica*.

El ensayo final implicó la detección de blancos reales procedentes de la amplificación con polimerasa de trofozoítos de amibas. Para estar seguros de que la doble cadena de DNA podría ser un blanco para el PNA del switch, realizamos experimentos previos en gel de poliacrilamida para determinar si la doble cadena del producto de PCR, desestabilizada por calor y baja concentración salina, era retardada por el PNA. El resultado positivo de estos experimentos nos llevó a la decisión de realizar el ensayo definitivo directamente con el producto del PCR normal de *E. histolytica*.

La doble cadena del producto de PCR se desestabiliza al hervir por 3 minutos antes de su colocación en la placa de microtitulación, además de que se añade buffer para disminuir la concentración de iones monovalentes a 12.5 mM. Como control positivo se emplean cantidades conocidas de efector sintético, que como vimos anteriormente es un buen disparador del switch.

El resultado del ensayo se muestra en la figura 38. Tal y como ocurrió en el caso del efector sintético, el ensayo es específico para el blanco de amibas: no se registra interacción notable con el coctail de DNAs heterólogos empleado como control negativo. Además se puede concluir que dentro del rango válido de detección ($5 \cdot 10^{12}$ a $8 \cdot 10^{11}$ sitios de unión al switch) el ensayo es perfectamente cuantitativo.

Es necesario destacar que lo que aparenta ser una baja sensibilidad en este ensayo con respecto al anterior, en el que se emplea el blanco sintético, puede ser un artefacto engañoso resultante de la exigencia impuesta al sistema. En este caso estamos cuantificando contra el número de sitios presentes en la solución blanco y no contra el número de moléculas de producto de PCR. Esto se debe a que, como vimos con anterioridad, el producto de PCR tiene secuencias que incluyen de 1 a 4 sitios de unión al switch. Sin embargo, debido a las restricciones espaciales que impone el esquema de ensayo con el switch inmovilizado, muy probablemente no todos los sitios de una misma molécula estén accesibles a la interacción, por lo que el número real de blancos detectables disminuiría, mejorando la sensibilidad del sistema. Esta idea es respaldada por la observación de que $1 \cdot 10^{12}$ moléculas de efector sintético generan prácticamente la misma señal que $5 \cdot 10^{12}$ sitios del producto de PCR. Lo verdaderamente importante es el hecho de que 10 μ l de una



No estimado de sitios de unión a la sonda en el producto de nPCR:

1. Buffer	12. $2.01 \cdot 10^{12}$ sitios	23. $2.70 \cdot 10^{11}$ sitios
2. Buf.+Switch	13. $1.67 \cdot 10^{12}$ sitios	24. $2.25 \cdot 10^{11}$ sitios
3. Buf.+Sw.+DNA heter.	14. $1.40 \cdot 10^{12}$ sitios	25. $1.89 \cdot 10^{11}$ sitios
4. $1.0 \cdot 10^{12}$ molec. EO19	15. $1.16 \cdot 10^{12}$ sitios	26. $1.56 \cdot 10^{11}$ sitios
5. $5.0 \cdot 10^{11}$ molec. EO19	16. $9.69 \cdot 10^{11}$ sitios	27. $1.30 \cdot 10^{11}$ sitios
6. $2.5 \cdot 10^{11}$ molec. EO19	17. $8.08 \cdot 10^{11}$ sitios	28. $1.09 \cdot 10^{11}$ sitios
7. $5.00 \cdot 10^{12}$ sitios	18. $6.73 \cdot 10^{11}$ sitios	29. $9.06 \cdot 10^{10}$ sitios
8. $4.17 \cdot 10^{12}$ sitios	19. $5.61 \cdot 10^{11}$ sitios	30. $7.55 \cdot 10^{10}$ sitios
9. $3.47 \cdot 10^{12}$ sitios	20. $4.67 \cdot 10^{11}$ sitios	31. $6.29 \cdot 10^{10}$ sitios
10. $2.89 \cdot 10^{12}$ sitios	21. $3.89 \cdot 10^{11}$ sitios	32. $5.24 \cdot 10^{10}$ sitios
11. $2.41 \cdot 10^{12}$ sitios	22. $3.25 \cdot 10^{11}$ sitios	

Figura 38. Ensayo de detección del nPCR de *E. histolytica* con el switch PNA-DNA en placas de microtitulación.

reacción normal de PCR (1/10 del total) son más que suficientes para detectar el producto mediante este ensayo y esto lo valida. Nuevamente hacemos notar que con un par fluoróforo-quencher más efectivo, la detectabilidad podría ser mejorada notablemente. Si se emplea por ejemplo fluoresceína o BODIPY como fluoróforo, se puede mejorar la detectabilidad del sistema en 5 y 10 veces respectivamente.

Detección de mutaciones puntuales con moléculas de PNA estructuradas

El sistema descrito hasta este momento implica la detección de blancos dentro de una mezcla compleja de DNA, no la discriminación de cambios puntuales en la secuencia del blanco. Sin embargo, debido a la reconocida capacidad del PNA de discriminar bases mal apareadas, decidimos diseñar un sistema para la detección de la mutación Leiden del Factor V de coagulación sanguínea, una de las pocas mutaciones puntuales acarreadoras de un riesgo tan importante para la salud como es la trombosis.

Con el objetivo de mejorar las propiedades discriminativas del PNA diseñamos una sonda estructurada: una molécula de PNA con estructura de tallo y asa. Esta vez utilizamos una molécula íntegra de PNA puesto que se conocía para entonces que la interacción entre PNAs complementarios antiparalelos llevaba a la formación de un híbrido estable. Al proponer una sonda de PNA estructurada, presuimos una competencia entre la formación del tallo y la formación del híbrido del asa con el blanco, colocando así a este último evento bajo una mayor astringencia, por lo cual debería estar restringido al blanco perfectamente complementario. Las propiedades de esta sonda estructurada fueron comparadas con la de una sonda de igual secuencia de interacción con el blanco, pero no estructurada.

Tm's teóricas en las interacciones PNA:DNA y PNA:PNA

Para diseñar las sondas a utilizar en los ensayos con Factor V fue necesario hacer varias consideraciones teóricas para lograr una predicción aceptable de la estabilidad de los híbridos PNA:DNA y PNA:PNA.

En el caso de los híbridos PNA:DNA, la información disponible de Tm's en función de secuencia permitió establecer dos ecuaciones con dos variables cada una, una de ellas correspondiente a los datos publicados para un decámero [31] y la otra correspondiente al los de un pentadecámero [38]. Para ésto se consideró además como primera aproximación, que el aporte energético de los pares A:T y T:A, así como de los pares G:C y C:G, sería equivalente, independientemente de la ubicación de las bases en el DNA o en el PNA:

$$6*(AT)+4*(GC) = 48^{\circ}C$$

$$10*(AT)+5*(GC) = 68.5^{\circ}C$$

De aquí se determina que cada par A:T aporta aproximadamente 3.4°C a la T_m del híbrido PNA:DNA, mientras que cada par G:C aporta aproximadamente 6.9°C. Este resultado, además de que predice satisfactoriamente la T_m de un tercer híbrido reportado (69.5°C determinados vs 72°C estimados [29]), encaja perfectamente con el resultado de T_m obtenido para nuestro switch PNA-DNA reducido con DTT (44.5°C predichos por la fórmula vs 46.11°C obtenidos experimentalmente). Es de relevante importancia hacer notar que el aporte a la T_m en los híbridos PNA:DNA del par G:C es aproximadamente el doble que el del par A:T, lo cual coincide con lo que sucede en los híbridos DNA:DNA y puede tener cierto valor predictivo en la estimación de la T_m de híbridos PNA:PNA.

Hasta la fecha sólo se ha reportado la T_m de un híbrido PNA:PNA [27]. Es por lo tanto extremadamente difícil predecir la T_m de otro duplex de esta naturaleza. Sin embargo, en vista de que es imposible ensayar con varias moléculas de PNA hasta encontrar la adecuada, es imprescindible tener algún criterio de estabilidad de los híbridos PNA:PNA para diseñar el tallo de la sonda estructurada empleada en la detección del Factor V Leiden. Extrapolando para el caso PNA:PNA el resultado (conocido para el DNA:DNA y deducido para el PNA:DNA) de que los pares G:C aportan el doble que los pares A:T a la T_m de los híbridos y utilizando la fórmula obtenida a partir de la única T_m reportada para el duplex PNA:PNA, se puede concluir que el aporte a la T_m de los pares A:T y G:C es de 4.2°C y 8.4°C respectivamente.

Diseño de las sondas para la detección del Factor V Leiden

La secuencia sonda de PNA empleada en la detección del Factor V Leiden cumple con una serie de características que determinaron su elección. Su longitud es de 12 bases, suficiente como para permitir una discriminación adecuada del blanco entre otras secuencias no específicas en aplicaciones que involucren hibridación con muestras de DNA de baja complejidad. La base responsable de la discriminación de la mutación puntual, una timina, se encuentra localizada hacia el centro de la secuencia. El 25% de purinas en su composición permite esperar una buena estabilidad del híbrido con el blanco de DNA. Por último, su secuencia tiene la ventaja de que comienza con una A y termina en TG (consideramos aquí la dirección desde extremo amino al extremo carboxilo), lo cual significa que estas bases pueden ser consideradas para formar parte del tallo en la sonda estructurada, aprovechando la interacción AT. La G final es conveniente ya que debido al alto precio de la síntesis de PNAs y la dificultad que involucra la síntesis de oligómeros largos, el tallo de la sonda estructurada debe ser rico en pares GC, para lograr una alta estabilidad empleando un mínimo de bases. Los diseños finales fueron los siguientes:

H₂N-Gly-ATT CCT TTGC CTG-CONH₂ para la sonda no estructurada, la T responsable de la detección es la enmarcada.

H₂N-Gly-GCG CATTCCT TTGCCTGCG C-CONH₂ para la sonda estructurada, los brazos del tallo se muestran con bases subrayadas y la región de interacción con el blanco con bases suprayadas.

La T responsable de la detección es la enmarcada.

La T_m esperada para la interacción de la secuencia sonda con el blanco (12 pb) es de $6 \cdot 3.4 + 6 \cdot 6.9 = 61.8^\circ\text{C}$ según la fórmula determinada anteriormente.

La secuencia del tallo es, como habíamos señalado, rica en G:C. Para elegir su longitud nos basamos en la fórmula $T_m = 4.2 \cdot (\text{AT}) + 8.38 \cdot (\text{GC})$. Encontramos así que cuatro pares de bases G:C, además del par A:T incluido como se explicó anteriormente, deben dar una T_m , según la fórmula, de aproximadamente 38°C . Si consideramos el componente entrópico resultante de una hibridación intramolecular, podemos esperar que la T_m del tallo sea de por lo menos 40°C . Menos de 4 pares de G:C darían un tallo poco estable y más de 4 lo harían demasiado estable.

Comparación de la capacidad de discriminación de bases mal apareadas entre el PNA estructurado y el no estructurado a diferentes temperaturas

A 40°C (figura 39) el PNA no estructurado interactúa con la secuencia perfectamente complementaria (Factor V Leiden), pero también lo hace con otras dos de las secuencias que generan un par imperfecto: T:G y T:T. El efecto desestabilizante del par imperfecto T:C es aparentemente tan alto [29] que el PNA no interactúa con este blanco aún a 40°C . El PNA estructurado interactúa con los blancos mutante y silvestre (T:A y T:G). A pesar de que el PNA estructurado es un poco más específico que el no estructurado, se puede concluir que a esta temperatura no hay una perfecta discriminación de pares imperfectos para ninguna de las sondas.

A 42°C (figura 40) la sonda no estructurada se comporta esencialmente igual que a 40°C , mostrando una discriminación de secuencia imperfecta. El PNA estructurado, por el contrario, interactúa sólo con su secuencia perfectamente complementaria y no se observa retardamiento alguno en las bandas correspondientes a los otros tres blancos imperfectamente complementarios.

A 55°C (figura 41) la discriminación de bases mal apareadas es excelente para las sondas estructurada y no estructurada. Este resultado no es sorprendente, ya que a altas temperaturas la sonda "estructurada" no puede formar un tallo estable y su comportamiento es similar al de la sonda no estructurada.

Otro resultado interesante es el obtenido a 60°C (figura 42). A esta temperatura, la unión entre los PNAs y el blanco complementario comienza a debilitarse. Esto sugiere que la T_m de estos híbridos es muy próxima a los 60°C , resultado que respalda una vez más la predicción hecha con la fórmula de T_m para híbridos PNA:DNA (61.8°C).

Notablemente, el rango de temperaturas a las que ocurre una discriminación efectiva con la sonda de PNA estructurada, se extiende desde los 42°C hasta los 60°C . Esta discriminación ocurre a pesar del modesto costo termodinámico que representa el mismatch T:G, que es por ende de los más difíciles de detectar. Orum et al. [32] reportaron que en el caso del duplex PNA:DNA este mismatch desestabiliza al híbrido en 10°C . Dado este costo energético, la discriminación entre

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Blanco	T	G	G	A	A	T	T	C	C
PNA estructurado	-	-	+	-	+	-	+	-	+
PNA no estruct.	-	+	-	+	-	+	-	+	-



Figura 39. Gel de retardamiento de los blancos de Factor V con las sondas de PNA a 40°C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Blanco	T	G	G	A	A	T	T	C	C
PNA estructurado	-	-	+	-	+	-	+	-	+
PNA no estruct.	-	+	-	+	-	+	-	+	-

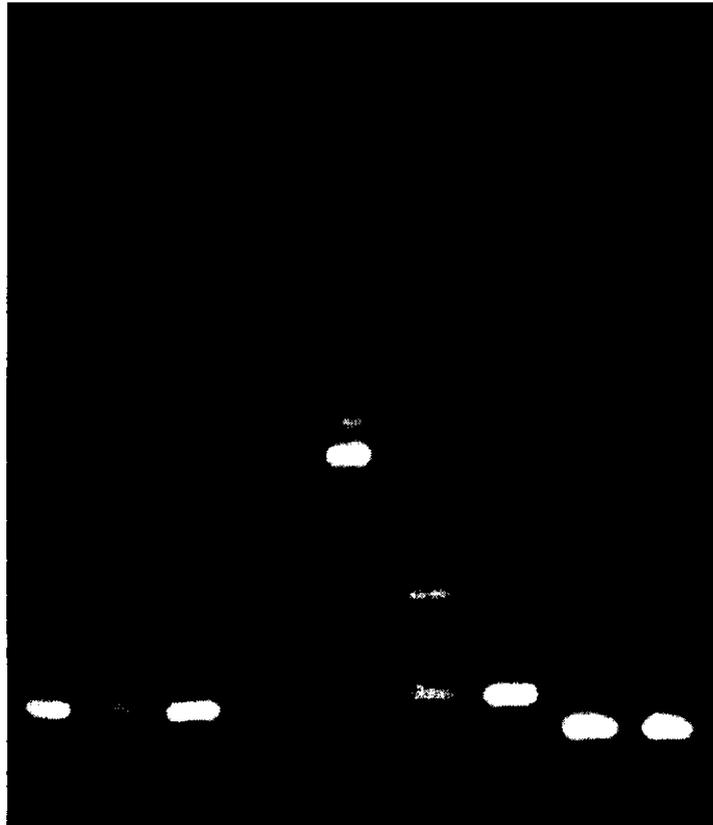


Figura 40. Gel de retardamiento de los blancos de Factor V con las sondas de PNA a 42°C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Blanco	T	G	G	A	A	T	T	C	C
PNA estructurado	-	-	+	-	+	-	+	-	+
PNA no estruct.	-	+	-	+	-	+	-	+	-



Figura 41. Gel de retardamiento de los blancos de Factor V con las sondas de PNA a 55°C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Blanco	T	G	G	A	A	T	T	C	C
PNA estructurado	-	-	+	-	+	-	+	-	+
PNA no estruct.	-	+	-	+	-	+	-	+	-

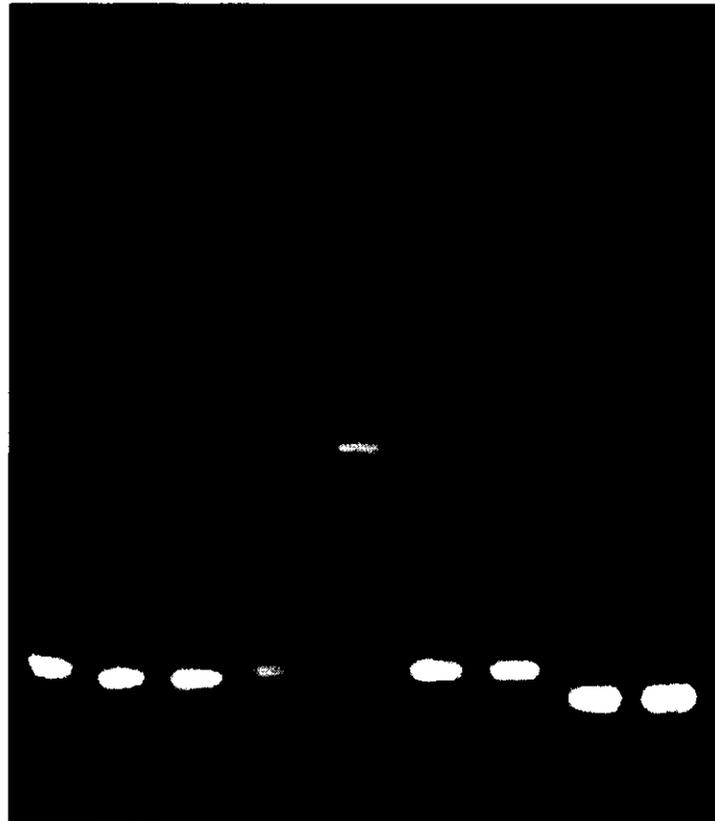


Figura 42. Gel de retardamiento de los blancos de Factor V con PNA a 60°C.

alelos debe ocurrir en un rango de 50 a 60°C con una sonda no estructurada de PNA estandar de 12 bases. La extensión de las propiedades de discriminación de alelos de la sonda estructurada hacia el rango inferior de temperaturas (de 42 a 49°C) puede ser explicada si la conformación cerrada de la sonda (formando la estructura tallo-asa) resulta termodinámicamente más estable que el estado molecular indeseable de la misma (híbrido con mismatch), pero menos estable que el complejo perfecto, según el anteriormente mencionado principio de stringency clamping (figura 43).

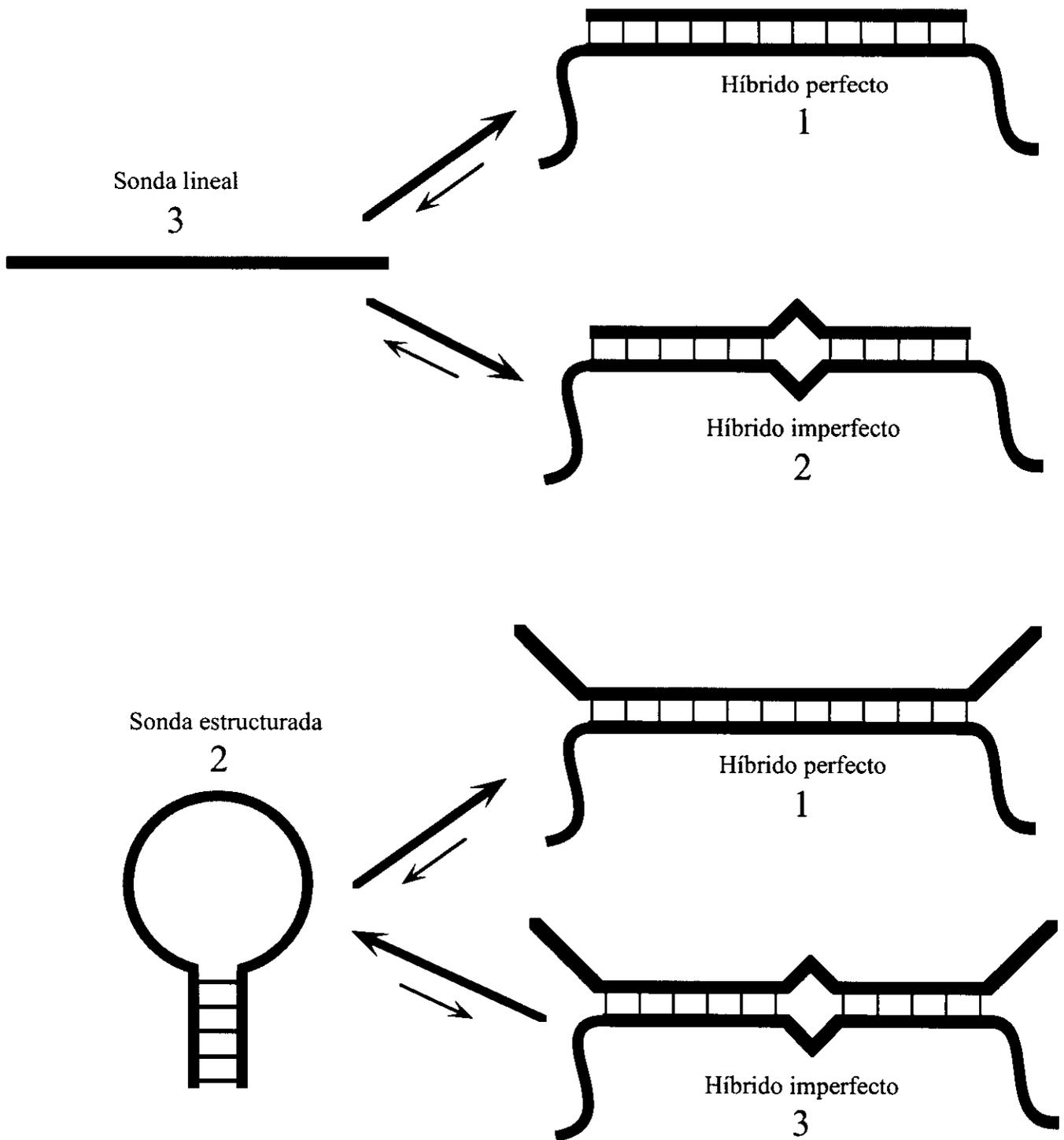


Figura 43. Comparación entre la estabilidad de los posibles estados moleculares de las sondas lineal y estructurada. Los números indican el orden de estabilidad de las especies y las flechas hacia dónde se ve desplazado el equilibrio entre ellas.

CONCLUSIONES

En este trabajo se logró el desarrollo de un ensayo modelo para la detección del parásito de humanos *Entamoeba histolytica*. Para ello se diseñó, construyó y afinó un sistema basado en el empleo de un switch molecular híbrido PNA-DNA acoplado a un sistema fluorescente.

Los criterios empleados en el diseño del switch demostraron ser adecuados.

Se comprobó la factibilidad de las modificaciones químicas en las moléculas de PNA, siendo corroborado que éstas no alteran sus propiedades de reconocimiento molecular.

Se demostró que la interacción PNA:DNA no se ve afectada por la presencia o ausencia de cationes bivalentes (magnesio). Se concluyó que un sistema basado en moléculas de PNA como sondas es por tanto más universal que su homólogo de DNA.

Basados en la capacidad de la molécula por nosotros diseñada de ser ensamblada y posteriormente desensamblada en sus componentes originales por una sencilla reacción RedOx, fuimos capaces de cuantificar el aporte entrópico que confiere a la temperatura de fusión el hecho de que la hibridación sea intramolecular. En nuestro caso, demostramos que el híbrido intramolecular tiene una T_m 6°C más alta que el intermolecular, siendo el cambio entrópico producto de la disociación de los híbridos 5 veces menor en el primer caso con respecto al segundo.

Comprobamos que nuestro sistema es unas 18 veces más rápido que su homólogo de DNA, el faro molecular. A las bajas concentraciones empleadas en este trabajo, se obtienen respuestas correspondientes a un 99% de hibridación en apenas 10 minutos.

Demostramos que el sistema conserva sus características al ser inmovilizado en una placa de microtitulación.

Verificamos que nuestro ensayo es específico para el blanco de *E. histolytica* y es además cuantitativo dentro del rango de detección.

El sistema funciona aún cuando el par fluoróforo-quencher que incluye no es el ideal. El desacierto en cuanto a su elección se revierte, sin embargo, en algo positivo, ya que queda claro que con sistemas fluorescentes más efectivos, el esquema va a funcionar y lo hará mejor. Esta conclusión permite pensar en el éxito de un sistema multiplex basado en el método por nosotros desarrollado (ver perspectivas).

Logramos implementar un ensayo en el cual no se requiere de lavados y en el que la detección ocurre en un solo paso: una alícuota de producto de PCR se deposita en una placa de microtitulación que contiene al switch inmovilizado, y después de una corta incubación se generan los resultados. La tecnología que requiere este ensayo está disponible en cualquier laboratorio de diagnóstico: un lector de fluorescencia con formato ELISA. Su automatización sería por tanto fácil de conseguir.

Diseñamos y probamos una sonda de PNA con estructura de tallo y asa. Es la primera vez que se utiliza una molécula de PNA con estas características.

Demostramos que el rango de discriminación efectiva de bases mal apareadas para la sonda de PNA estructurada es de 42°C a 60°C, mucho más amplio que el de cualquier sonda análoga de DNA o que el propio PNA no estructurado. Este amplio rango se obtiene a pesar de que la mutación detectada (par T:G) es de las que implica el menor costo termodinámico al híbrido y por tanto de las más difíciles de detectar.

Las moléculas de PNA estructuradas podrán desempeñar un importante rol en el diseño de sistemas de detección por hibridación, ya que al permitir la discriminación de alelos sobre un rango más amplio de temperaturas podrían propiciar el diseño de ensayos más robustos para aplicaciones que involucren a miles de sondas con propiedades de fusión heterogéneas (ver perspectivas).

PERSPECTIVAS

Hemos puesto a funcionar un sistema en el que una molécula híbrida de PNA-DNA estructurada es inmovilizada a un soporte y detecta un blanco por hibridación. Hemos demostrado además que las sondas estructuradas de PNA son muy eficientes en la discriminación de alelos. Una combinación de estos resultados induce a pensar en un sistema en el que switches de PNA dirigidos contra diferentes blancos y con diferentes pares fluoróforo-quencher son inmovilizados en los pozos de una placa de microtitulación. En este caso, con la misma instrumentación utilizada en nuestro trabajo y realizando lecturas a diferentes longitudes de onda, es posible detectar a la vez un gran número de blancos, o sea, sería éste un ensayo multiplex. De hecho, el número de blancos detectables estaría sólo limitado por el número de pares fluoróforo-quencher con diferentes longitudes de onda de emisión que puedan encontrarse y por la capacidad del pozo de la placa. En nuestro trabajo empleamos un par de baja eficiencia. Sin embargo, se encuentran comercialmente disponibles muchos otros fluoróforos que permitirían reducir el número de moléculas de cada tipo a inmovilizar y por tanto incrementar el número de blancos que se pueden detectar a la vez. Ejemplos de estos fluoróforos son los denominados BODIPY con los que se puede abarcar prácticamente todo el espectro visible, desde los 500 nm hasta más allá de los 650 nm. Estas especies poseen características que los hacen superiores a muchos de los fluoróforos comunes: un muy elevado coeficiente de extinción molar (de 4 a 10 veces mayor que el de la Coumarina), un rendimiento cuántico elevado (muy cercano a 1.0, aún en agua), espectros insensibles a la polaridad del solvente y al pH, bandas de emisión estrechas (resultantes en una mayor intensidad de los picos y en una menor superposición con los picos de otras especies), una mayor fotoestabilidad (permitiendo lecturas múltiples, así como la posible regeneración y reuso del sistema) y la ausencia de cargas iónicas. Cerca de 30 diferentes modificaciones de BODIPY, con diferentes propiedades ópticas, son comercializadas actualmente por Molecular Probes, Inc (OR, USA).

Otro posible diseño del sistema propuesto, es aquel en que los switches de PNA de diferente secuencia y/o fluorógenos son inmovilizados en regiones específicas del pozo (figura 44). En este caso, con un lector zonal, se puede aislar perfectamente la respuesta de una zona (correspondiente a un blanco) con la proveniente de su vecina (generada por la interacción con otro blanco). Una extensión de este diseño serían evidentemente los arreglos de alta densidad como los descritos en la introducción. Las ventajas adicionales en este caso serían por un lado, la sencillez y versatilidad de la síntesis de péptidos, y por el otro el amplio rango de temperaturas en que ocurre la dicriminación de secuencias, como hemos mostrado.

La propiedad del PNA de no ser reconocido por enzimas puede ser aprovechada en un sistema de detección de productos de PCR en el cual un switch híbrido PNA-DNA similar al empleado en nuestro trabajo funcione como primer de amplificación (figura 45). El producto de

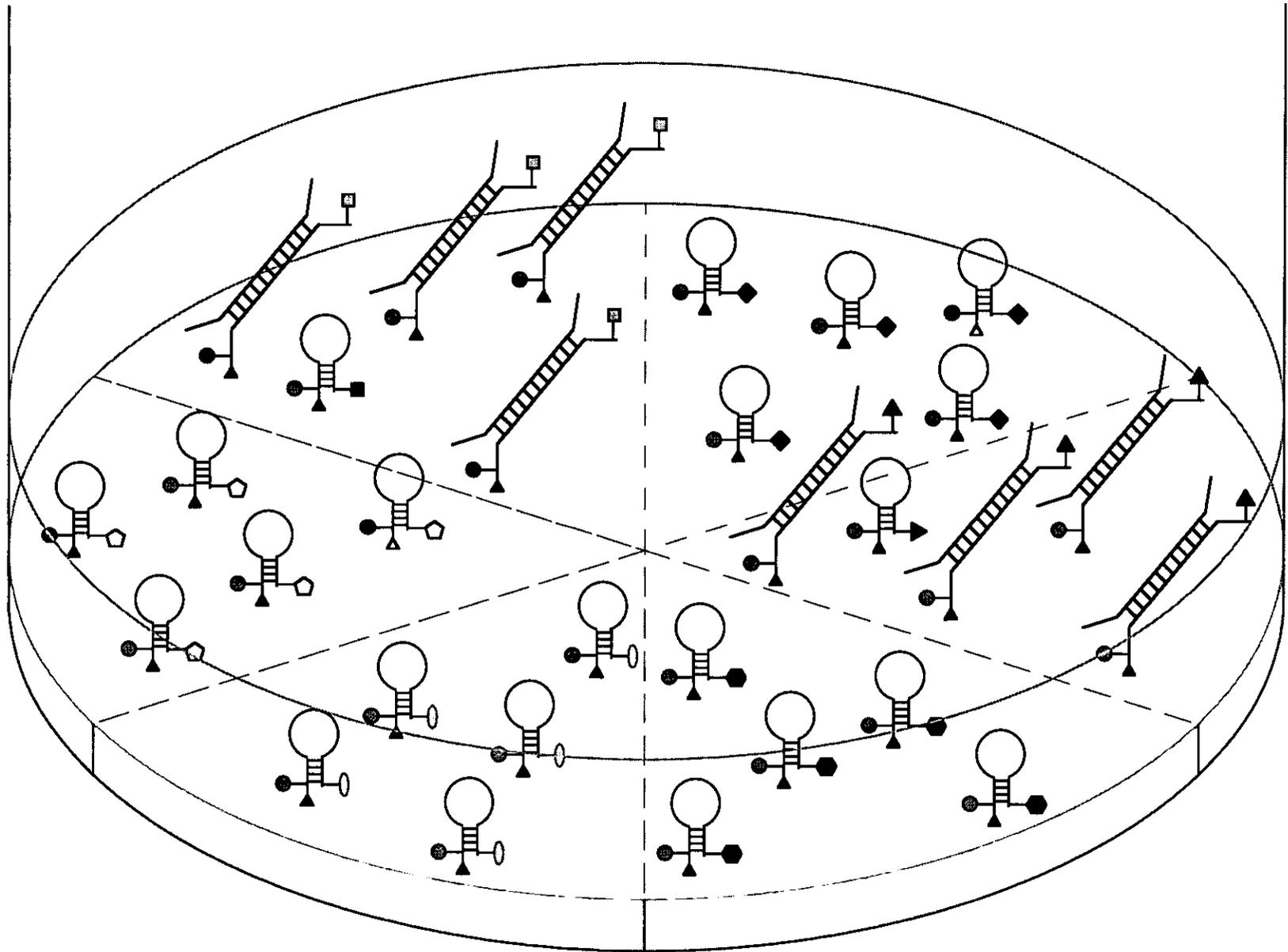


Figura 44. Pozo de placa de microtitulación derivatizado con múltiples switches moleculares específicos para diversos blancos. En cada caso el grupo fluorescente es diferente, lo que permite analizar mezclas de blancos (ensayos multiplex).

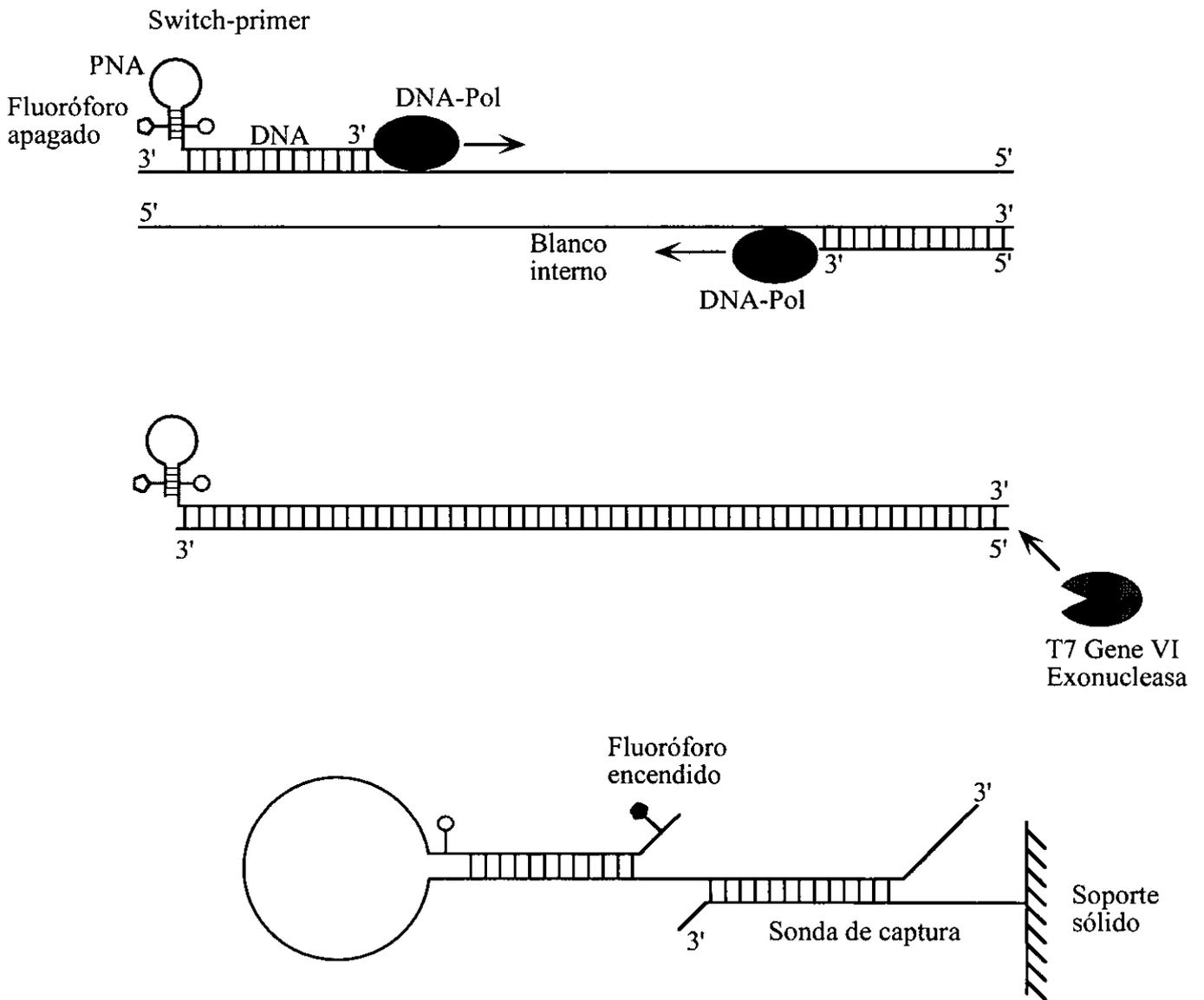


Figura 45. Esquema de funcionamiento del switch-primer híbrido PNA-DNA.

doble cadena amplificado sería tratado con la enzima T7 Gene VI Exonucleasa, que digeriría exclusivamente la cadena complementaria a la que incluyó al PNA, ya que esta última tendría su extremo 5 protegido por dicho PNA. La sonda de PNA podría estar dirigida contra un blanco en el interior del amplicón y la inmovilización del híbrido podría realizarse por hibridación específica con una sonda de captura dirigida a otra región interna del producto de cadena sencilla. Estos dos eventos paralelos de reconocimiento darían a este sistema una gran especificidad.

Otra de las atractivas perspectivas de este trabajo consiste en el diseño de switches moleculares de PNA como sondas antisentido empleables en terapia génica.

Una sonda es diseñada de tal manera que contenga en el extremo amino terminal el fragmento de 16 aminoácidos correspondiente a la tercera hélice del homeodominio de Antennapedia de *Drosophila* [59] y un switch de PNA en el extremo carboxy terminal. El asa del switch de PNA se dirige contra la secuencia de interés, por ejemplo, el gen *ccr5* normal de los linfocitos CD8⁺, el cual codifica para el co-receptor normal de las cepas de HIV que predominan en los estadios iniciales de la infección. En los brazos del tallo, un par fluoróforo-quencher se introduce con el objetivo de detectar la interacción específica entre el switch molecular y el blanco. El fragmento del dominio de Antennapedia es capaz de traslocar la construcción a través de la membrana celular y de acarrear al switch hacia el núcleo. Una vez en el núcleo, el switch de PNA sería capaz de encontrar su blanco y la formación de un híbrido separaría físicamente el fluoróforo del quencher, generando la señal como fluorescencia emitida.

Las ventajas de este sistema son:

1. La sonda consiste de una sola molécula, sintetizada en una única máquina: un sintetizador de péptidos, con las químicas corrientes de Fmoc or tBoc, empleando tanto aminoácidos convencionales como monómeros de PNA. El fluoróforo y el quencher pueden ser introducidos mediante química de aminos y/o tioles o pueden ser incluidos directamente en los monómeros antes de la etapa de síntesis.

2. El fragmento de Antennapedia asegura que la construcción migre al núcleo de la célula.

3. El switch indicaría el lugar exacto de la hibridación, ya que los switches no hibridados no fluorescen. La detección puede ser realizada con técnicas de microscopía de fluorescencia (incluyendo microscopía confocal).

4. El PNA no es sustrato de nucleasas ni peptidasas. Esto asegura una interacción prolongada con los blancos celulares.

5. El PNA posee propiedades de discriminación de secuencia superiores a las del DNA o el RNA que garantizarían en cierta medida la especificidad del sistema. La estructura de tallo y asa del switch aportaría también a la especificidad, compitiendo con potenciales híbridos erróneos.

6. El PNA tiene mayor afinidad por el DNA que el propio DNA o el RNA. Esto permite la síntesis de sondas relativamente cortas sin perder especificidad. Como hemos visto, algunas

secuencias de PNA han mostrado su capacidad de desplazar cadenas homólogas de DNA para formar híbridos con las secuencias complementarias . Es también posible diseñar PNAs capaces de formar triple hélice.

7. Los humanos homocigotos del gen *ccr5* mutado, no son infectados por HIV. Las personas que poseen un alelo mutado y otro silvestre (heterocigotos) son infectados por HIV, aunque el proceso de infección es mucho más lento. Sería muy interesante saber qué sucede a las células heterocigotas después de apagarles el alelo normal de *ccr5* con un switch antisentido de PNA. ¿quedarán vacunadas contra el HIV?

El empleo de moléculas de PNA es aún joven. Muchas nuevas aplicaciones aparecerán sin duda alguna en los próximos años. Las propiedades mejoradas de los PNAs estructurados podrán encontrar un lugar en múltiples sistemas como los propuestos en esta sección. Esta es evidentemente una rama de la investigación que promete un excelente futuro.

REFERENCIAS

1. Lipshutz, R. J.; Morris, D.; Chee, M.; Hubbell, E.; Kozal, M. J.; Shah, N.; Shen, N.; Yang, R. and Fodor, S. P. (1995). Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *Biotechniques*. **19**. (3): 442-447.
2. Varga, J. M.; Lande, S. and Richards, F. F. (1974). Immunoglobulins with multiple binding functions. II. The use of nylon-polyserine whisker discs in screening myeloma immunoglobulins for binding activity. *J Immunol*. **112**. (4): 1565-1570.
3. Cantor, C. R. and Schimmel, P. R. (1980). Biophysical chemistry. Part III: The behavior of biological macromolecules. San Francisco, W. H. Freeman & Co.
4. Ikuta, S.; Takagi, K.; Wallace, R. B. and Itakura, K. (1987). Dissociation kinetics of 19 base paired oligonucleotide-DNA duplexes containing different single mismatched base pairs. *Nucleic Acids Res*. **15**. (2): 797-811.
5. Kemp, D. J.; Smith, D. B.; Foote, S. J.; Samaras, N. and Peterson, M. G. (1989). Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. *Proc Natl Acad Sci USA*. **86**. (7): 2423-2427.
6. Keller, G. H.; Huang, D. P. and Manak, M. M. (1989). A sensitive nonisotopic hybridization assay for HIV-1 DNA. *Anal Biochem*. **177**. (1): 27-32.
7. Bauwens, J. E.; Clark, A. M. and Stamm, W. E. (1993). Diagnosis of Chlamydia trachomatis endocervical infections by a commercial polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol*. **31**. (11): 3023-3027.
8. Jaschek, G.; Gaydos, C. A.; Welsh, L. E. and Quinn, T. C. (1993). Direct detection of Chlamydia trachomatis in urine specimens from symptomatic and asymptomatic men by using a rapid polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol*. **31**. (5): 1209-1212.
9. Bobo, L.; Coutlee, F.; Yolken, R. H.; Quinn, T. and Viscidi, R. P. (1990). Diagnosis of Chlamydia trachomatis cervical infection by detection of amplified DNA with an enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*. **28**. (9): 1968-1973. Published erratum appears in *J Clin Microbiol* (1991). **29**. (12): 2912
10. Lazar, J. G.; Tumulty, J. A.; Salim, H. and Challberg, S. S. (1993). Sensitive and specific detection of PCR products: application of the Digene Sharp Signal™ system. 93rd Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Atlanta, GA.
11. Estrada, G.; Colin, L.; Gaytan, P.; Alagon, A. and Lizardi, P. M. (1996). Sequence-specific detection of PCR-amplified DNA by restriction enzyme release of hybrids. *Mol Cell Probes*. **10**. (3): 179-185.
12. Morrison, L. E.; Halder, T. C. and Stols, L. M. (1989). Solution-phase detection of polynucleotides using interacting fluorescent labels and competitive hybridization. *Anal Biochem*. **183**. (2): 231-244.

13. Bagwell, C. B.; Munson, M. E.; Christensen, R. L. and Lovett, E. J. (1994). A new homogeneous assay system for specific nucleic acid sequences: poly-dA and poly-A detection. *Nucleic Acids Res.* **22**. (12): 2424-2425.
14. Kramer, F. R. and Lizardi, P. M. (1989). Replicable RNA reporters. *Nature*. **339**. (6223): 401-402.
15. Tyagi, S. and Kramer, F. R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*. **14**. (3): 303-308.
16. Zamecnik, P. C. and Stephenson, M. L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*. **75**. (1): 280-284.
17. Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H. and Buchardt, O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*. **254**. (5037): 1497-1500.
18. Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E. and Berg, R. H. (1992). Peptide Nucleic Acids (PNA). Oligonucleotide Analogues with an Achiral Peptide Backbone. *J. Am. Chem. Soc.* **114**. 1895-1897.
19. Norton, J. C.; Waggenspack, J. H.; Varnum, E. and Corey, D. R. (1995). Targeting peptide nucleic acid-protein conjugates to structural features within duplex DNA. *Bioorg. Med. Chem.* **3**. (4): 437-445.
20. Boffa, L. C.; Carpaneto, E. M. and Allfrey, V. G. (1995). Isolation of active genes containing CAG repeats by DNA strand invasion by a peptide nucleic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**. (6): 1901-1905.
21. Nielsen, P. E. (1996). Strand displacement binding of a duplex-forming homopurine PNA to a homopyrimidine duplex DNA target. *J. Am. Chem. Soc.* **118**. 2287-2288.
22. Smulevitch, S. V.; Simmons, C. G.; Norton, J. C.; Wise, T. W. and Corey, D. R. (1996). Enhancement of strand invasion by oligonucleotides through manipulation of backbone charge. *Nature Biotechnol.* **14**. 1700-1704.
23. Bentin, T. and Nielsen, P. E. (1996). Enhanced peptide nucleic acid binding to supercoiled DNA: possible implications for DNA "breathing" dynamics. *Biochemistry*. **35**. (27): 8863-8869.
24. Boffa, L. C.; Morris, P. L.; Carpaneto, E. M.; Louissaint, M. and Allfrey, V. G. (1996). Invasion of the CAG triplet repeats by a complementary peptide nucleic acid inhibits transcription of the androgen receptor and TATA-binding protein genes and correlates with refolding of an active nucleosome containing a unique AR gene sequence. *J Biol Chem*. **271**. (22): 13228-13233.
25. Nielsen, P. E.; Egholm, M. and Buchardt, O. (1994). Evidence for (PNA)₂/DNA triplex structure upon binding of PNA to dsDNA by strand displacement. *J Mol Recognit.* **7**. (3): 165-170.
26. Wittung, P.; Nielsen, P. and Norden, B. (1997). Extended DNA-recognition repertoire of

- peptide nucleic acid (PNA): PNA-dsDNA triplex formed with cytosine-rich homopyrimidine PNA. *Biochemistry*. **36**. (26): 7973-7979.
27. Wittung, P.; Nielsen, P. E.; Buchardt, O.; Egholm, M. and Norden, B. (1994). DNA-like double helix formed by peptide nucleic acid. *Nature*. **368**. (6471): 561-563.
28. Schwartz, A. W. (1994). The origin of macromolecular chirality. *Current Biology*. **4**. (8): 758-760.
29. Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L., et al. (1993). PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature*. **365**. (6446): 566-568.
30. Brown, S. C.; Thomson, S. A.; Veal, J. M. and Davis, D. G. (1994). NMR solution structure of a peptide nucleic acid complexed with RNA. *Science*. **265**. (5173): 777-780.
31. Leijon, M.; Graslund, A.; Nielsen, P. E.; Buchardt, O.; Norden, B.; Kristensen, S. M. and Eriksson, M. (1994). Structural characterization of PNA-DNA duplexes by NMR. Evidence for DNA in a B-like conformation. *Biochemistry*. **33**. (33): 9820-9825.
32. Orum, H.; Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. and Stanley, C. (1993). Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res*. **21**. (23): 5332-5336.
33. Mollegaard, N. E.; Buchardt, O.; Egholm, M. and Nielsen, P. E. (1994). Peptide nucleic acid.DNA strand displacement loops as artificial transcription promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**. (9): 3892-3895.
34. Nielsen, P. E.; Egholm, M. and Buchardt, O. (1994). Sequence-specific transcription arrest by peptide nucleic acid bound to the DNA template strand. *Gene*. **149**. (1): 139-145.
35. Demers, D. B.; Curry, E. T.; Egholm, M. and Sozer, A. C. (1995). Enhanced PCR amplification of VNTR locus D1S80 using peptide nucleic acid (PNA). *Nucleic Acids Res*. **23**. (15): 3050-3055.
36. Veselkov, A. G.; Demidov, V. V.; Nielson, P. E. and Frank, K. M. (1996). A new class of genome rare cutters. *Nucleic Acids Res*. **24**. (13): 2483-2487.
37. Hanvey, J. C.; Peffer, N. J.; Bisi, J. E., et al. (1992). Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids. *Science*. **258**. (5087): 1481-1485.
38. Bonham, M. A.; Brown, S.; Boyd, A. L., et al. (1995). An assessment of the antisense properties of RNase H-competent and steric-blocking oligomers. *Nucleic Acids Res*. **23**. (7): 1197-1203.
39. Wittung, P.; Kajanus, J.; Edwards, K.; Nielsen, P.; Norden, B. and Malmstrom, B. G. (1995). Phospholipid membrane permeability of peptide nucleic acid. *Febs Lett*. **365**. (1): 27-29.
40. Wang, J.; Palecek, E.; Nielsen, P. E.; Rivas, G.; Cai, X.; Shiraiishi, H.; Dontha, N.; Luo, D. and Farias, P. A. M. (1996). Peptide nucleic acid probes for sequence-specific DNA biosensors. *J. Am. Chem. Soc*. **118**. 7667-7670.
41. Weiler, J.; Gausepohl, H.; Hauser, N.; Jensen, O. N. and Hoheisel, J. D. (1997). Hybridisation

- based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligomer arrays. *Nucleic Acids Res.* **25**. (14): 2792-2799.
42. Walsh, J. A. (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis.* **8**. (2): 228-238.
43. Nanda, R.; Baveja, U. and Anand, B. S. (1984). *Entamoeba histolytica* cyst passers: clinical features and outcome in untreated subjects. *Lancet.* **2**. (8398): 301-303.
44. Huber, M.; Koller, B.; Gitler, C.; Mirelman, D.; Revel, M.; Rozenblatt, S. and Garfinkel, L. (1989). *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. *Mol Biochem Parasitol.* **32**. (2-3): 285-296.
45. Bhattacharya, S.; Bhattacharya, A.; Diamond, L. S. and Soldo, A. T. (1989). Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA. *J Protozool.* **36**. (5): 455-458.
46. Estrada, G. (1996). Detección de *Entamoeba histolytica* por medio de la reacción en cadena con DNA polimerasa y la liberación enzimática de híbridos. Tesis de maestría. Dpto Reconocimiento Molecular y Bioestructura.UACPyP-CCH/IBT-UNAM.
47. Dittman, W. A. and Majerus, P. W. (1990). Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant. *Blood.* **75**. (2): 329-336.
48. Dahlback, B.; Carlsson, M. and Svensson, P. J. (1993). Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**. (3): 1004-1008.
49. Bertina, R. M.; Koeleman, B. P.; Koster, T.; Rosendaal, F. R.; Dirven, R. J.; de, R. H.; van, d. V. P. and Reitsma, P. H. (1994). Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* **369**. (6475): 64-67.
50. Jordan, W. (1961). Pulmonary embolism. *Lancet.* **ii**. 1146-1147.
51. Gerstman, B.; Piper, J.; Tomita, D.; Ferguson, W.; Stadel, B. and Lundin, F. (1991). Oral contraceptive estrogen dose and the risk of deep venous thromboembolic disease. *Am J Epidemiol.* **133**. 32-37.
52. Boemenkamp, K.; Rosendaal, F.; Helmerhorst, F.; Büler, H. and Vandenbroucke, J. (1995). Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *Lancet.* **346**. 1593-1596.
53. Rosendaal, F. R.; Koster, T.; Vandenbroucke, J. P. and Reitsma, P. H. (1995). High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood.* **85**. (6): 1504-1508.
54. Vandenbroucke, J. P.; Koster, T.; Briet, E.; Reitsma, P. H.; Bertina, R. M. and Rosendaal, F. R. (1994). Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet.* **344**. (8935): 1453-1457.
55. Freier, S. M.; Kierzek, R.; Jaeger, J. A.; Sugimoto, N.; Caruthers, M. H.; Neilson, T. and

- Turner, D. H. (1986). Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. *Proc Natl Acad Sci USA*. **83**. (24): 9373-9377.
56. Roberts, R. W. and Crothers, D. M. (1991). Specificity and stringency in DNA triplex formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **88**. (21): 9397-9401.
57. Grasseti, D. R. and Murray, J. J. (1967). Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine. *Arch Biochem Biophys*. **119**. (1): 41-49.
58. Tomac, S.; Sarkar, M.; Ratilainen, T.; Wittung, P.; Nielsen, P. E.; Norden, B. and Graslund, A. (1996). Ionic effects on the stability and conformation of peptide nucleic acid complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **118**. 5544-5552.
59. Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*. **269**. (14): 10444-10450.

MOLECULAR AND CELLULAR PROBES

Editors: Dr Alan F. SCOTT
Center for Medical Genetics,
Blalock 1033,
Johns Hopkins University
School of Medicine,
600 N. Wolfe Street
Baltimore, MD 21287, USA
Fax: 410 614 9752
E-mail: aScott@welchlink.welch.jhu.edu

Dr Joseph L. WANER
Pediatric Infectious Diseases,
University of Oklahoma Health
Sciences Center,
Children's Hospital of Oklahoma,
940 NE 13th Street, Rm 2B283,
Oklahoma City, OK 73104, USA
Fax: 405 271 4740
E-mail: joseph-waner@uokhsc.edu

May 4, 1998

Paul M. Lizardi, Ph.D.
Associate Professor
Department of Pathology
Yale University School of Medicine
310 Cedar Street
New Haven, Connecticut 06520

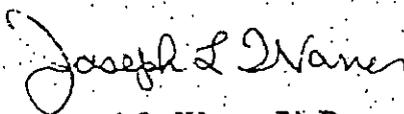
Fax: 203-785-7303

Dear Dr. Lizardi:

I am pleased to inform you that your article "PNA molecular beacons for rapid detection of PCR amplicons" (Ref. #1298) has been accepted for publication in *Molecular and Cellular Probes*. The reviewer's comments did not recommend changes that would require you to submit a revised manuscript. I am, therefore, forwarding your paper to the editorial office of Academic Press Ltd., 24-28 Oval Road, London NW1 7DX, UK, (FAX: 0171 482 2293). All further communication regarding your manuscript should be conducted with that office.

Thank you for submitting your article to *Molecular and Cellular Probes*.

Sincerely,



Joseph L. Waner, Ph.D.
Co-Editor, *Molecular and
Cellular Probes*

JLW/rms



PNA molecular beacons for rapid detection of PCR amplicons

Ernesto Ortiz, Georgina Estrada and Paul M. Lizardi

Department of Molecular Recognition and Structural Biology, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México.

Address correspondence to: Paul M. Lizardi, Department of Pathology, Yale University School of Medicine, 310 Cedar St., New Haven, Connecticut 06520. Fax: (203) 785 7303. E-mail: paul.lizardi@yale.edu.

Short title: **PNA molecular beacons**

KEYWORDS: PNA, nucleic acid detection, fluorescence, microtiter, structured probes.

ABSTRACT

We have developed a method for rapid detection of PCR amplicons based on surface immobilized PNA-DNA hybrid probes that undergo a fluorescent-linked conformational change in the presence of a complementary DNA target. Amplicons can be detected by simply adding a PCR reaction to a microtiter well containing the previously immobilized probe, and reading the generated fluorescence. No further transfers or washing steps are involved. We demonstrate the specificity of the method for the detection of ribosomal DNA from *Entamoeba histolytica*.

INTRODUCTION

Tyagi and Kramer (1) have described a homogeneous PCR assay based on the properties of special structured DNA probes called "molecular beacons". These molecules contain a probe sequence bounded by a stem structure that holds a fluorescent moiety and a quencher moiety in close physical proximity. When the DNA probe binds its complementary target sequence in a PCR amplicon, the stem structure is disrupted, separating the quencher compound from the fluor, which now becomes detectable by fluorescent emission. By using fluors that emit energy at different wavelengths, Tyagi and Kramer have recently constructed a cocktail of molecular beacons of different colors designed for the simultaneous, real-time detection of different DNA targets (2).

Peptide nucleic acids (PNAs) are able to form highly specific and extraordinarily stable duplexes with complementary DNA sequences (3, 4). We have endeavored to construct molecular beacons containing PNA probe portions, and to evaluate their properties and their utility in the detection of PCR amplicons. We chose to design PNA molecules suitable for surface immobilization because this feature will offer advantages in the future, when it will become possible to exploit molecular beacons using surface array formats. Here we report the construction of surface-immobilized molecular beacons containing a PNA probe domain, and a hybrid PNA:DNA stem. We have evaluated the performance of PNA molecular beacons in model assays for the detection of PCR amplicons from the ribosomal episome of the enteric parasite *Entamoeba histolytica*. Amplicons can be detected specifically by simply adding a PCR reaction to a microtiter well that contains immobilized PNA molecular beacons, and reading the fluorescence generated as the amplified DNA binds to the PNA probes.

MATERIALS AND METHODS

DNA materials

All DNA oligonucleotides (obtained from Operon Technologies, Inc) were resuspended in 5% ammonia/water, and purified by precipitation with n-butanol (5). The primers used for amplification of target sequences from *Entamoeba histolytica* trophozoites were: RER1: 5'-CAAAACATTTCAATTCTTTCATC-3', 23-mer, position 1273-1295; and RER-D5: 5'-GATTCATAAGAACCTTTTGG-3', 21-mer, positions 700-720, 844-864, 988-1004, 1132-1147. Primers positions are given according to Bhattacharya et al. (6). The 10-mer modified oligo EOstem10: 5'-(HS)AGACAGAAT(NH₂)A-3'-Ica-Biotin, which contains a biotin at the 3' end, an aminated thymidine at the second position and a thiolated linker at the 5' end, was used as one of the arms of the stem. The oligo EO19: 5'-GTGTAAAAATAGTAAAAAAT-3', 19-mer, served as a synthetic target for the PNA-DNA probe. As negative (non-complementary) controls we used the following oligonucleotides: F5WT.34: 5'-CAGATCCCTGGACAGGCGAGGAATACAGAGGGCA-3', 34-mer, GM.LR74: 5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGACTGGTGAAATTGCTGCCATTGTCTAATTAAGAATGCCATAGACCCATCAAT-3', 74-mer, and a PCR amplicon from the 4RRV gene of Rotavirus. All PCR reactions were performed according to Estrada et al. (7).

PNA materials

The PNA oligomer EO24 (PerSeptive Biosystems, Inc): NH₂-Gly-TATTCTGTCTTTTTACTAATTTAC-Cys-CONH₂, 24-mer, a specific probe for detection of *Entamoeba histolytica* rDNA targets, was purified by RP-HPLC.

HPLC was performed using a reverse phase Ultrasphere C18 column (Beckman Instruments), at ambient temperature and a flow rate of 1 ml/min with 0.1 M triethylammonium acetate, pH 7.5, and acetonitrile. A two-step gradient of acetonitrile (7 to 25% in 18 min., followed by 25 to 40% in 5 min.) was used for the purification of the products from each reaction. Whenever coumarin was part of the product to be purified, an in-line fluorescence detector (FluoroMonitor, Milton Roy) was used to detect the dye.

Derivatization of the oligonucleotide EOstem10 with DABCYL

A 300 μ l solution containing 2 μ g/ μ l oligodeoxyribonucleotide EOstem10 dissolved in 0.1 M sodium bicarbonate buffer, pH 9.0, was reacted with a 500 μ l solution containing 10 mg/ml of DABCYL-NHS (Molecular Probes, Inc, D-2245) in N,N-dimethylformamide, with continuous stirring at 25°C, over a 36 h period. The unreacted DABCYL was removed by precipitating the oligonucleotide with 2.5 volumes of ethanol and 0.1 volume of 3 M sodium acetate, pH 5.2. The derivatized oligonucleotide was then purified by RP-HPLC.

Derivatization of the PNA EO24 with AMCA

A 200 μ l solution containing 240 ng/ μ l PNA EO24 in 0.1 M sodium bicarbonate buffer, pH 9.0, was reacted with a 100 μ l solution containing 10 mg/ml of AMCA-NHS (Molecular Probes, Inc., A-1418) in N,N-dimethylformamide, with continuous stirring at 37°C, for 4 h. A volume of 20 μ l of 10 mM dithiothreitol was then added to the reaction mixture, and the incubation was continued for 8 h at 25°C. The unreacted coumarin was removed by centrifugation, followed by exclusion chromatography through a Biogel P4 (BioRad) column. The derivatized PNA was purified by RP-HPLC.

Activation of the thiol in the PNA

The coumarin derivatized PNA was treated with 10 mM dithiothreitol and the resulting solution was stirred for 18 h at 37°C. The product was then collected by RP-HPLC directly into 100 µl of a 1 mg/ml 4,4'-dithiopyridine solution in 100 mM phosphate buffer, pH 5.5, containing 20% acetonitrile (8). This mixture was allowed to react overnight at 25°C, after which the product (thiopyridylated PNA-coumarin) was purified by RP-HPLC, dried in vacuo, and resuspended in 300 µl of 0.1 M triethylammonium acetate, pH 7.5, containing 20% acetonitrile.

Coupling of PNA and DNA via disulfide exchange reaction

10 nmol of the derivative oligonucleotide EOstem10-DABCYL were treated with 10 mM dithiothreitol, and the resulting solution was stirred for 4 h at 37°C. The reduced product was then collected by RP-HPLC directly into the thiopyridyl-PNA-coumarin solution resulting from the previous step (8). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The product was then purified by RP-HPLC.

Thermal denaturation and renaturation profiles

Fluorescence measurements were performed on an LS-50 Luminescence Spectrometer (Perkin Elmer) coupled to a system of two circulating water baths (Thermomix-Frigomix, B. Braun and Lauda, Brinkmann), using 1 cm path length and 400 µl volume cuvettes (Uvonic Instruments, Inc.). The fluorescent probe was excited at 354 nm, and the emitted fluorescence measured at 450 nm. The fluorescence of a 300 µl solution containing 3.3 pmol of the probe in 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM KCl, pH 7.5 buffer, was monitored as the temperature was increased from 25°C to 70°C and then returned back to 20°C. A similar solution was treated with 10 mM dithiothreitol and stirred at 37°C overnight. After reduction, a new denaturation-renaturation profile was recorded. Melting temperatures were determined by computer fit of the first derivative of fluorescence emission with respect to 1/T.

Real-time solution assays of probe-target interactions

The fluorescence of a 300 µl solution containing 3.3 pmol of the probe in 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM KCl, pH 7.5 buffer, was monitored continuously in a spectrometer. After 5 minutes, an irrelevant target mixture was added consisting of 100 µg denatured salmon sperm DNA, 2.5 pmol of ssDNA from an asymmetric PCR reaction of Rotavirus amplicons, 166 pmol of the oligonucleotide F5MU.T.34, and 166 pmol of the oligonucleotide GM.LR.74 in 60 µl of the same buffer. After 12 minutes, 10 µl of a specific DNA target was added, consisting of 16.5 pmol of the oligonucleotide EO19 in the same buffer. The fluorescence emission was recorded continuously for another 25 minutes.

Probe immobilization

Probes were immobilized on streptavidin coated microtiter plates (Reacti-Bind, Pierce) using the following protocol: 50 µl of a solution containing 0.5 pmol/µl of the chimeric probe, 100 ng/µl of denatured salmon sperm DNA, 0.1% of gelatin and 1XSSC, was incubated for 1 h at 50°C with gentle shaking (150 rpm) inside each well. The plate was then cooled to room temperature and rinsed twice with 250 µl of washing buffer (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0.1 M, 0.05% Tween 20, pH 7.5).

Interaction of immobilized probes with an artificial DNA target

The microtiter plate with the immobilized probe was rinsed once with 50 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH 7.5 buffer. A 0.66 pmol/µl solution of the oligonucleotide EO19 in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5) was delivered into the wells of the plate, with a coefficient of decrement for the target concentration of 4/5. As controls we used wells containing: a) buffer without probe or target, b) buffer and probe but no target, and c) buffer, probe and a cocktail of heterologous DNAs (1.5 pmol of the product from the asymmetric PCR from Rotavirus amplicons, 16.6 pmol of the oligonucleotide F5MU.T.34, and 16.6 pmol of the oligonucleotide GM.LR.74). Hybridization was performed 1 h at 37°C with gentle shaking (150 rpm). Fluorescence was then read in a CytoFluor® 2300 system (Millipore) using the filter set A/A (excitation 360±20 nm; emission 460±20 nm), at a sensitivity setting of 4. The relative fluorescence was calculated by subtracting the measured fluorescence from a control which contained the probe, but not the target. The plate was protected from light at all steps.

Detection of PCR products from *Entamoeba histolytica*

PCR amplification of *E. histolytica* rDNA was performed as described (7). The microtiter plate with the immobilized probe was rinsed once with 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 12.5 mM KCl, pH 8.3 buffer. The PCR product was denatured for 3 minutes at 98°C, and then delivered into the plate in aliquots containing estimated amounts of complementary target sites, starting at 5*10¹², with a coefficient of decrement of 5/6 from each well to the next. The negative controls were the same as for the synthetic target. As positive controls were used wells with 1*10¹², 5*10¹¹, and 2.5*10¹¹ molecules of the complementary oligonucleotide EO19. The rest of the procedure was as described above for the synthetic target.

RESULTS

Design and synthesis of PNA molecular beacons

The structure and mechanism of operation of the chimeric PNA-DNA molecular beacon is shown diagrammatically in Fig. 1. Fig. 2 shows the base sequence and chemical structure of the PNA:DNA adduct. The DNA part of the adduct has three functional moieties: a) a 3'-terminal biotin which serves to immobilize the entire structure by binding to streptavidin-coated microtiter wells; b) a quencher moiety (DABCYL) at the 3'-terminus of the DNA stem structure; c) a sequence which pairs with 10 bases in the PNA part of the adduct, forming the 10-base pair stem structure. The PNA part of the adduct, which is joined to the DNA part via a disulfide bond, also comprises three functional moieties: a) a 15-base probe sequence in the unstructured loop domain; b) 10 bases capable of pairing with the DNA part, where one base in the PNA probe performs double duty, also being part of the 10-base stem structure; c) a fluorescent moiety (AMCA), coupled to the free terminus of the PNA.

In the absence of target, the DNA and PNA arms of the probe interact to form a stem and loop structure. This conformation places the fluorophore and the quencher in close proximity, and in this state no fluorescent emission can be detected. In the presence of the target, a rearrangement occurs, as the probe forms a larger and more stable duplex than the stem. The strands that comprise the stem are forced apart, separating the fluorophore and the quencher to a distance where no resonance can occur, thus allowing the fluorophore to emit detectable photons (Fig.1). As the fluorophore-quencher pair we selected the fluorophore 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid (AMCA), and the quencher p-(dimethylaminophenylazo)benzoic acid (DABCYL). When stimulated by ultraviolet light (354 nm), AMCA emits blue fluorescence (440 nm). DABCYL is a nonfluorescent dye with an absorption spectrum that perfectly overlaps the emission of AMCA.

The sequence of the probe was designed to interact with DNA generated by PCR amplification of the ribosomal episome (rDNA) of *Entamoeba histolytica* (9), which our laboratory has used as a model system for DNA amplicon detection methods (7). The target and probe sequences were chosen on the basis of the high stability of PNA oligomers containing at least 20-25% purine. The sequences used for the DNA:PNA stem were arbitrary, but the PNA part of the stem was also restricted to a 25% purine content.

The scheme followed to achieve the synthesis of the adduct is shown in Fig. 3. A 3'-end biotinylated deoxyribonucleotide which includes an aminated thymidine and a 5' thiol group was coupled to the quencher DABCYL-succinimidyl ester by formation of a stable carboxamide with the aminated thymidine. A PNA molecule which has an amino-terminal glycine and a carboxyl-terminal cysteine was covalently linked to the fluorescent moiety coumarin-succinimidyl ester by the same reaction with the amino group of the glycine. Both species were then conjugated via disulfide coupling of the 5' thiol group of the deoxyribonucleotide with the cysteine of the PNA.

Hybridization properties of the PNA-DNA molecular beacon

We performed thermal melting and renaturation experiments using either the intact chimeric probe, or a probe in which the disulfide bond joining the DNA and PNA moieties had been cleaved by reduction with DTT. After DTT reduction we should in essence be observing the interaction of an equimolar amount of two non linked complementary sequences. The results (Fig 4A) indeed show a marked difference in melting and renaturation behavior. The profiles for the covalently linked structured probe display a higher melting temperature (the T_m for dissociation was 52.1 °C; for reassociation, 50.4 °C) and a less significant hysteresis than the profiles for the separated molecules. The latter showed a considerably less stable interaction (T_m for dissociation, 46.1 °C; for reassociation, 37.4 °C). Remarkably, these curves were reproduced with no significant change using a buffer that contained 5 mM MgCl₂ (data not shown). These observations indicated that melting behavior is relatively independent of the concentration of bivalent ions.

The PNA:DNA molecular beacon was highly specific for the target DNA sequence. The beacons were incubated in a cuvette inside a spectrofluorimeter, and the response to the addition of different DNA targets was followed in real time. High concentrations of heterologous DNAs, comprising a mixture of genomic DNA, an unrelated PCR product, and oligonucleotides with different lengths and sequences, had no effect on the fluorescence emitted by the system (Fig. 4B, target addition No. 1). On the other hand, the addition of a complementary oligonucleotide target led to a rapid increase in fluorescence (Fig 4B, target addition No.2).

Detection of artificial DNA targets in microtiter plates

The results for the interaction of the immobilized PNA molecular beacons with a synthetic oligonucleotide target are shown in Fig. 5A. The immobilized probe is capable of detecting targets that differ in amount by one order of magnitude, from 1.2×10^{11} to 1.1×10^{12} molecules. The interaction is highly specific, since the negative controls, which contained more than 2×10^{13} irrelevant molecules, did not generate a significant signal.

Specific detection of rDNA amplicons in microtiter plates

Fig. 5B shows the results of an assay for the detection of PCR amplicons containing repeated sequences of the

rDNA of *E. histolytica*. The number of target sites was calculated by estimating the number of molecules of rDNA amplicons in a polyacrylamide gel, and then correcting for the number of sequence repeats in each amplicon. The assay signal was highly specific for *E. histolytica* rDNA amplicons, and the fluorescence intensity was proportional to the number of estimated target sites within the range of 5×10^2 to 8×10^4 molecules. However, the signal generated by the PCR products was approximately four times lower than the signal generated by an equivalent number of artificial DNA targets. This observation suggests that the renaturation of PCR products competed with the amplicon/immobilized PNA interaction, possibly due to DNA helix stabilization by the presence of residual monovalent and divalent ions derived from the PCR reaction buffer. This problem would be less acute if the molecular beacons were in solution, because the rate constant for PNA/DNA reassociation would then be much higher.

DISCUSSION

We have documented a simple method for detecting PCR amplicons using surface-bound fluorescent probes. The principle of exploiting resonance energy transfer for homogeneous DNA detection assays was first described by Morrison in 1987 (10). Our laboratory has had a long-standing interest in exploiting nucleic acid conformational switches as a general mechanism for the generation of specific signals in bioassays (11, 12). The first demonstration of a practical DNA detection assay based on the combination of DNA conformational changes and fluorescence energy transfer was published by Bagwell et al in 1994 (13). In 1995, Tyagi and Kramer described "molecular beacons" which combined a DNA molecular switch principle with a very efficient fluorescence quenching system (1). Their studies demonstrated the usefulness of molecular beacons for the detection of PCR products in real time, as well as a remarkable capability for discrimination of single base mismatches. Recently, Tyagi and Kramer have shown that DABCYL, when used in a molecular beacon format, can serve as a universal quencher for a variety of dyes (2). This observation has greatly expanded the number of fluorescent dyes that may be used in molecular beacon format, making possible multiplex assays in solution. The recent work of Tyagi and Kramer also suggests that the excellent allele discriminating properties of molecular beacons may be due to the hairpin structure of the probe. The work presented here extends the applications of molecular beacons to include the use of PNA probes, which we have employed in a novel surface-immobilized format.

Our experimental protocol for the detection of DNA amplicons post-PCR is remarkably simple. After a standard PCR is performed, an aliquot of the product is transferred to a microtiter plate and, after a short incubation period, the data is recorded using an automated fluorescence plate reader. The use of a PNA probe permitted the use of relatively short (15-base) sequence of high binding affinity. The improved hybridization stability of PNA over DNA made possible the direct detection of double stranded PCR products using a simple heat denaturation step, because the PNA probes are able to compete to a reasonable extent with the reassociating DNA strands (4). The relative insensitivity of the DNA:PNA beacon's melting behavior to the concentration of Magnesium ions suggests that bivalent ion concentration should be less critical when using PNA molecular beacons as opposed to DNA molecular beacons.

A limitation of the PNA:DNA molecular beacon assay described here is the narrow dynamic range for DNA detection in microtiter format. This, however, is not an inherent limitation of the molecular beacon system, being due instead to factors that can be improved considerably. An important detrimental factor was the relatively high background fluorescence of the instrument (Millipore Cytofluor® 2300) and microtiter dishes (Pierce, Reacti-Bind) that were used. A second limiting factor was the coumarin-based fluorescent moiety, which gives a relatively poor fluorescence quantum yield, and is subject to rapid photobleaching. Our initial choice of this fluor was based on the excellent fluorescent overlap with the absorbance spectrum of DABCYL. However, as mentioned above, a variety of high quantum yield fluorescent compounds, including fluorescein and other dyes, can be effectively quenched by DABCYL when employed in the molecular beacon format (2). By employing fluorescent dyes with higher quantum yields, as well as optimized surfaces and detection instrumentation, it should be possible to realize a significant increase in the sensitivity and dynamic range of surface-immobilized PNA molecular beacons.

The use of a DNA oligonucleotide as part of the PNA:DNA molecular beacon served to facilitate our original prototyping studies for the choice of an optimal length for the stem portion of the molecule, allowing inexpensive modifications of this critical parameter. However, in the future it will be preferable to synthesize molecular beacons where the entire molecule is made of PNA. Molecular beacons made entirely of PNA could be constructed with relatively small stem structures (5 to 6 bases), for a total PNA length of 25 to 27 bases. Weiler et al. have recently described the solid-state synthesis of arrays containing hundreds of different PNA oligomers (14). It should of course be possible to adapt this chemistry to the synthesis of PNA molecular beacons on surface arrays. By combining PNA array technology with fiber-optic, site-addressed detection instrumentation, it should become possible to perform multiplex fluorescence detection in arrays of different PNA molecular beacons bearing unique probe sequences. Such array formats, which can be adapted for use within a thermocycler, would permit the simultaneous detection of a very large number of DNA targets. Most importantly, the same, highly optimized fluor/quencher pair could be used in all the molecular beacons because on a surface array format the signals are spatially resolved. Another exciting prospect, which remains to be explored, is the possibility that PNA molecular beacons may offer improved stringency for the discrimination of point mutations, as is the case for DNA molecular beacons (2, 4).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs Alejandro Alagón, Susana López and Xavier Soberón for valuable discussions and criticism. This work was supported by a grant from the Howard Hughes Medical Institute awarded to PML (75191-527103).

REFERENCES

1. Tyagi S. & Kramer F. R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology* 14, 303-8.
2. Tyagi S., Bratu D. & Kramer F. R. (1998). Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nature Biotechnology* 16.
3. Nielsen P. E., Egholm M., Berg R. H. & Buchardt O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254, 1497-500.
4. Egholm M., Buchardt O., Christensen L., et al. (1993). PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* 365, 566-8.
5. Sawadogo M. & Van D. M. (1991). A rapid method for the purification of deprotected oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Research* 19, 674.
6. Mittal V., Sehgal D., Bhattacharya A. & Bhattacharya S. (1992). A second short repeat sequence detected downstream of rRNA genes in the *Entamoeba histolytica* rDNA episome. *Molecular and Biochemical Parasitology* 54, 97-100.
7. Estrada G., Colin L., Gaytan P., Alagon A. & Lizardi P. M. (1996). Sequence-specific detection of PCR-amplified DNA by restriction enzyme release of hybrids. *Molecular and Cellular Probes* 10, 179-85.
8. Zuckermann R., Corey D. & Schultz P. (1987). Efficient methods for attachment of thiol specific probes to the 3'- ends of synthetic oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Research* 15, 5305-21.
9. Mittal V., Bhattacharya A. & Bhattacharya S. (1992). Organization of repeated sequences in the region downstream to rRNA genes in the rDNA episome of *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research* 23, 17-8.
10. Morrison L. E., Halder T. C. & Stols L. M. (1989). Solution-phase detection of polynucleotides using interacting fluorescent labels and competitive hybridization. *Analytical Biochemistry* 183, 231-44.
11. Kramer F. R. & Lizardi P. M. (1989). Replicable RNA reporters. *Nature* 339, 401-2.
12. Porta H. & Lizardi P. M. (1995). An allosteric hammerhead ribozyme. *Biotechnology* 13, 161-4.
13. Bagwell C. B., Munson M. E., Christensen R. L. & Lovett E. J. (1994). A new homogeneous assay system for specific nucleic acid sequences: poly-dA and poly-A detection. *Nucleic Acids Research* 22, 2424-5.
14. Weiler J., Gausepohl H., Hauser N., Jensen O. N. & Hoheisel J. D. (1997). Hybridisation based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligomer arrays. *Nucleic Acids Research* 25, 2792-9.

FIGURE LEGENDS

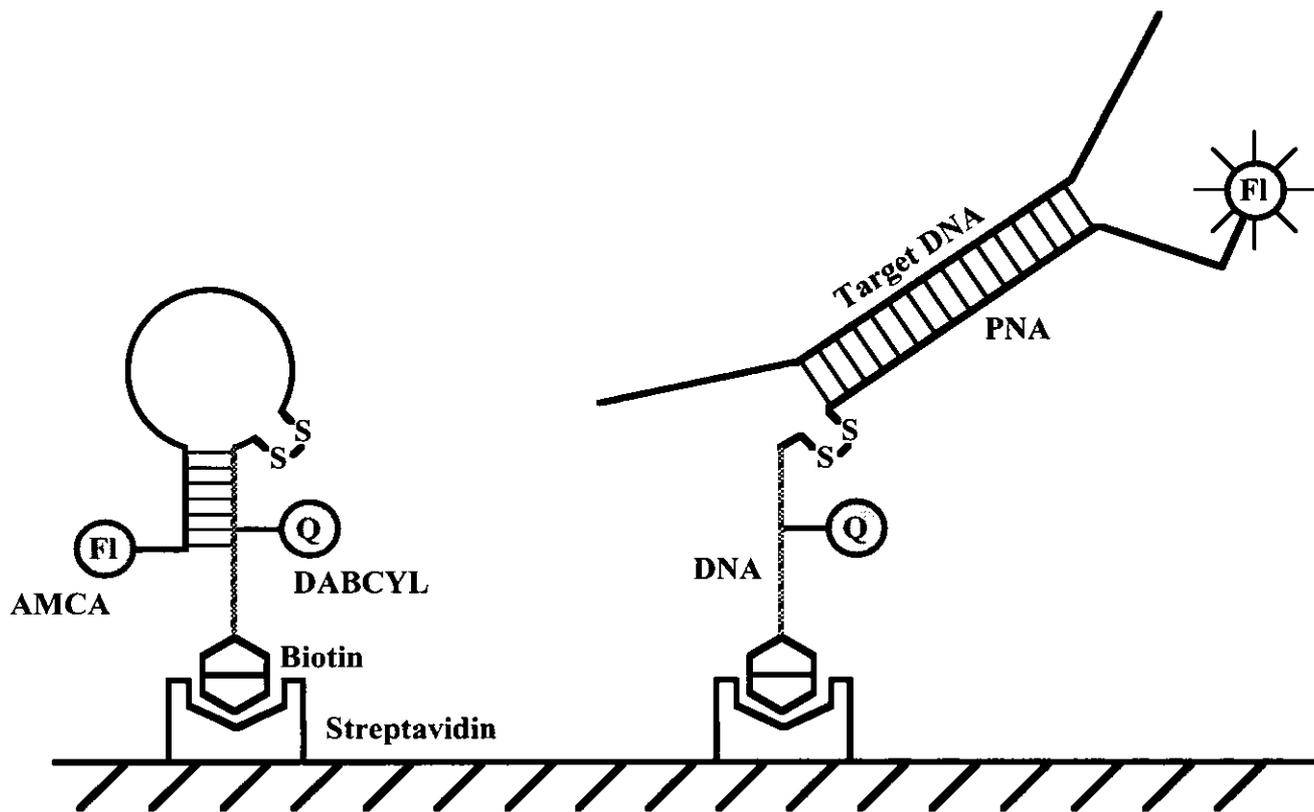
Fig. 1. The chimeric PNA-DNA probe in the "closed" (quenched) state and, after the interaction with the target, in the "open" (fluorescent) state.

Fig. 2. Structure and sequence of the PNA-DNA molecular beacon.

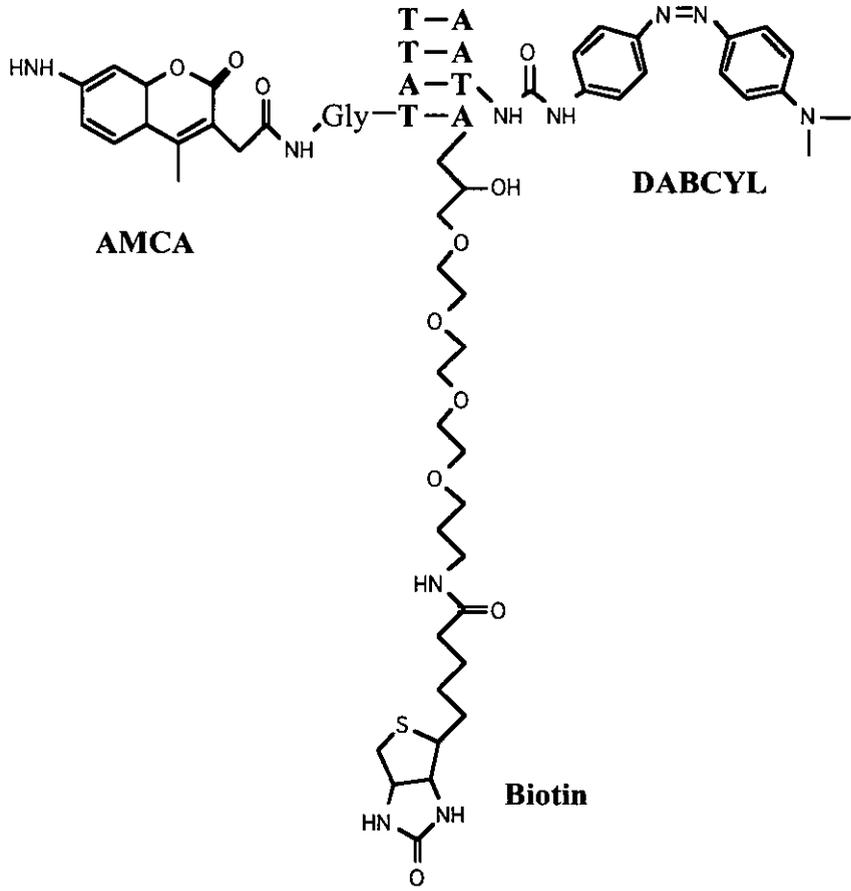
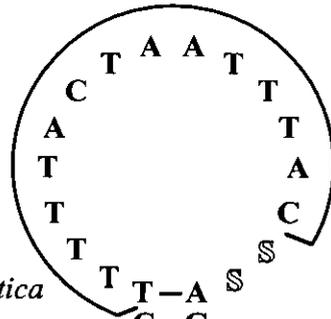
Fig. 3. Scheme of the synthesis of the chimeric PNA-DNA probe. HPLC chromatograms are also shown for the last two steps (main products indicated by arrows): thiol activation of the coumarin-derivatized PNA, and purification of the final adduct (time intervals of 10 minutes).

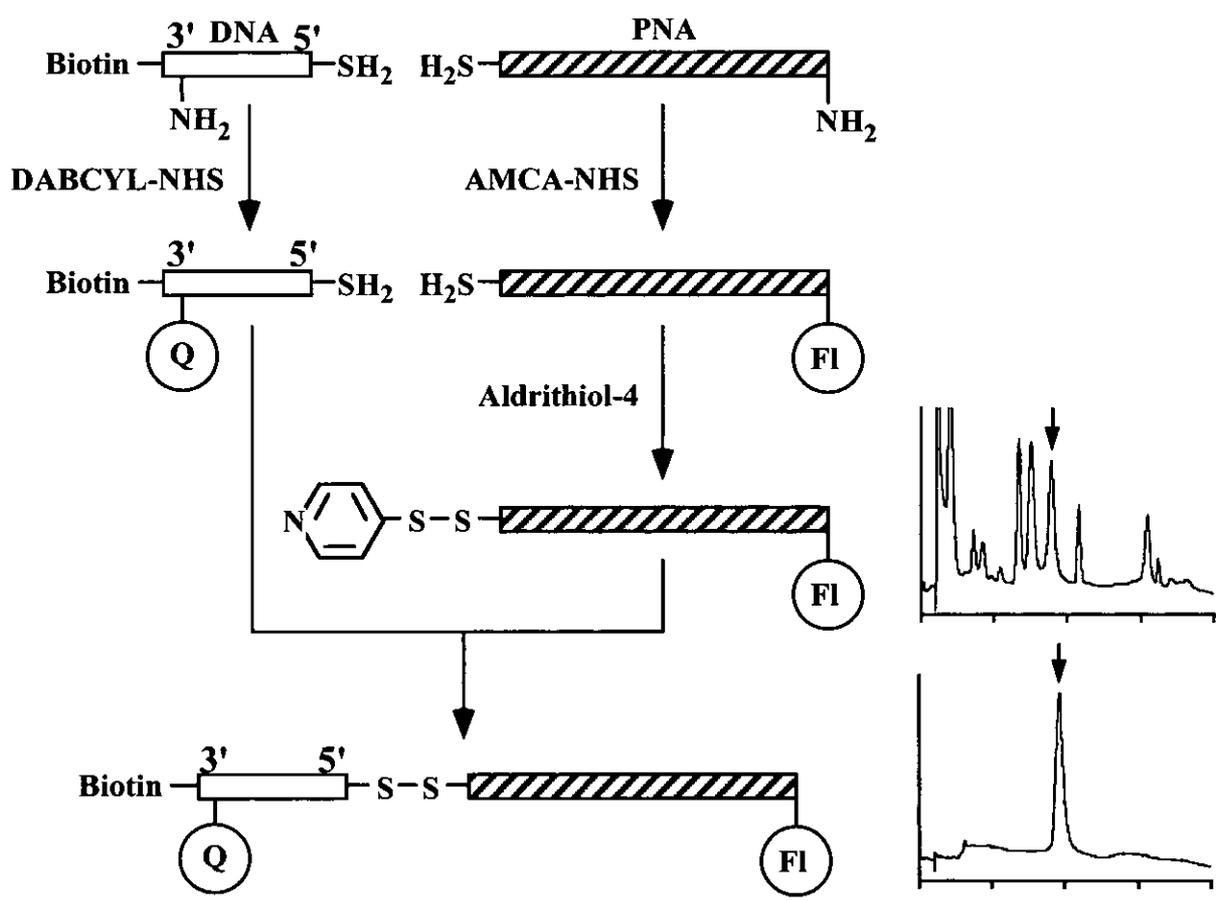
Fig. 4. A. Melting (1) and renaturation (2) profiles of the "native" chimeric PNA-DNA probe, and for the probe after treatment with DTT (3 and 4 respectively). B. Specificity of the probe for *Entamoeba histolytica* targets: 1- addition of a cocktail of heterologous DNAs; 2- addition of the correct oligonucleotide target.

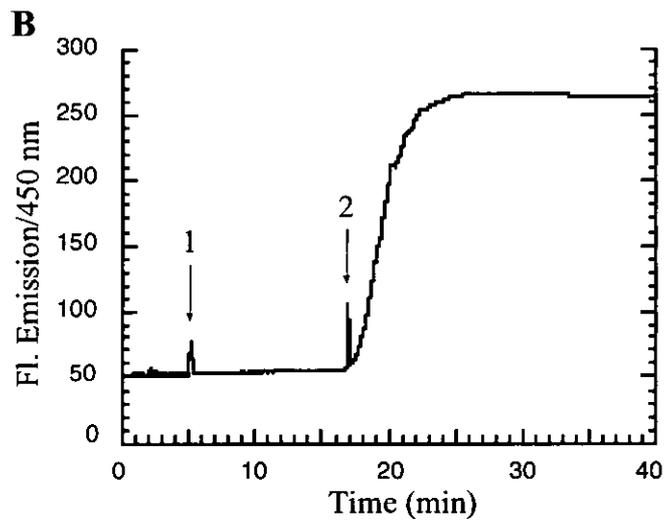
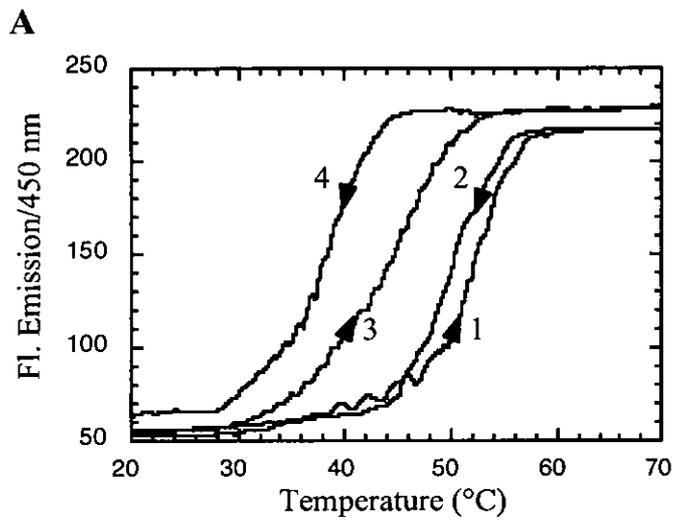
Fig. 5. A. Detection of the complementary oligonucleotide target by the PNA-DNA probe. Wells No 4 to 34: oligonucleotide EO19, from 2.0×10^{13} to 1.6×10^{10} molecules, with a decrement coefficient of 16/25. B. Detection of the rDNA PCR product from *E. histolytica*. Wells No 4 to 6: controls with 1.0×10^{12} , 5.0×10^{11} and 2.5×10^{11} molecules of EO19 respectively; wells No 7 to 20: PCR product, from 5.0×10^{12} to 4.7×10^{11} molecules, with a decrement coefficient of 5/6. For both A and B, well No 1: control without probe and target, well No 2: control with probe but without target, well No 3: control with probe and a cocktail of irrelevant sequences.

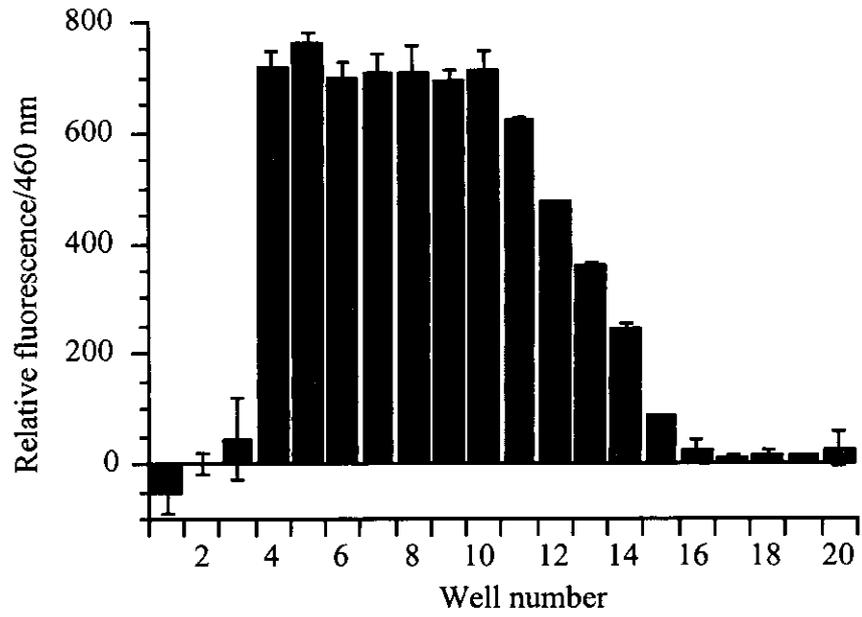


Probe PNA sequence
specific for *E. histolytica*







A**B**